



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

“CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE miR-1305 EN
PROCESOS ONCOGÉNICOS EN MODELOS *in vitro*
DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO VÁZQUEZ VILLASEÑOR

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Felipe Vaca Paniagua



Los Reyes Iztacala, Edo. de México
2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Felipe Vaca Paniagua, mi tutor de tesis, por permitirme formar parte de su laboratorio, por su apoyo y su dirección para llevar a cabo este proyecto.
- A la Dra. Clara Estela Díaz Velásquez por su asesoría y apoyo técnico para la realización de este trabajo.
- A mis sinodales, por su excelente disposición para la realización de los trámites de titulación y por contribuir con su experiencia en el presente estudio.
- A la Dra. Yolanda Irasema Chirino López y a los integrantes del laboratorio 10 de la UBIMED por su disposición para el apoyo técnico y préstamo de material.
- A los integrantes del laboratorio 4 del Instituto Nacional de Cancerología. En especial a la Dra. Yesennia Sánchez Pérez y a la bióloga María del Rocío Morales Bárcenas, por su asesoría, apoyo técnico y donación de las células (MDA-MB-231) empleadas en el presente estudio.
- Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y al laboratorio 8 de la UBIMED por su amable disposición para el préstamo del lector de microplacas, el cual fue indispensable para este trabajo.
- A los laboratorios y compañeros de la UBIMED que de alguna forma contribuyeron a la realización del presente estudio.
- Al personal de servicios escolares y de la jefatura de la carrera de biología de la FES Iztacala, por su excelente disposición y trabajo para llevar a cabo los trámites correspondientes para mi titulación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1. Cáncer.....	10
2. Cáncer de mama.....	12
2.1. Tratamiento del cáncer de mama	20
2.1.1. Terapias dirigidas.	21
2.2. Clasificación del cáncer de mama	22
2.2.1. Clasificación histológica	22
2.1.2. Clasificación inmunohistoquímica	24
2.2.3. Clasificación molecular	25
2.3. Características moleculares del cáncer de mama	30
3. MicroRNAs.....	32
3.1. Biogénesis de miRNAs	33
3.2. MicroRNAs en cáncer	38
3.2.1. MicroRNAs en cáncer de mama.....	40
4. Cáncer de mama triple negativo	43
4.1. Características moleculares del cáncer de mama triple negativo	44
4.2. MicroRNAs en cáncer de mama triple negativo	44
5. MicroRNA-1305.....	46
II. JUSTIFICACIÓN	48
III. HIPÓTESIS.....	49
IV. OBJETIVOS.....	50
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
5.1. Estrategia experimental	51
5.2. Cultivo celular.....	52
5.3. Transfección.....	52
5.3.1. Estandarización de la transfección	53
5.3.2. Transfección de miR-1305.....	54
5.4. Ensayo MTT	55
5.5. Ensayo de la herida.....	56

5.6. Análisis estadístico	56
5.7. Análisis <i>in silico</i>	57
VI. RESULTADOS	58
6.1. Estandarización de la transfección	58
6.2. Ensayo MTT	62
6.3. Ensayo de la herida	63
6.4. Análisis <i>in silico</i>	64
VII. DISCUSIÓN	66
VIII. CONCLUSIONES	68
IX. PERSPECTIVAS	69
X. REFERENCIAS	70

RESUMEN

El cáncer de mama (CM) es el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en las mujeres. En México, esta neoplasia es la más diagnosticada y es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres. Inmunohistoquímicamente, el CM se clasifica con base al estatus de ER, PR y HER2. Los tumores negativos para estos tres marcadores se denominan triples negativos. El CMTN representa el 15-20% de todos los tumores de mama, ocurre comúnmente en mujeres jóvenes y en mujeres de origen africano o hispano, además de ser el subtipo más agresivo con el pronóstico más grave. Los pacientes con CMTN tienen el porcentaje más alto de reincidencia local temprana, especialmente entre el primer y tercer año después del diagnóstico, y la mayoría de las muertes ocurren en los primeros 5 años, después de la terapia. La metástasis de estos tumores tiende a ser más agresiva comparada con otros subtipos. Molecularmente, esta enfermedad es muy heterogénea y las alteraciones en la expresión de microRNAs (miRNAs) contribuyen de manera importante en la patogénesis de este tipo de cáncer. Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes de 18-22 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica postranscripcionalmente mediante la unión a su respectivos mRNAs blancos, ocasionando represión traduccional o degradación de estos. Se ha demostrado que los genes que codifican para esta clase de RNAs se encuentran en regiones frágiles del genoma, susceptibles a alteraciones. Los miRNAs pueden actuar como genes supresores o como oncogenes, dependiendo del tejido tumoral donde se expresen. Su relevancia como blancos moleculares para terapias o como biomarcadores de uso clínico ha sido demostrada. En un estudio realizado por Vaca y colaboradores, miR-1305 fue identificado como uno de los miRNAs más sobreexpresados en pacientes mexicanas con CMTN. En el presente estudio se llevo a cabo la transfección de miR-1305 en la línea celular de CMTN MDA-MB-231, con el objetivo de evaluar su efecto en procesos oncogénicos como la proliferación y migración, mediante la realización del ensayo de MTT y el ensayo de la herida respectivamente. Los resultados indicaron que miR-1305 no tuvo efecto en ninguna de estos dos procesos.

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
AR	Receptor de andrógenos (Androgen Receptor)
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CM	Cáncer de mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CN	Control negativo
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)
DO	Densidad Óptica
ER	Receptor de estrógenos (Estrogen Receptor)
FISH	Hibridación fluorescente <i>in-situ</i>
HDA	Hiperplasia ductal atípica
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HLA	Hiperplasia lobular atípica
IHC	Inmunohistoquímica
kb	Kilobases
Lipo	Lipofectamina 2000
LLC	Leucemia linfocítica crónica
MEp	Células mioepiteliales
miRNA	MicroARN (MicroRNA)
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
nM	Nanomolar
PR	Receptor de progesterona (Progesterone Receptor)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)
siRNA	ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA)
TEE	Tasa estandarizada por edad
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TN	Triple negativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial durante el año 2012

Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en las mujeres a nivel mundial y en México. Se muestra el porcentaje del número de casos totales durante el año 2012.

Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria.

Figura 4. Corte a través de una glándula mamaria.

Figura 5. Desarrollo multifacético del cáncer de mama.

Figura 6. Clasificación histológica del cáncer de mama.

Figura 7. Frecuencias de estatus inmunohistoquímico del CM esporádico y hereditario BRCA1.

Figura 8. Genes mutados de manera importante en cáncer de mama y su correlación con características genómicas y clínicas

Figura 9. Regulación de la transcripción de genes de miRNAs autónomos por factores de transcripción y proteínas de regulación epigenética

Figura 10. Estructura de un pri-miRNA típico de metazoario

Figura 11. Biogénesis de miRNA.

Figura 12. MicroRNAs implicados en cáncer de mama

Figura 13. Ubicación de *MIR1305* en el cromosoma 4

Figura 14. Diagrama de flujo de la estrategia experimental seguida en este trabajo

Figura 15. Genes blancos predichos para miR-1305 y rutas de señalización implicadas

Figura 16. Ensayo de MTT en MDA-MB-231 24 horas postransfección de siRNA *AllStars Hs Cell Death*.

Figura 17. Ensayo de MTT en MDA-MB-231 48 horas postransfección de siRNA *AllStars Hs Cell Death*.

Figura 18. Ensayo de MTT en MDA-MB-231 transfectadas con miR-1305

FIGURA 19. Imagen representativa del ensayo de la herida en células MDA-MB-231 transfectadas

Figura 20. Ensayo de la herida en MDA-MB-231 transfectadas con miR-1305

Figura 21. Genes blancos predichos para miR-1305 y rutas de señalización implicadas

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares de CM

Tabla 2. MicroRNAs y subtipos moleculares de CM. Se comparó con tejido normal o con líneas celulares parentales en el caso de datos preclínicos

Tabla 3. Resumen de miRNAs implicados en CMTN, blancos validados y funciones biológicas

Tabla 4. Secuencias maduras de los miRNAs obtenidas de miRBase.org para la síntesis de los miRNAs mimics

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la expresión anormal del genoma, resultado de alteraciones en genes supresores de tumores y protooncogenes, adquiridas durante una progresión crónica de eventos, a través de la cual una célula normal desarrolla capacidades para evadir los circuitos regulatorios que dirigen la proliferación celular normal y la homeostasis. Los trastornos moleculares y de transducción de señales que conducen a la tumorigénesis implican la autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis. Estos procesos moleculares actúan en conjunto y permiten que las células cancerígenas proliferen de manera incontrolada, generando conglomerados de células malignas (tumores), que invaden el tejido sano circundante y diseminan células a través de la circulación linfática o sanguínea a sitios distantes del cuerpo donde establecen tumores secundarios (metástasis). Hay más de 100 tipos distintos de cánceres, y subtipos de tumores se pueden encontrar en órganos específicos (Hanahan et al, 2000).

De acuerdo con la información de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), a nivel mundial el cáncer figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad, con un estimado de 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes en 2012. Los tumores de pulmón, mama, colorectal y de próstata sobrepasan el 40% de todos los cánceres diagnosticados y más de la mitad de todos los decesos por cáncer al año se deben a cáncer de pulmón, de estómago, de hígado, colorectal y de mama. Este último ocupa el segundo lugar en incidencia y el quinto en mortalidad para ambos sexos (GLOBOCAN.iarc. 2012) (Figura 1).

CÁNCER A NIVEL MUNDIAL: AMBOS SEXOS

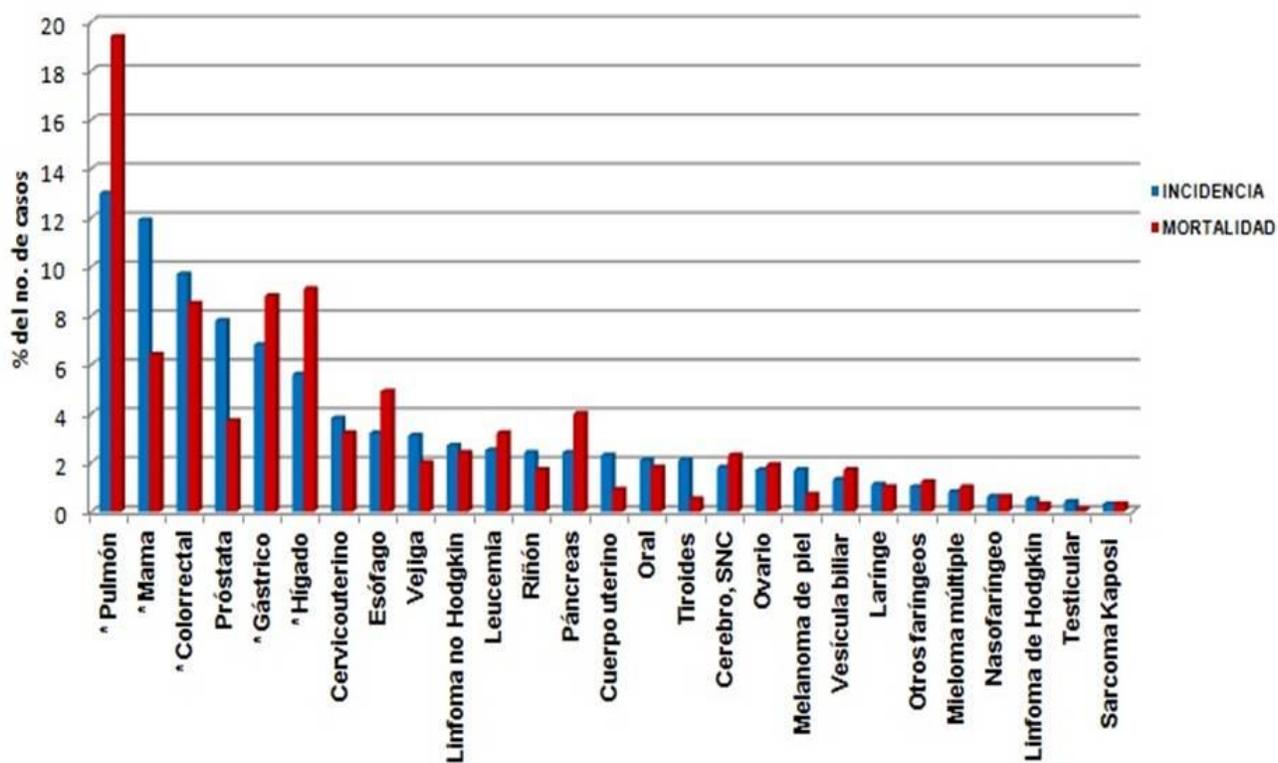


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial (para ambos sexos). Se muestra el porcentaje del número de casos totales durante el año 2012. Basada en GLOBOCAN.iarc.fr

2. Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es el cáncer más frecuentemente diagnosticado entre las mujeres, con un estimado de 1, 676,633 millones de nuevos casos (25.2 % de todos los cánceres) y es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres tanto en países económicamente desarrollados como en vías de desarrollo, con cifras de 521, 907 decesos anuales (14.7 % de todos los cánceres). Asimismo, en nuestro país, este padecimiento ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad de las neoplasias malignas que afectan a las mujeres, con un número de 20,444 diagnósticos nuevos (24.8 % de los casos totales) y 5,680 muertes al año (14.2 % de los casos totales) respectivamente (GLOBOCAN.iarc. 2014) (Figura 2).

Actualmente los factores de riesgo (acontecimientos que incrementan la probabilidad de contraer una enfermedad) más reconocidos para el desarrollo del CM son de carácter biológico, factores relacionados con el estilo de vida o atribuidos a la aplicación de algún tipo de terapia. A continuación se menciona cada uno de estos:

- Sexo femenino. Los hombres pueden llegar a padecer CM, pero esta enfermedad es aproximadamente 100 veces más común entre las mujeres que en los hombres.
- Envejecimiento. El riesgo de adquirir CM aumenta con la edad y existen tendencias en cuanto a la edad y el estado del ER. La incidencia del CM ER-positivo incrementa con la edad, contrastando con la del CM ER-negativo, la cual aumenta hasta los 50 años, pero después permanece constante. Por lo tanto, las mujeres posmenopáusicas son más propensas a desarrollar tumores ER-positivos.
- Edad de la menarquía. Las mujeres que han tenido más ciclos menstruales debido a que presentaron la menarquía (primera menstruación) a temprana edad (antes de los 12 años) y/o que experimentaron tarde la menopausia (después de los 55 años) tienen un riesgo ligeramente mayor de contraer cáncer de seno. Esto podría deberse a una exposición más prolongada a las hormonas estrógeno y progesterona durante la vida.
- Edad al primer embarazo. Las mujeres que no han tenido hijos o que tuvieron su primer parto después de los 35 tienen en general un riesgo ligeramente mayor de padecer cáncer de seno. Los embarazos múltiples y quedar embarazada cuando la mujer es joven reducen el riesgo del cáncer de seno en general. Esta condición se aplica en particular a los CM ER-positivos y para

las mujeres que son diagnosticadas después de la menopausia. Para cierto tipo de cáncer de seno conocido como triple negativo, el embarazo parece aumentar el riesgo.

- Lactancia. Algunos estudios sugieren que la lactancia podría disminuir ligeramente el riesgo de cáncer de seno, especialmente si se prolonga por 1 a 2 años. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes, especialmente en países occidentales, donde la lactancia por un periodo tan prolongado como éste no es común. En contraste, la reducción del riesgo se ha demostrado en países no occidentales. En China, las mujeres que alimentaron con leche materna durante un total de 10 años o más tuvieron una reducción del riesgo del 64%. Un análisis agrupado a gran escala demostró una reducción del riesgo relativo de 4.3% por cada 12 meses de lactancia materna. Una explicación para esto puede ser que la lactancia reduce el número total de ciclos menstruales en la vida de una mujer (similar a comenzar los periodos menstruales a una edad mayor o experimentar la menopausia temprano).
- Anticonceptivos hormonales. El uso de anticonceptivos que contengan hormonas (estrógeno y progestina) se asocia con un ligero incremento de riesgo (24%) de adquirir CM que aquellas mujeres que nunca los han usado. El riesgo parece disminuir a lo normal con el paso del tiempo una vez se dejan de tomar las pastillas anticonceptivas. Las mujeres que dejaron de usar los anticonceptivos orales hace más de 10 años no parecen tener aumento del riesgo de padecer CM.
- Terapia de restitución hormonal. La aplicación actual o reciente de terapia hormonal con estrógeno (a menudo combinada con progesterona) ha sido usada para ayudar a aliviar los síntomas de la menopausia y para prevenir la osteoporosis (adelgazamiento de los huesos). Este tratamiento es conocido con distintos nombres como terapia hormonal postmenopáusica, terapia de restitución hormonal y terapia hormonal menopáusica.

- Lesiones benignas del seno. Tener un historial personal de lesiones benignas de la mama puede estar asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama posterior en función de la histología. Las lesiones no proliferativas, como quiste simple o fibroadenoma, no parecen afectar el riesgo de cáncer de seno y de hacerlo, es en muy poca extensión (riesgo relativo 1.3). Las lesiones proliferativas de mama sin atipia (adenosis, papiloma intraductal, cicatriz radical) conllevan un riesgo relativo de 1,3 a 1,9. Las lesiones proliferativas de mama asociado con atipia (ductal atípica o hiperplasia lobular) se considera de alto riesgo y se asocia con un riesgo 4.3 veces mayor. La hiperplasia lobular confiere un riesgo mayor que el ductal. Las lesiones proliferativas con atipia (hiperplasia ductal atípica (HDA) e hiperplasia lobular atípica (HLA)) tienen un efecto mayor en el riesgo de CM, aumentando el riesgo normal de 3½ a 5 veces. Las mujeres con un antecedente familiar de cáncer de seno y con hiperplasia o hiperplasia atípica tienen un riesgo aún mayor de padecer cáncer de seno (Ban et al, 2014).
- Genéticos. Alrededor del 5 al 10 % de los casos de CM son hereditarios, lo que significa que se originan de mutaciones en genes de susceptibilidad relevante como *BRCA1* y *BRCA2*, que son heredadas en un patrón autosómico dominante. Estos genes poseen diferente grado de penetrancia (la frecuencia con la que un carácter es expresado) y de acuerdo a esto se dividen en genes de alta penetrancia, que contribuyen al 25% de todos los casos de CM hereditario; genes de penetrancia intermedia, que cuentan para el 5% de riesgo de CM familiar; y genes de baja penetrancia, que también cuentan para el 5% de riesgo de este cáncer (ver características moleculares del CM) (Schwab *et al*, 2012).
- Exposición a radiación. Las mujeres que recibieron radiación en el tórax como tratamiento contra otro cáncer (como linfoma) tienen un riesgo significativamente mayor de padecer CM. Esto varía con la edad de la paciente al momento de recibir la radiación. El riesgo de padecer un cáncer de seno debido a radiación administrada al tórax es mayor si la radiación se recibió durante la adolescencia, cuando los senos aún están en desarrollo. La radioterapia después de los 40 años no parece aumentar el riesgo de padecer cáncer de seno.
- Alcohol y tabaco. El consumo de bebidas alcohólicas está claramente asociado a un aumento en el riesgo de padecer CM. El riesgo se incrementa con la cantidad de alcohol consumido. En comparación con las mujeres que no ingieren alcohol, las que consumen una bebida alcohólica

diaria tienen un aumento muy ligero en el riesgo. Aquéllas que toman de 3 a 4 bebidas al día tienen alrededor de 32% más riesgo que las mujeres que no toman alcohol. También se sabe que el consumo excesivo de bebidas que contienen alcohol incrementa el riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer. La relación entre el consumo de tabaco y el CM es incierta. Algunos estudios sugieren que fumar aumenta el riesgo de CM, especialmente cuando se inicia el consumo a temprana edad y con un alto y prolongado uso. Desafortunadamente, ha sido difícil separar el efecto del consumo del alcohol con el del consumo de tabaco en el desarrollo del CM.

- Dieta. Muchos estudios han analizado la relación entre los hábitos alimenticios y el riesgo de CM, pero hasta el momento los resultados han sido contradictorios. Algunos estudios han indicado que la alimentación desempeña un papel en el riesgo, mientras que otros no han encontrado evidencia que demuestre que la alimentación esté implicada en el riesgo de este cáncer. Es necesario realizar más investigaciones para entender el efecto de los alimentos consumidos sobre el riesgo de CM. Sin embargo, se ha demostrado que las calorías son un factor que cuenta. Los alimentos con altos contenidos de grasa pueden causar obesidad o sobrepeso, lo que es un factor de riesgo para el cáncer de seno.
- Obesidad. El efecto de la obesidad sobre el riesgo del CM ha sido bien estudiado y depende de la menopausia. Un índice de masa corporal elevada tiene efectos protectores significativos antes de la menopausia, pero tiene una correlación positiva con el riesgo de CM después de la menopausia. Mujeres premenopáusicas obesas tienen la mitad de probabilidades de desarrollar CM en comparación con las mujeres con peso normal, mientras que las mujeres obesas posmenopáusicas son 25% más propensas a desarrollar este tipo de cáncer.
- Actividad física. Numerosos estudios sugieren que la actividad física, particularmente en la edad adulta, disminuye el riesgo de desarrollar CM. Entre los estudios observacionales y de casos-contróles, los informes de este efecto variaron considerablemente, del 10% a 50% de reducción de riesgo con actividad física de regular a vigorosa. Análisis de estudios prospectivos sugieren un efecto más modesto, con un riesgo relativo de 10% a 12% para las mujeres que participan en la actividad física regular. El efecto es dosis-dependiente y el beneficio es mayor para las mujeres premenopáusicas con peso normal y asociadas con cáncer ER/PR negativo (Ban et al, 2014).

