



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
GENÓMICA DEL CÁNCER

**CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE TUMORES DE MAMA TRIPLES NEGATIVOS
MEDIANTE ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS Y
MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS.**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA
SANDRA LORENA ROMERO CÓRDOBA**

TUTOR PRINCIPAL
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA, FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
**DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**
**DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D. F. , Diciembre 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.

**DEDICADO A MIS PADRES
JOAQUIN ROMERO OLIVARES
MARÍA TERESA CÓRDOBA MEJÍA**

A LA MEMORIA DEL DR. JOAQUIN ROMERO OLIVARES

*“La ciencia es más que un cuerpo de conocimiento, es una forma de pensar,
una forma de interrogar con escepticismo al universo”
Carl Sagan*

Índice

Agradecimientos.....	4
Resumen	5
Abstract.....	6
Introducción	8
Generalidades de la glándula mamaria.	8
Cáncer de mama.....	10
Cáncer de mama: un nuevo reto en la salud pública.....	13
miRNA: importantes reguladores post-tranccripcionales.....	18
miRNAs como elementos regulatorios de la expresión génica en los tumores triple negativos.	27
miRNAs como clasificadores de tumores triple negativos	29
Justificación	31
Planteamiento del problema	32
Pregunta experimental:	33
Hipótesis:	33
Objetivos.....	34
Objetivo General.....	34
Objetivos Específicos	34
Materiales y métodos.....	35
Obtención de muestras tumorales	35
Extracción de RNA	36
Análisis de patrones de expresión de microRNAs	36
Análisis Bioinformáticos para los perfiles de expresión de miRNAs	36
Firma de miRNAs derivada para subclasificar los tumores TN.....	37
Validación independiente del clasificador con datos públicos	38
Enriquecimiento de rutas y análisis ontológicos	38
Asociación de subgrupos con parámetros clínicos.....	39
Perfil de expresión diferencial de miRNAs entre tumores triple negativos y otros subtipos	39
Validación funcional experimental	40
Análisis funcionales de los procesos celulares tras la expresión exógena de miR-342-3p.....	41
Análisis de Patrones de Expresión Génica en células transfectadas y no transfectadas con premiRs.....	42
Análisis bioinformáticos para definir la expresión génica de la línea con expresión exógena de miR-342-3p.....	42

Western Blot:	43
Construcción de plásmidos.....	43
Transfección del vector psiCheck en modelo celular y análisis de gen reportero	45
Consumo de lactato exógeno	45
Consumo de lactato intra y extra celular	45
Análisis estadísticos.....	46
Resultados	47
Muestras clínicas evaluadas	47
Clasificación de tumores triple negativo	48
Distintas rutas y procesos celulares se asocian a cada subtipo de miRNAs de tumores triple negativos.	49
Características clínicas por subtipo	53
Relación de los subtipos TN basados en expresión de miRNAs con los subtipos de Lehmann basado en expresión de RNAm.....	56
Firma derivada recapitula clasificación de tumores triple negativos	57
Caracterización de los miRNAs que clasifican los subtipos de tumores TN.....	57
Correlación de la expresión de miRNAs y la expresión de RNAm predichos como blancos transcripcionales	58
Sub-clasificación de modelos celulares de tumores triple negativos	59
Validación independiente de la expresión abatida de miR-342-3p en tumores triples negativos	60
miR-342-3p suprime proliferación, viabilidad y migración de células humanas de tumores triple negativos	61
MCT1 es un blanco directo de miR-342-3p.	63
MCT1 esta correlacionado negativamente con miR-342-3p en los tumores de mama triple negativo	65
miR-342-3p inhibe el consumo de lactato exógeno.....	67
La cantidad de lactato y glucosa intra y extracelular se alteran con la inhibición de MCT1 por miR-342-3p.....	67
La expresión de miR-342-3p es promovida por el receptor de estrógenos.....	70
Discusión.....	75
Conclusión	85
Bibliografía.....	86
Anexos	92
Publicaciones.....	106

Agradecimientos

A mis padres por que a lo largo de esta aventura me apoyaron incondicionalmente, siempre encontré una palabra de aliento, una sugerencia útil. Sin ustedes este sueño no hubiese sido posible. Gracias por siempre interesarse en mí quehacer científico y motivarme a nunca rendirme. Mamá, gracias por procurarme, por aconsejarme, por compartir conmigo cada experiencia, gracias por estar siempre en mi vida. A mi papá, gracias por tus largas charlas, por tus consejos y sabiduría, por tu amor, te extraño mucho.

A mi tutor Alfredo Hidalgo quien desde hace ya varios años me brindó la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia, quien no sólo me mostró como generar preguntas científicas, si no lo emocionante e interesante que es el cuestionar los procesos, el siempre ser curiosa. Gracias también por tu confianza, apoyo y amistad. Este tiempo fue una experiencia de vida única.

A mis compañeros del INMEGEN Rosa, Mónica, Luis, Rocío, Alberto, Fredy, Susy y Pily por brindarme su tiempo para discutir temas científicos y principalmente, aquellos no científicos que amenizan las mañanas y tardes en el laboratorio.

A Iván por compartir tantos sueños, alegrías y tristezas. Gracias por ser mi compañero de estudio, de laboratorio, de diversión y de vida. Esta etapa no hubiese sido igual sin tus largas explicaciones, sin tu gran conocimiento en muy diversos temas, sin tu amor. Sin duda has enriquecido mi vida. Gracias por forma parte de este sueño y nuestro planes futuros.

A mi muy querida universidad porque simplemente soy de piel dorada y puma de corazón.

A Marilena Iorio, quien me recibió en su laboratorio apoyando siempre mi formación académica. A Elvira, Claudia, Sara, Ilaria, Ada, Cristina, Chiara y Luana por sus consejos académicos y no académicos, por hacer de mi estancia en Milán una de las mejores experiencias de vida. Grazie di tutto.

Al FUCAM por abrirnos sus puerta para la recolección de muestras haciendo posible la realización de este trabajo.

A las pacientes quienes día a día luchan contra esta enfermedad. Mi admiración a estas guerreras.

Resumen

La heterogeneidad del cáncer de mama, en especial de los tumores triple negativos (TN), representa un reto clínico y biológico. Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión génica y modulan rutas oncogénicas en los tumores de mama. El objetivo de este trabajo es describir la heterogeneidad biológica en los tumores TN mediante el análisis de la expresión de 1050 miRNAs en 132 tumores TN y 40 tumores con otros inmunofenotipos, mediante el uso de microarreglos. Los análisis bioinformáticos con algoritmos de agrupamiento no supervisado, definieron 4 subgrupos asociados con parámetros clínicos como presencia de recurrencia o metástasis y tiempo de supervivencia y supervivencia libre de enfermedad. Procesos celulares como la proliferación, muerte celular programada y movilidad celular resultaron enriquecidos en los subgrupos definidos. Los tumores TN también se contrastaron con otros fenotipos, lo que permitió identificar miRNAs diferencialmente expresados tanto entre tumores con fenotipos diferentes, como entre los subgrupos dentro de los TN. De esta forma se seleccionaron miRNAs candidatos con relevancia biológica para su posterior análisis en modelos celulares. El miR-342-3p, sub-expresado en tumores TN y abatido en uno de los subgrupos de riesgo clínico, fue transfectado en la línea celular mda-mb-468 evaluando sus blancos transcripcionales mediante un análisis de expresión génica con el arreglo HumanGeneSt v1.0 (Affymetrix). Estos datos, junto con los análisis *in silico* definieron 140 genes alterados por el miRNA, de los cuales 35 son potenciales blancos directos. La sobre-expresión exógena de miR-342-3p provocó la reducción de la proliferación, viabilidad-migración celular, y arresto significativo en la fase S. MCT1, un transportador de lactato, es uno de los blancos directos de miR-342-3p validados por ensayos de gen reportero (expresión de luciferasa) y expresión del producto proteico de MCT1 mediante westernblot. El efecto biológico de la expresión exógena del miR-342-3p resulta en una acumulación de lactato exógeno, aumento del lactato endógeno, acompañado de la disminución de glucosa extra e intracelular. Estos resultados sugieren un cambio metabólico por la alteración de los flujos de lactato establecidos por la inhibición de MCT1 por miR-342-3p. Nuestros datos identificaron un perfil de miRNA que revela la existencia de 4 subgrupos de tumores TN. La caracterización biológica del miR-342-3p aportó nuevos conocimientos sobre los programas transcripcionales en tumores TN. El conjunto de datos presentados confirman la participación de los miRNAs como reguladores de los programas oncogénicos en los tumores TN.

Palabras clave: miRNA, cáncer de mama, heterogeneidad, miR-342-3p, tumores triple negativo, clasificador basado en perfiles de expresión de miRNAs

Abstract

Triple negative breast cancer (TNBC) represents a challenging tumor type due to their poor prognosis and limited treatment options. It is well recognize that clinical and molecular heterogeneity of TNBC is driven in part by post-transcriptional regulators such as miRNAs. To stratify TNBCs, we profiled 1050 miRNAs in 132 adjuvant TNBC tumors and 40 tumors from other immunophenotypes using an Affymetrix microarray platform. A NMF clustering analysis allowed us to identify 4 TNBC subtypes featuring unique miRNA expression patterns, disease free and overall survival rates and particular gene ontology enrichments (performed with GSEA algorithm). Our agglomerative approach was cross-validated by using two other clustering algorithms (k-means and consensus clustering). TNBC miRNAs subgroups were also correlated with the Lehmann intrinsic subtypes, finding a significant enrichment of immnomodulatory and basal 1 subtypes in our high risk miRNA subgroups. 3 cell line models (MDA MB 468, MDA MB 231 and HS578T) were classified according to our miRNA signature, recapitulating two different miRNA subgroups. The TNBC tumors were compared against other phenotypes identifying differentially expressed miRNAs that together with the altered miRNAs within the subgroups allowed us to define interesting miRNAs for further functional analysis. We found low expression levels of miR-342-3p in TNBC tumors compared with other breast cancer phenotypes, and this down-regulation characterizes one of our miRNA subgroups with high risk to relapse. To characterize its functional role, miR-342-3p was transiently transfected in the cell line MDA-MB-468, showing a decrease in cell proliferation, viability and migration rates. A gene expression profile (Human gene st, Affymetrix) revealed 140 altered mRNAs, from which 35 are potential direct targets of miR-342-3p defined by an in-silico analysis. The monocarboxylate transporter 1(MCT1), was confirmed as one target of miR-342-3p by a luciferase assay and western blot analysis. MCT1 repression by the miRNA promotes lactate efflux changes in the tumor cells, reflected in the accumulation of exogenous lactate and the increase in levels of extracellular endogenous lactate together with a decrease level of intra and inter cellular glucose concentration. We also explored other mechanisms that can contribute to the modulation of lactate and glucose levels such as the expression of MCT4, HIF1alpha and Glut1, but not significant changes were observed, pointing out the important role of the regulatory circuit of miR-342-3p and MCT1 in a particular TNBC tumor cells metabolism. These data suggest a metabolic change that favors a more glycolytic environment, which lead to a glucose deprivation context that may contribute to the reduction in proliferation, viability and migration capabilities already described. Furthermore, to define the main transcriptional modulator of the intronic miR-342-3p in TNBC, we evaluated the correlation between the expression of estrogen receptor, miR-342-3p and its host gene EVL in

TNBC tumors from TCGA data. A significant correlation between these transcripts was observed. These results, together with information from other studies and Chip-seq analysis suggest that the ER activates the transcription of EVL and consequently the intronic miR-342-3p. We validated these correlations in our cellular model by transiently silencing of the ER. Our data provides evidence that miRNAs sub-classification signature can recapitulate the biological and clinical heterogeneity of TNBC. Moreover, show that miRNAs regulate important oncogenic pathways in TNBC cells such as: proliferation, cell movement and apoptosis in the different subgroups.

Introducción

Generalidades de la glándula mamaria.

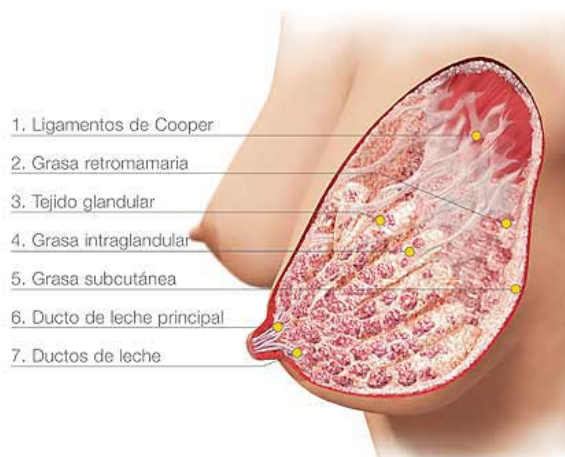


Fig. 1 Anatomía de la glándula mamaria. Tomado de www.medelasml.com.ar

La glándula mamaria es una estructura de origen embrionario ectodérmico localizada entre la segunda y la sexta costillas prologándose hasta la axila. Se compone primordialmente por tejido secretor (tejido funcional) y estroma formado por tejido conjuntivo (mesénquima) el cual brinda sostén a toda la mama. El elemento glandular presenta conductos galactóforos, denominados lóbulos, que se abren

hacia el pezón y se subdividen en estructuras más pequeñas llamadas lobulillos que contienen las unidades funcionales productoras de leche (ácinos) [1, 2]. También se presentan vasos sanguíneos y linfáticos, así como tejido conectivo (Fig. 1). El mayor porcentaje de los cánceres de mama inicia en las células que recubren los conductos (cánceres ductales), otro porcentaje menor se originan en las células que recubren los lobulillos (cánceres lobulillares), mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos del seno.

Desarrollo de la glándula mamaria

El desarrollo de la mama es un proceso continuo que abarca gran parte de la vida de la mujer. La formación de dicha estructura comienza durante el desarrollo embrionario cuando se forman los primordios mamarios, principalmente los conductos galactóforos y las células epiteliales secretoras que son inducidas por los fibroblastos que expresan receptores a estrógenos, progesterona y testosterona, y por los pre-adipocitos, los cuales controlan la ramificación de los conductos[1]. Durante esta etapa las hormonas sexuales juegan un papel fundamental en el establecimiento del dimorfismo sexual. Mientras que en las

mujeres los niveles bajos de testosterona permiten que los conductos vayan incursionando al mesodermo, en el hombre los altos niveles de esta hormona detienen su desarrollo primario (Fig 2a) [1].

En la pubertad se lleva a cabo la segunda etapa del desarrollo, periodo en el que las hormonas estimulan la formación de la glándula funcional, seguida por el estado adulto en el que los ductos galactóforos finalizan su crecimiento hacia el pezón y el tejido glandular se extiende hasta los extremos de la mama. Las últimas etapas tienen lugar durante el embarazo, cuando ocurre un cambio en la arquitectura ductal a una estructura lóbulo-alveolar y durante la lactancia, tiempo durante el cual se produce leche (Fig 2b) [1, 2].

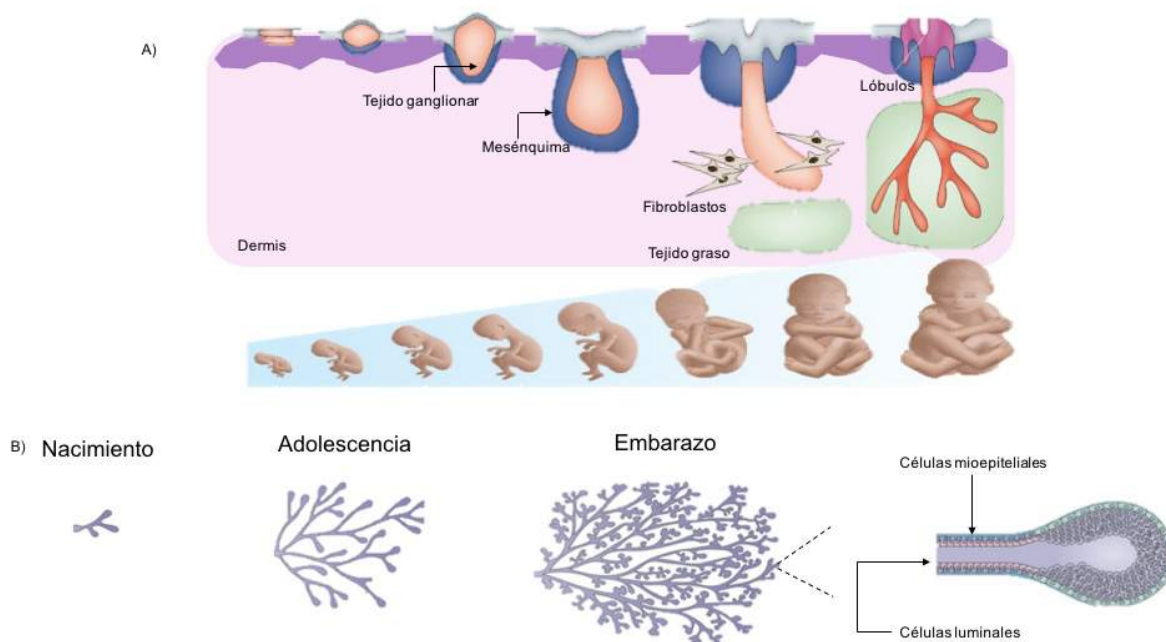


Fig 2: Desarrollo de la glándula mamaria desde la etapa embrionaria (A) hasta la culminación de su crecimiento durante el embarazo y lactancia (B). Modificada de: "Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development"

Diversas biomoléculas poseen una actividad biológica fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria: los estrógenos, estimulan el crecimiento y la diferenciación del epitelio ductal y conectivo, la progesterona es necesaria para el desarrollo del lóbulo alveolar y la diferenciación de las células epiteliales

alveolares, la hormona del crecimiento estimula la maduración epitelial y promueve el metabolismo para la producción de leche durante la lactancia, la prolactina participa en la ramificación lateral de los ductos y la hormona paratiroidea permite el desarrollo normal del sistema ductal[1, 3].

Cáncer de mama

El cáncer de mama comprende un conjunto de diversas patologías presentes en el tejido mamario, usualmente originado en los conductos y lóbulos, a causa de la acumulación de daños en el material genético y celular los cuales favorecen la división celular anormal y descontrolada, proliferación no restringida capaz de invadir y metastatizar otros tejidos y órganos a través de los sistemas sanguíneo y linfático, inducción de señales angiogénicas que favorecen la optima irrigación de nutrientes y oxígeno, así como resistencia a los mecanismos de muerte celular (Fig3) [4].

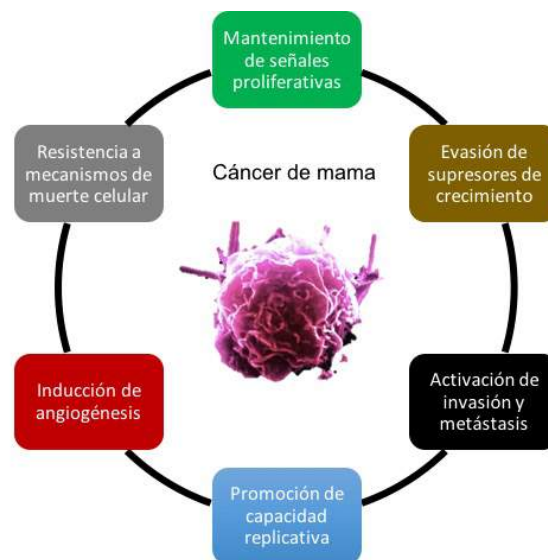


Fig 3: Características moleculares de las células tumorales de la glándula mamaria los cuales confieren ventajas selectivas sobre las células normales . Modificada de [4]

El desarrollo del cáncer se basa en diversos procesos: la adquisición continua de variaciones en el genoma debido a mutaciones al azar, variación somática en el número de copias, alteraciones en los perfiles de expresión génica, actividad anormal de reguladores pos-transcripcionales y alteración en mecanismos

epigenéticos, así como la selección celular que actúa sobre la diversidad de los fenotipos resultantes. De esta forma, las células que presentan ciertas alteraciones, adquieren capacidades más efectivas de sobrevivir que las células vecinas, al poseer una ventaja competitiva. El cáncer resulta debido a la acumulación de alteraciones en el genoma adquiridas a lo largo de la vida del paciente, de las cuales una fracción muy pequeña se han convertido en cambios fijos que promueven el desarrollo tumoral [5].

La transformación de las células mamarias normales a tumorales depende de un conjunto complejo de procesos moleculares y celulares causados por factores internos (procesos que abarcan desde los niveles celulares hasta el estado general del organismo) y externos (exposición a factores radioactivos, mutagénicos y cancerígenos) a los cuales se les denomina factores de riesgo.

A continuación se enlistan los principales factores que contribuyen al desarrollo de cáncer de mama [1-3, 6, 7]:

- *Exposición a estrógenos*: La prolongada y continua exposición de estrógenos favorece el crecimiento celular aumentando el riesgo de padecer cáncer de mama:
 - Comienzo de menstruación a edades tempranas (antes de los 12 años)
 - Inicio de la menopausia a edades avanzadas (después de los 55 años)
 - Exposición de estrógenos (ambiente hormonal adverso): administración de suplementos hormonales, anticonceptivos estrogénicos y exposición ambiental.
- *Edad e historia personal*: edad mayor de 40 años, padecimiento previo de cáncer en una mama y cambios fibroquísticos significativos en la estructura mamaria.

- *Embarazo y lactancia*: Edad del primer embarazo y tiempo de lactancia. Estos aspectos disminuyen el número de ciclos menstruales y por tanto la exposición a estrógenos. Aunado a ello, el proceso de lactancia genera cambios fisiológicos, génicos y epigenéticos que promueven mecanismos protectores contra el cáncer de mama
- *Peso*: El sobrepeso, sobre todo en mujeres post-menopáusicas, brinda una fuente importante de estrógenos a través del tejido graso. Así, cuando existe mucho tejido graso también se presentan mayores niveles estrogénicos los cuales podrían promover un estado tumorigénico.
- *Estilo de vida*: vida sedentaria y dieta alta en grasas y carbohidratos.
- *Consumo de alcohol*: El alcohol limita la capacidad del hígado de controlar los niveles hormonales.
- *Etnicidad*: Las mujeres caucásicas tienen mayor propensión que las Afroamericanas, Asiáticas, Hispanas y Nativas Americanas.
- *Génicos e historia familiar*: Familiares de grado directo con cáncer de mama con posible presencia de mutaciones en línea germinal en genes relevantes para el mantenimiento celular. Aproximadamente de entre 10 al 15% del cáncer de mama posee un componente hereditario reflejado en la presencia de mutaciones en: 1) BRCA1 y BRCA2: genes supresores de tumor que regulan el ciclo celular y evitan la proliferación incontrolada a través de la regulación de mecanismos de reparación de DNA, 2) ATM: participa en la reparación del DNA dañado, 3) TP53: participa en la regulación del crecimiento celular, 4) CHEK2: la mutación de este gen puede aumentar el riesgo de cáncer de mama hasta dos veces más, 5) PTEN: regula el crecimiento celular, 6) STK11: la mutaciones de este gen se asocian con un mayor riesgo de presentar un tumor mamario 7) PALB2: interactúa y colocaliza la proteína BRCA2, 8) BRIP1: interactúa con BRCA1 durante la reparación de rompimientos de DNA de doble cadena.

Cáncer de mama: un nuevo reto en la salud pública.

El cáncer, es en la actualidad uno de los mayores retos en la salud pública mundial, pues es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad cuya incidencia aumentará durante las próximas décadas. Se prevé que las muertes a causa del cáncer aumentarán un 45% entre 2007 y 2030, pasando de 7.9 millones a 11.5 millones de defunciones, mientras que el diagnóstico de nuevos casos de cáncer también aumentará de 11.3 millones en 2007 a 15.5 millones en 2030 [8, 9]. En particular el cáncer de mama, es el cáncer femenino más común a nivel mundial con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012. La mayor incidencia de este padecimiento se presenta en regiones en vías de desarrollo como Latinoamérica, Asia y África, con un total de 883,000 de nuevos casos para el 2012, mientras que en la regiones desarrolladas la tasa de nuevos casos fue de 794,000. En regiones menos desarrolladas el cáncer de mama, representa la causa de muerte más común, correspondiendo a estos países cerca del 72% de las muertes por cáncer ocurridas en 2007 (Fig. 4) [9, 10].