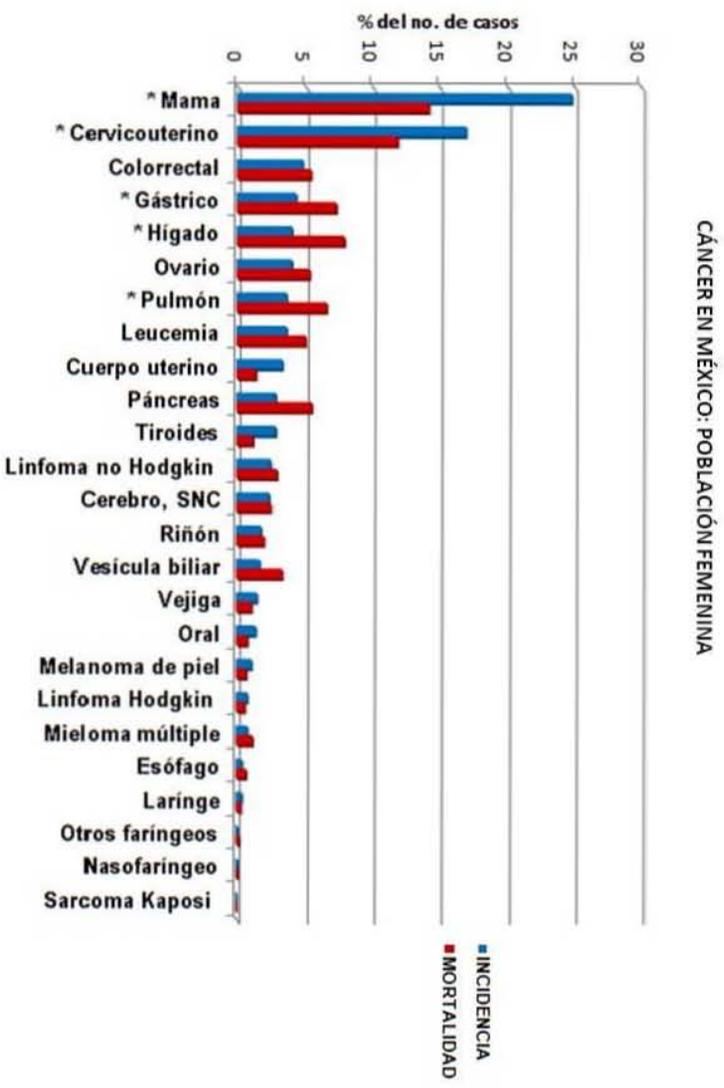
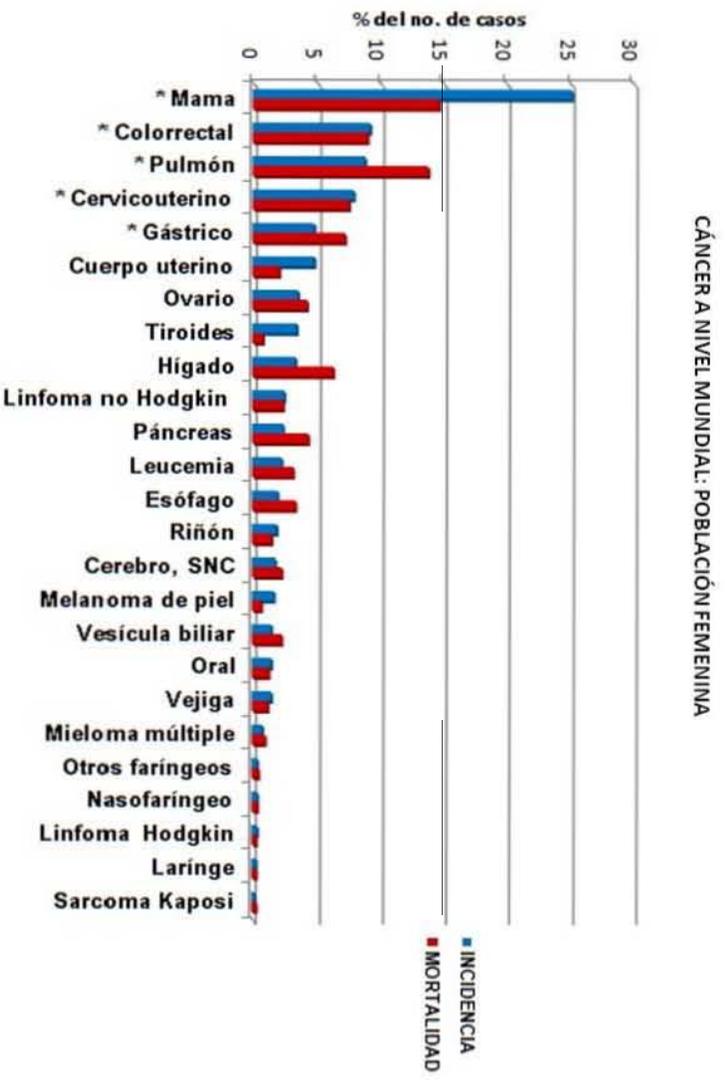


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en las mujeres a nivel mundial y en México. Se muestra el porcentaje del número de casos totales durante el año 2012. Basada en GLOBOCAN.iarc.fr

El cáncer de mama es la neoplasia maligna que se origina en las células epiteliales de la glándula mamaria. Su tumorigénesis involucra la señalización aberrante que afecta los procesos de proliferación y diferenciación en las células madre mamarias, dando así lugar a la variedad de carcinomas de mama (Pasqualini 2008).

Las glándulas mamarias son órganos distintivos de los mamíferos que poseen una estructura dinámica que varía con la edad, ciclo menstrual y estado reproductivo de la hembra; y cuya función es la producción de leche. Cada glándula mamaria, o mama, está compuesta sobre todo por glándulas tubuloalveolares ramificadas dentro de un estroma de tejido conjuntivo denso abundante y cantidades variables de tejido adiposo. Cada glándula mamaria contiene de 15 a 20 lóbulos, cada lóbulo contiene una serie de conductos ramificados que desembocan en el pezón (Figura 3). Cada conducto está revestido de una capa de células epiteliales, responsable de la producción de la leche. Éstas están rodeadas por una capa externa de células mioepiteliales con propiedades contráctiles (cancer.org; Ross et al, 2007) (Figura 4).

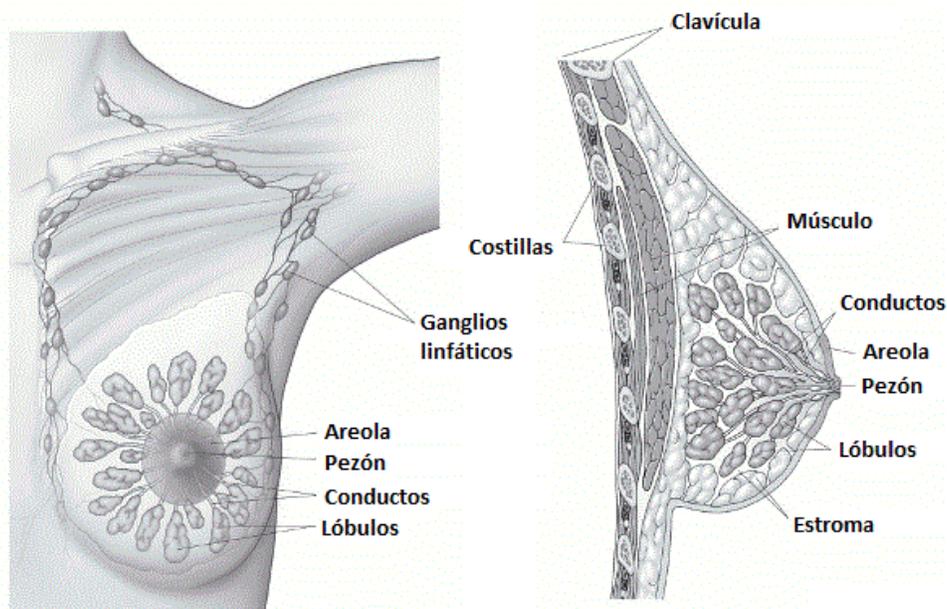


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria. Tomada de cancer.org

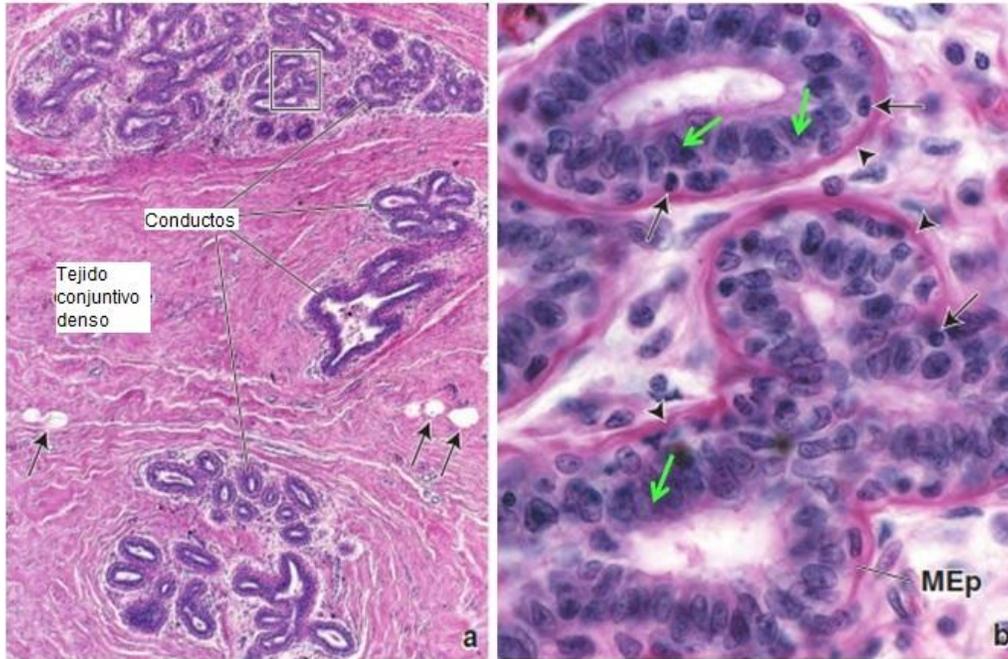


Figura 4. Corte a través de una glándula mamaria. **(a)** Adipositos señalados con flechas. **(b)** Más aumento de la región contenida en el rectángulo de **a**. Células epiteliales señaladas con flechas verdes, citoplasma de células mioepiteliales (MEp) señaladas con puntas de flecha y linfocitos señalados con flechas negras. Tomada y modificada de Ross et al, 2007

La vía de desarrollo del cáncer de mama aún no es clara. Hay poca evidencia de modelos animales y análisis de cambios genéticos que indican que puede comenzar con una proliferación anormal de células epiteliales, denominada hiperplasia, seguido de una fase preneoplásica llamada hiperplasia atípica, condición donde las células de mama parecen anormales en morfología, número o patrón de crecimiento; y carcinoma ductal *in situ* (CDIS). CDIS se refiere a células epiteliales de mama que se han convertido en células cancerígenas pero que aún ocupan su lugar normal en conductos y lóbulos. El CDIS por definición no es invasivo, pero puede cambiar al adquirir capacidades que le permitan infringir la membrana basal, dando origen al carcinoma invasivo, en el cual las células cancerosas se han extendido más allá de los conductos o lobulillos mamarios, invadiendo el estroma circundante y finalizando con cáncer de mama metastásico (Ali et al, 2002; Allred 2010; Rivenbark et al, 2013) (Figura 5).

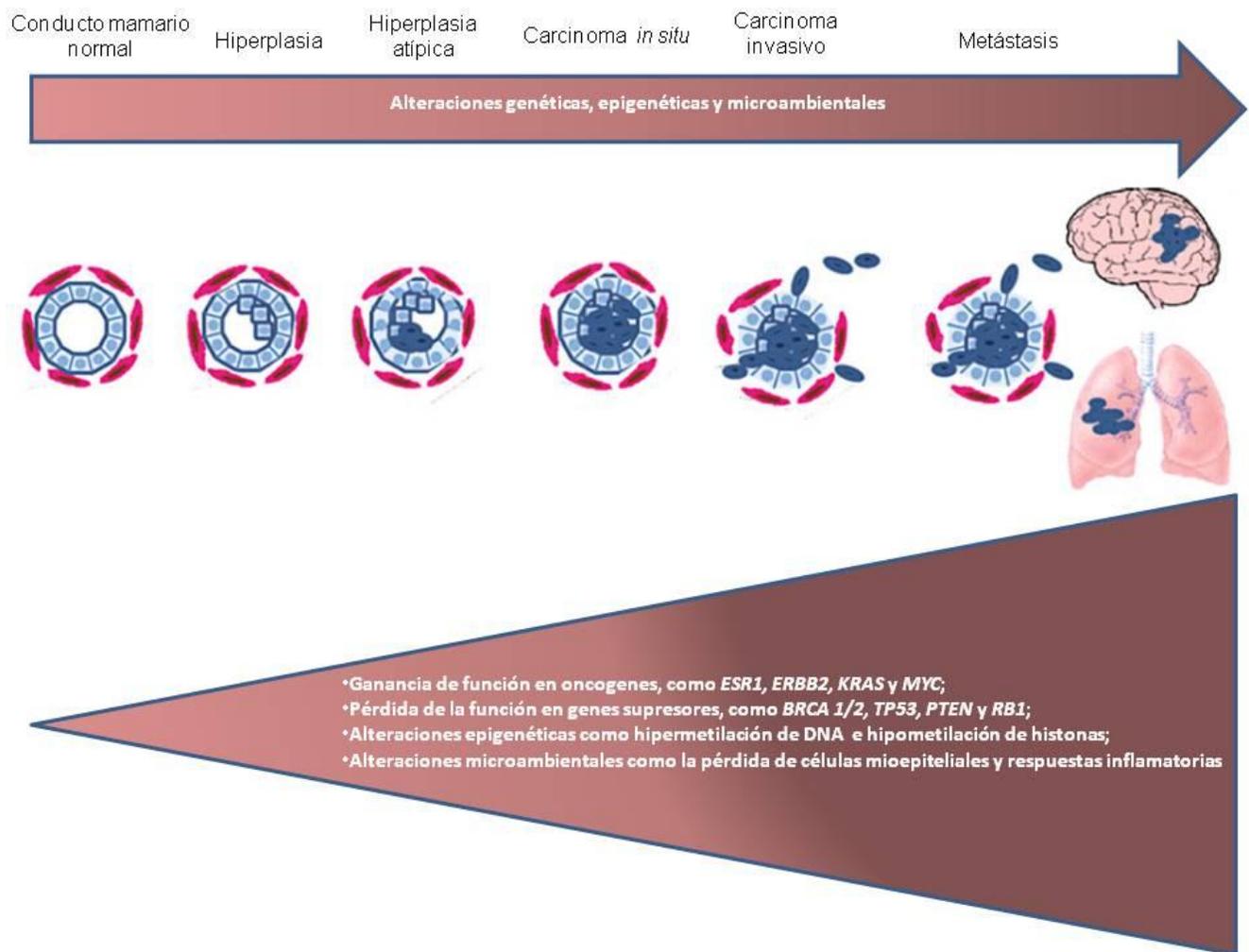


Figura 5. Desarrollo multifacético del cáncer de mama. Tomada y modificada de Schwab *et al*, 2012

2.1. Tratamiento del cáncer de mama

Normalmente la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia se emplean para tratar el CM. La mastectomía radical modificada ha sido tradicionalmente el estándar de cuidado para el CM invasivo en estadio temprano. Sin embargo, la cirugía conservadora de seno ha sido recientemente favorecida. Esta terapia implica retirar el tumor sin eliminar tejido sano excedente, resultando en un seno estéticamente más aceptable para la paciente que el resultado de la mastectomía. En etapas más avanzadas, cuando el tumor alcanza un tamaño superior a 5 cm, la quimioterapia preoperatoria se emplea con el objetivo de disminuir la talla tumoral, permitiendo así proceder con la cirugía conservadora de seno. No obstante, la mastectomía puede ser la mejor opción en caso de obtener resultados pobres en la quimioterapia neoadyuvante (a reserva de la elección de la paciente) (Maughan et al, 2010). Usualmente se administra la radiación después de la cirugía para ayudar a reducir la probabilidad de que el cáncer regrese en el seno o en los ganglios linfáticos adyacentes. La radiación causa daños en el DNA dentro de las células cancerígenas, lo cual inhibe su posterior crecimiento. Si bien la radiación también puede dañar el tejido sano, su efecto es mayor sobre las células tumorales. Como el crecimiento de estas células es más rápido, no se pueden reparar los daños fácilmente. La quimioterapia se refiere al tratamiento del cáncer mediante fármacos que pueden ser administrados de forma oral o intravenosa (Rita, 2012). Recientes investigaciones han introducido nuevos tratamientos para el CM que incluyen terapia adyuvante, terapia neoadyuvante y terapias dirigidas. La terapia adyuvante es la que se aplica después del tratamiento principal (cirugía), se utiliza en pacientes que tienen alto riesgo de recurrencia a pesar de que el tumor ha sido extirpado quirúrgicamente o tratado con radioterapia o combinación de las 2, con el propósito de aumentar la prevención. Los criterios para establecer el riesgo de recurrencia dependen del grado de la extensión local, la presencia de ganglios metastásicos aunque hay criterios específicos para cada tumor. La terapia que se administra antes de la terapia principal se denomina neoadyuvante. Esta tiene como objetivos disminuir el tamaño del tumor para facilitar la cirugía y el control de la enfermedad sistémica, tratando de eliminar la enfermedad micrometastásica (Majeed et al, 2014). Numerosos agentes quimioterapéuticos han sido empleados en el tratamiento del CM ya sea como monodroga o en combinación, entre los cuales deben mencionarse: sales de platino (carboplatino y cisplatino), agentes alquilantes (ciclofosfamida), taxanos (docetaxel y paclitaxel), antraciclinas (doxorrubicina) y antimetabolitos (metotrexato y capecitabina).

2.1.1. Terapias dirigidas.

En pacientes cuyos tumores sobreexpresan el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2), la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado dos fármacos para suprimir la expresión de este receptor tirosincinasa. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal para HER2, que se dirige al dominio extracelular de este receptor disminuyendo su actividad. El lapatinib es un inhibidor de la tirosina kinasa acoplada a los receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR (*ErbB1*) y HER2 (*ErbB2*). Actúa sobre el componente intracelular de los receptores antes mencionados. Debido a esto, y a diferencia de trastuzumab, puede bloquear la señalización de receptores que han perdido o han mutado sus dominios extracelulares y no presenta resistencia cruzada con él. En las pacientes con CM positivo para receptores hormonales, la terapia hormonal reduce el desarrollo de células tumorales hormono-sensibles al inhibir la síntesis de estrógeno y progesterona desde los ovarios, mediante el tratamiento con fármacos agonistas (análogos) de hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH), como Goserelina y Leuprolide. Ambos interfieren con las señales de la glándula pituitaria que estimulan la producción de estrógeno en los ovarios (Majeed et al, 2014). Con el mismo objetivo, se han empleado los inhibidores de la enzima aromatasa, como letrozol y anastrozol, los cuales evitan la formación de estrógenos en los ovarios por medio del bloqueo de esta enzima. La inhibición de los receptores de estrógenos también es eficaz en el tratamiento de este tipo de tumores. Para realizar lo anterior, se usa el tamoxifen, ya que es una sustancia que funciona como un antagonista del estrógeno. En CM la angiogénesis juega un papel importante en el crecimiento tumoral, invasión y metástasis. El factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) es un potente inductor de permeabilidad vasular y formación de vasos sanguíneos. Agentes que bloquean *VEGF* han demostrado inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. *VEGF* puede ser inhibido de varias maneras: con agentes que se unen al ligando, como bevacizumab, inhibiendo la subunidad tirosincinasa de su receptor, como sunitinib, inhibiendo efectores corriente debajo de la actividad de *VEGF* (inhibidores de mTOR) y con agentes que modulan la producción de *VEGF* (agentes contra HER2) (Munagala et al, 2011).

2.2. Clasificación del cáncer de mama

Con el objetivo de obtener información pronóstica sobre el comportamiento del tumor o para predecir la respuesta a las terapias, los tumores de mama se han dividido en subtipos mediante métodos de clasificación que incluyen la histopatología estándar, patología molecular y perfiles de expresión genética (Pascualini 2008).

2.2.1. Clasificación histológica

Con base en la ubicación, morfología, patrones de crecimiento y características citológicas el CM se categoriza en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo o infiltrante. A su vez, el carcinoma de mama *in situ* se divide en ductal o lobular. El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) es más común que su contraparte carcinoma lobular *in situ* y engloba un heterogéneo grupo de tumores. CDIS ha sido más subclasificado tradicionalmente basándose en las características arquitectónicas del tumor, las cuales han dado lugar a cinco subtipos bien reconocidos: comedo, cribiforme, micropapilar, papilar y sólido. De manera similar a los carcinomas *in situ*, los carcinomas invasivos son un grupo heterogéneo de tumores diferenciados en subtipos histológicos. Dentro de los principales tipos de tumores invasivos se encuentra el ductal infiltrante, lobular invasivo, lobular-ductal, mucinoso (coloide), tubular, medular y carcinomas papilares. De éstos, el carcinoma ductal invasivo o infiltrante (CDI) es el subtipo más común representando el 70-80 % de todas las lesiones invasivas. El CDI se subclasifica en bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciado (grado 2) y pobremente diferenciado (grado 3), con base en los niveles de pleomorfismo nuclear, formación túbulo-glandular e índice mitótico (Malhotra et al, 2010) (Figura 6).