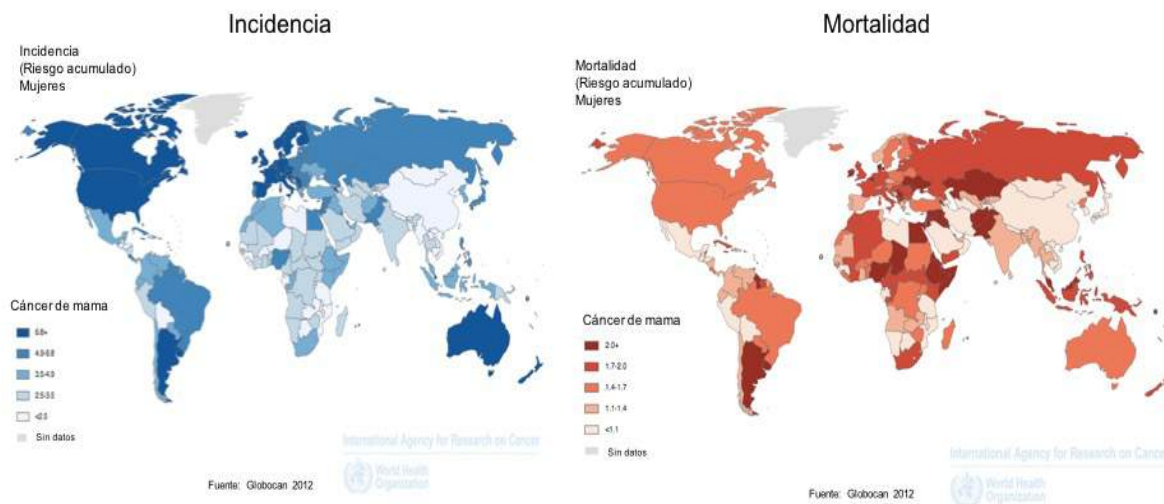


Fig 4: Panorama mundial sobre incidencia y mortalidad del cáncer de mama en población femenina. Fuente: Globocan, 2012.

Si bien hoy en día contamos con mejores métodos de detección temprana y tratamiento, son muchos los factores que determinan la aparición y desarrollo del cáncer, por ello su estudio presupone un importante reto científico y tecnológico, cuya comprensión brindará nuevas y mejores soluciones para su tratamiento [10].

Cáncer de mama en México

El cáncer de mama en México es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, correspondiendo al 15% del total de los tumores, con una incidencia de 35.3 por 100,000 mujeres en 2011 (Estimaciones de Knaul FM, Arreola-Ornelas H y Tómatelo a Pecho, A.C., con base en datos [9]). La tasa de mortalidad causada por cáncer de mama en mujeres ha presentado un incremento importante en los últimos años, aumentando de 14.7 a 16.3 muertes por cada cien mil mujeres de entre 2001 y 2013 (Fig 5) [11, 12].

Asimismo, de acuerdo con las cifras de la Secretaría de Salud 46% de las pacientes mexicanas padecen esta enfermedad antes de cumplir 50 años (Fig. 5) [10]; esto es, la incidencia de cáncer de mama en nuestro país se presenta una década antes que en las poblaciones Europeas o Estadounidenses, lo cual puede deberse a la estructura poblacional en la que hay un amplio porcentaje de población joven o bien a factores medioambientales que favorezcan la aparición precoz de este padecimiento.

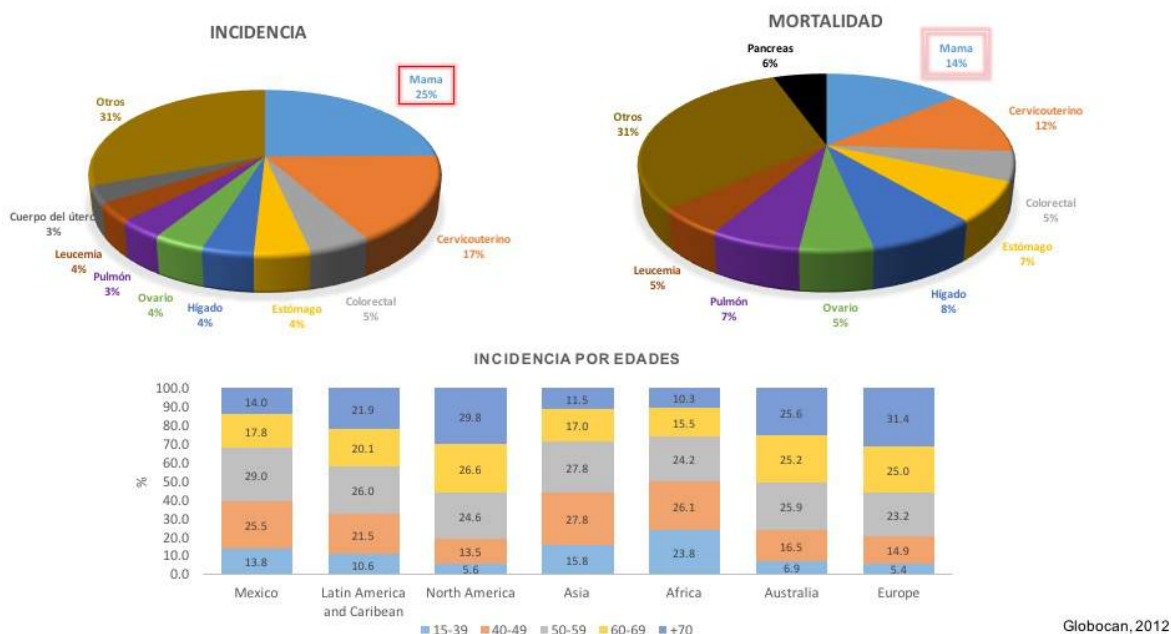


Fig 5: Descripción epidemiológica del cáncer de mama en México. (Superior) Tasa de incidencia y mortalidad por tumores en México. (Inferior) Porcentajes por edades sobre la incidencia de cáncer de mama en diversas regiones mundiales. GLOBOCAN, 2012

Las cifras muestran un panorama crítico en México, en el 2009 la Secretaría de Salud reportó que en los últimos 10 años la incidencia de cáncer de mama había aumentado un 50%. Las proyecciones epidemiológicas reportan que la incidencia de cáncer de mama en nuestro país aumentará un 68% para 2030 con respecto a 2012, mientras que la mortalidad aumentará 81% [8]. Por ello, los métodos de diagnóstico temprano deben ser una estrategia básica en los programas de detección y prevención del cáncer de mama. Asimismo, los programas científicos deben ir encaminados a ampliar los esquemas de diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, pues del total de las pacientes mexicanas tan sólo del 5 al 10% se detectan en los primeros estadios, el resto es diagnosticado en estadios 3 o 4 lo que dificulta el tratamiento y aumenta los costos y la incertidumbre para la paciente. Por el contrario, en países desarrollados como Estados Unidos el 50% de los casos es detectado en estadios tempranos [13]. Es importante conjugar los avances clínicos con los científicos para poder brindar nuevas opciones tanto diagnósticas como terapéuticas encaminadas a mejorar la sobrevivencia de la paciente.

Genómica del cáncer de mama

Hace más de un siglo que se había propuesto que el cáncer es causado por alteraciones en el DNA como mutaciones y re-arreglos cromosómicos [14], es decir el cáncer es un enfermedad del genoma. Tuvieron que pasar 70 años para que los científicos pudieran comprobar dichos conceptos al describir la existencia de genes mutados promotores de la carcinogénesis [15, 16]. Así en la década de los 80s se describió la presencia de dos tipos de genes relacionados con el establecimiento del tumor: los oncogenes y los genes supresores de tumor, así como cambios genómicos como alteraciones en el número de copias y re-arreglos en el DNA. Estos estudios pioneros comenzaron a sugerir lo complejo que sería el genoma del cáncer. Gracias a los avances en las tecnologías de análisis genómico desarrollados en las últimas décadas, se ha conseguido analizar de forma sistemática las alteraciones presentes en el genoma del cáncer (Tabla 1)

[17]. En la actualidad existen diversos esfuerzos internacionales cuyo objetivo es describir el complejo panorama del cáncer a nivel de mutaciones, alteraciones somáticas en el número de copias, re-arreglos estructurales, cambios epigenéticos y perfiles de expresión de diversos transcritos y proteínas, lo que permitirá obtener un catálogo de las alteraciones genéticas y epigenéticas más comunes en tumores de alta incidencia en el mundo (Fig. 6).

La correlación entre variables clínicas, tiempo libre de metástasis y sobrevida con diversas características genómicas, tales como perfiles de expresión de RNA mensajero y mutaciones en genes accionables, han permitido el desarrollo de herramientas de predicción de curso clínico e identificación de blancos terapéuticos específicos.

Los avances en el entendimiento de las bases moleculares del cáncer de mama han sido amplios, sin embargo, falta por estudiar muchos mecanismos involucrados en los procesos de regulación y expresión génica.

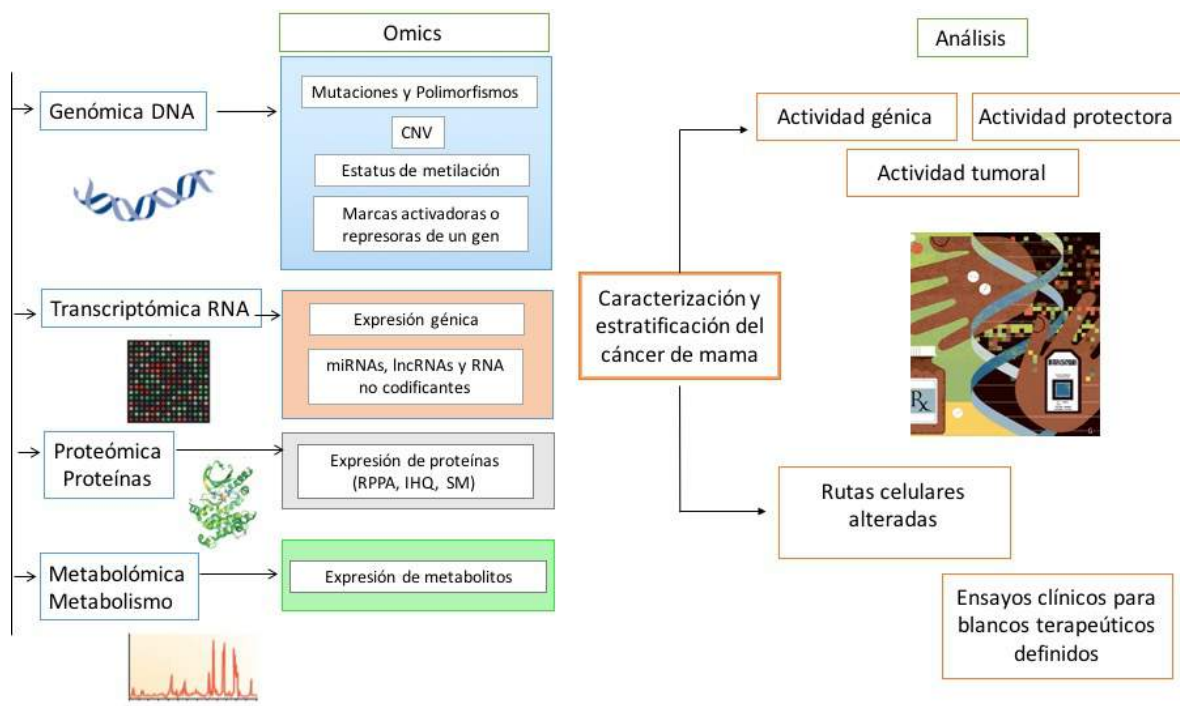


Fig 6: Omics del cáncer de mama y estrategia analítica para caracterizarlo y estratificarlo

Tabla 1: Abordajes genómicos en cáncer de mama [17]

Nivel biológico	Alteraciones	Descripción	Relevancia biológica
DNA	Mutaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Espectro y tasa de mutaciones • Mutaciones en genes que dirigen el desarrollo del cáncer • Mecanismos mutacionales 	Mutaciones somáticas conocidas como mutaciones “conductoras” : PIK3CA, PTEN, AKT1, TP53, GATA3, CDH1, RB1, MLL3, MAP3K1 and CDKN1B
	Genes de fusión	El gen de fusión es causado por translocaciones cromosómicas aberrantes que unen exones de dos genes no relacionados dando como resultado RNAm y eventualmente proteínas quiméricas.	Mediante abordajes de secuenciación de nueva generación se han definido 2 tipos de translocaciones: 1) privadas, presentes en un porcentaje pequeño de tumores como: MAGI3-AKT3 2) Redundantes distribuidas en un mayor número de neoplasias. Se han registrado al menos 15 de ellas distribuidas en subtipos definidos de cáncer de mama.
	Alteraciones somáticas del número de copias (asnc)	<ul style="list-style-type: none"> • Ganancia y pérdida de cromosomas • Rompimiento cromosómico: cromotripsis que produce un gran número de re-arreglos 	Mediante análisis de segmentación se han identificado amplificaciones y deleciones a nivel focal, así como ganancias y pérdidas a nivel de brazo. Amplificaciones en <i>PIK3CA</i> , <i>EGFR</i> , <i>FOXA1</i> and <i>HER2</i> Deleciones en <i>MLL3</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB1</i> and <i>MAP2K4</i>
	Aneuploidias		
	Metilación	Mecanismos de regulación epigenética dado que se ha reportado su alteración temprana en la tumorigénesis mamaria.	Perfiles bien caracterizados de metilación donde se describe una tendencia a la hipo-metilación global del genoma. Metilación aberrante se ha asociado con la progresión clínica
	Modificadores de histonas		Análisis de ChIP-Seq han permitido definir las interacciones entre la proteínas modificadoras y el DNA genómico.
RNA	Expresión génica	Los perfiles de expresión de transcritos analizan los patrones de un número de genes de las células cancerosas para predecir riesgos a recurrencia y muerte, determinar el óptimo tratamiento y describir la naturaleza del tumor.	Mediante microarreglos y secuenciación se han definido genes con expresión diferencial importantes en la carcinogénesis, así como la sub-clasificación de los tumores de mama de acuerdo a firmas de expresión de RNAm o miRNAs con relevancia clínica y biológica. Asociación de mutaciones y asnc con los patrones de expresión.
	miRNAs		
Proteínas	Expresión y estructura de proteínas	Cuantificación de la expresión de proteínas asociadas a cáncer así como las proteínas fosforiladas mediante RPPA.	El análisis proteómico permite entender a nivel operacional la oncogénesis mamaria y contribuye a la caracterización de los diversos fenotipos tumorales, así como la identificación de blancos terapéuticos antineoplásicos.

En la actualidad contamos con tecnología que permite detectar secuencias específicas del material genético y algunas otras biomoléculas de forma muy específica, lo que ha permitido su uso como biomarcadores de progresión tumoral que han ayudado a la elección de tratamientos específicos, mejorando la expectativa de vida de las pacientes. De igual forma, al tener más información

acerca de la estructura del genoma humano y de otras especies animales usadas como modelos biológicos, se han generado clasificadores moleculares mucho más confiables en cuanto a su capacidad predictiva, lo que permite evaluar, por ejemplo, el diseño y la caracterización de fármacos antitumorales y su posible respuesta en diversos modelos celulares y animales. El desarrollo de tecnologías como los microarreglos para analizar la expresión génica, genotipificar miles de marcadores, análisis de alteraciones somáticas en el número de copias, así como la expresión de proteínas y más recientemente la secuenciación de nueva generación, amplía de forma importante la posibilidad de abordar nuevos campos en la investigación de las bases moleculares del cáncer.

La función de nuevos actores biológicos, así como su participación en el desarrollo de la carcinogénesis mamaria ha comenzado a ser estudiada ampliamente. Un ejemplo es el estudio de la función biológica de los RNAs no codificantes, como los microRNAs (miRNAs) los cuales tienen un papel importante en el desarrollo tumoral y una posible aplicación como clasificadores del cáncer de mama [18, 19].

miRNA: importantes reguladores post-transcripcionales

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes de 21 a 25 nucleótidos, los cuales son incorporados en complejos de silenciamiento, dirigiéndose a secuencias complementarias blanco homólogas de RNAs mensajeros, provocan la inhibición de la transcripción del RNA blanco o bien lo degradan por completo. Los miRNAs representan una importante fase de la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional [20-27].

Los miRNA juegan un papel importante en la mayoría de las células eucariontes incluyendo plantas, hongos, insectos (por ejemplo *Drosophila melanogaster*), nemátodos, como *Caenorhabditis elegans* (en los cuales en 1993 fueron descritos por primera vez con el miRNA lin-4) y mamíferos.

La función biológica de los miRNAs en *Caenorhabditis elegans* es la de controlar el desarrollo larvario a través de sus cuatro etapas (Li-L4) funcionando pues como un reloj regulatorio del linaje celular [28-30].

Entre las funciones biológicas de los miRNA se incluyen la regulación de la diferenciación y crecimiento celular, respuesta al estrés, muerte celular, diferenciación hematopoyética, morfogénesis de la piel, metabolismo, desarrollo neuronal entre muchas otras. Su acción depende básicamente del tejido y tipo celular en el que se encuentre; siendo altamente específicas al tiempo (etapa del desarrollo) y tejido [20, 31-33].

Diversos estudios han reportado que esta regulación pos-transcripcional es muy amplia, puesto que un sólo miRNA puede poseer hasta 200 genes blanco con muy diversas funciones [34, 35]. En el ser humano se han predicho aproximadamente 1881 precursores y 2588 miRNAs maduros (miRBase: <http://www.mirbase.org/index.shtml>), que impactan una gran variedad de procesos celulares importantes para las funciones normales, así como en el desarrollo y progresión del cáncer. Lo anterior apunta a los miRNAs como un importante modulador de la expresión génica, sin embargo la importancia funcional de muchas de la anotaciones de miRNA continúan sin ser determinadas [34].

Maquinaria de síntesis y maduración de miRNA.

Los miRNAs son transcritos que poseen un proceso de maduración complejo y cuyo papel es importante en la regulación de las redes celulares. La organización genómica de los miRNAs es diversa, ocurriendo de forma individual y localizándose en zonas exónicas, intergénicas o intrónicas [36-38]; o bien organizándose en estructuras denominadas clusters, los cuales son un conjunto de miRNAs (transcritos policistrónicos) expresados de forma coordinada en el tiempo; lo anterior sugiere su posible actividad conjunta en diversos procesos biológicos [38, 39].

El proceso global de síntesis y maduración de los microRNAs se puede dividir en dos etapas: nuclear y citoplasmática. El proceso de transcripción inicia en el núcleo, donde la mayoría de los miRNAs son polimerizados por la RNA polimerasa II generando un transcrito denominado pri-miRNA (transcrito primario) en forma de tallo-asa, el cual puede poseer la secuencia de uno o más miRNA (policistrónico) (Fig 7) [40].

A continuación, el microprocesador formado por Drosha, una RNasa tipo III reconoce la doble cadena del pri-miRNA junto con el complejo proteico DGCR8, generando un pre-miRNA en forma de pasador de entre 60 y 70 nucleótidos [27, 41-44]. En seguida el pre-miRNA es transportado al citoplasma por Exportin 5[27, 44]. A continuación, la RNasa III DICER actúa junto con la proteína citoplasmática *TRBP* (Transactivating response RNA-binding protein) para procesar el pre-miRNA en un miRNA maduro de doble cadena (Fig. 7) [39, 44, 45].

Cuando esta segunda digestión concluye, se genera una doble cadena de entre 21 a 25 nucleótidos(miRNA:miRNA^{*}); de la cual una de las hebras es seleccionada por *TRBP* (al actuar como biosensor en la elección de la cadena “guía”) para incorporarla al complejo RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Entre menor estabilidad termodinámica (menor estabilidad entre los puentes de hidrógeno) tenga la hebra en el extremo 5' se facilitará su incorporación al complejo RISC (Fig. 7). La hebra pasajera puede ser incorporada a otro complejo RISC o bien degradada [39, 44, 45].

El complejo RISC que contiene el miRNA (miRISC), está compuesto por varias proteínas: Dicer, Ago2, *TRBP* y *Piwi* (Fig 7). miRISC se une a través de la proteína argonauta a la región 3' no traducida (3' UTRs) del RNAm blanco de forma perfecta o imperfecta. Las bases del miRNA en la posición 2 a 7 poseen la región semilla, la cual debe tener una complementariedad del 100% para unirse con su blanco. Estas regiones son las que han servido para predecir los blancos transcripcionales de cada miRNA [27, 33]. Algunos estudios han reportado que la

unión de los miRNAs al extremo 5' no traducible o a las secuencias codificantes del RNAm podrían ser funcionales, aun cuando este es un mecanismo que no está claramente descrito en mamíferos [46-48].

Los miRNAs regulan la expresión del RNAm blanco mediante diversos mecanismos mediados a través de la degradación o represión de la traducción: 1) Degradación del transcrito 2) Deadenilación de la cola de poliA y la eliminación de la caperuza para la degradación del RNAm en el citoplasma. Estos 2 mecanismo son llevados acabo por complejos miRISC digestivos [49, 50]. 3) La asociación de miRISC con los cuerpos P (Cuerpos de procesamiento) para la degradación del RNAm [27, 44, 51] 4) Durante el inicio de la traducción al inhibir la función de factor eIF4E, lo que genera disminución significativa en la eficiencia de la síntesis de proteínas y 5) degradación de la cadena proteica naciente [52].

En el cáncer, diversos componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs se encuentran alterados. Las ribonucleasas III DROSHA y DICER están sub-expresadas en diversos tumores como mama, pulmón, ovario y neuroblastomas. Adicionalmente la baja expresión de estas proteínas se asocian también a cursos clínicos agresivos. El conocimiento de los procesos que alteran la biogénesis de miRNAs permitiría identificar blancos terapéuticos para restaurar los óptimos perfiles de expresión de miRNAs, así como biomarcadores con relevancia clínica (Detalle de este tema en: [43, 53])

Regulación de miRNA.

Otro de los mecanismos celulares que pueden modificar la tasa de expresión de los miRNAs es la regulación de su transcripción. Diversos estudios reportan que la regulación de los miRNA ocurre por mecanismos clásicos epigenéticos o bien mediante otros procesos celulares que responden a estímulos endógenos y exógenos.