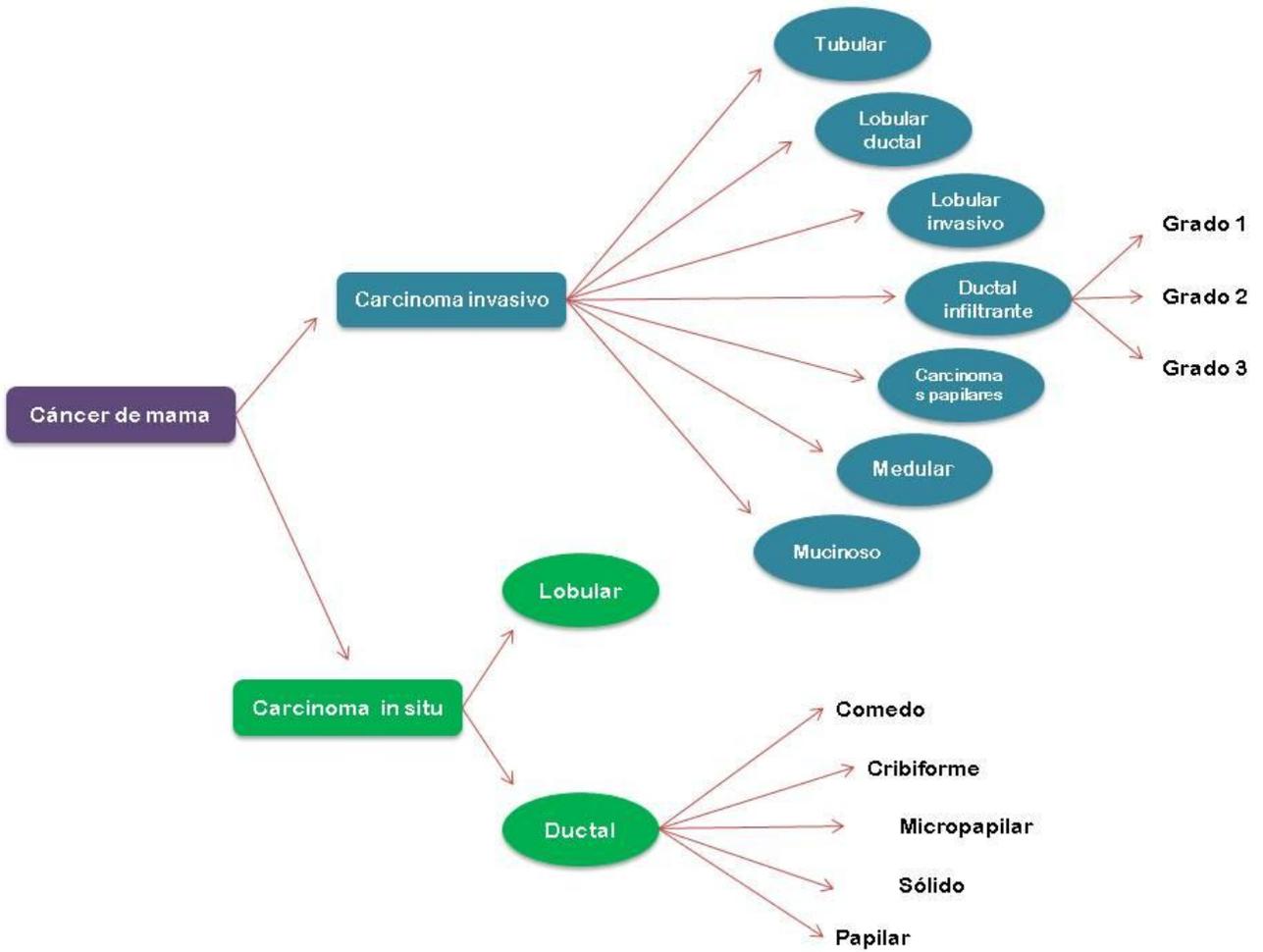


Figura 6. Clasificación histológica del cáncer de mama. Tomada y modificada de Malhotra et al, 2010

2.1.2. Clasificación inmunohistoquímica

Desde el punto de vista clínico, los tumores de mama han sido clasificados de acuerdo a inmunohistoquímica (IHC) e hibridación fluorescente *in-situ* (FISH) empleando biomarcadores que corresponden al receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2), dividiendo el CM en tres tipos principales: el grupo de receptores hormonales positivo, el grupo HER2 positivo y el grupo triple negativo (TN). Este último concierne a tumores que no expresan ER, PR y no presentan amplificación de HER2 (Wesolowski et al, 2011). Entre los tumores esporádicos, es decir, no condicionados por factores hereditarios, el 70% son ER-positivos, el 50% son PR-positivos y aproximadamente el 15% son HER2-positivo. Los carcinomas ER-positivo responden mejor a tratamiento endócrino anti-estrógeno, mientras que los HER2-positivo responden bien a terapia dirigida, como trastuzumab. Alrededor del 20% de todos los casos de CM son TN (ver Cáncer de mama triple negativo). En cuanto al CM hereditario, el 78 % de los tumores derivados de portadores de mutaciones en *BRCA1* son ER-negativos, mientras que sólo el 23% de los tumores que surgen en los portadores de mutaciones en *BRCA2* son ER-negativos. Por otra parte, la sobreexpresión de HER2 únicamente se observa in aproximadamente 10% de los portadores de mutación. Por consiguiente, el TN cuenta para el 69% de los tumores *BRCA1* y el 16 % para los *BRCA2* (Larsen et al, 2014) (Figura 7).

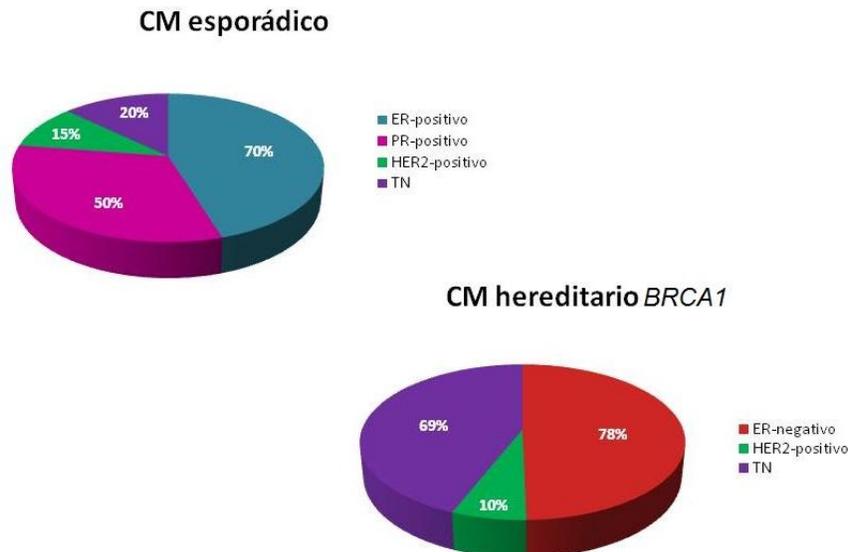


Figura 7. Frecuencias de estatus inmunohistoquímico del CM esporádico y hereditario *BRCA1*. Basada en Larsen et al, 2014

2.2.3. Clasificación molecular

El análisis de perfiles de expresión genética basados en microarreglos, que evaluaron la expresión de *ESR1* y genes asociados con ER, genes relacionados con la proliferación, y en menor medida, *ERBB2* y genes mapeados en la región del amplicón de *ERBB2* en el cromosoma 17, demostraron la diversidad a nivel molecular del CM, clasificándolo en cuatro categorías principales: Luminal; HER2 sobreexpresado; “parecido” al basal y “parecido al normal” (Perou et al, 2000). Estudios subsecuentes realizados por Perou y colaboradores han ampliado estos hallazgos iniciales, proporcionando información adicional para nuevas mejoras y ajustes de la clasificación del CM. Dentro del subtipo luminal, caracterizado por la expresión de marcadores luminales, se han reconocido tres grupos: luminal A, luminal B/HER2 negativo y luminal B/HER2 positivo (Sorlie et al, 2001; Sorlie et al, 2003). Algunos autores consideran que el subtipo “parecido al normal” fue mal caracterizado y representa contaminación por tejido normal, en lugar de un subtipo real (Lam et al, 2014). A partir de esta descripción inicial, se han identificado nuevos subtipos que corresponden a los grupos claudina baja y apócrino molecular (Alizart et al, 2012; Reis-Filho et al, 2011) (Tabla 1).

Subtipos Luminales

Los subtipos luminales comprenden los tumores de mama que expresan receptores hormonales y que tienen patrones de expresión similares a las células epiteliales luminales de la glándula mamaria, distinguiéndose por la expresión de citoqueratinas de bajo peso molecular (CK) 8/18, ER y genes implicados en la ruta de ER.

Luminal A

El subtipo Luminal A es el más común y representa el 50%-60% de todos los CM. Estos tumores generalmente presentan bajo grado histológico, bajo grado de pleomorfismo nuclear y actividad mitótica baja. Inmunohistoquímicamente, el subtipo Luminal A se define como tumores ER-positivos y/o PR-positivos, HER2 negativos e índice bajo de Ki67 (antígeno nuclear de células en proliferación). Este subtipo se caracteriza por expresar niveles altos de ER, niveles bajos de genes relacionados con la proliferación, expresión de las CK 8/18, otros marcadores luminales asociados incluyendo *ESR1*, genes asociados con la función ER tales como *LIV1 (SLC39A6)*, *FOXA1*, *XBP1*, *GATA3*, *BCL2*, *ERBB3* y *ERBB4*. Los pacientes con CN Luminal A poseen el mejor pronóstico y la tasa de recurrencia es más baja que en los otros subtipos. La recurrencia es común en huesos, mientras que la metástasis

se presenta en hígado, pulmón y sistema nervioso central, ocurriendo en menos del 10% de los pacientes y el tratamiento se basa principalmente en terapia hormonal (Yersal et al, 2014; Eroles et al, 2012; Reis-Filho et al, 2011).

Luminal B

Los tumores Luminal B comprenden el 15%-20% de los CM y tienen un fenotipo más agresivo, alto grado histológico, alto índice proliferativo y un peor pronóstico. Este subtipo posee una alta tasa de recurrencia y bajas tasas de supervivencia después de la recaída comparado con el subtipo Luminal A. La principal diferencia entre ambos subtipos luminales es el incremento de la expresión de genes relacionados con la proliferación, tales como *v-MYB*, *GGH*, *LAPTMB4*, *NSEP1* y *CCNE1* en CM Luminal B. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, el subtipo Luminal B se define como ER-positivo, HER2-negativo y expresión elevada de Ki67. Además, estos tumores con frecuencia expresan EGFR y HER2. Sin embargo, esta definición no incluye a todos los tumores Luminal B ya que el 6% de ellos son negativos para ER y HER2. La supervivencia promedio en tumores Luminal B no tratados es similar a los subtipos Basal y HER2 positivo, los cuales son ampliamente reconocidos como tumores de alto riesgo. Los tumores Luminal B tienen los resultados más pobres con hormonoterapia. Varios estudios sugieren que los CM Luminal B son relativamente insensibles tanto a terapia endócrina, en comparación con CM Luminal A, como a quimioterapia preoperativa que contenga paclitaxel y doxorubicina, comparado a CM HER2-positivo y parecido a basal. Sin embargo, los tumores Luminal B responden mejor a quimioterapia neoadyuvante que el subtipo Luminal A, logrando las mayores tasas de respuesta patológica completa. El aumento de las tasas de recaída observadas en los tumores Luminal-B se limitan a los primeros 5 años después del diagnóstico. Estudios recientes sugieren que rutas alternas de factores de crecimiento, tales como el receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1), HER1, fosfoinositol 3 cinasa polipéptido catalítico alfa (PI3K) y protooncogen sarcoma (*Src*), pueden contribuir a la alta proliferación y al pronóstico pobre del CM Luminal B (Yersal et al, 2014; Eroles et al, 2012; Reis-Filho et al, 2011).

HER2-positivo

El receptor 2 del factor de crecimiento epidermal (HER2) es un miembro de la familia de receptores tirosin cinasa. Este receptor es codificado por el gen *ERBB2*, el cuál es un protooncogen localizado en el cromosoma 17q12. Debido a que HER2 carece de ligando, su activación depende de la heterodimerización con otro miembro de la familia, ya que no suele homodimerizar (Franklin et al,

2004). La cascada de señalización resultante de la activación de HER2 ocasiona la transcripción de genes implicados en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, angiogénesis, invasión y metástasis (Moasser et al, 2007). El subtipo HER2 sobreexpresado cuenta para el 15-20 % de los CM. Estos tumores se asocian con un comportamiento clínico más agresivo y se caracterizan por la sobreexpresión y amplificación de *ERBB2* y otros genes asociados con la ruta HER2. Aunque este subtipo no expresa genes del grupo basal, puede mostrar bajos niveles de expresión de genes luminales característicos. Morfológicamente, estos tumores son altamente proliferativos, el 75 % posee alto grado histológico y más del 40 % presentan mutaciones en *TP53*. Casi la mitad de los CM HER2 sobreexpresado son positivos para ER, pero generalmente lo expresan a bajos niveles (Yersal et al, 2014; Eroles et al, 2012; Reis-Filho et al, 2011).

Basal

El subtipo Basal representa el 10-20 % de todos los carcinomas de mama. Estos tumores se denominan basales debido a que poseen un perfil de expresión genética similar al de las células mioepiteliales (basales) normales de la glándula mamaria. Entre los genes expresados se encuentran las citoqueratinas de alto peso molecular CK5 y CK17, laminina, P-cadherina, caveolinas 1 y 2, nestina, CD44 y EGFR. Este subtipo también expresa genes característicos de células luminales, tales como CK8/18 y Kit, pero a niveles más bajos que los carcinomas luminales. Frecuentemente presentan mutaciones en *TP53*, inestabilidad genómica e inactivación de la ruta Rb. Otra característica importante de este subtipo es la ausencia de la expresión de ER, PR y HER2. Clínicamente, los carcinomas basales se caracterizan por su aparición a temprana edad, predominantemente en mujeres de origen africano, presentando tumores de grandes al momento del diagnóstico, de alto grado histológico y una alta frecuencia de afectación de ganglio linfático. Los tumores basales tienden a ser CDI con un alto índice mitótico, necrosis tumoral, márgenes de expansión y una clara respuesta linfocítica estromal. El patrón de recaída metastásica es agresivo, con predominancia en órganos viscerales, principalmente pulmones, sistema nervioso central y ganglios linfáticos. El subtipo basal tiene peor pronóstico que los luminales, con una alta tasa de recaída en los primeros tres años a pesar de mostrar una alta respuesta a quimioterapia. Además, tumores con mutaciones en la línea germinal en BRCA1 se encuentran en este subtipo molecular (Yersal et al, 2014; Eroles et al, 2012; Reis-Filho et al, 2011).

Claudina baja

En 2007, Herschkowitz y colaboradores identificaron un nuevo subtipo de CM que se caracteriza por la baja expresión de genes implicados en uniones estrechas y adhesión célula-célula, los cuales incluyen cadherina 3, 4 y 7, cingulina, ocludina y E-cadherina (de ahí el nombre de claudina baja). Este subtipo comparte algunas características de expresión genética con el subtipo basal, tales como la expresión baja de ERBB2 y genes del grupo Luminal. A diferencia de los carcinomas basales, este grupo sobreexpresa un conjunto de 40 genes relacionados a con la respuesta inmune, indicando una alta infiltración de los tumores de células del sistema inmune. Los tumores Claudina baja tienen un pronóstico pobre a pesar de expresar bajos niveles de genes implicados en la proliferación. Por otra parte, sobreexpresan un conjunto de genes estrechamente vinculados a la diferenciación mesenquimal y transición epitelial-mesenquimal, características asociadas con la adquisición de un fenotipo de célula madre cancerígena. Inmunohistoquímicamente, son generalmente triple negativo, pero como con el subtipo Basal, la concordancia TN/Claudina baja no es del 100% y alrededor del 20% de carcinomas claudina baja son positivos para receptor de hormonas. Estos tumores muestran un pronóstico pobre a largo plazo y una respuesta insuficiente a quimioterapia neoadyuvante con valores intermedios entre los subtipos basal y luminal (Herschkowitz et al, 2007; Eroles et al, 2012).

Apócrino molecular

El subtipo apócrino molecular se estima que cuenta para el 10-15 % de los CM invasivos, incluyendo los casos de ER negativo que no entran en la categoría basal. Se caracteriza por la expresión del receptor de andrógenos (AR) y genes relacionados con AR. (Alizart et al, 2012, Reis-Filho et al, 2011).

Subtipo molecular	Frecuencia %	Inmunofenotipo	Grado histológico	Genes característicos	Mutaciones en TP53	Pronóstico
Luminal A	50-60	ER+: 91–100% PR+: 70–74% HER2+: 8–11% Ki67: bajo	Bajo	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1</i>	Bajo	Bueno
Luminal B	10-20	ER+: 91–100% PR+: 41–53% HER2+: 15–24% Ki67: alto	Intermedio / alto	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, v-MYB, GGH, LAPTM4, NSEP1, CCNE1</i>	Intermedio	Intermedio / malo
HER2 sobreexpresado	15-20	ER+: 29–59% PR+: 25–30% HER2+: 66–71% Ki67: alto	Alto	<i>ERBB2, GRB7</i>	Alto	Malo
Basal	10-20	ER+: 0–19% PR+: 6–13% HER2+: 9–13% Ki67: alto	Alto	<i>KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2</i>	Alto	Malo
Claudina baja	12-14	ER+: 12–33% PR+: 22–23% HER2+: 6–22% Ki67: intermedio	Alto	<i>CD44, SNAI3</i>	Alto	Malo
Apócrino molecular	10-15	ER– PR– HER2 +/- Ki67: alto	Intermedio / alto	<i>AR y genes relacionados con AR</i>	Alto	Malo

Tabla 1. Subtipos moleculares de CM. Basada en Eroles et al, 2012 y Reis-Filho et al, 2011

2.3. Características moleculares del cáncer de mama

Los genes *BRCA1* (gen del cáncer de mama 1) y *BRCA2* (gen del cáncer de mama 2) han sido identificados como los principales genes de susceptibilidad al CM, para el cual las mutaciones en la línea germinal en estos genes ocurren en aproximadamente 20-30% de todos los casos de CM hereditario y únicamente en el 2-3% de todos los tumores de mama. *BRCA1* y *BRCA2* funcionan como genes supresores de tumores y son importantes en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, ya que están implicados en la mediación de la reparación de rupturas de DNA de doble cadena por recombinación homóloga (Larsen et al, 2014). Las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* son los indicadores más fuertes para el riesgo de CM y de ovario. Las mujeres portadoras de mutaciones en cualquiera de los dos genes tienen un 60-80% de riesgo de desarrollar CM y 15-40% de riesgo para cáncer de ovario. Se estima que el 0.7-29% de los CM familiares corresponden a mutaciones en *BRCA1* y el 1.5-25% cuentan para mutaciones en *BRCA2*. *BRCA1/2* y *TP53* conforman el grupo de genes con alta penetrancia, que proporcionan un riesgo de CM mayor a cinco veces (25% de todos los casos) (Schwab et al, 2012). *TP53* es un gen supresor de tumores esencial en el control del ciclo celular. Cuando se produce daño en el DNA, p53 promueve el arresto del ciclo celular o la entrada en apoptosis, dependiendo de la gravedad del daño. La pérdida de la función de *TP53* por mutaciones somáticas ocurre frecuentemente en los tumores y mutaciones en la línea germinal en este gen se correlacionan con el síndrome de Li-Fraumeni (LFS). Este síndrome ocasiona el desarrollo de CM a temprana edad (el 30% de mujeres portadoras de la mutación del gen desarrollan tumores de mama a los 30 años de edad). Sin embargo, el LFS solo cuenta para el <0.1% de CM, pero mutaciones en *TP53* confieren un incremento del 18 a 60 veces mayor de riesgo de CM <45 años que la población general (Lalloo et al, 2012). Además, existen otros genes que confieren un riesgo similar a *BRCA1/2*, estos incluyen a *PTEN*, asociado con el síndrome de Cowden, *STK11*, relacionado con el síndrome Peutz-Jeghers, y *CDH1*, implicado en el cáncer gástrico difuso hereditario. Por otra parte, hay cinco genes que poseen una frecuencia poblacional de menos del 1%, que corresponden a *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2* y *RAD51C*. Estos alelos están asociados con un riesgo relativo de ≥ 1.5 y < 5 . Se ha estimado que mutaciones en estos genes son responsables de menos del 3% del CM hereditario y se consideran de moderada penetrancia (Lalloo et al, 2012). Por último, los genes *CASP8*, *TNRC9*, *MAP3K1*, *LSP1*, *FGFR2*, 8q24, 2q35, 5p12, 6q22 y 16q12, tienen baja penetrancia, individualmente confieren un riesgo de CM muy bajo (≥ 1.01 y < 1.5) y cuentan para el 9% del CM hereditario (Fillipini et al, 2013).

Sin embargo, la mayoría de los casos de CM (alrededor del 90%) se consideran esporádicos, es decir no condicionados por factores hereditarios (Vogelstein et al, 2002; Filippini et al, 2013; Stefansson et al, 2013), donde las mutaciones somáticas se presentan heterogéneamente en frecuencia y tipo, en un número importante de genes y de forma particular entre cada subtipo intrínseco. Los genes más mutados dentro del subtipo Luminal A son *PIK3CA* (45%), *MAP3K1* y *GATA3* (13% cada uno), *TP53* (12%) y *CDH1* (9%). Las mutaciones más frecuentes en los tumores Luminal B se encuentran en *TP53* y *PIK3CA* (29 % cada uno), *GATA3* (15%) y *TTN* (12%). Dentro del subtipo HER2 sobreexpresado, la amplificación de *ERBB2* es el principal mecanismo de sobreexpresión de HER2. En este subtipo las mutaciones somáticas más relevantes ocurren en *TP53* (72%) y *PIK3CA* (39%). En cuanto al subtipo Basal, *TP53* posee la frecuencia más altas de mutaciones (80%), sólo seguido por *PIK3CA* (9%). En contraste con los demás subtipos, los tumores basales expresan muy bajos o nulos niveles de la gran mayoría de los genes presentes en los carcinomas luminales y HER2 sobreexpresado; y más del 50% de las mutaciones que ocurren en *TP53* son sin sentido (TCGA 2012; Cornen et al, 2014). En lo referente a la alteración del número de copias (ANC), el CM expone un singular, pero importante, panorama de expresión constituido por la amplificación de *IGF1R*, *KRAS*, *EGFR* y *MYC* (los cuales son blancos terapéuticos) y la delección de *CDKN2B*, *BRCA2*, *RB1*, *ATM*, *SMAD4*, *NCOR1* y *UTX* (Curtis et al, 2012; Stephens et al, 2012; Balko et al, 2013) (Figura8).

Las modificaciones epigenéticas tienen un gran impacto en el desarrollo del cáncer, ya que pueden inactivar genes supresores de tumores o activar oncogenes. Con respecto al CM, genes supresores de tumores como *BRCA1* y *PTEN*, de gran relevancia en CM hereditario, además de otros genes, incluyendo *CDKN2A*, *CDH1*, *RARB2* y *GSTP1*, se encuentran sometidos bajo silenciamiento epigenético por hipermetilación de islas CpG en frecuencias similares en CM hereditario y en aquellos de origen esporádico. Se ha demostrado que en tumores esporádicos la expresión de *BRCA1* es reprimida mediante una combinación de delección genética y silenciamiento epigenético a través de la hiper metilación del DNA. De hecho, actualmente está bien establecido que la hipermetilación de islas CpG de la región promotora de *BRCA1* ocurre en aproximadamente 10% - 15% de todos los CM esporádicos. Como se mencionó antes, uno de los modelos que se ha desarrollado para la carcinogénesis es la hipótesis *two-hit* propuesta por Knudson. En tumores hereditarios *BRCA1*, la hipermetilación sirve ocasionalmente como un mecanismo alterno para el segundo *hit*. Estos hallazgos resaltan la importancia del papel de las alteraciones epigenéticas, en adición a las mutaciones genéticas, como contribuyentes para el desarrollo del CM (Stefansson et al, 2013; Nowsheen et al, 2014). Además de las de las alteraciones en genes codificantes, el CM se encuentra sometido a una gran desregulación en la expresión de microRNAs.

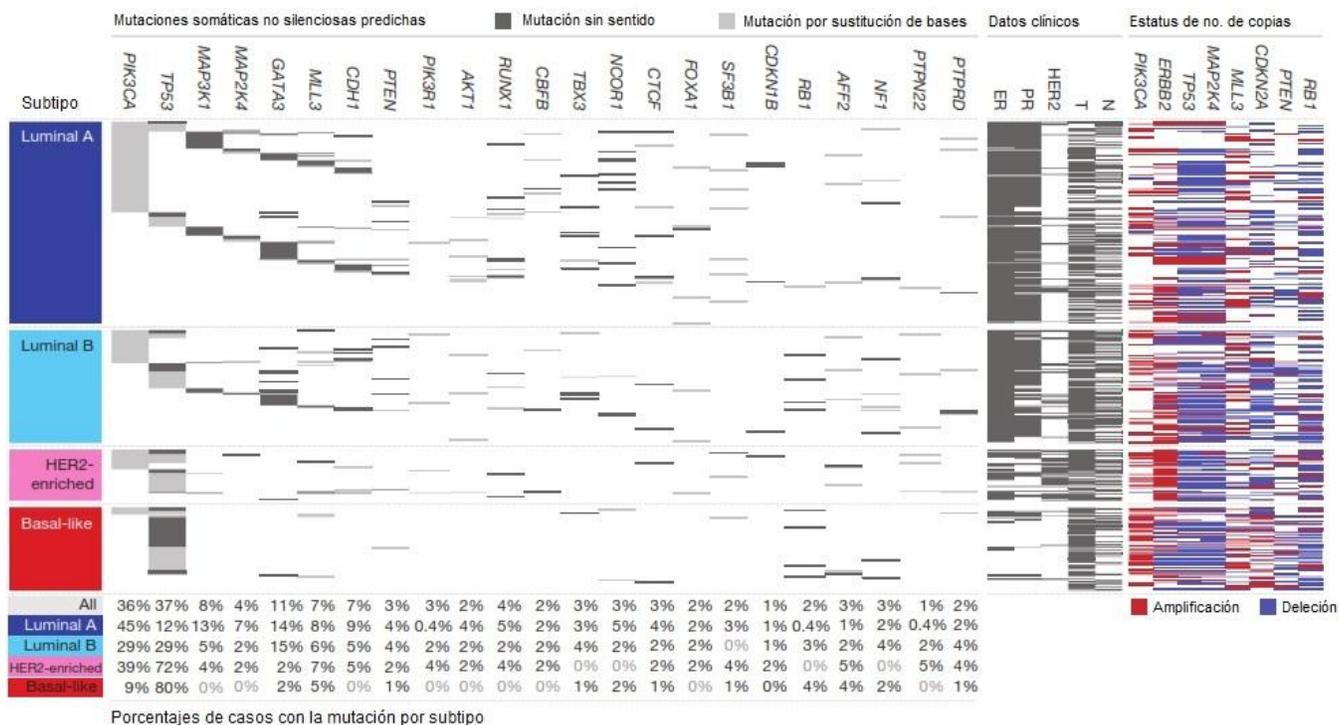


Figura 8. Genes mutados de manera importante en cáncer de mama y su correlación con características genómicas y clínicas. Tomada y modificada de TCGA 2012.

3. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNAs pequeños no codificantes, evolutivamente conservados, de aproximadamente 18-22 nucleótidos (nt) de longitud, que regulan la expresión génica de manera postranscripcional, mediante la unión a su respectivos mRNAs blancos, ocasionando represión traduccional o degradación de estos.

3.1. Biogénesis de miRNAs

Transcripción de miRNAs

En eucariontes, los genes que codifican para miRNA están localizados en intrones de genes que codifican proteínas, en intrones o exones de genes no codificantes o agrupados con un arreglo de transcrito primario policistrónico. La transcripción de genes de miRNAs que se expresan de manera autónoma se encuentra bajo los mismos mecanismos de regulación que los genes que codifican proteínas (Winter et al., 2009). Los factores de transcripción regulan positiva o negativamente la expresión de miRNAs de manera tejido-específica o desarrollo-específica. Por ejemplo, *MYC* y *MYCN*, ambos promueven la expresión de del agrupamiento oncogénico miR-17-92 en células de linfoma y miR-9 en células de neuroblastoma, pero inhiben la expresión de varios miRNAs supresores tumorales, como miR-15a, lo que ocasiona la tumorigénesis mediada por *MYC*. Por otra parte, p53 estimula la expresión de las familias miR-34 y miR-107, lo cual aumenta el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Los promotores de los genes de miRNA también están sometidos a la regulación por acetilación o metilación. El factor de transcripción silenciante RE1 (REST), recluta histona deacetilasas y a la proteína de unión a metil CpG MeCP2 al promotor del gen de miR-124, evitando su transcripción en células progenitoras neuronales y no neuronales. REST es bajamente regulado en la diferenciación, lo que permite una alta expresión de miR-124 en neuronas post-mitóticas. La transcripción de miR-148a, miR-34b/c, miR-9 y let-7 depende del estatus de metilación de sus correspondientes promotores, que es regulada por las metiltransferasas de DNA DNMT1 y DNMT3b (Krol et al., 2010) (Figura 9).

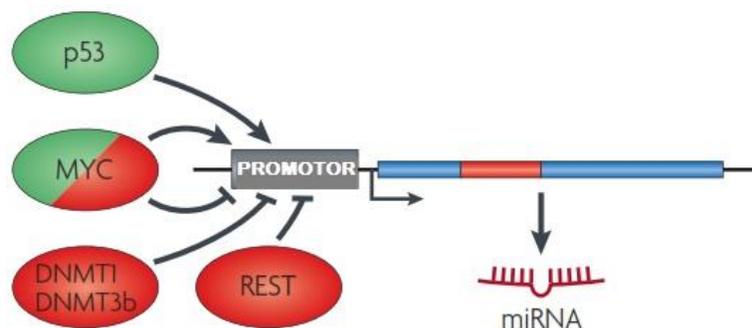


Figura 9. Regulación de la transcripción de genes de miRNAs autónomos por factores de transcripción y proteínas de regulación epigenética. Tomada y modificada de Krol et al., 2010

En general, la transcripción de los miRNAs es llevada a cabo por la RNA polimerasa II. Adicionalmente se han descrito miRNAs transcritos por la RNA polimerasa III, como en el caso de los miRNAs que están agrupados en el cromosoma 19 humano (*C19MC* por sus siglas en inglés *chromosome 19 miRNA cluster*) (Borchert et al., 2006). Los transcritos primarios (pri-miRNAs) que son generados por Pol II usualmente son moléculas de 1-3 kb de longitud, con un casquete (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y una cola de poli (A) en el extremo 3', las cuales se pliegan en estructuras de tallo y bucle de por apareamiento imperfecto de bases (Lee et al, 2002; Lee et al, 2004; Lee et al, 2003; Denli et al, 2004) . Un pri-miRNA típico de metazoarios consiste en un tallo de ~33 pares de bases (pb), dividido en tallo superior (~22 pb) y tallo inferior (~11 pb); un bucle terminal y segmentos flanqueantes de RNA de cadena sencilla que se encuentran enseguida de la unión basal del RNA dúplex (Ha et al., 2014) (Figura 10).

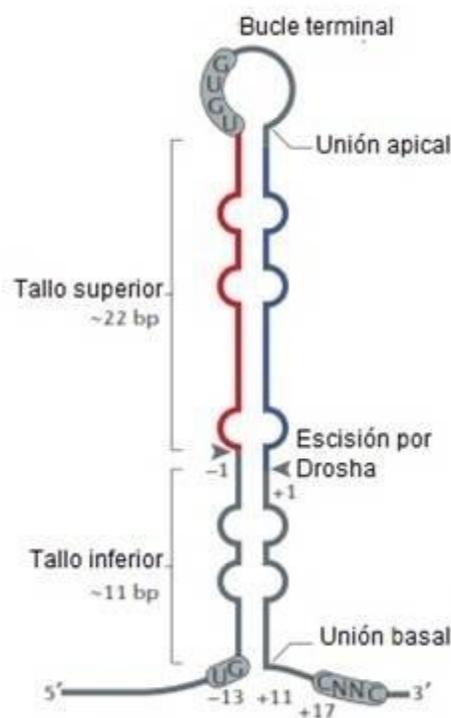


Figura 10. Estructura de un pri-miRNA típico de metazoario. Tomada y modificada de Ha et al., 2014

El primer paso de la maduración del miRNA es la escisión nuclear del pri-miRNA, mediada por el complejo microprocesador conformado por la enzima RNasa III Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena DGCR8 (pasha). DGCR8 interactúa con los pri-miRNAs a través de los segmentos flanqueantes y el tallo de ~33 pb, asistiendo a Drosha para cortar el tallo inferior del sustrato. (Kim et al., 2009). En miRNAs intrónicos, se ha demostrado que el procesamiento de pri-miRNAs puede ser un proceso co-transcripcional, ya que la escisión del intrón por Drosha no perjudica el *splicing* del mRNA hospedero. Por lo tanto, el procesamiento por Drosha podría tener lugar después de que el transcrito esté comprometido al espliceosoma, pero antes de que el intrón sea liberado. Además de los miRNAs intrónicos canónicos, se han descubierto miRNAs que se encuentran en intrones cortos, denominados "mirtrons", para los cuales la biogénesis no requiere del procesamiento por Drosha. Después de la terminación del *splicing*, el intrón forma una estructura de horquilla que se asemeja a un pre-miRNA. De esta manera, se convierten en un sustrato para la exportación nuclear, evitando la interacción con Drosha para ser procesados en el citoplasma (Kim et al., 2009). Posteriormente, el pre-miRNA es transportado activamente del núcleo al citoplasma por Ran-GTP y el factor nuclear de exportación Exportina 5 (Yi et al, 2003; Lund et al, 2004). En el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por la encima RNasa III Dicer (Lee et al, 2003).en colaboración con la proteína de unión a RNA de doble cadena TRBP. Mediante su dominio PAZ, Dicer reconoce el extremo 5' fosforilado del pre-miRNA y con sus dominios RNasa III, corta el tallo y bucle del este para generar un RNA dúplex formado por una cadena de miRNA maduro y una cadena de miRNA complementaria (miRNA/miRNA*) de ~22 nt de longitud (Bartel 2004; Krol et al, 2010). En mamíferos, la enzima argonauta 2 (AGO2), la cual tiene una actividad similar a endonucleasa RNasa H, puede ayudar al procesamiento de Dicer cortando el brazo 3' de algunos pre-miRNAs (Krol et al, 2010). Después de la digestión, Dicer permanece asociada al miRNA dúplex, que posteriormente es liberado por acción de la RNA helicasa A en células humanas. En seguida, el miRNA dúplex maduro es cargado en una proteína AGO (AGO2 en mamíferos), que junto con la proteína GW182, forman el complejo silenciador inducido por RNA (RISC). En este proceso el RNA dúplex es separado, una cadena (miRNA*, sentido o también llamada pasajera) es liberada y degradada, mientras que la otra cadena (miRNA, antisentido o guía) es incorporada al RISC. Generalmente, la hebra guía es determinada en base a la estabilidad termodinámica relativa de los dos extremos del RNA dúplex. La cadena con menor estabilidad de apareamiento de bases en el extremo 5' es seleccionada como la hebra guía (Ha et al., 2014) (Figura 11).

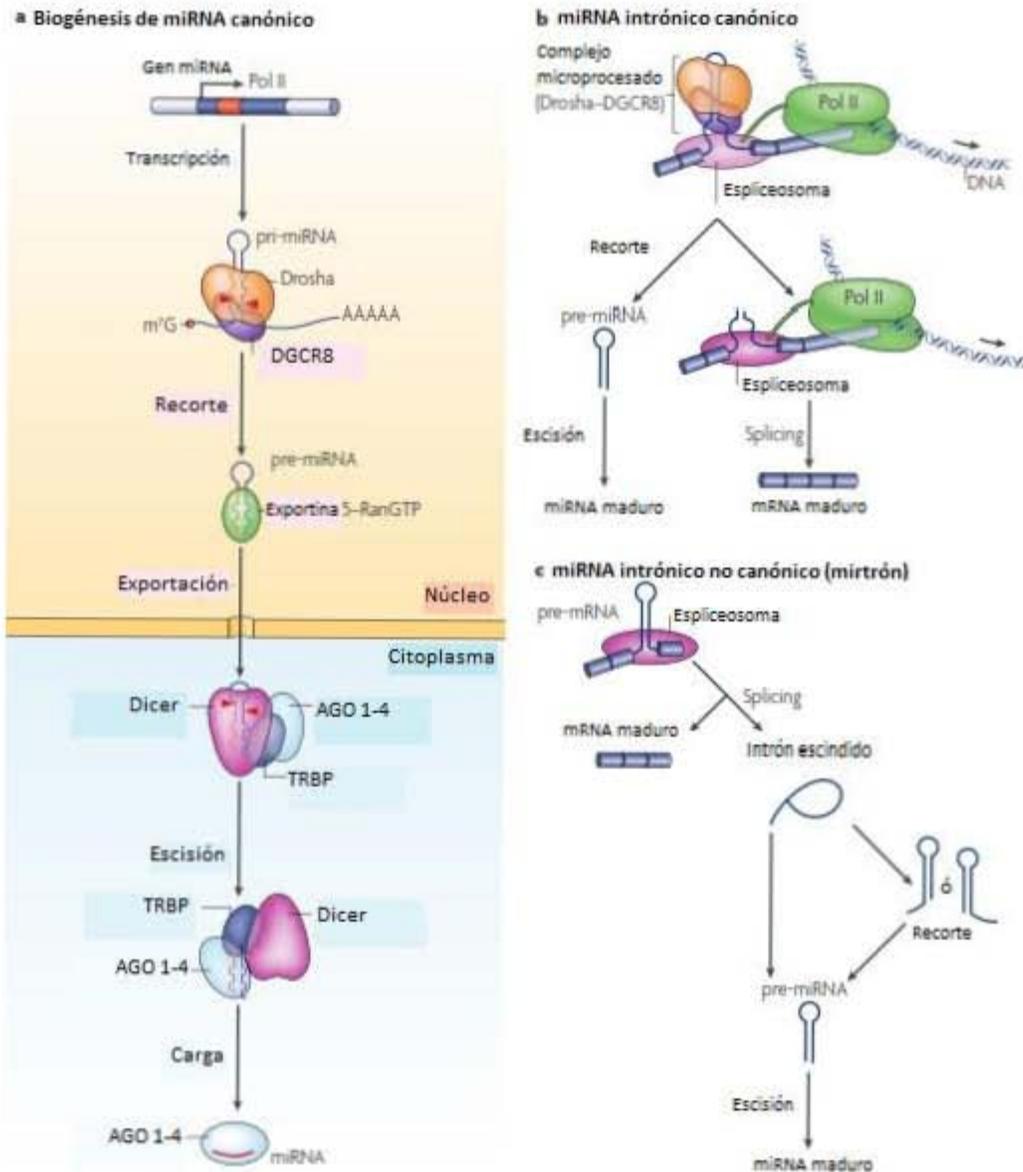


Figura 11. Biogénesis de miRNAs. En a) miRNA canónico, b) miRNA intrónico canónico y c) miRNA intrónico no canónico (mirtrón). Tomada y modificada de Kim et al, 2009

Una vez incorporado dentro de RISC, el miRNA causará la degradación del blanco si dicho mRNA tiene en la 3'-UTR suficiente complementariedad a la región "seed" del miRNA (secuencia que comprende los nucleótidos 2-7 del extremo 5' del miRNA maduro), o reprimirá la traducción si la 3'-UTR del mRNA es parcialmente complementaria a esta (Bartel 2004). La unión imperfecta del miRNA a su mRNA diana también puede llevar a la deadenilación realizada por el complejo CAF1-CCR4 (Krol et al, 2010). Recientemente se ha demostrado la existencia de interacciones menos frecuentes que pueden mediar la actividad de los miRNAs, que ocurren a través de secuencias distintas a la región "seed", conservadas evolutivamente y que se encuentran en regiones centrales del miRNA maduro enriquecidas con sitios de unión a proteínas AGO. Estas regiones constan de 11 nucleótidos (nt), comenzando en la posición 3, 4 ó 5 y cuyo apareamiento perfecto puede inhibir la traducción de mRNAs (Grimson et al., 2007; Bartel 2009; Shin et al., 2010; Chi et al., 2012; Martin et al., 2014). Los mRNAs traduccionalmente reprimidos pueden acumularse en focos citoplásmicos discretos, conocidos como cuerpos de procesamiento (P-bodies) o cuerpos de glicina-triptofano (GW-bodies). Los P-bodies funcionan en el almacenamiento y descomposición de mRNAs reprimidos. En consecuencia, están enriquecidos con proteínas implicadas en la represión traduccional, deadenilación de mRNAs y degradación, como proteínas AGO, GW182, miRNAs maduros y mRNAs reprimidos. Estos cuerpos son estructuras dinámicas, con proteínas y mRNAs moviéndose continuamente dentro y fuera de ellos. El número y tamaño de los P-bodies varía dependiendo de la actividad traduccional de la célula y existe una correlación positiva entre la represión mediada por miRNAs y la acumulación de mensajeros blancos en estos focos citoplásmicos (Eulalio et al, 2007). Desde el descubrimiento del primer microRNA, lin-4 en *Caenorhabditis elegans* por Ambros y colaboradores (Lee et al, 1993), se han registrado 35828 secuencias de miRNAs en 223 especies (miRBase.org 2014) que incluyen vertebrados, moscas, nematodos, plantas e incluso en virus. Sin embargo, solo se ha determinado experimentalmente la función de una fracción de esta cifra de pequeños RNAs interferentes (Griffiths-Jones et al, 2006). Un miRNA puede tener cientos de diferentes blancos conservados y no conservados y se ha predicho que esta clase de moléculas regulan alrededor del 50% de todos los genes que codifican proteínas en mamíferos. Estudios funcionales demuestran que el papel de estas moléculas como reguladoras de la expresión genética es determinante en casi todos los procesos celulares investigados hasta el momento, como el crecimiento, proliferación, diferenciación, apoptosis, adquisición y mantenimiento de un fenotipo dado. Se ha demostrado que los cambios en la expresión de miRNAs están asociados a muchas patologías humanas, incluyendo el cáncer (Calin et al, 2002; Bartel 2004; Krol et al, 2010).