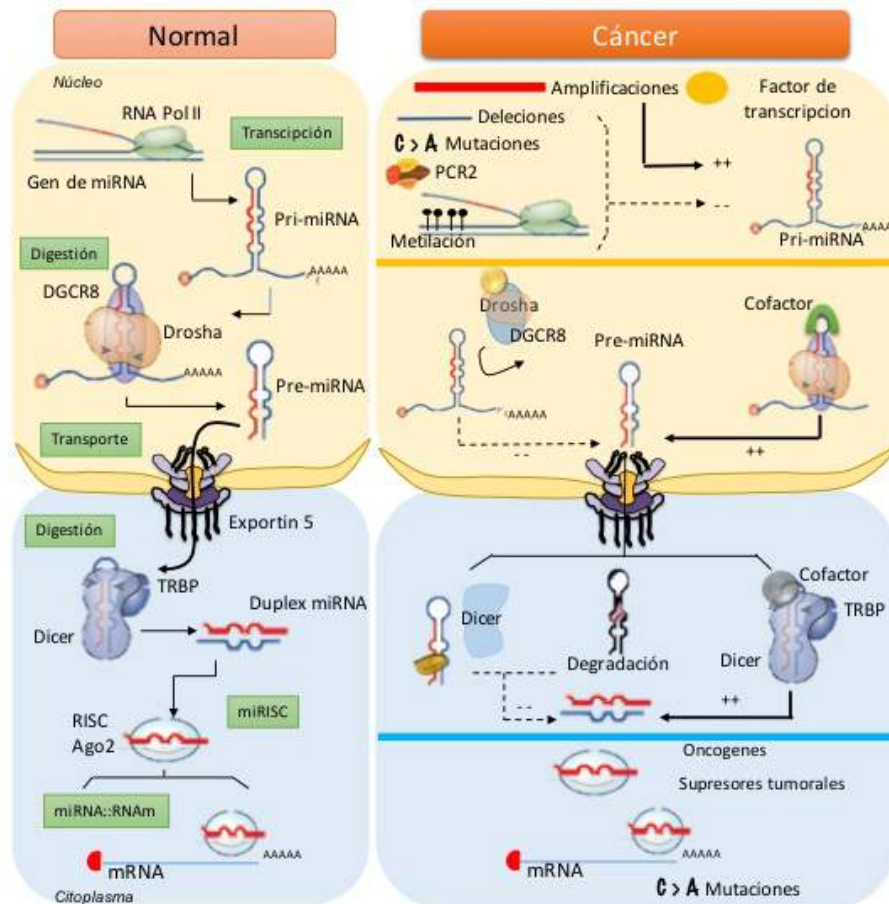


Fig 7: Biogénesis de miRNAs en condiciones fisiológicas normales y en cáncer

Con respecto a los mecanismos epigenéticos, varios reportes han descrito que la metilación del DNA y la actividad de inhibidores de deacetilasas de histonas pueden modificar la expresión de un número importante de miRNAs [54, 55]. La identificación de mecanismos de metilación sobre promotores de miRNAs en un grupo amplio de tumores señala la importancia que tiene este procesos en la sub-expresión de los miRNAs en los programas de cáncer. Así mismo, la expresión desregulada de los miRNAs en cáncer también puede ser consecuencia de la alteración de la marcas de histonas que puede ocurrir mediante la activación aberrante de deacetilasasa de histonas o complejos como Policomb sobre las secuencias codificantes de miRNAs [56, 57].

Los factores inducibles de hipoxia (FIH) son otros de los mecanismos que regulan a los miRNA en respuesta a niveles bajos de oxígeno, condición muy común en los microambientes generados en las zonas neoplásicas, sobre todo en aquellas que presentan una pobre prognosis y resistencia a las terapias convencionales [58]. La interacción y la relación que se da entre los miRNA y los factores transcripcionales como P53 y el receptor de estrógenos, ambos alterados en diversas neoplasias, han sido implicados en la desregulación de la expresión de algunos miRNAs [59, 60].

Heterogeneidad del cáncer de mama

El cáncer de mama es una neoplasia que se ha descrito como altamente heterogénea desde el punto de vista biológico y clínico. Esta heterogeneidad fenotípica y funcional surge como consecuencia de cambios genéticos, diferencias tanto en el ambiente celular como en el que se desenvuelve el individuo y cambios en las propiedades celulares. La descripción de dicha variabilidad tiene impacto no solo en el entendimiento biológico de la enfermedad, sino también en el comportamiento clínico del tumor y la respuesta a quimioterapia, lo cual pone de manifiesto la relevancia de clasificar los tumores de mama en distintos grupos con características biológicas y clínicas independientes y únicas [61-67].

El cáncer de mama se ha clasificado mediante diversos abordajes y a través del uso de diferentes moléculas. Los grupos histopatológicos se han definido basados en la expresión de marcadores inmunohistoquímicos a través de la evaluación de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), así como el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*ERBB2* o HER2). Esta clasificación ha permitido un diagnóstico clínico estratificado, orientado al tratamiento dirigido a moléculas blanco mediante terapia hormonal contra los receptores hormonales o bien el bloqueo de la actividad de HER2 mediante anticuerpos monoclonales. Otras moléculas como el RNAm ha permitido definir subtipos que permiten predecir prognosis y respuesta a tratamiento específico, revolucionando de esta forma el sistema de clasificación del cáncer de mama. Perou y colaboradores en

2009 clasificaron el cáncer de mama en cinco categorías de acuerdo a perfiles intrínsecos de expresión génica de 50 genes (PAM50) [68, 69]:

1. Luminal A: Caracterizado por alto nivel de expresión de RE y RP, por lo que los tratamientos más eficaces es la hormonoterapia teniendo un buen pronóstico. Es negativo a HER2 (RE+, RP+, HER2-).
2. Luminal B: Comparte la mayor parte de las características de luminal A, excepto porque este subtipo tumoral es HER2 + (RE+, RP+, HER2+) y presenta elevados índices de la expresión proteica de ki67.
3. Parecido a Basal: tejido en el cual se expresan productos génicos característicos de células basales, sobresaliendo las queratinas 5, 6, 14 y 17. Por sus características inmunohistoquímicas la mayoría son triples negativos, es decir negativos RE, RP y HER2. El pronóstico de este subtipo tumoral no es bueno pues es muy agresivo (RE-, RP-, HER2-).
4. HER 2+: Es un tejido caracterizado por ser negativo a estrógenos y progesterona y positivo para Her2. Los tratamientos más empleados son el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, el cual actúa contra el ectodominio de HER2 (RE-, RP-, HER2+).
5. Bajos en claudinas: caracterizados por la baja expresión de las proteínas claudinas y marcadores luminales, así como un sobre-expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima y características de células progenitoras.

Los perfiles de expresión también han sido empleados para desarrollar firmas pronosticas como Mammaprint y Oncotype DX [69-72], las cuales permiten definir el riesgo de recaída y muerte de forma personalizada, así como la necesidad de administrar quimioterapia para el tratamiento del tumores en estadios tempranos.

Biología de los tumores triple negativo

El cáncer de mama tripe negativo (CMTN) se define como RE-, RP- y HER2-. Uno de los grandes retos de este tumor es la ausencia de blancos terapéuticos específicos, siendo la quimioterapia citotóxica sistémica la única opción aprobada

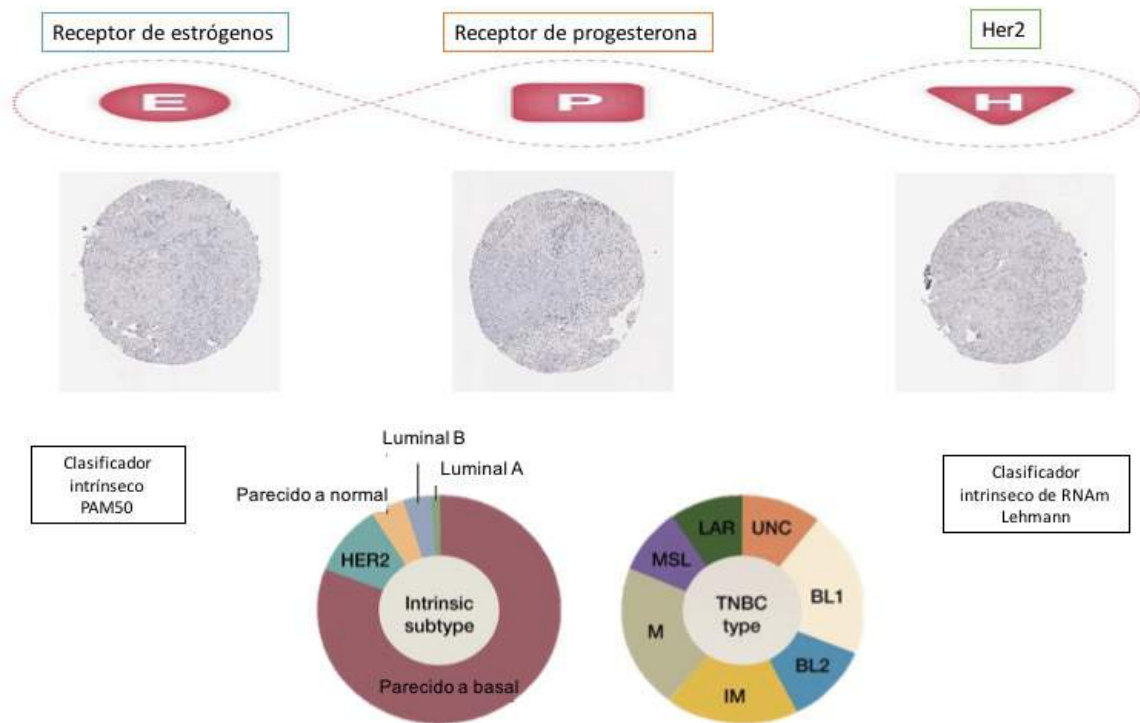
en la actualidad para el tratamiento de este tipo de cáncer. Aun cuando los tumores TN muestran mayor quimio-sensibilidad que los tumores RE+, un porcentaje importante de las pacientes con tumores TN presentan mayores índices de recurrencia, metástasis y muerte durante los primeros 5 años que otros fenotipos [72-74]. La heterogeneidad de los tumores TN está considerada como un importante potenciador de agresividad y quimio-resistencia (Fig. 8).

Una primera clasificación inmunohistoquímica distinguió al menos dos grupos de tumores TN basados en la expresión de 5 marcadores proteicos: RE, RP, HER2, Cit5/6 y EGFR1. El primer grupo se caracteriza por la expresión de Cit5/6 y/o EGFR1 y el segundo en la no expresión de ninguno de los marcadores, siendo este último grupo el más agresivo [75, 76]. Mediante abordajes moleculares los tumores TN se clasifican como parecidos a basal (50%), bajos en claudinas (30%) y luminales A, B y Her2 (20%). En 2011 Lehmann y colaboradores analizaron los perfiles de expresión génica de 500 tumores TN clasificándolos en 6 subtipos diferentes basados en firmas intrínsecas de expresión de RNAm: parecido a basal 1 y 2 (BL1 y BL2), mesenquimal (M), mesenquimal parecido a células progenitoras (MSL), inmunomodulatorio (IM) y luminal enriquecido en rutas androgénicas (LAR) [77, 78].

Cada subtipo posee una biología única:

1. BL1: presenta enriquecimientos ontológicos en procesos de ciclo celular y respuesta a daño en el DNA.
2. BL2: está enriquecido en señalización de factores de crecimiento y marcadores mioepiteliales.
3. M: presenta una alta expresión de genes involucrados en diferenciación y rutas de crecimiento.
4. MSL: enriquecidos en rutas de transición epitelio mesénquima y factores de crecimiento.

5. IM: Enriquecidos en procesos de sistema inmune como señalización de citosinas, procesamiento y presentación de antígenos y procesos de transducción de señales por señalización inmune.
6. LAR: señalización dirigida por andrógenos.



Tomado de: <http://www.nationalbreastcancerfoundation.org/triple-negative-breast-cancer>, New Strategies for Triple-Negative Breast Cancer—Deciphering the Heterogeneity (2014) y the Human Protein Atlas <http://www.proteinatlas.org/>

Fig 8. Caracterización biológica de los tumores de mama triple negativos. **(Superior)** Caracterización inmunohistoquímica definida por la ausencia de receptores estrógenos, progesterona y HER2. **(Inferior)** Clasificación molecular basada en perfiles de expresión de RNAm mediante PAM50 y Lehmann.

Los subtipos intrínsecos de los tumores triples negativos también presentan respuestas variadas a terapia. Masuda evaluó retrospectivamente la respuesta patológica en 130 tumores TN tratados en neoadjuvancia con doxorrubicina, ciclofosfamida y paclitaxel [79]. La mayor respuesta patológica completa se observó en el subtipo BL1, mientras que la menor se identificó en BL2, LAR y MSL. Estos hallazgos sugieren que las pacientes con tumores TN pueden verse beneficiadas de distintas terapias de acuerdo al subtipo molecular del tumor y ponen de manifiesto la importancia de sub-clasificar este tipo de cáncer.

Por otro lado, esfuerzos como el *Cancer Genome Atlas* (TCGA), integró información genómica y transcriptómica para determinar la heterogeneidad de los tumores TN. Las alteraciones más frecuentes presentes en esta neoplasia son la pérdida de función de genes asociados a reparación de DNA como *TP53*, *RB1* y *BRCA1*. También es frecuente la aberrante activación de *PI3K*, y la sub-expresión de *PTEN* [80].

miRNAs como elementos regulatorios de la expresión génica en los tumores triple negativos.