3.2. MicroRNAs en cáncer

La primera evidencia que demuestra que los miRNAs están implicados en cáncer surgió de un estudio realizado en 2002, por el grupo de Croce, en el que pretendían encontrar genes supresores tumorales en el cromosoma 13q14, relacionado con la leucemia linfocítica crónica (LLC) y cuya delección se presenta en aproximadamente 70% de las LLC. Sin embargo, observaron que la región crítica de este cromosoma no contenía un gen codificante de proteína supresora tumoral, sino dos genes de miRNAs, correspondientes a miR-15a y miR-16-1, presentes en el mismo RNA polisistónico. Posteriormente, analizaron la expresión de miR-15a y miR-16-1 en muestras de sangre de pacientes con LLC. Los resultados mostraron que ambos miRNAs estaban ausentes o disminuidos en el 68% de los casos en comparación con linfocitos o tejido normal. Estos hallazgos sugieren que estos dos miRNAs están causalmente relacionados con la patogénesis de la LLC (Calin et al, 2002). En un subsecuente estudio realizado por Calin y colaboradores, se mapearon todos los genes de miRNAs conocidos y encontraron que aproximadamente el 50% se ubican en regiones del genoma susceptibles a delecciones o amplificaciones en muchos tumores diferentes, en las cuales no se pudieron encontrar genes supresores de tumores u oncogenes después de muchos años de investigación (Calin et al, 2004). Los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Zhang y colaboradores en 2006 confirman los hallazgos anteriores. En ese estudio, se llevó a cabo un arreglo de expresión genética comparada (CGH) de tres tumores epiteliales (mama, ovario y melanoma), el cual mostró que una proporción alta de loci genómico contienen genes de miRNAs que presentaron alteraciones en el número de copias de DNA en cáncer de ovario (37.1%), CM (72.8%) y melanoma (85.9%), donde las alteraciones en el número de copias observadas por arriba del 15% se consideraron significativas para cada gen de miRNA (Zhang et al, 2006). Los genes de miRNAs también se encuentran sometidos bajo los mecanismos de reguñación epigenética, como hipo o hipermetilación y remodelación de cromatina, como lo demuestra la sobreexpresión de miR-21 y miR-203 en cáncer de ovario, cuyos respectivos genes se encuentran hipometilados. Por su parte, la hipermetilación de miR-9-1 ocasiona la disminución en la expresión de este en CM y la inhibición de la histona deacetilasa en células de carcinoma de mama SKBR3 provoca la alteración de los niveles de miRNAs (Iorio et al, 2008). Las regiones cromosómicas que contienen genes de miRNAs vinculados en la regulación negativa de un gene supresor de tumores, están amplificadas. Esta amplificación puede resultar en el incremento de la expresión del miRNA y en consecuencia, provocar el silenciamiento del gen supresor tumoral. A la inversa, los miRNAs que inhiben oncogenes se ubican frecuentemente en las regiones frágiles del genoma, que están propensas a delecciones o mutaciones que pueden ser responsables del decremento en sus niveles y la subsecuente sobreexpresión del oncogén blanco (Iorio et al, 2011). Los

cambios en la expresión de los miRNAs también pueden ser debidos al incremento o disminución de la actividad de factores de transcripción, los cuales pueden regularlos de manera positiva o negativa, como p53, que activa la transcripción de miR-34a o miR-205, que tienen un papel oncosupresivo, o miRNAs con funciones oncogénicas, como el grupo miR-17-92, que es activado por *MYC* y cuyos blancos son Let-7 y miembros de la familia miR-29; o *ZEB1*, que reprime directamente la transcripción de miembros de la familia de miR-200, que a su vez son capaces de inhibir a *ZEB1* y *ZEB2* (Iorio et al. 2012). De esta manera, los miRNAs que están alta o bajamente regulados (expresados) en tejido tumoral con respecto al normal, pueden ser considerados como oncomiRs o miRs supresores tumorales. Cabe mencionar que es importante especificar en qué casos se le atribuye a un miRNA alguna de las dos actividades antes mencionadas, ya que un miRNA puede desempeñar un papel de oncomiR en una clase de tumores y comportarse como miR supresor tumoral en otro tipo de tejidos o células. Por ejemplo, miR-221 y miR-222 se dirigen al oncogén *KIT* e inhiben el crecimiento de la leucemia heritroblástica, funcionando así como genes supresores tumorales en estas células. Sin embargo, estos miRNAs también regulan al menos cuatro supresores tumorales (*PTEN*, p27, p57 y *TIMP3*), funcionando como miRNAs oncogénicos al reprimir la expresión de estos genes supresores en varios tumores sólidos. Los miRNAs afectan los seis "hallmarks" del cáncer propuestos por Hanahan y Weinberg: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento (familia Let-7), 2) insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento (grupo miR-17/92), 3) evasión de la apoptosis (miR-34a), 4) potencial de replicación ilimitado (grupo miR-372/373), 5) angiogénesis (miR-210), 6) invasión y metástasis (miR-10b) (Di Leva et al, 2014). Luego de los hallazgos de que revelan el papel de los miRNAs en el cáncer, se han desarrollado plataformas para evaluar la expresión global de estas moléculas en tejido normal y afectado, en un esfuerzo por obtener firmas de miRNA que puedan ser usadas para la clasificación, diagnóstico y pronóstico de tumores. Estas plataformas consisten en microarreglos de miRNA y secuenciación profunda de alto rendimiento, con las que se obtienen perfiles de miRNA que no sólo pueden distinguir el tejido sano del canceroso, e identificar el tejido de origen, sino que además pueden discriminar diferentes subtipos de un cáncer particular o incluso anomalías oncogénicas específicas (Iorio et al, 2012). Los avances en la investigación de miRNAs implicados en la tumorigénesis pueden ser aplicados para el desarrollo de terapias dirigidas y para el establecimiento de biomarcadores tumorales específicos.

3.2.1. MicroRNAs en cáncer de mama

En 2005, Iorio y colaboradores reportaron la primera firma de miRNAs CM-específica al realizar un análisis de expresión genética sobre un gran número de muestras de tejido normal y tumoral, que les permitió identificar 29 miRNAs diferencialmente expresados, capaces de discriminar tejido tumoral del normal con una exactitud del 100%. Entre los miRNAs diferencialmente expresados, miR-10b, miR-125b y miR-145b estaban disminuidos, mientras que miR-21 y miR-155 se encontraron aumentados, sugiriendo que estos miRNAs pueden ejercer un papel como miRNAs supresores de tumores u oncomiRs respectivamente (Iorio et al, 2005). Así mismo, otros perfiles de miRNAs en tumores de mama, han mostrado patrones de expresión que permiten la identificación de firmas de miRNA que pueden estratificar los tumores en los subtipos moleculares como Basal, HER2 positivo, Luminal A y B (Serpico et al, 2014) (Tabla 2).

Firma	Subtipo	Referencias
Aumentado: miR-150, -142-3p, -142-5p, 148a, -106a/b, -18a, -93, -155, -25, -187, -135b	Basal	Blenkiron et al, 2007
Aumentado: miR-150, -142-3p, -142-5p, -148a, -106b, -93, -155, -25, -187, -375 Disminuido: miR-125 ^a y b	HER2 positivo	Blenkiron et al, 2007 Mattie et al, 2006 Wu et al, 2012
Aumentado: miR-191, -26, -126, -136, -100, -99a, -145, -146b, -10a, -199a/b, -130a, -30a-3p, -30a-5p, -224, -214, let-7a/b/c/f, -342 Disminuido: miR-206, -15b, -107, -103	Luminal A	Iorio et al, 2005 Blenkiron et al, 2007 Mattie et al, 2006
Aumentado: miR-191, -26, -106a/b, -93, -25, -10a, -30a-3p, -30a-5p, -224, let-7b/c/f y -342, -15b, -107, -103 Disminuido: miR-206, -100, -99a, -130, -126, -136, -146b	Luminal B	Iorio et al, 2005 Blenkiron et al, 2007 Mattie et al, 2006

Tabla 2. MicroRNAs y subtipos moleculares de CM. Se comparó con tejido normal o con líneas celulares parentales en el caso de datos preclínicos. Tomada y modificada de Serpico et al, 2014.

A partir de los estudios de perfiles de miRNAs se han realizado varias investigaciones con el propósito de caracterizar la función de estas moléculas en el desarrollo del CM. Como en otros tipos de cáncer, los miRNAs pueden desempeñarse como oncomiRs o miRNAs supresores tumorales. Entre los miRNAs con propiedades oncogénicas, miR-21 promueve la proliferación, supervivencia celular, invasividad y metástasis al dirigirse a *PTEN*, *PDCD4* y *TPM1*. miR-10b inhibe la expresión de *HOXD10*, liberando a *RHOC*, ocasionando invasión celular y metástasis. En la angiogénesis, miR-27 juega un papel importante reprimiendo la expresión de *ZBTB1* y *ZBTB10*, ocasionando el incremento moléculas de supervivencia y angiogénicas, como Survivina, *VEGF* y *VEGFR1*. La lista de miRNAs implicados en la tumorigénesis también incluye a miR-191, el cuál es estrógeno inducible, promueve la proliferación celular, migración y supervivencia en microambiente tumoral mediante la inhibición de *SATB1* en la cascada estrógeno/ER/miR191/*STAB*. A diferencia de otros tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón o linfomas, el agrupamiento miR-17-92 se encuentra suprimido en tumores de mama. Además, uno de sus miembros, miR-17, limita el crecimiento independiente de anclaje al reprimir al oncogén *AIB1*, el cuál amplifica los efectos transactivadores del ER. Así mismo, en cultivos celulares, este agrupamiento inhibe la proliferación celular al dirigirse directamente a la ciclina D1 (Iorio et al, 2008; Serpico et al, 2014). En lo referente a los miRNAs oncosupresores, miR-125a y b, ambos disminuidos en CM, están implicados en la regulación de *ERBB2* y *ERBB3*. En estadios tempranos de la progresión del CM, la expresión de Let-7 está perdida. Para este miRNA, se ha identificado a los oncogenes *RAS*, *HMGA2*, *IMP-1* y *MYC* como blancos. La manipulación de los niveles de Let-7 en líneas celulares de CM afecta la proliferación y metástasis, involucrando a estos genes en la respuesta. En apoptosis, la expresión de miR-34 es inducida por p53, promoviendo la represión de Bcl-2. Los miembros de la familia de miR-200 suprimen la TEM al dirigirse a *ZEB1* y *ZEB2*, oncogenes que regulan la transcripción de varios genes implicados en el mantenimiento de la polaridad celular, disminuyen la expresión de E-cadherina e inducen la expresión de vimentina (Le Quesne et al, 2010). En la Figura 12, se muestran los miRNAs implicados en los *hallmarks* del CM.

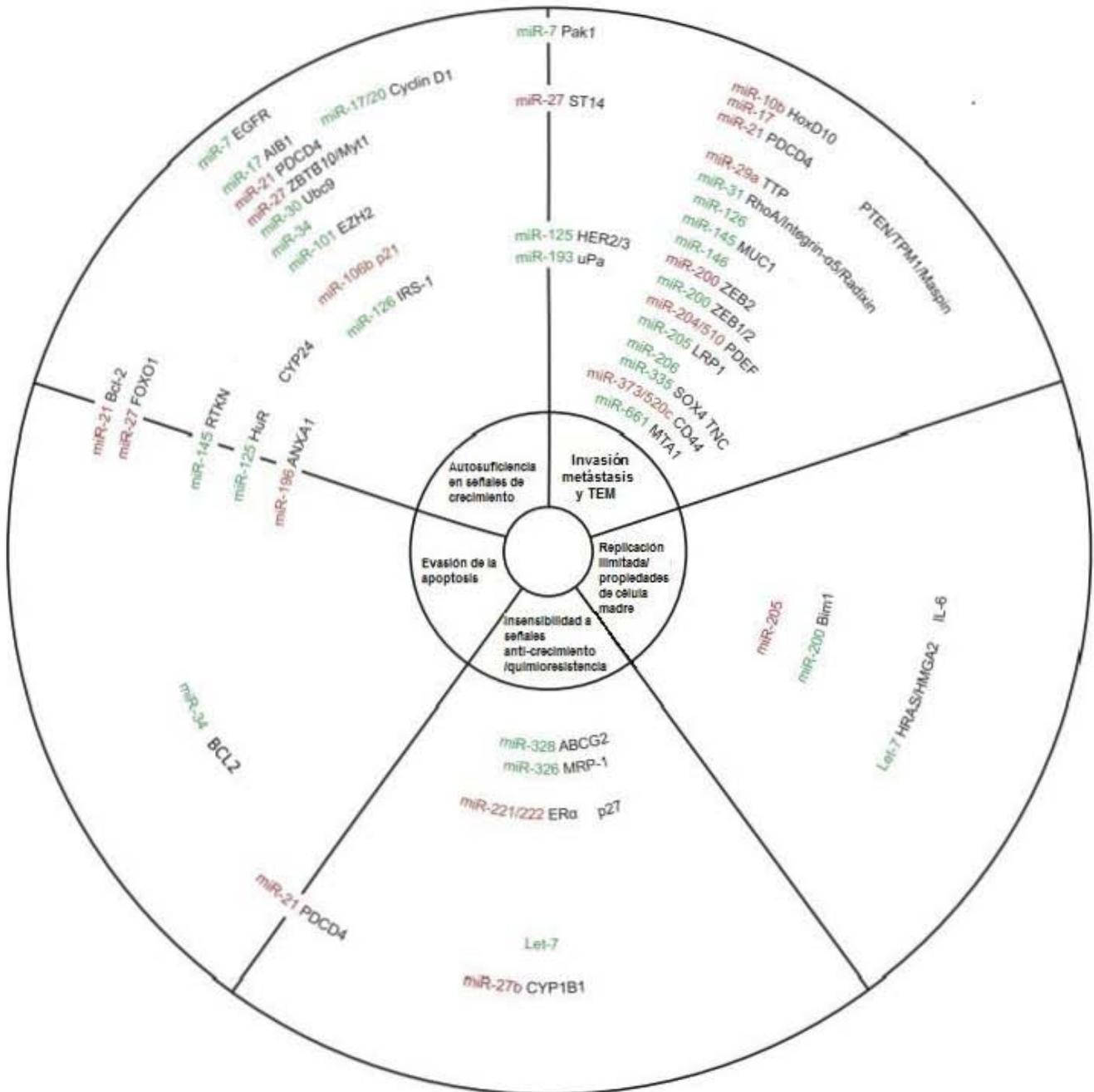


Figura 12. MicroRNAs implicados en cáncer de mama. En color rojo se señalan los oncomiRs, en color verde los miRNAs supresores tumorales y en letras negras sus respectivos blancos. Tomada y modificada de Le Quesne et al, 2010

4. Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) se define por la pérdida de la expresión de ER, PR y HER2 (Schmadeka et al, 2014). EL CMTN representa el 15-20% de todos los tumores de mama, ocurre comúnmente en mujeres jóvenes y en mujeres de origen africano o hispano, y es el subtipo clínicamente más agresivo con el pronóstico más grave. Los pacientes con CMTN tienen el porcentaje más alto de reincidencia local temprana, especialmente entre el primer y tercer año después del diagnóstico, y la mayoría de las muertes ocurren en los primeros 5 años, después de la terapia (Xu et al, 2014). Las metástasis de los tumores negativos tienden a ser más agresivas comparada con otros subtipos y ocurren principalmente en los pulmones (40%), cerebro (30%), hígado (20%) y en huesos (10%) (Liedtke et al, 2008). Además, el CMTN carece de blancos específicos para el empleo de la terapia dirigida, por lo que la quimioterapia sigue siendo el tratamiento estándar. Sin embargo, aunque el CMTN muestra más quimiosensibilidad en comparación con el cáncer de mama ER-positivo, la mayoría de los pacientes con CMTN tienen residuos de la enfermedad en la mama y los ganglios linfáticos después del tratamiento neoadyuvante. La ausencia de terapia dirigida hace que estos pacientes sean más susceptibles a la recaída y presenten una peor supervivencia global en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (D'Ippolito et al, 2013). Un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de CM es representado por las mujeres que acarrean mutaciones en *BRCA1*. El 75 % de las pacientes con CM que son portadoras de mutaciones en este gen tienen un fenotipo TN. Por otra parte, en pacientes con fenotipo TN, la prevalencia de mutaciones en *BRCA1* es de 6.5 a 34.4%. CMTN se utiliza a menudo como un sustituto para referirse al subtipo Basal, y aunque los 2 patrones comparten muchas similitudes, no son biológicamente sinónimos. El subtipo Basal posee una firma distintiva de expresión génica caracterizada por una fuerte expresión de marcadores basales, como citoqueratinas 5, 6 y 17 (ver clasificación molecular), y también abarca un grupo diverso de tumores. Por otro lado, el término TN se refiere al inmunofenotipo definido por la negatividad para los marcadores que corresponden a los receptores hormonales (ER, PR) y HER2 (Alluri et al, 2014). En un estudio se reportó que el 71% de los CMTN fueron Basales, mientras que el 77% de los tumores Basales fueron de naturaleza TN (Bertucci et al, 2008). Aunque ambos tipos de cánceres presentan similitudes clínicas, histopatológicas y moleculares, también exhiben discordancias en estos aspectos. Por ejemplo, el análisis del estatus de ER, PR y HER2 de tumores con un perfil de expresión genética perteneciente al subtipo Basal, reveló que el 15-54% de estos expresó al menos uno de estos marcadores (Reis Filho et al, 2008). Desde el punto de vista molecular, esta diversidad se manifestó en el trabajo realizado por Lehmann y colaboradores en 2011, en el cuál realizaron un metaanálisis de perfiles de expresión de 21 conjuntos de datos e identificaron 581 casos de CMTN,

identificando seis subtipos: dos basales (BL1 y BL2), un inmunomodulador (IM), un mesenquimal (M), un mesenquimal similar a célula madre (MSL) y un receptor de andrógenos luminal (LAR). Los subtipos BL1 y BL2 expresaron marcadamente genes de ciclo celular y de respuesta a daño en DNA (*ATR/BRCA1*) y líneas celulares representativas respondieron exclusivamente a agentes antimitóticos y que dañan el DNA, como los derivados de platino. El subtipo IM estuvo enriquecido por señalización de célula inmune, pero aún no está claro si este perfil genético es reflejo de célula cancerígena o de infiltración de células del sistema inmune al estroma. Los subtipos M y MSL expresaron genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (TEM), motilidad y diferenciación celular. Sus líneas celulares representativas fueron sensibles a inhibidores de PI3K/mTOR. Sin embargo, el subtipo MSL estuvo enriquecido de genes relacionados con células madre mesenquimales. Finalmente, el subtipo LAR presentó firmas de señalización luminal y de receptor de andrógenos.

4.1. Características moleculares del cáncer de mama triple negativo

Molecularmente el CMTN presenta una gran heterogeneidad, caracterizada por una alta inestabilidad genómica, un espectro continuo en el número de mutaciones (desde 3 hasta cientos), mutaciones en *TP53* (80% de los casos), *PIK3CA* (7-10%), *USH2A* (9%), mutación o delección de *RB1* (~20%), mutación o delección de *PTEN* (10%), mutaciones esporádicas (5%) y en la línea germinal (10%) en *BRCA 1/2*, amplificación de *MYC* (40%), *MCL1* (20%), *CCNE1* (9%), *EGFR* (5%) y *FGFR2* (4%). Con respecto a alteraciones epigenéticas, los tumores basales presentan los niveles más bajos de metilación de DNA y se ha reportado que los marcadores de célula madre, CD44, CD133, y MSH1, se encuentran hipometilados en CMTN. (Turner et al, 2013; Xu et al. 2014). El CMTN también presenta alteraciones en la expresión de miRNAs.

4.2. MicroRNAs en cáncer de mama triple negativo

El primer estudio de perfil de miRNAs totalmente enfocado en tumores CMTN con los resultados más consistentes provino de un perfil a gran escala realizado por Cascione y colaboradores en 2013. En un primer conjunto de CMTN primario y tejido normal, el perfil reveló 116 miRNAs desregulados, entre los cuales miR-106b, el agrupamiento miR-17/92, la familia miR-200 (miR-200a,-200b y -200c), miR-21 y miR-155 fueron los más sobreexpresados. Un segundo conjunto de CMTN asociado a metástasis en ganglio linfático y tejido normal permitió la identificación de un grupo de seis miRNAs expresados

diferencialmente en los tejidos metastásicos (miR-424, -125^a-5P, -627, -579, Let-7g y miR-101), con miR-424 y miR-125^a diferencialmente expresados sólo en metástasis vs. tumor primario y en tejido normal vs. metástasis respectivamente (Cascione et al, 2013). Algunos de los miRNAs que se relacionan con los subtipos luminales o Basal reflejan su origen epitelial y mioepitelial respectivamente. Por ejemplo, la familia miR-200 está asociada con el subtipo Luminal, lo cual no es una sorpresa ya que este miRNA tiene como blancos directos a los reguladores de la TEM *ZEB1/2*, mientras que miR-145 y miR-205, expresados en células mioepiteliales normales, están subexpresados en tumores TN Basales, lo que sugiere que este cambio de expresión puede ser una consecuencia de la progresión de la enfermedad en este subtipo (D'Ippolito et al, 2013). Para muchos de los miRNAs que provienen de estudios de perfiles únicamente se han descrito interacciones predichas con los principales procesos biofisiológicos relacionados con el CMTN. No obstante, existe un pequeño número de miRNAs validados experimentalmente (Tabla 3).

MicroRNA	Blanco(s) validado(s)	Principal función(es) en CMTN
Supresores de tumores		
miR-200a/b	<i>Zeb1/Zeb2, Suz 12, EphA2</i>	Estimulación de la diferenciación en línea celular mamaria indiferenciada
miR-200c	<i>Zeb1/Zeb2</i>	Inhibición de TEM
	<i>MSN, FN1</i>	Supresión de migración
	<i>TrkB</i>	Reversión de anoikis resistencia
miR-205	<i>E2F1, LAMC1</i>	Reducción de proliferación, ciclo celular y crecimiento del tumor
miR-203	<i>BIRC5</i>	Reducción de proliferación
	<i>LASP1</i>	Inhibición de la migración
miR-31	<i>WAVE3, RhoA, Radexin</i>	Reducción de potencial metastásico
	<i>PRKCE</i>	Inducción de apoptosis y potenciamiento de quimio y radiosensibilidad
miR-34a	<i>AXL</i>	Inhibición de migración
OncomiRs		
miR-181a/b	<i>Bim</i>	Inhibición de anoikis

	<i>ATM</i>	Inhibición de reparación de rupturas de DNA de doble cadena
MIR-146 y miR-146-5p	<i>BRCA1</i>	Control de proliferación y recombinación homóloga mediada por BRCA1
miR-182	<i>PFN1</i>	Inhibición de proliferación celular e invasión Inhibición de apoptosis

Tabla 3. Resumen de miRNAs implicados en CMTN, blancos validados y función biológica. Tomada y modificada de D'Ippolito et al, 2013

5. MicroRNA-1305

El gen que codifica para miR-1305, *MIR1305*, se localiza en el cromosoma 4q34.3, posee 86 bases y contiene únicamente un exón (genecards.org 2015) (Figura 13).

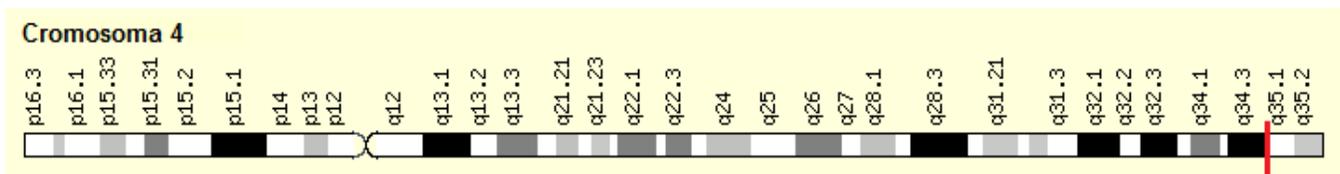


Figura 13. Ubicación de *MIR1305* en el cromosoma 4 (señalada con rojo). Tomada y modificada de genecards.org 2015

En 2011, Niyazi y colaboradores realizaron un perfil de expresión de miRNAs de muestras de tejido embebidas en parafina de 35 pacientes con glioblastoma, que fueron tratados con cirugía y radioterapia postoperatoria durante un periodo de 2005 a 2008, con el objetivo de identificar miRNAs con valor pronóstico, resultando ser miR-1305 uno de los miRNAs significativamente desregulados. En

un estudio elaborado por Slattery y colaboradores en 2011, donde se llevaron a cabo perfiles de expresión de miRNAs de tumores colorrectales, miR-1305 se encontró subexpresado, siendo uno de los 73 miRNAs que presentaron una diferencia de expresión mayor al doble con respecto al tejido normal. En el mismo año, Ali y colaboradores realizaron un perfil de expresión de miRNAs en plasma de 50 pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas, que compararon con el perfil de 10 voluntarios sanos, logrando identificar 91 miRNAs diferencialmente expresados, de los cuales 54 de ellos mostraron sobreexpresión, incluido miR-1305. Dos años después, Uchino y colaboradores analizaron la expresión de miRNAs en las líneas celulares de cáncer de vejiga M-UC-3, 5637, MBT2, J82 y TCCSUP, para las que se ha reportado pérdida de número de copias en varios regiones genómicas relacionadas con la progresión tumoral y que corresponden a la ubicación de genes de miRNAs, incluyendo 4q33-34, cromosoma donde se encuentra el gen de miR-1305. Sin embargo, los resultados no mostraron reducción de la expresión de miR-1305. En 2014, Su y colaboradores, interesados en el papel de los miRNAs en la radioresistencia de células de cáncer de esófago, realizaron un microarreglo de miRNAs, con el propósito de detectar miRNAs diferencialmente expresados entre la línea celular radiorresistente de cáncer de esófago KYSE-150R y la línea celular parental KYSE-150. De los 35 miRNAs diferencialmente expresados, 25 resultaron disminuidos, incluyendo miR-1305. Recientemente, Tormo y colaboradores, en 2015, analizaron el perfil de expresión de miRNAs en respuesta al tratamiento con doxorubicina en las líneas celulares de CMTN MDA-MB-231 y MDA-MB-468, comparándolas con MCF-7, que es una línea celular representativa del subtipo Luminal A. Obtuvieron 218 miRNAs con un perfil de expresión alterado significativamente, los cuales fueron agrupados de acuerdo a su expresión por línea celular, expresión compartida entre ambas líneas de CMTN; y expresión semejante entre las tres líneas. Los resultados ubicaron a miR-1305 dentro del grupo de miRNAs expresados en células MCF7. En un estudio realizado por Vaca y colaboradores, 2015, se identificó que miR-1305 está desregulado en tumores de pacientes mexicanas con CMTN, mostrando un nivel de expresión que lo ubicó entre los 10 miRNAs más sobreexpresados, incluso por encima de miR-21. Hasta la fecha, no hay estudios que describan el papel de miR-1305 en la carcinogénesis de ningún tipo de tumor.

II. JUSTIFICACIÓN

El CMTN es el subtipo más agresivo de CM, con el peor pronóstico y ocurre principalmente en mujeres jóvenes. Debido a la gran heterogeneidad molecular que poseen estos tumores, actualmente no existe una terapia dirigida disponible, por lo que la quimioterapia continua siendo el principal tratamiento para esta enfermedad. Sin embargo, este método es muy tóxico y los resultados siguen siendo relativamente pobres, lo que representa su principal limitación. Los miRNAs constituyen uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión genética y están implicados en las vías de señalización alteradas en el cáncer. Prácticamente cada gen supresor tumoral u oncogén está sometido a la modulación de esta clase de pequeños RNAs no codificantes, por lo que representan un blanco prometedor para el desarrollo de terapias dirigidas y establecimiento de biomarcadores de gran relevancia en la detección, pronóstico y predicción del CMTN. Por lo que, la caracterización de la función de los miRNAs en procesos oncogénicos, así como la validación de sus genes blancos, es de gran importancia para el desarrollo de terapias dirigidas, tratamientos y el establecimiento de biomarcadores de relevancia clínica.

III. HIPÓTESIS

Si miR-1305 se encuentra sobreexpresado en CMTN, entonces este miRNA tendrá un efecto positivo en la proliferación y migración de la línea celular de CMTN MDA-MB-231, funcionando así como miRNA oncogénico.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar la participación de miR-1305 en procesos oncogénicos en modelos *in vitro* de cáncer de mama triple negativo.

Objetivos particulares

- Estandarizar la transfección de miR-1305 en la línea celular de CMTN MDA-MB-231
- Evaluar el efecto de miR-1305 en la proliferación de células MDA-MB-231
- Evaluar el efecto de miR-1305 en la migración de células MDA-MB-231
- Obtener genes blancos predichos para miR-1305 e identificar vías de señalización donde estén involucrados.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Estrategia experimental

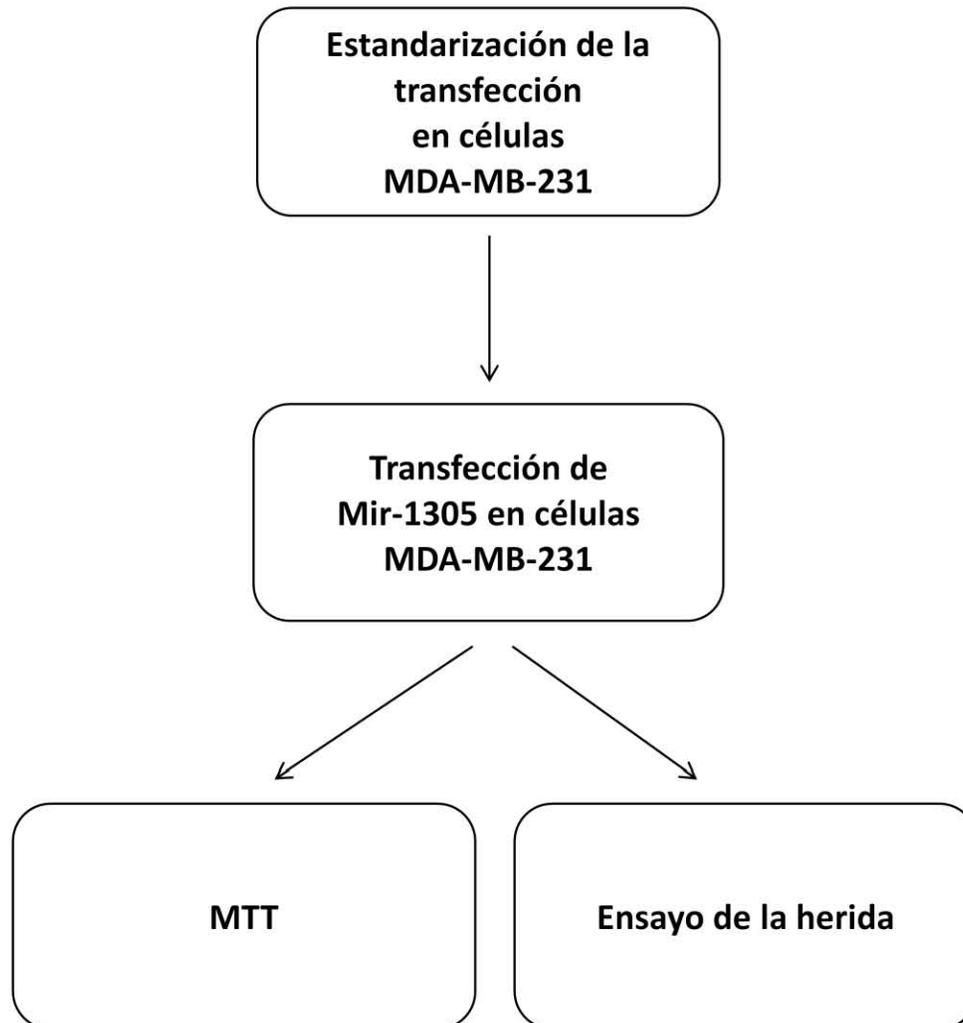


Figura 14. Diagrama de flujo de la estrategia experimental seguida en este trabajo

5.2. Cultivo celular

En el presente estudio se usó como modelo *in vitro* de CM tripe negativo la línea celular MDA-MB-231 (Chavez *et al*, 2010) obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células fueron cultivadas con medio DMEM/F12 1:1 (Liu *et al*, 2013) marca gibco suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) marca Corning, en un frasco T-75 e incubadas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas. Una vez alcanzada la confluencia del 75%, se retiró el medio de cultivo y se lavó con 5 mL de PBS 1X, se agregaron 3 mL de verseno y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. En seguida, se agregaron 2 mL de tripsina-EDTA (Tripsina-0.53 mM EDTA 0.25% (p/v)) marca Corning y se incubó durante 5 min a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, se inactivó la tripsina añadiendo 5 mL de medio DMEM/F12 1:1 suplementado con 10% de SFB, se resuspendió, se pasaron los 10 mL de suspensión celular a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente, se descarto el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 3 mL de medio DMEM/F12 1:1 suplementado con 10% de SFB. En seguida se llevo a cabo el conteo celular con el método de azul tripano y se pasaron a dos frascos T-75 con una densidad de 1.5×10^6 células por frasco: un frasco fue para trabajar y el otro sirvió para mantener la línea celular.

5.3. Transfección

La transfección es el proceso mediante el cual se introducen ácidos nucleicos en células de mamífero, facilitando su integración o expresión al disponer de la propia maquinaria celular. Entre las aplicaciones de este método se incluyen estudios de función de genes, modulación de la expresión genética y producción de proteínas recombinantes. El material genético incluido en la célula puede encontrarse de manera estable o transitoria, dependiendo del método empleado y la naturaleza del material genético. La transfección estable (también conocida como transducción) ocurre cuando el gen marcado (transgen) es insertado en el genoma de la célula hospedera, permitiendo la expresión sostenida del transgen incluso después de las divisiones de las células hospederas. A diferencia de la transfección estable, en la transfección transitoria el material genético no es incorporado al genoma celular y en consecuencia sólo se expresa durante un periodo de tiempo muy corto (24-96 hrs) (Recillas *et al*, 2006).

Existen varios métodos de transfección y cada uno de ellos utiliza diferentes aproximaciones que deben ser consideradas dependiendo del tipo celular y el propósito. El método ideal debe tener alta

eficiencia de transfección, baja toxicidad celular, efectos mínimos sobre la fisiología normal, fácil de usar y reproducible. Con base en lo anterior, los métodos de transfección se pueden dividir en biológicos (mediado por virus), físicos (micro inyección y electroporación) y químicos (fosfato de calcio, polímeros catiónicos y lipofección) (Kim et al, 2010).

El método de lipofección es el más popular debido a su practicidad, eficiencia y costo. Emplea lípidos catiónicos que interactúan con el DNA o RNA, moléculas que en condiciones fisiológicas normales poseen una carga neta negativa, formando complejos de transfección (liposomas) por medio de los cuales pueden introducirse a la célula a través de la membrana plasmática, que también tiene una carga neta negativa, por endocitosis, (Dalby et al, 2004). Una vez adentro de la célula, los ácidos nucleicos salen de los liposomas y con ayuda de la maquinaria enzimática celular, ejercen su función influyendo en el fenotipo de esta.

5.3.1. Estandarización de la transfección

Para la transfección se empleó como reactivo la Lipofectamina 2000 (Invitrogen), que es un lípido catiónico y en lugar de un miRNA, se usó el siRNA *AllStars Hs Cell Death* (Qiagen). Este siRNA se dirige a genes que se expresan de forma ubicua y que son esenciales para la supervivencia de la célula, ocasionando muerte celular 48 a 96 hrs postransfección que se puede observar mediante microscopía óptica (qiagen.com). Con base en lo anterior, se aplicó el ensayo MTT (ver MTT) con el propósito determinar las condiciones óptimas para la transfección.

Se evaluaron tres concentraciones finales de siRNA *AllStars Hs Cell Death*, que fueron de 50, 75 y 100 nM, Lipofectamina 2000 a volúmenes finales de 0.25 y 0.5 μL , una relación 1:1 volumen-volumen de miRNA-Lipofectamina, cantidad de células a transfectar en placa de 96 pozos, que constó de 1×10^4 y 4×10^4 células por pozo y periodos de incubación de 24 y 48 hrs postransfección.

Doce horas antes de la transfección se sembraron células MDA-MB-231 en una placa de 96 pozos a la densidad correspondiente en un volumen final de 100 μL de medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB por pozo. El día de la transfección se prepararon los complejos diluyendo 0.25 ó 0.5 μL de siRNA *AllStars Hs Cell Death* con 24.75 ó 24.5 μL de medio Opti-MEM respectivamente. En seguida, se diluyeron 0.25 ó 0.5 μL de Lipofectamina 2000 en 24.75 ó 24.5 μL de Opti-MEM respectivamente y se incubó durante 5 min a TA. Transcurrido este tiempo, se mezclaron los 25 μL de miRNA - Opti-MEM con los 25 μL de Lipofectamina - Opti-MEM y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos de transfección. A continuación, se retiró el medio de cultivo del

pozo de la placa, se agregaron los 50 µL de complejos de transfección y se incubó a 37 °C durante 6 hrs. Un grupo control con células sin transfectar se estableció al mismo tiempo. Una vez cumplido el tiempo de incubación se sustituyeron los complejos por 100 µL de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB. A partir de entonces las placas se incubaron por 24 y 48 hrs respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación postransfección se realizó el ensayo MTT (ver MTT).

5.3.2. Transfección de miR-1305

Con el objetivo de evaluar el efecto de miR-1305 en MDA-MB-231 se utilizaron miRNAs *mimics*, que son moléculas sintéticas de RNA dúplex con las mismas secuencias de los miRNAs maduros endógenos y que imitan la función de estos. Para la inhibición se aplicó un miRNA inhibidor (Anti-miRNA), que es un oligonucleótido anti sentido diseñado con perfecta complementariedad a su secuencia blanco y con modificaciones químicas, como la tecnología de ácido nucleico bloqueado (ANB), que le confieren estabilidad (Lennox et al, 2011).

Para la transfección se utilizaron las concentraciones finales de 50 nM, 75 nM y 100 nM de miR-1305 mimic, miR-21 mimic, Control Negativo (cel-miR-67) (miRIDIAN microRNA Mimics, Dharmacon) y miR-1305 inhibidor (miRCURY LNA inhibitor, Exiqon). Las secuencias de los miRNAs maduros para la síntesis de los mimics se obtuvieron de miRBase (mirbase.org) (Tabla 4). Se empleó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) a una relación 1:1 (volumen-volumen) miRNA-Lipofectamina y para diluir ambos reactivos se utilizó medio Opti-MEM 1X (gibco).

miRNA	Secuencia madura
hsa-miR-1305	5'-UUUUCAACUCUAAUGGGAGAGA-3'
hsa-miR-21-5p (CP)	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
cel-miR-67-3p (CN)	5'-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3'

Tabla 4. Secuencias maduras de los miRNAs obtenidas de miRBase.org para la síntesis de los miRNAs mimics.

Doce hrs antes de la transfección se sembraron células MDA-MB-231 en una placa de 96 pozos a un volumen final de 100 μ L de medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB por pozo. El día de la transfección se prepararon los complejos diluyendo 0.25 μ L de miRNA mimic, CN o inhibidor con 24.75 μ L de Opti-MEM. En seguida, se diluyeron 0.25 μ L de Lipofectamina 2000 en 24.75 μ L de Opti-MEM y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se mezclaron los 25 μ L de miRNA - Opti-MEM con los 25 μ L de Lipofectamina - Opti-MEM y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos de transfección. A continuación, se retiró el medio de cultivo del pozo de la placa y se agregaron los 50 μ L de complejos de transfección y se incubó a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 6 hrs. Una vez cumplido el tiempo de incubación se sustituyeron los complejos por 100 μ L de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB. A partir de entonces las placas se incubaron por 48 hrs a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Cumpliéndose este periodo, se realizó el ensayo subsecuente.

5.4. Determinación de la viabilidad celular

Con el objetivo de determinar el efecto de miR-1305 en la proliferación de células MDA-MB-231 se realizó el ensayo de MTT. Este método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán, realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, permitiendo determinar la viabilidad mitocondrial de las células tratadas. Puede ser utilizado para medir citotoxicidad y proliferación celular ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido. Los resultados pueden ser leídos en un lector de microplacas (espectrofotómetro) y muestra un alto grado de precisión. Las principales ventajas de este ensayo colorimétrico son su rapidez, precisión y que no requiere el uso de algún radioisótopo (Mosmann et al,1983).

Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pozos y se sembró a una densidad celular de 1×10^4 células por pozo. Una vez cumplido el tiempo de incubación postransfección, se removió el medio de las placas, se añadieron 150 μ L de solución MTT 5 mg/mL-DMEM/F12 1:20 por pozo, a fin de obtener una concentración final de MTT por pozo de 0.25 mg/mL y se incubó durante 2 hrs a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. En seguida, se descartó el medio, se agregaron 150 μ L de isopropanol grado molecular por pozo y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por dos horas para la disolución de los cristales de formazan. Posteriormente, las placas fueron leídas en un lector de microplacas marca Thermo Labsystems, modelo Multiskan Ascent, a una longitud de onda de 570 nm.

5.5. Evaluación de la migración celular

Con el objetivo de evaluar el efecto de miR-1305 en la migración de células MDA-MB-231 se realizó el ensayo de la herida. Es un método simple y económico para estudiar la migración celular *in vitro*. Se basa en la observación de que, luego de la creación de una nueva grieta, llamada "herida" o "rayadura", en una monocapa celular confluyente, las células en el borde de la nueva grieta se moverán hacia la abertura para cerrar la "rayadura" hasta que los nuevos contactos célula-célula se establezcan de nuevo (Liang et al, 2007). Los pasos básicos implican la creación de la "herida" en una monocapa de células, la captura de las imágenes al principio y a intervalos regulares durante la migración celular para cerrar la herida, y la comparación de las imágenes para cuantificar la tasa de migración de las células (Rodriguez et al, 2005).

En este estudio se hicieron modificaciones al protocolo propuesto en 2007 por Liang y colaboradores, llevándose a cabo el ensayo en placas de 96 pozos con el propósito de tomar un sólo campo correspondiente a una sola foto por pozo (área del pozo= 0.5 cm^2) y se obtuvieron las fotos en un cámara conectada a un microscopio de campo claro invertido.

Se sembró a una densidad celular de 2.5×10^4 células por pozo. Doce hrs después, se efectuó la transfección y se incubó durante 48 hrs (ver transfección). En seguida, se realizaron las rayaduras a cada pozo usando una micropipeta con punta de $200 \mu\text{L}$ y un porta-objetos estéril como apoyo para lograr heridas verticales rectas. Posteriormente, se retiró el medio de los pozos, se lavaron con $100 \mu\text{L}$ de PBS 1X y se agregaron $100 \mu\text{L}$ de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB. Luego de lo anterior, se tomaron fotos correspondientes a las 0, 24 y 48 horas, una foto por pozo a un aumento de 4X en un microscopio invertido de campo claro Leica, modelo DMIL LED. Las imágenes se procesaron mediante el programa TScratch que calcula el porcentaje del área abierta de la herida.

5.6. Análisis estadístico

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, en todos los ensayos se aplicó la prueba de ANOVA unifactorial para determinar si hubo diferencias significativas entre los grupos y la prueba de Tukey para comparar la media de cada grupo con todas las demás. Todos los ensayos se realizaron 3 veces con $n= 3$ y el nivel de significancia fue de $p<0.05$. Ambos análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.

5.7. Análisis *in silico*

Con el objetivo de obtener genes blancos predichos para miR-1305 e identificar las vías de señalización donde participan, se realizó un análisis *in silico*, mediante las bases de datos disponibles en línea, targetScan y DAVID. TargetScan se utilizó con el propósito de buscar los genes blancos predichos para miR-1305 y para ubicar en cuáles vías de señalización participan estos genes se empleó DAVID.