La descripción de perfiles de expresión de miRNAs mediante el uso de tecnologías masivas como microarreglos o secuenciación de nueva generación ha permitido identificar patrones de expresión así como miRNAs específicos con relevancia en la carcinogénesis de los tumores triple negativos.

Los miRNAs, pueden controlar la proliferación, diferenciación, supervivencia y metabolismo celular así como la estabilidad genética, invasión, migración y angiogénesis, procesos que en conjunto afectan el establecimiento y desarrollo del tumor. Aun cuando miRNAs individuales pueden poseer una función oncogénica (ganancia de función dada por la expresión a la alza) o supresora de tumor (pérdida de función dada por la expresión a la baja), diversos estudios han reportado que la expresión global de los miRNAs está suprimida en las células cancerosas de los tumores triples negativos (Fig. 9) [19, 81]. Funcionalmente, a través del estudio de muestras de pacientes y modelos *in vivo* e *in vitro*, se ha definido que los miRNAs poseen una importante función en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer de mama triple negativo [82, 83].

Los cambios en los perfiles de expresión de miRNAs asociados a la carcinogénesis han emergido como un prometedor marcador diagnóstico que se correlaciona con la progresión de la enfermedad, la supervivencia del paciente así como con la respuesta biológica al tratamiento (Fig. 9).

Los miRNAs también pueden ser secretados al ambiente celular circundante o a los diversos fluidos biológicos de forma libre o empaquetados en vesículas liposomales como los exosomas. Este mecanismo representa un importante proceso de comunicación celular, donde fenotipos de resistencia a terapia, señales de crecimiento, invasión o metástasis pueden ser intercambiados por las diversas clonas celulares del tumor [84-86]. Así mismo plantea un nuevo panorama en los biomarcadores circulantes pues los miRNAs por sus características bioquímicas son moléculas sumamente estables lo que favorece la reproducibilidad y sensibilidad de la detección [20, 21].

Para la mayor parte de los miRNAs asociados a la carcinogénesis mamaria triple negativa definidos mediante perfiles de expresión, únicamente se ha reportado análisis *in silico*, describiendo sus interacciones predichas con los RNAm blanco y su posible relación con la biología de los tumores TN, existiendo un número limitado de miRNAs que se hayan validado experimentalmente. En la tabla 2 se describen la mayor parte de los miRNAs que se han evaluado funcionalmente en el CMTN.

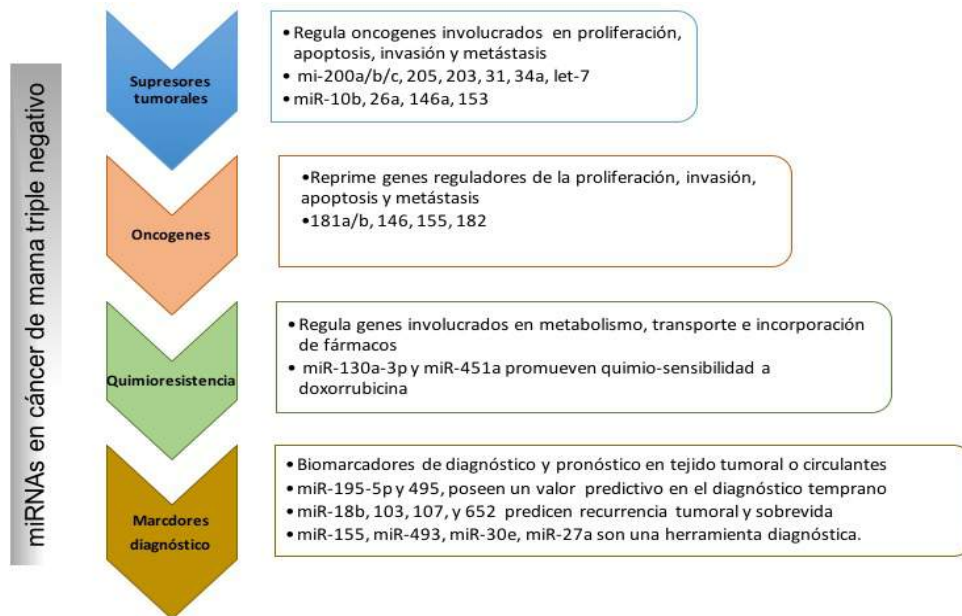


Fig 9: Caracterización funcional de los miRNAs en el cáncer de mama triple negativo [19, 81, 82, 83]

miRNAs como clasificadores de tumores triple negativos

Varias moléculas se han empleado para desarrollar perfiles de expresión que se asocien con la taxonomía, biología y agresividad tumoral, así como con respuesta a tratamiento y progresión de la paciente. Los miRNAs son uno de los transcritos que están tomando gran relevancia ya que por su pequeño tamaño poseen mayor estabilidad que otros transcritos como los RNAm o RNAs largos no codificantes, lo que permite el análisis de muestras embebidas en parafina u otros materiales biológicos como sangre, plasma suero [87-89], orina [90], saliva [91] o exosomas circulantes [92] de forma óptima.

Tabla 2: Resumen sobre la actividad de los miRNAs en tumores triple negativos con información de sus blancos validados y funciones biológicas [93]

miRNA	Blanco validado	Función biológica en tumores TN	Cita
Supresores tumorales			
miR-200a/b	Zeb1/Zeb2, Suz12 y EphA2	Estimulación de la diferenciación del epitelio mamario	[94]
miR-200c	Zeb1/Zeb2 MSN y FN1 TrkB	Inhibición de transición epitelio mesénquima Supresión de migración Reversión de anoikis resistente	[95] [96] [97]
miR-205	E2F1 y LAMC1	Reducción de proliferación, ciclo celular y crecimiento de tumor	[60]
miR-203	BIRC5 LASP1	Reducción de proliferación, su sobre-expresión se asocia a cursos clínicos pobres Inhibición de migración, sobre-expresado en cáncer metastásico	[98]
miR-31	WAVE3, RhoA y Radexin PRKCE	Reducción de potencial metastásico Inducción de apoptosis y promoción de quimio y radio sensibilidad	[98] [99]
miR-34a	AXL	Reducción de migración	[100]
Familia let-7	RAS, MYC y HMGA2	Regulación de oncogenes	[101]
OncomiRs			
miR-181a/b(*)	Bim ATM	Inhibición de anoikis Deterioro de la reparación de rompimientos DNA de doble cadena *Es regulado positivamente por TGF-B *Su expresión sensibiliza a las células para tratamiento con cisplatino e inhibidores de PARP	[102] [103]
miR-146 y miR-146b-5p	BRCA1	Media proliferación y recombinación homologa	[104]
miR-155(*)		Es regulado por BRCA1 y estímulos pro-oncogénicos como la hipoxia.	[57]
miR-182	PFN1	Antagonista de mecanismos de inhibición de la proliferación e invasión celular.	[105]

Perfiles de sub-clasificación clínica:

En 2013, Cascione *et. al*, determinó perfiles de expresión diferencial de miRNAs en tumores TN relacionando firmas de expresión con características clínicas. Dos patrones de expresión: miR-125b, miR-655 y miR-421 (firma asociada a riesgo) y miR-16, miR-374a, miR-374b y miR-497 (firma “protectora”) predicen significativamente sobrevida promedio y sobrevida libre de enfermedad. Estos hallazgos sugieren la importante actividad de los miRNAs en el subtipo triple negativo mediante su habilidad de regular procesos celulares importantes tales como crecimiento y proliferación celular, migración celular y degradación de la matriz extracelular [106].

Posteriormente Gasparini, identificó un firma de 4 miRNAs (miR-155, miR-493, miR-30e y miR- 27a) que permite subdividir a los tumores TN de acuerdo a sus características inmunohistoquímicas en basal core (CB, EGFR and/or CK5, 6 positive) o tumores “cinco negativos” (5NP), pero también en grupos de alto y bajo riesgo clínico prediciendo prognosis en pacientes tratadas con dos de los más comunes regímenes quimioterapéuticos: antraciclinas or antraciclinas mas taxanos[107].

Como se puede observar, existe clara evidencia acerca de que la heterogeneidad biológica y clínica en tumores de mama triple negativos puede estar mediada por la expresión diferencial de miRNAs, por lo que se requiere continuar caracterizando el paisaje transcriptómico de los miRNAs mediante diversos abordajes matemáticos que nos permitan identificar sub-grupos biológicos y clínicos reproducibles, así como recapitular otros clasificadores intrínsecos. De igual forma, es importante aumentar el número de muestras vírgenes a tratamiento evaluadas con información clínica de relevancia, para poseer cohortes de validación independiente y fortalecer los diversos clasificadores. Así mismo, estos abordajes permitirán elegir miRNAs candidatos de forma más adecuada, para su evaluación experimental en modelos in vivo a in vitro y con ello definir mecanismos de acción y relevancia en el fenotipo triple negativo .

Justificación

El cáncer de mama triple negativo es una entidad altamente heterogénea con características biológicas y cursos clínicos diversos, así como limitadas opciones terapéuticas, restringiéndose únicamente a la quimioterapia citotóxica sistémica. Hasta el momento existen pocos estudios que hayan descrito abordajes matemáticos y biológicos para clasificar subgrupos de tumores triple negativos con relevancia clínica y biológica. A partir de firmas de expresión de RNAm se han definido grupos enriquecidos en rutas celulares particulares, que contribuyen a la tumorigénesis y al comportamiento biológico y clínico del tumor. Entre las alteraciones presentes en el establecimiento y desarrollo del tumor se encuentra también la expresión de los miRNAs, por lo que el agrupamiento no supervisado del fenotipo triple negativo basado en esta molécula es útil para identificar nuevos subgrupos tumorales o bien para recapitular los previamente ya establecidos mediante otras moléculas.

Los perfiles de miRNAs poseen ciertas ventajas como moléculas clasificadoras: 1) permiten emplear muestras embebidas en parafina, pues gracias a su estabilidad y tamaño se obtienen transcritos con calidad e integridad óptima que eviten el sesgo en el establecimiento y reproducibilidad del clasificador, a diferencia de los transcritos largos. 2) La identificación de patrones de miRNAs permite establecer mecanismos regulatorios de la expresión génica y su posible impacto en la biología celular, generando también nuevos conocimientos para el desarrollo de blancos terapéuticos.

La aplicación de metodologías de análisis genómico ofrece una amplia resolución y la posibilidad de determinar miRNAs que no han sido descritos previamente en cáncer de mama, lo cuales representan interesantes candidatos para su evaluación experimental, y por ende para el mejor entendimiento de la compleja red de regulación post-transcripcional.

Planteamiento del problema

El cáncer de mama es un problema grave de salud pública a nivel mundial y nacional. Desafortunadamente, de acuerdo a las predicciones epidemiológicas durante las próximas décadas tanto la incidencia como la mortalidad por tumores de mama triple negativo irá en aumento. Conocer los diversos aspectos de esta patología es fundamental para su mejor entendimiento y clasificación.

Las alteraciones en la expresión global de los miRNAs son uno de los principales factores para el desarrollo del cáncer. En la actualidad se han identificado cambios en los patrones de expresión de microRNAs que permiten una mejor clasificación de los tumores mamarios, así como una mejor evaluación de riesgo a recurrencia y muerte. Sin embargo, particularmente en el subtipo triple negativo la información aun es limitada, sesgada a cohortes compuestas mayoritariamente por muestras tumorales tratadas con esquemas quimioterapéuticos diversos los cuales potencialmente pueden modificar drásticamente los niveles de expresión de los miRNAs, así como muestras que no cumplen los estándares diagnósticos para ser consideradas triple negativas establecidos en las guías clínicas. Así mismo, no existen estudios que validen la utilidad de dichas firmas como herramientas de evaluación a riesgo.

Una de las tareas científicas que han cobrado importancia durante los últimos años es la descripción de las actividades biológicas funcionales de los miRNAs detectados como alterados en un contexto tumoral definido, y aun cuando existen perfiles diferenciales de expresión de miRNAs con predicciones *in silico*, en realidad, de un número de miRNAs muy escaso conocemos su función celular mediante abordajes experimentales. Lo anterior, limita claramente el conocimiento de los miRNAs como reguladores transcripcionales.

El costo humano y económico derivado de esta neoplasia, hace que la caracterización de alteraciones transcripcionales de miRNAs asociadas al desarrollo de cáncer de mama se convierta en una necesidad estratégica de

salud. Por ello esta investigación contribuirá al desarrollo del conocimiento sobre los perfiles de expresión de miRNAs que distingan subgrupos con relevancia biológica y clínica en tumores triple negativos así como la caracterización funcional de alguno de estos transcritos.

Pregunta experimental:

En los tumores de mama clasificados como triple-negativos, ¿existen patrones de expresión de miRNAs que permitan agrupar de forma no supervisada conjuntos de tumores con relevancia clínica y biológica?

Hipótesis:

Si existe una variación intertumoral en la expresión global de miRNAs en el cáncer de mama triple negativo, entonces será posible generar un clasificador basado en centroides, que permitan sub-clasificar el inmunofenotipo triple negativo con base a la expresión de un grupo de miRNAs y el cual se relacionará con el enriquecimiento de rutas celulares particulares, así como características clínicas de los tumores.

Objetivos

Objetivo General

Analizar los perfiles de expresión de microRNAs en tumores primarios de mama triples negativos vírgenes al tratamiento y en modelos celulares, con la finalidad de identificar moléculas que permitan sub-clasificar al subtipo triple negativo.

Objetivos Específicos

1. Analizar los patrones de expresión de microRNAs en tumores triple negativos vírgenes a tratamiento embebidos en parafina y líneas celulares mediante plataforma de alta densidad Affymetrix.
2. Identificar mediante algoritmos de agrupamiento no supervisado un grupo de miRNAs que permitan determinar subgrupos de tumores y líneas celulares triple negativos.
3. Correlacionar los subgrupos definidos por los análisis bioinformáticos con características clínicas y moleculares.
4. Validar los hallazgos de agrupamiento mediante minería de datos públicos como TCGA, METABRIC y Geo Omnibus.
5. Definir un perfil de expresión diferencial de miRNAs entre tumores y líneas celulares triple negativos y otros inmunofenotipos
6. Validar funcionalmente el papel de microRNAs específicos que se hayan asociado a un subgrupo específico de interés en los tumores primarios a través de ensayos funcionales en modelos celulares.
7. Definir posibles marcadores inmunohistoquímico que se correlacionen con los subtipos triple negativos, a través de la evaluación de los perfiles de expresión y la biogénesis de los miRNAs.

Materiales y métodos

Obtención de muestras tumorales: Los tumores de mama evaluados provienen de bancos de tejidos mexicanos e italianos. Los bloques de parafina con tumores de mama triple negativos (N=90) así como de otros inmunofenotipos (N=40) provenientes de México, fueron colectadas retrospectivamente del banco de tejidos del departamento de histopatología de la Fundación Mexicana de Fomento para la Prevención Oportuna del Cáncer de Mama, A.C., (FUCAM). Los criterios de inclusión para la colecta de las muestras tumorales fueron: pacientes vírgenes a tratamiento a la toma de la muestra y pacientes con seguimiento clínico de al menos 3 años. La colecta de las muestras ha sido previamente avalada por los comités de ética del FUCAM e INMEGEN. Los tumores provenientes de Italia (N=50) fueron obtenidos dentro del marco de una colaboración científica con el Instituto Nacional del Tumor (IRCCS), Milán. La colecta de las muestras cumple con los criterios de inclusión de este estudio y con la aprobaciones éticas del IRCCS.

Clasificación Inmunohistoquímica y evaluación histológica: La evaluación inmonohistoquímica se realizó mediante el análisis de la expresión de RE, RP (PharmDX kit) y HER2 (DAKO kit). La clasificación tumoral se realizó de acuerdo a los estándares clínicos establecidos en las guías de patología oncológica [108, 109]. Aquellos tumores con positividad igual o menor al 1% de RE, RP y HER2 se consideraron como triples negativos tras la observación independiente de dos patólogos entrenados. Una vez clasificando y seleccionando el conjunto de tumores a analizar un patólogo entrado determinó la celularidad tumoral y localizó las zonas con mayor contenido de células neoplásicas. Dichas áreas fueron macrodisectadas mediante un arreglador de tejidos obteniendo un cilindro de 2mm de diámetro para su posterior procesamiento. Para un un grupo de tumores (N=190) el panel inmunohistoquímico se amplió incluyendo la evaluación de proteínas de biogénesis de miRNAs: DICER (abcam,1:50) y Argonauta 2 (abcam, 3µg/ml) siguiendo el protocolo propuesto por ABCAM.

Extracción de RNA: La extracción de RNA total incluyendo la fracción pequeña de los tumores y líneas celulares se realizó mediante método de columnas con el kit comercial Recover All (Ambion) dedicado para muestras embebidas en parafina. Brevemente, los cilindros de las muestras tumorales fueron desparafinados y a continuación se aisló el RNA mediante columnas tras la digestión enzimática de proteasas y DNAsas. La concentración de RNA total se determinó mediante espectrofotometría con el sistema Nanodrop.

Análisis de patrones de expresión de microRNAs: La expresión de miRNAs se evaluó mediante la plataforma Gene Chip microRNA microarray v2.0 y v3.0 (Affymetrix, Santa Clara CA, USA), las cuales evalúan de forma conjunta la expresión de 1050 miRNAs maduros de humano. El perfil de expresión de miRNAs se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Affymetrix FlashTag Biotin HSR RNA labeling kit Manual). En resumen, 600 ng totales de RNA fueron marcados con el flashtag HSR kit e hibridados al sistema Gene Chip. Los procesos de lavado y tinte se realizaron en la estación de fluidos GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara CA, USA). Los arreglos fueron leídos usando el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA, USA), en la unidad de microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Análisis Bioinformáticos para los perfiles de expresión de miRNAs: Los valores de intensidad de señal fueron corregidos por el algoritmo robust multiarray analysis (RMA) y resumidos de forma independiente para cada lote de arreglos de acuerdo a versión 2 o 3 en el ambiente R mediante el paquete affy. A continuación todos las muestras fueron conjunta y colectivamente normalizadas por cuantiles y transformados logarítmicamente en el ambiente R mediante la librería limma. En aquellos genes que están representados por varias sondas, la sonda con mayor valor fue elegida para representar al gen. Los efectos de lote (variación no relacionada con la biología) fueron ajustados mediante el ajuste de cada gen con un abordaje Bayesiano no paramétrico mediante el algoritmo

COMBAT implementado en genepattern (ComBat, <http://genepattern.broadinstitute.org/gp/pages/index.jsf>) [110]

Para permitir un análisis robusto, el conjunto de tumores evaluados mediante microarreglos de miRNAs se dividió en cohorte de entrenamiento (N=83) y de validación (N=50). La identificación de subtipos estables se realizó en la cohorte de entrenamiento mediante el algoritmo de agrupamiento no supervisado non-negative matrix factorization, NMF [110], (2 000 iteraciones, función de error: euclideana y un máximo de 10 clusters) basado en los miRNAs que presentaban mayor variación a lo largo de las muestras (N=185, Desviación estándar: >0.95) en la herramienta en línea Genepattern (NMF Consensus, <http://genepattern.broadinstitute.org/gp/pages/index.jsf>). La reproducibilidad del agrupamiento se evaluó usando otros dos algoritmos aglomerativos: K-means y consensus clustering. Este procedimiento se realizó de forma independiente también en la cohorte de validación. Para poder asignar una nueva muestras a un grupo u a otro se realizó un modelo supervisado de maquinas vectoriales (SVM, <http://genepattern.broadinstitute.org/gp/pages/index.jsf>) el cual analiza y reconoce patrones en la cohorte de entrenamiento mediante una separación en hiperplanos entre los vectores de expresión y los grupos para predecir a que categoría pertenece una determinada muestra. El archivo que contiene el modelo se adjunta como material suplementario para poder ser empleado en la clasificación dentro flujo de análisis de GenePattern. Como parte de la caracterización de la heterogeneidad dentro de los subtipos triple negativos también se sub-clasificaron 3 modelos celulares triple negativos: mda-mb-468, mda-mb-231, HS578t, basados en los análisis supervisados previamente mencionados.

Firma de miRNAs derivada para sub-clasificar los tumores TN: Para generar una firma derivada de los subtipos TN, se realizaron dos abordajes matemáticos: 1) Un análisis de expresión diferencial mediante una prueba de T ajusta por FDR mediante el paquete limma en R, detectando aquellos genes significativamente expresados ($\log FC:2$ y $FDR \geq 0.05$) en cada subtipo que estuvieran alterados en al menos el 80% de las muestras de cada grupo. 2) La correlación de Pearson

entre cada uno de los genes y los subtipos definidos. Los genes con una correlación significativa ($P. Value \geq 0.05$) se consideraron como asociados a un cierto subtipo. Con la integración de ambos abordajes se definió un firma reducida de 67 miRNAs. A continuación, se calculó la puntuación Z (Z-score) de cada miRNA y se obtuvo un modelo de centroides por un análisis de máquinas vectoriales (SVM) que permite clasificar las muestras a un subgrupo definido. Así mismo se evaluó la especificidad y sensibilidad de dicha firma en la asignación del subgrupo.

Validación independiente del clasificador con datos públicos: Para validar la firma de clasificación de tumores triple negativos se emplearon dos conjuntos de datos públicos: 1) GSE40267 de la base GEO Omnibus [111]. Dicho conjunto de datos presenta el perfil de expresión de miRNAs de 182 tumores frescos triple negativos, analizados por la plataforma de microarreglos Agilent Human miRNA Microarray (V3) que evalúa 457 miRNAs maduros de humanos y comparte 135 miRNAs con la firma de clasificación propuesta. 2) Datos de 736 miRNAs de la base de datos METABRIC [112, 113] analizados mediante microarreglos Agilent ncRNA 60k y que comparte 156 miRNAs con la firma de clasificación propuesta. Finalmente, para su clasificación se empleó el modelo generado a partir del SVM y se analizó su enriquecimiento con características clínicas y biológicas, así como la correlación con los resultados generados con nuestros datos.

Enriquecimiento de rutas y análisis ontológicos: Para definir el enriquecimiento ontológico de rutas celulares en cada uno de los subtipos de tumores triple negativos se realizó un análisis integrativo entre perfiles de expresión de miRNAs y RNAm (datos que forman parte de la línea de investigación del laboratorio) mediante el software MAGIA [114]. Inicialmente a través de un análisis *in silico* con los algoritmos TargetScan, miRanda y Pita se identificaron los RNAm blancos predichos, a continuación mediante una correlación de Pearson entre los niveles de expresión del miRNA y el RNAm predicho se establecieron blancos génicos directos. Estos RNAm fueron analizados con el algoritmo Gene Set Enrichment

analysis (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) y DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>) para definir los procesos celulares involucrados en cada grupo.

Asociación de subgrupos con parámetros clínicos: Con el fin de definir correlaciones de los subgrupos de los tumores triple negativos con parámetros clínicos se evaluó en primera instancia el riesgo relativo relativo y razón de momios [115] a presentar recurrencia y/o metástasis, así como a muerte. A continuación se realizó un análisis de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general a través del tiempo mediante el estimador Kaplan-Meier con el software Prism, el cual computa el porcentaje de supervivencia, que es contrastado para determinar su significancia ($P < 0.05$) mediante una prueba log-rank (prueba de Cox) y Gehan-Wilcoxon. Finalmente, se grafica el análisis mediante una curva Kaplan-Meier.

Perfil de expresión diferencial de miRNAs entre tumores triple negativos y otros subtipos: Parte de la caracterización de los tumores TN abordó la comparación entre distintos inmunofenotipos: muestras TN vs muestras con positividad a alguno de los marcadores hormonales (RE ó RP) ó HER2 (como previamente se describió), identificando miRNAs con expresión alterada en los tumores TN. Este conjunto de datos se contrastó con los miRNAs cuya expresión caracterizaba a cada subtipo. Aquellos miRNAs alterados en ambos análisis se definieron como moléculas de interés biológico para su posterior análisis funcional. miR-342-3p es el miRNA que se decidió caracterizar en los modelos celulares. Para ello, previamente se validó la expresión diferencial del miRNA por dos diferentes abordajes: primero se realizó una validación *in silico* usando las bases de datos públicas METABRIC y TCGA (N=2300). Después se confirmó su sub-expresión en los tumores TN en un sub-conjunto independiente de muestra de varios fenotipos (N=40) y líneas celulares (N= 10) mediante RT-PCR con sondas TaqMan. La expresión del miRNA se calculó mediante el método Delta Ct.