VI. RESULTADOS

6.1. Estandarización de la transfección

Para poder determinar el efecto de miR-1305 en la proliferación y migración de células MDA-MB-231, primeramente se llevo a cabo la estandarización de la transfección con Lipofectamina 2000 usando el siRNA *AllStars Hs Cell Death*, con el propósito de provocar muerte celular que se evaluó mediante la aplicación del ensayo MTT. Se determinó que las condiciones óptimas de transfección son: un volumen final de Lipofectamina 2000 que no afectara la viabilidad en comparación al control de células sin tratamiento, la concentración fina de siRNA que ocasionara más muerte celular y un periodo de incubación postransfección en el cual se observara el mayor efecto de la concentración final del siRNA, es decir, donde se presentara el valor de densidad óptica (DO) más bajo, demostrando que efectivamente hubo transfección y el siRNA entró a las células. Lo anterior se probó en 10 mil y 40 mil células, ya que es el número de células que se necesita para la realización de los ensayos posteriores con miR-1305, MTT y ensayo de la herida, respectivamente. Como se observa en la Figura 14, a las 24 horas postransfección, en 10 mil células, con un volumen de 0.5 μ L de Lipofectamina se presentó la mayor disminución de la viabilidad en los grupos tratados con siRNA, siendo significativa al compararla con el grupo control s/t. Para 40 mil células, la disminución de la viabilidad más significativa, de los grupos tratados con siRNA, también se observó con 0.5 μ L de Lipofectamina, entre el grupo control s/t en comparación con 75 y 100 nM de siRNA. Sin embargo, con esta cantidad de células los valores de DO fueron mayores a 1.25, que es el valor mayor del intervalo que debe alcanzar la lectura correspondiente a las células sin tratamiento (van Meerloo et al, 2011). Por otra parte, como se muestra en la Figura 15, a las 48 hrs postransfección, en 10 mil células, la disminución de la viabilidad de los grupos tratados con siRNA, al compararlos con el control s/t y el control tratado con lipofectamina, fue tres veces significativa con ambos volúmenes de Lipofectamina, observándose mayor efecto de los grupos tratados con siRNA en las células tratadas con 0.5 μ L de Lipofectamina. Sin embargo, con esta cantidad de lipofectamina, la viabilidad del grupo tratado con Lipofectamina disminuye respecto al control s/t, lo que no ocurre con las células en las que se emplearon 0.25 μ L de Lipofectamina. En 40 mil células, usando 0.5 μ L de Lipofectamina, se obtuvo la mayor disminución de la viabilidad de los grupos tratados con siRNA, que fue tres veces significativa en comparación con el control s/t y el control tratado con Lipofectamina. Sin embargo, esta cantidad de células de nuevo proporcionó valores de DO superiores a 1.25. Curiosamente, en este ensayo no hubo diferencias significativas entre ninguna de las tres concentraciones de siRNA. Con base en lo anterior, se

determinó que un volumen final de 0.25 μ L de Lipofectamina y 48 hrs de incubación postransfección, son las condiciones optimas para llevar a cabo la transfección de miR-1305 y posteriormente evaluar su efecto en la proliferación celular con el ensayo de MTT. Como no hubo diferencias significativas entre las tres concentraciones de siRNA, se decidió volver a probar las mismas tres concentraciones en los ensayos posteriores. Estas mismas condiciones se emplearon para realizar el ensayo de la herida ajustando la cantidad de células a 25 mil, con la finalidad de obtener una confluencia celular aproximadamente del 100% al momento del ensayo.

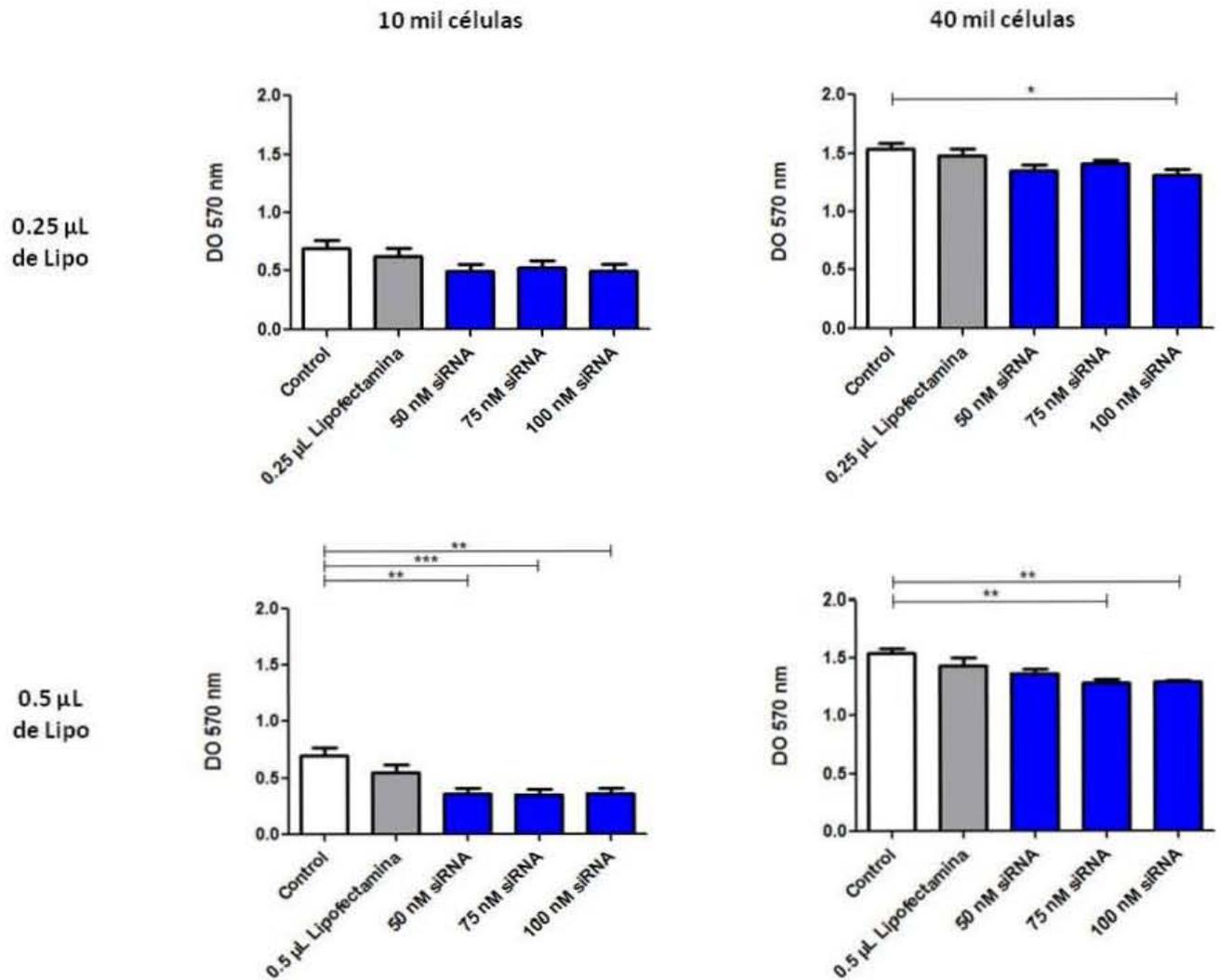


Figura 14. Ensayo de MTT en MDA-MB-231 24 horas postransfección de siRNA *AllStars Hs Cell Death*. Se probaron las concentraciones finales de 50, 75 y 100 nM de siRNA (barras azules) y 0.25 y 0.5 µL Lipofectamina 2000 en 10 mil y 40 mil células. * $p < 0.05$.

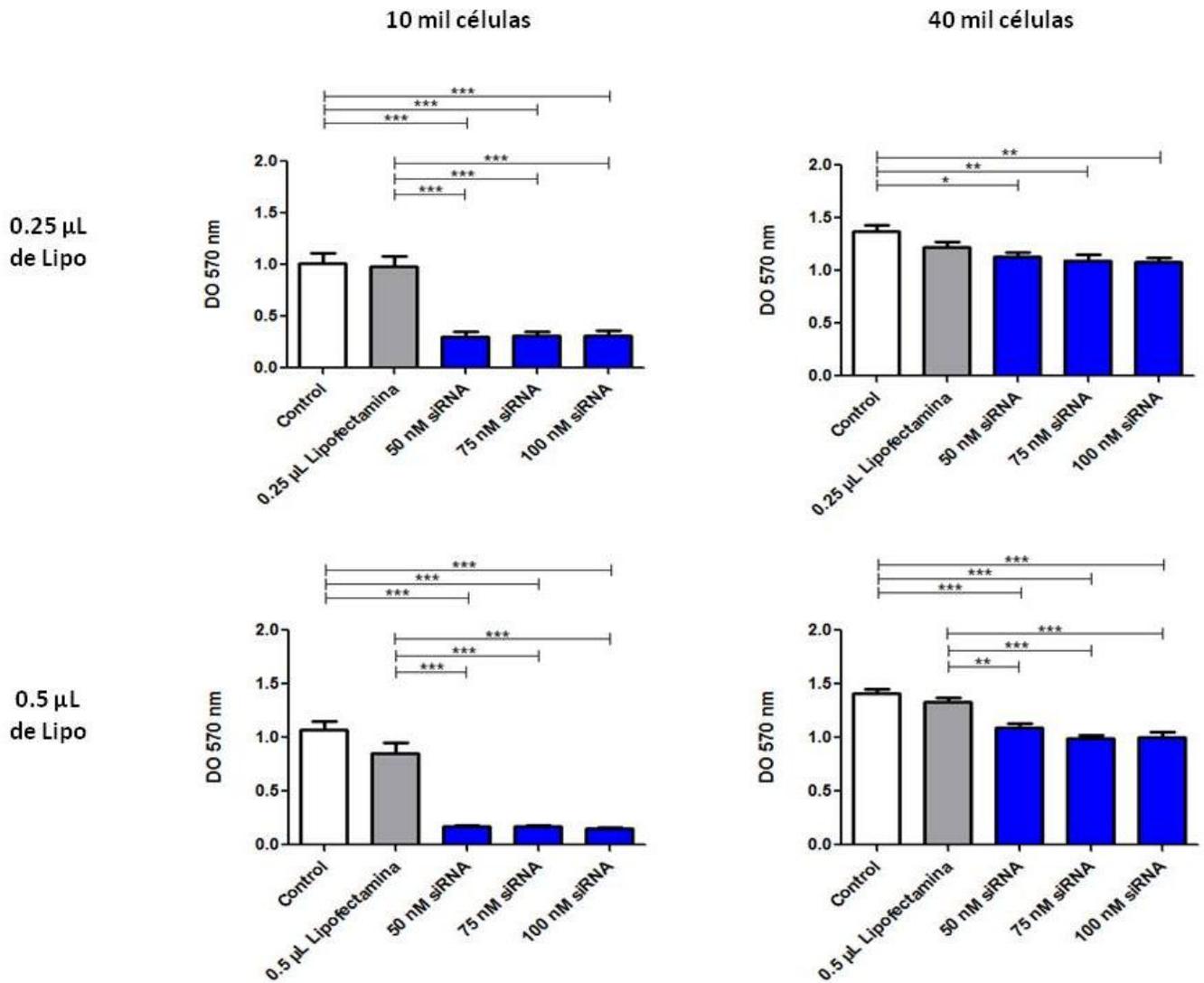


Figura 15. Ensayo de MTT en MDA-MB-231 48 horas postransfección de siRNA *AllStars Hs Cell Death*. Se probaron las concentraciones finales de 50, 75 y 100 nM de siRNA (barras azules) y 0.25 y 0.5 µL Lipofectamina 2000 en 10 mil y 40 mil células. * $p < 0.05$.

6.2. Ensayo MTT

Con el objetivo de evaluar el efecto de miR-1305 en la proliferación celular en MDA-MB-231, se realizó el ensayo MTT 48 horas después de la transfección. Como se observa en la Figura 16, a excepción del control de Lipofectamina, todos los tratamientos tuvieron diferencias significativas con respecto al control s/t. Sin embargo, hubo una leve disminución de la proliferación en el control de Lipofectamina en comparación con el control s/t, pero no fue significativa. No se observaron diferencias significativas en los valores de DO de ninguno de los tratamientos con respecto al control de Lipofectamina o al control negativo (CN), por lo cual se concluyó que miR-1305 no tuvo efecto en la proliferación celular en MDA-MB-231.

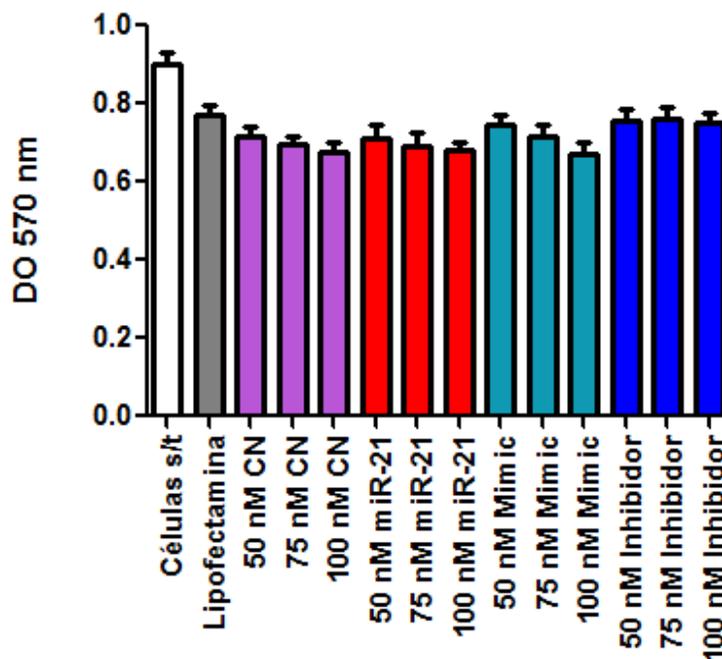


Figura 16. Ensayo de MTT en MDA-MB-231 transfectadas con miR-1305. Se probaron las concentraciones finales de 50, 75 y 100 nM de miR-1305 (turquesa), miR-1305 inhibidor (azul), control negativo (CN, morado) y miR-21 (control positivo, rojo). miR-1305 no tuvo efecto significativo en la proliferación celular. * $p < 0.05$.

6.3. Ensayo de la herida

Con el objetivo de evaluar el efecto de miR-1305 en la migración de células MDA-MB-231, se llevó a cabo el ensayo de la herida 48 hrs después de la transfección y se procesaron las fotos tomadas de la herida a las 0, 24 y 48 hrs mediante el programa TScratch (Figura 17). Como se muestra en la Figura 18, 24 hrs después de la realización de la herida, las únicas diferencias significativas en el porcentaje de cierre de la herida se presentaron entre las concentraciones de miR-1305 mimic, donde hubo una muy leve disminución del porcentaje de cierre de la herida en las concentraciones de 75 y 100 nM con respecto a la de 50 nM; y en 100 nM de miR-1305 mimic en comparación con 100 nM de su inhibidor. Sin embargo, no hubo diferencias significativas de ninguno de los tratamientos en comparación con el grupo control s/t, control de Lipofectamina o con alguna de las concentraciones del control negativo (CN). Por otra parte, a las 48 hrs después de haber realizado la herida, el porcentaje de cierre de esta fue del 100% en todos los controles y tratamientos, por lo cual se concluye que miR-1305 no tuvo efecto en la migración de MDA-MB-231.

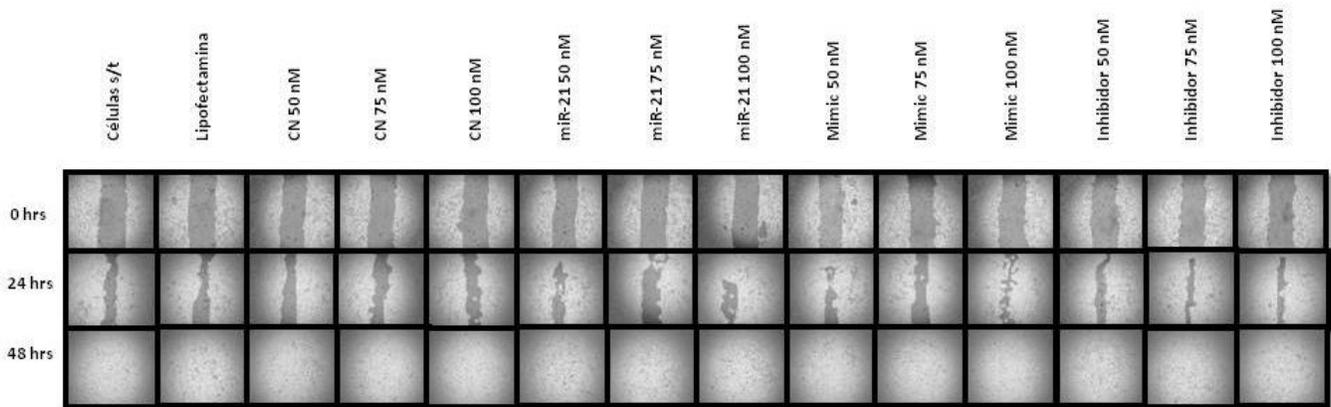


FIGURA 17. Imagen representativa del ensayo de la herida en células MDA-MB-231 transfectadas. Se muestran fotos a las 0, 24 y 48 hrs después de la realización de la herida.

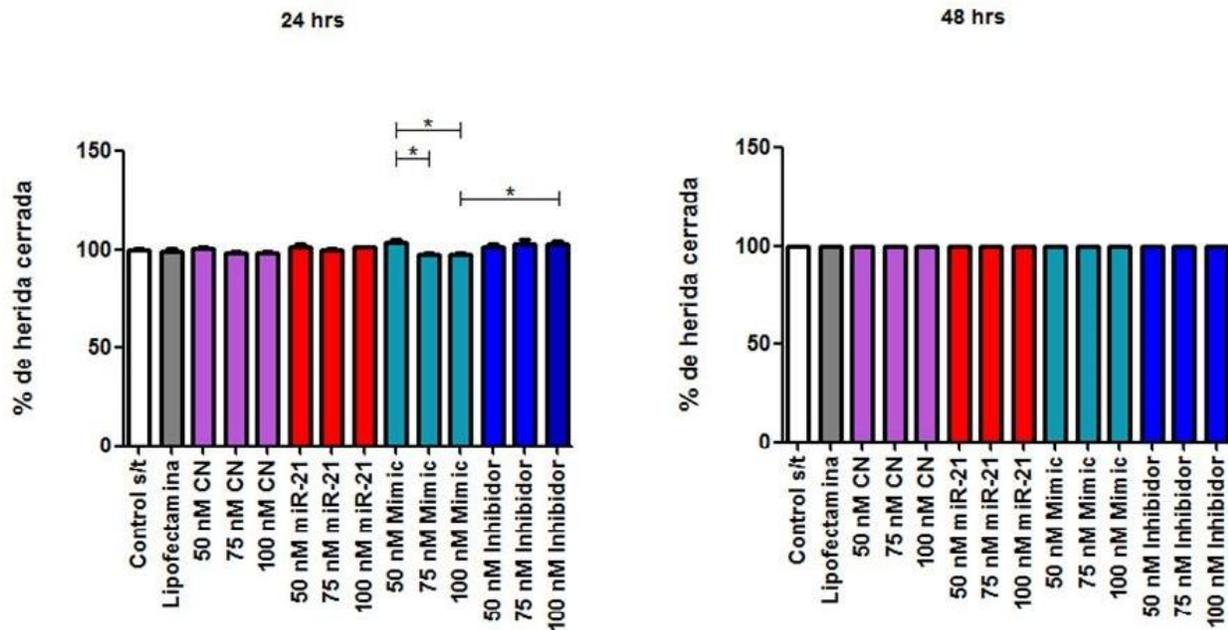


Figura 18. Ensayo de la herida en MDA-MB-231 transfectadas con miR-1305. Se probaron las concentraciones finales de 50, 75 y 100 nM de miR-1305 (turquesa), miR-1305 inhibidor (azul), control negativo (CN, morado) y miR-21 (control positivo, rojo). Se observan las gráficas correspondientes a 24 y 48 hrs luego de la realización de la herida. miR-1305 no tuvo efecto significativo en el cierre de la herida. * $p < 0.05$.

6.4. Análisis *in silico*

En el análisis *in silico* realizado a través de las bases de datos targetScan, con la cual se buscaron los genes blancos de miR-1305, y DAVID, base de datos que analizó las vías de señalización donde participan estos genes, se obtuvieron genes implicados en la respuesta inmune innata, tales como *CXCL1*, *IL8*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CCL8*, *CCL18*, *IL23A*, *IL2RA*, *IL2RB*, *GHR*, *HGF*, *KITLG*, *IL22RA2*, *IL26*, *EGFR*, *SF11A*, *TNFSF18*, *ACVR2*, *IL1A*, *IL18R1* y *IL8RB*. Genes que participan en la vía de señalización de p53 como *TP53*, *MDM2*, *ATM* (Biocarta), *GADD45*, *p53R2*, *CDK4/6*, *CDK2*, *Siah*, *ciclina G* y *Siah1*. Genes implicados en el desarrollo de melanoma, incluyendo *GF*, *RTK*, *PI3K*, *TP53*, *MDM2* y *CDK 4/6*. Genes para la regulación de ciclo celular como *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *GADD45* y

WEE1 (KEGG 2015, Biocarta). Genes que relacionados con hipoxia, incluyendo algunos ya mencionados como *TP53*, *MDM2*, *GADD45*, *ATM* y *HSP70* (Biocarta). Entre sus blancos también se encuentran genes involucrados en el tráfico de vesículas asociadas al aparato de Golgi, a través de la membrana, tales como *ARF1*, *SEC24D*, *AP1S2*, *ARCN1*, *CLTC* y *VAMP7* (Reactome) (Figura 19).

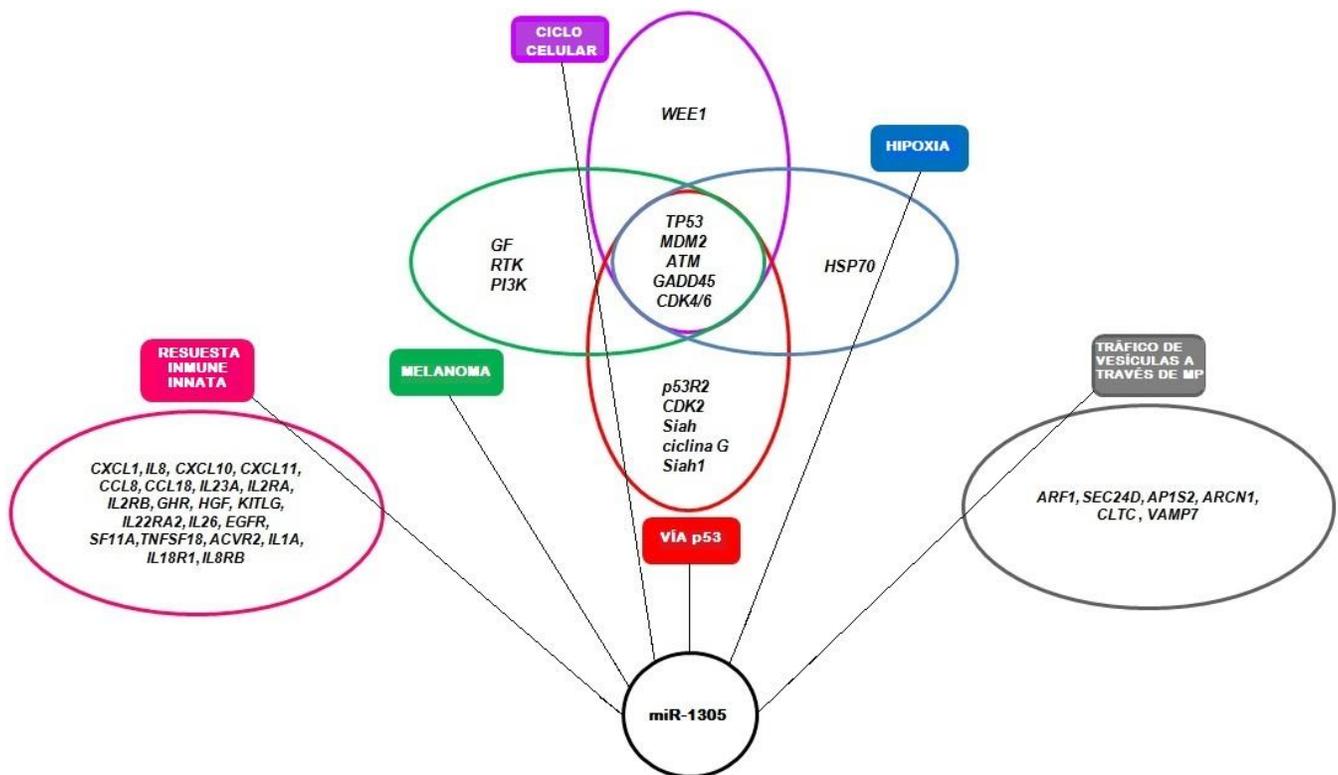


Figura 19. Genes blancos predichos para miR-1305 y rutas de señalización implicadas

VII. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue caracterizar el papel de miR-1305 en procesos oncogénicos en modelos *in vitro* de CMTN. Específicamente, se evaluó el efecto de miR-1305 en la proliferación y migración de la línea celular de CMTN MDA-MB-231. Para lo anterior, se aplicó el ensayo MTT y se realizó el ensayo de la herida respectivamente. Los resultados de ambas pruebas indicaron que miR-1305 no tuvo efecto en estos procesos, lo que sugiere que este miRNA no participa en estos eventos, al menos en MDA-MB-231. Dada la heterogeneidad de este tipo de tumores de mama, la evaluación de miR-1305 en líneas celulares representativas de alguno de los otros subtipos de CMTN propuestos por Lehmann y colaboradores en 2011, podría darnos un panorama más completo del desempeño de este miRNA en la proliferación y migración en carcinomas TN. Además de haber empleado un único modelo de CMTN, en este estudio también nos limitamos a analizar únicamente dos procesos carcinogénicos. Como no se han realizado estudios para caracterizar la función de miR-1305, así como para validación de genes blancos, los resultados del análisis *in silico* de miR-1305 en targetscan conciernen solamente a blancos predichos. Estos forman parte de diversas vías de señalización. Las más relevantes para CM corresponden a la vía de p53 y ciclo celular, las cuales están estrechamente vinculadas; la señalización en respuesta a hipoxia y genes que también están relacionados con melanoma. En las cuatro rutas anteriores se encontraron genes específicos para cada una, así como genes en común entre ellas. También se encontraron blancos en rutas implicadas en otro tipo de procesos que contribuyen a la progresión tumoral, como la respuesta inmune innata y el tráfico de vesículas, relacionadas con el aparato de Golgi, a través de la membrana plasmática. La mayor cantidad de blancos de miR-1305 en todas las vías analizadas en este estudio, se presentaron en la respuesta inmune innata, encontrándose 21 genes, y más precisamente, en la respuesta inflamatoria (Figura 19). De estos, cuatro genes (*CXCL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IL8*) codifican para quimiocinas, agentes quimiotácticos que atraen a los leucocitos al sitio de infección y propician la intra y extravasación, así como la angiogénesis. Se ha demostrado que estas moléculas juegan un papel muy importante en la progresión, metástasis y quimioresistencia del CM. *CXCL1* es una citoquina quimiotáctica que regula la progresión del cáncer de mama y quimioresistencia (Zou et al, 2014). Constituyen una red paracrina, junto con el *CXCL2*, que media la metástasis de pulmón y quimioresistencia en cáncer de mama (Acharyya et al, 2012). La señalización *CXCL10/CXCR3* interviene en las interacciones parácrinas y autócrinas entre células tumorales y estromales, que promueven el crecimiento tumoral, migración y metástasis (Wightman et al, 2015), mediante la inducción de las vías de señalización survivina, β -catenina, *MKP-1* y *MMP-1* (Ejaeidi et al, 2015). Además, la interacción de *CXCL11* con sus respectivos receptores, *CXCR3* y *CXCR7*, promueve la

invasión en CM a través de la activación de la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP), como MMP-1, MMP-13, MMP-2 y MMP-9 (Mosley et al, 2009). IL-8 es otro factor quimiotáctico cuyo gen (CXCL8) es blanco de miR-1305. Se ha reportado que la señalización de IL-8 tienen un papel muy importante en la EMT en CM y cáncer de pulmón (Fernando et al, 2011). La relevancia clínica de IL-8 se exhibió en el trabajo de Rody y colaboradores, quienes propusieron un ratio de alta presencia de células B y una baja actividad de IL-8, como un marcador de pronóstico favorable en CMTN, además de resaltar la inhibición de la ruta de esta interleucina como un blanco terapéutico atractivo (Rody et al, 2011). Otro estudio demostró que las células de CM en el borde anterior del tumor, presentan los niveles más altos de expresión de IL 8, en comparación con las células residentes en el tumor, estimulando la migración, invasión, intravasación y metástasis (Patsialou et al, 2012). Entre los genes blancos de miR-1305 que participan en el tráfico de vesículas asociadas al aparato de Golgi, *VAMP7* está implicado en la fusión de vesículas de transporte con sus membranas blanco. Por otra parte, *ARCN1* (*archain1*), *AP1S2* y *CLTC* codifican para proteínas clatrina-asociadas (ncbi.nlm.nih.gov 2015). Las clatrininas son proteínas que recubren las vesículas de transporte facilitando su endocitosis y exocitosis. Los exosomas son vesículas secretadas por todos los tipos celulares. En su interior contienen proteínas y ácidos nucleicos. Estas vesículas son liberadas al ambiente extracelular y pueden ser absorbidas por células receptoras. Se ha demostrado que las células cancerígenas, como MDA-MB-231, secretan miRNAs oncogénicos mediante este tipo de transporte (Zou et al, 2014). Recientemente, en un estudio realizado por Melo y colaboradores, se encontró que los exosomas producidos por células de CM, además de portar miRNAs, contienen los elementos responsables de la maduración de miRNA en citoplasma, como Dicer, TRBP, AGO2, lo que sugiere que el miRNA es incluido en la vesícula como pre-miR y dentro de esta, lleva a cabo su maduración. Estos miRNAs influyen en las células sanas, cambiando su transcriptoma, promoviendo su tumorigénesis (Melo et al 2014). De acuerdo a la función de todos estos genes en las vías antes mencionadas, miR-1305 podría fungir como un miRNA supresor tumoral, ya que la cantidad de genes blancos supresores es mucho menor, como el caso de *TP53*, *WEE1* y *ATM*. Esta observación descarta la hipótesis planteada en este estudio, sugiriendo que miR-1305 podría desempeñar un papel de miRNA supresor de tumores en células MDA-MB-231.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se llevó a cabo la estandarización de la transfección, en donde se determinaron las condiciones óptimas para este ensayo.
2. Se llevó a cabo la transfección de miR-1305 en células MDA-MB-231.
3. Se realizaron los ensayos de MTT y de la herida en células MDA-MB-231, con los que se evaluó la proliferación y migración respectivamente.
4. En el modelo de la línea celular MDA-MB-231 se observó que miR-1305 no tiene efecto en la proliferación ni en la migración.

IX. PERSPECTIVAS

Es necesario hacer estudios enfocados en la evaluación de miR-1305 en otros procesos oncogénicos, como la invasión, metástasis e interacción con el microambiente tumoral, en células MDA-MB-231 y en otras líneas celulares de CMTN. De gran importancia y para entender la función de miR-1305 en los procesos mencionados, es imprescindible evaluar su expresión endógena y diferencial en esta línea celular, así como en modelos de CM ER-positivos (MCF-7) y en células de mama normal (MCF-10), y realizar experimentos con el objetivo de validar sus genes blanco, que actualmente sólo están predichos, implicados en la progresión del CMTN. Esto permitirá identificar blancos moleculares para el desarrollo de terapias dirigidas y el establecimiento de biomarcadores para esta heterogénea enfermedad.

X. REFERENCIAS

- Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P., Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V., Norton, L., Brogi, E., Massague, J. 2012. A CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis. *Cell*. 150: 165–178
- Ali, S., Coombes, C. 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer*. Vol 2: 101-112
- Alizart, M., Saunus, J., Cummings, M., Lakhani, S. 2012. Molecular classification of breast carcinoma. *Diagnostic histopathology*. 18(3): 97-103
- Allred, DC. 2010. Ductal Carcinoma In Situ: Terminology, Classification, and Natural History. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. 41: 134–138
- Alluri, P., Newman, L. 2014. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives. *Surgical Oncology Clinics N Am*. 23: 567–577
- Balko, J., Stricker, T., Arteaga, C. 2013. The genomic map of breast cancer: which roads lead to better targeted therapies? *Breast Cancer Research*. 15: 209
- Ban, K., Godellas, C. 2014. Epidemiology of Breast. *Cancer Surgical Oncology Clinics of North America*. 23(3):409–422
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, Vol. 116: 281-297.
- Bartel, D. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136:215–233
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., et al. 2008. How basal are triple-negative breast cancers? *International Journal of Cancer*. 123 (1):236–40
- Borchert, G., Lanier, W., Davidson, B., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*. 13: 1097–1101
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al, 2002. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 15524–15529.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, 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;101:2999–3004.
- Cascione, L., Gasparini, P. 2013. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One*. 8: e55910

- Chi, S., Hannon, G., Darnell, R. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol.*19:321–327
- Cornen, S., Guille, A., Adélaïde, J., Addou-Klouche, L., Finetti, P., Saade, MR., et al, 2014. Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS One.* 9(1):e81843
- Curtis, C., Shah, S., Chin, S., Turashvili, G., Rueda, O., Dunning, M., Speed, D., Lynch, A., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., METABRIC Group., Langerod, A., Green, A., Provenzano, E., Whishart, G., Pinder, S., Watson, P., Markowets, F., Murphy, L., Ellis, I., Purushotham, A., Borresen, A., Brenton, J., Tavaré, S., Caldas, C., Aparicio, S. 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486: 346-352
- D'Ippolito, E., Iorio, M.V. 2013. MicroRNAs and triple negative breast cancer. *Molecular Sciences*, Vol 14: 22202-22220.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E., Tilkins, M., Price, P., Ciccarone, V. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33: 95-103
- Ejaeidi, A., B., L., Lewis, R., Cruse, J. 2015. Hormone receptor-independent CXCL10 production is associated with the regulation of cellular factors linked to breast cancer progression and metastasis. *Experimental and Molecular Pathology.*99 (1):163-172
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez, J., Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews.* 38: 698:707
- Eulalio, A., Behm, I., Izaurralde, E. 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 9–22
- Fernando, R., Castillo, D., Litzinger, M., Hamilton, D., Palena, C., et al, 2011. IL-8 Signaling Plays a Critical Role in the Epithelial–Mesenchymal Transition of Human Carcinoma Cells.
- Fillipini, S., Vega, A. 2013. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Frontiers in Bioscience*, Vol 18: 1358-1372
- Franklin, M., Carey, K. Vajdos, F., Leahy, D., de Vos, A., Sliwkowski, M. 2004. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer cell.* 5(4):317-328
- Glen M Borchert, William Lanier, Beverly L Davidson. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* volume 13 number 12 december 2006.

- Grimson, A., Farh, K., Johnston, W., Garrett, P., Lim, L., Bartel, D. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 27:91–105
- Ha, M., Kim, V., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular cell Biology*. 15(8):509-24
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, Vol 100: 57-70
- Herschkowitz, J., Simin, K., Weigman, V., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K., Jones, L., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M., Yin, Y., Khramtsov, A., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R., Brown, P., Green, J., Kopelovich, L., Furth, P., Palazzo, J., Olopade, O., Bernard, P., Churchill, G., Van Dyke, T., Perou, C., 2007. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*.8(5):R76
- Iorio, M., Croce, C. 2012. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*. 33(6): 1126-1133
- Iorio, M., Casalini, P., Piovan, C., Braccioli, L., Tagliabue, E. 2011. Breast cancer and microRNAs: Therapeutic impact. *The Breast*. 20: 563-570
- Iorio, M., Casalini, P., Tagliabue, E., Ménard, S., Croce, C. 2008. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *European Journal Of Cancer*. 44: 2753:2759
- Iorio, M.V., Sabbioni, S., Ménard, S., Nenci, I., Ferracin, M., Magri, E., Palazzo, J. P., Calin, G. A., Liu, C., Pedriali, M., Rosenberg, A., Querzoli, P., Veronese, A., Fabbri, M., Musiani, P., Negrini, M., Spizzo, R., Campiglio, M., Volinia, S., Croce, C. M. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 65: 7065-7070.
- Jones, S., Li, M., Markowitz, S., Goggins, M., Velculescu, V., Parsons, D., Yan, H., Bigner, D., Maitra, A., Zhang, X., Hruban, R., Malek, S., Papadopoulos, N., Wesseling, J., Powell, S., Eshleman, J., Vogelstein, B., Kristel, P., Schmidt, M., Iacobuzio-Donahue, C., Kinzler, K. 2011. Somatic Mutations in the Chromatin Remodeling Gene ARID1A Occur in Several Tumor Types. *Human mutation*. Vol. 33(1): 100-103
- Kim, T., Eberwine, J. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397: 3173–3178
- Kim, V., Han, J., Siomi, M., 2009. Biogenesis of small rnas in animals. *Nature Reviews Molecular cell Biology*. 10(2):126-39
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews*. 11: 597-610

- Lalloo, F., Evans, D. 2012. Familial breast cancer. *Clinical Genetics*. 82:105-114
- Lam, S., Jimenez, C., Boven, E. 2014. Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. *Cancer Treatment Reviews*, Vol 40: 129-138.
- Larsen, M., Thomassen, M., Gerdes, A., Kruse, T. 2014. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 8:145–155
- Le Quense, J., Caldas C. 2010. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular oncology* 4:230e241
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Ra, O., Kim, S., Kim, V.N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, Vol. 425: 415-418.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J., Kim, S., Kim, V. N. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, Vol. 21, No. 17: 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S., Kim, N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by polymerase II. *The EMBO Journal*, Vol. 23: 4051–4060
- Lehmann, B., Bauer, J., Chen, X., Sanders, M., Chakravarthy, A., Shyr, Y., et al. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 121:2750–2767.
- Lennox, K., Behlke, M. 2011. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Therapy*. 18: 1111-1120
- Liang, C., Park, A., Guan, J. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*. 2(2):329-33.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K., Andre´, F., Tordai, A., Mejia, J., Symmans, W., Gonzalez, A., Hennessy, B., Marjorie Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G., Pusztai, L. 2008. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of clinical oncology*. Vol. 26. 8: 1275-1281
- Liu, H., Wang, Y., Li, X., Zhang, Y., Li, J., Zheng, Y., Liu, M., Song, X., Li, X. 2013. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1. *Tumor Biology*. 34: 1713-1722
- Ma, C., Liu, Y., He, L. 2009. microRNAs - powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci*, 52 Vol. 4: 323–330
- Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., Raza, A. 2011. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15 (8): 3353-3358

- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., Band, V. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 10 (10): 955-60
- Martin, H., Wani, S., Steptoe, A., et al., 2014. Imperfected centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. *Genome Biology*. 15:R51
- Maughan, K., Jutterbif, M., Ham, P. 2010. Treatment of breast cancer. *American Family Physician*. 81(11): 1339-1346
- Melo, S., Sugimoto, H., O'Connell, J., Kato, N., 2014. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*. 26(5):707-21
- Moasser, M. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 26:6469-6487
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 16; 65 (1-2):55-63
- Mosley, L., Singh, R., Sharma, P., Singh, S., Singh, R., Lillard, J. 2009. CXCL11 and CXCL12 mediate matrix metalloproteinase expression by breast cancer cells through CXCR7. *Journal of Immunology*. 182, 98.2
- Munagala, R., Agil, F., Gupta, R. 2011. Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian Journal of Pharmacology*. 43(3): 236–245
- Nowsheen, S., Aziz, K., Tran, P., Gorgoulis, V., Georgakilas, A., Yang, E. 2014. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. *Cancer Letters*. 342: 213–222.
- Pasqualini, J. 2008. Breast cancer: prognosis, treatment, and prevention. 2da edición. New York: Informa Healthcare. 596 p.
- Patsialou, A., Wang, Y., Lin, J., et al, 2012. Selective gene-expression profiling of migratory tumor cells in vivo predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 14:R139
- Perou, C.M.; Sorlie, T. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, Vol 406: 747–752.
- Recillas-Targa F (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology* 34(3):337–354
- Reis-Filho, J., Pusztai, L. 2011. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378:1812-1823

- Reis-Filho, S., Tutt, A. 2008. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 52:108–118
- Rita, N. 2012. New developments in the treatment of HER2positive breast cancer. *Breast Cancer*, 4:53-64
- Rivenbark, AG., O'Connor, SM., Coleman WB. 2013. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer Challenges for Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology*. Vol. 183 (4): 1113-24
- Rodriguez, L., Wu, X., Guan, L. 2005. Wound-healing assay. *Methods in Molecular Biology*. 294:23-9.
- Rody, A., Karn, T., Liedtke, C., et al, 2011. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research*. 13:R97
- Ross, Michael H., Pawlina, Wojciech. 2007. *Histología: Texto y Atlas color con biología celular y molecular*. Quinta edición. Editorial médica panamericana. pp 864-868.
- Schmadeka, R., Harmon, B., Singh, M. 2014. Triple-Negative Breast Carcinoma Current and Emerging Concepts. *American Journal of Clinical pathology*, Vol 141: 462-477.
- Schwab, M.(Ed.). 2012. *Encyclopedia of Cancer*. Third edition. Springer. pp 522-523
- Serpico, D., Molino, L., Di Cosimo, S. 2014. miRNAs in breast cáncer development and treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 40: 595-604
- Shin, C., Nam, J., Farh, K., Chiang, H., Shkumatava, A., Bartel, D. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*. 38:789–802
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418-23.
- Stefansson, O., Esteller, M. 2013. Epigenetic Modifications in Breast Cancer and Their Role in Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology*, Vol 183, No. 4.
- Stephens, P., Tarpey, P., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. et al, 2012. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 486(7403):400-404
- The Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. Vol 490 (7418): 61–70

- Turner, N., Reis, J. 2013. Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 19: 6380-6388
- Vaca, F., Álvarez, R., Aquiles. H., et al, 2015. Revealing the Molecular Portrait of Triple Negative Breast Tumors in an Understudied Population through Omics Analysis of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *PLOS ONE*.10(5): e0126762
- Van Meerloo, J., Kaspers, G., Cloos, J. 2011. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer cell culture Methods and Protocols*. Springer Protocols. pp 237-245
- Van Rooij, E. 2011. The art of MicroRNA research. *Journal of the American Heart Association*, Vol 108: 219-234
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. 2002. *The genetic basis of human cancer*. McGraw Hill Higher Education; segundaedición. P. 821
- Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B., Cummings, M. C., Lakhani, S. R. 2014. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* . Jul;465 (1) : 1-14.
- Wesolowski, R., Ramaswamy, B. 2011. Gene Expression Profiling: Changing Face of Breast Cancer Classification and Management. *Gene Expr*. 15 (3): 105–115.
- Wightman, S., Uppal, A., Pitroda, S., Ganai, S., Burnette, B., Stack, M., Oshima, G., Khan, S., Huang, X., Posner, M., Weichselbaum, R., Khodarev, N. 2015. Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome. *British Journal of Cancer*. 113: 327-335
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R., Diederichs., S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 11(3): 228-234
- Xu, Hong.,Eirew, Peter., Mullaly, Sarah C., Aparicio, Samuel. 2014. The Omics of Triple-Negative Breast Cancers. *Clinical Chemistry* 60:1 122–133
- Yersal, O., Barutca, S. 2014. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*. 5(3): 412-424
- Zou, A., Lambert, D., Yeh, H., et al, 2014. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β signaling proteins. *BMC Cancer*.14: 718
- Zhou, W., Fong, M., Min, Y., Somlo, G., et al, 2014. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* . **25**: 501–515