Validación funcional experimental:

Modelos Celulares: Se emplearon las siguientes líneas celulares triple negativos (RE-, RP-, HER2-): MDA MB 231, MDA MB 468 y HS578T. Las cuales fueron obtenidas de la compañía ATCC y genotipificadas para confirmar la autenticidad de la línea en laboratorio de diagnóstico genómico del INMEGEN.

Cultivos celulares y transfecciones: Las líneas celulares se cultivaron a 37 ° C con CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen).

Transfección transitoria del mimic de miR-342-3p: Para determinar la actividad biológica de miR-342-3p se transfectó transitoriamente el mimic del miRNA al modelo celular MDA MB 468. Brevemente, el pre-miRNA miR-342-3p (Ambion, PM12328 Cat. AM17100) a una concentración final de 30nM fue expresado exógenamente mediante el agente transfectante NeoFX (Ambion) y medio reducido en suero Optimem (Gibco). Como control negativo se transfectó el Pre-miR miRNA Precursor Negative Control 1 (Ambion, AM17110) el cual es una secuencia validada que no produce efectos identificables. El transfectante y el mimic del miRNA se incubaron por 24hrs, tras las cuales se cambió el medio por DMEM suplementado.

Evaluación de la eficiencia de la transfección: Para determinar la eficiencia de la transfección se colectaron las células a 24, 48 y 72hrs post-transfección y se extrajo el RNA mediante Qiazol (Qiagen) de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante. A continuación se evaluó la expresión de miR-342-3p mediante sondas TaqMan. La sonda RNU-44 fue empleada como control de normalización. Todos los experimentos fueron evaluados por triplicado. La expresión del miRNA se calculó mediante el método Delta Ct. Así mismo, se emplearon secuencias aberrantes marcadas con cy3 las cuales se visualizaron mediante un microscopio

de fluorescencia, obteniendo una imagen en luz clara y luz fluorescente para su posterior cuantificación con ImageJ.

Análisis funcionales de los procesos celulares tras la expresión exógena de miR-342-3p.

Viabilidad celular: Se evaluó mediante el ensayo de MTT empleando el kit comercial MTT Cell Proliferation Assay (ATCC) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante incubando las células durante 2hrs con la solución de MTT a 37°C. Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro de placas Biorad a 570nm.

Proliferación: Se evaluó mediante la tinción con SRB tras 24 o 48hrs post-transfección siguiendo el experimento hasta 120hrs colectando las células cada 24hrs. Brevemente, las células fueron fijadas con solución de ácido tricloro acético (TCA) al 10% incubando durante 1 hora a 4°C. A continuación se tiñeron las muestras con SRB durante 15 min, posteriormente se eliminó el exceso de colorante mediante lavados de ácido acético al 1%. Finalmente se disolvió el colorante en Tris base 10mM y las placas se leyeron en un espectrofotómetro de placas Biorad a 570nm.

Migración e invasión: El potencial migratorio de las células transfectadas (24 y 48hrs post-transfección) se evaluó mediante sistemas transwell (Corning) sembrando 100 000 células e incubándolas durante 24hrs a 37°C. El potencial invasor de las células se evaluó a través de cámaras de invasión transwell cubiertas con Matrigel (BD Biosciences) al 10% sembrando 100 000 células e incubándolas durante 24hrs a 37°C. Tanto para migración como invasión las células fueron fijadas con alcohol al 100% durante 1hr a -20°C. A continuación las células fueron teñidas con SRB y lavadas con ácido acético al 1%. Para calcular el número de células que traspasaron a la zona inferior del transwell se tomaron cuatro fotos de los cuadrantes que abarcan la membrana del transwell para su posterior cuantificación con el software Image J. Asimismo, se disolvió el colorante SRB con Tris base 10mM y las placas se leyeron en un espectrofotómetro de placas BioRad a 570nm.

Apoptosis: Se evaluó mediante el Kit Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen) de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante. Se partió de un total de 600 000 células a 24 y 48hrs post-transfección definiendo la fluorescencia mediante la lectura en el citómetro de flujo BD FACS Aria I midiendo la emisión a 530 y 575nm (para los canales de FITC y yoduro de Propidio) y el software de análisis FACSDiva.

Ciclo celular: Se analizó con el kit comercial CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (BD Biosciences), de acuerdo al manual del fabricante. La medición de la fluorescencia se realizó con el citómetro de flujo BD FACS Aria I entre 580 y 650nm (canal para loduro de propidio) y el software de análisis modFit 3.2

Todos los experimentos fueron evaluados por triplicado de forma independiente para cada procesos celular

Análisis de Patrones de Expresión Génica en células transfectadas y no transfectadas con premiRs: Para definir el efecto biológico de la expresión exógena de miR-342-3p sobre los programas transcripcionales en la línea celular mda-md468 se evaluó la expresión global de RNAm mediante la plataforma de microarreglos de Affymetrix Human Gene 1.0 ST que interroga 28,869 genes. Brevemente, se obtuvo RNA total de células transfectadas con mimic de miR-342-3p y control negativo colectadas 48hrs postransfección. Concentraciones equimolares de RNA de 3 replicados técnicos fueron agrupados en 2 muestras (N=6). La síntesis de DNA, amplificación, hibridación y marcaje se realizaron de acuerdo al protocolo del fabricante (Affymetrix WT Sense Target labeling assay Manual, GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array). Los lavados y marcaje se realizaron en una estación GeneChip Fluidics Station 450. Los microarreglos fueron leídos en un escáner The GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA, USA). El procesamiento de los arreglos se realizó en la unidad de microarreglos del INMEGEN.

Análisis bioinformáticos para definir la expresión génica de la línea con expresión exógena de miR-342-3p: Para definir los RNAm con expresión

diferencial entre los modelos celulares se realizó una prueba de t ajustada por FDR con el paquete limma en el ambiente R. Con el objetivo de definir blancos probables del miR-342-3p se realizó un análisis integrativo con la herramienta MAGIA (<http://gencomp.bio.unipd.it/magia/start/>) como previamente se ha descrito. A continuación se definieron RNAm blancos directos para su validación experimental. Finalmente, se usaron análisis *in silico* en bases de datos para evaluar otros mecanismos genómicos (mutaciones, variantes somáticas en el número de copias o re-arreglos estructurales) y epigenéticos (metilación) que pudieran afectar la expresión de RNAm blanco mediante la herramienta en línea cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) [116].

Western Blot: Las células fueron colectadas a 24, 48 y 72hrs post transfección y lisadas en buffer RIPA. La cuantificación de la concentración de proteína se realizó con el método colorimétrico de azul de Coomasie (Thermo Fisher) por duplicado con una curva estándar de 4 puntos. A continuación se realizó electroforesis horizontal de las proteínas en gel tris 4-12% (Invitrogen) y buffer MOPS 1x (Thermo Fisher) a 120v en cámara BioRad. Las proteínas fueron transferidas a membrana Immobilon-P fluoruro de polibilideno (Millipore) en cámara de transferencia BioRad. Las membranas fueron probadas contra anticuerpos específicos para MCT1 (Santa Cruz sc-365501, 1:200), HIF1alpha (BD, 1:250), Glut1 (Abcam ab115730, 1:1000), receptor de estrógeno (Santa Cruz sc-543, 1:200) y como controles de carga vinculina (1:2000) o B-actina (1:10000). Subsecuentemente el anticuerpo secundario anti-raton o anticonejo fue hibridado en una concentración 1:5000. Las bandas específicas fueron visualizadas con solución ECL y reveladas en placa radiográficas exponiéndolas a diferentes tiempos para obtener la resolución de la imagen óptima. El análisis densitométrico se realizó en software Image J.

Construcción de plásmidos: La región de hibridación del miRNA y el 3' UTR del gen de interés se determinó mediante el software microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). A continuación se diseñaron las

secuencias que se insertaron en el plásmido agregándole los sitios de corte para la enzimas de restricción XHOL y NOTL a los extremos, y en la región central un sitio único de corte para SACL (Fig. 10), mapa del plásmido en anexos). También se diseñó una secuencia de inserto degenerada con mutaciones en tres bases de la región semilla. Las secuencias fueron sintetizadas en la compañía IDT.

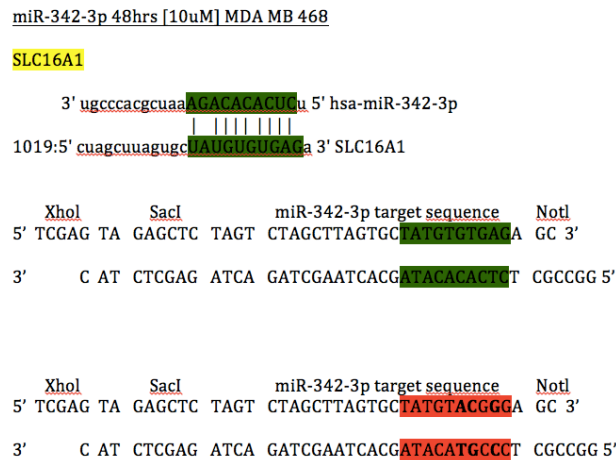


Fig. 10: Secuencias del inserto de la secuencia 3'UTR de MCT1 (SLC16A1). A) Hibridación de miR-342-3p y MCT1. B) Secuencias dúplex (5'-3', 3'-5'). Marcada en verde se resalta la región semilla WT, en rojo la región semilla mutada, en negritas los nucleótidos que se cambiaron

El vector fue linearizado con las enzimas de restricción XhoI y NotI (Promega). A continuación el inserto fue ligado durante toda la noche a 16°C con ligasa T4 DNA (ThermoFisher). Después, se realizó la transformación del plásmido en bacterias E. Coli competentes con el kit TransformAid Bacterial Transformation (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para el día 2 las bacterias se sembraron en agar suave (Sigma) suplementado con ampicilina (0.5mg/ml) incubándolas a 37°C toda la noche. Las colonias bacterianas con plásmido fueron seleccionadas y expandidas en medio líquido LB (Sigma) a 37°C durante toda la noche. El plásmido fue extraído con el kit Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo) y el DNA fue cuantificado por espectrofotometría. La presencia del inserto se evaluó mediante digestiones con la enzima SACL (Promega) y digestiones dobles con HINT I (Promega) y SACL por PCR punto final. Los plásmidos seleccionados fueron secuenciados con primers dirigidos para el promotor T7 para

verificar la inserción y correcta dirección de la secuencia previo a ser transfectados en el modelo celular.

Transfección del vector psiCheck en modelo celular y análisis de gen reportero: El plásmido psichack con el inserto de la secuencia del gen de interés WT, mutado y vacío fue transfectado transitoriamente a la línea celular mda-mb-468 con lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las células fueron colectadas 24hrs post-transfección. Para definir la actividad de la luciferasa se empleó el kit Dual luciferase reporter Assay (Promega) leyendo la muestras en un luminómetro GloMax® 20/20 (Promega). Para definir las unidades relativas de luz de la luciferasa se normalizaron los valores obtenidos de la luciferasa Renilla (usado como gen reportero primario) con la intensidad de señal obtenida de luciferasa firefly (corrector de la eficiencia de transfección). Todos los experimentos se realizarán por triplicado.

Consumo de lactato exógeno: 200 000 células mda mb 468 transfectadas con el mimic miR-342-3p y con el control negativo fueron expuestas a 10mM de una solución de sodio L-lactate-3-13-c (Sigma), concentración correspondiente al nivel de lactato mas comúnmente detectada en los tumores humanos [117], durante 24, 48 y 72hrs en medio DMEM suplementado con glucosa (4mg/L) libre de fenol. El rango de incorporación de lactato se evaluó en el medio de cada uno de los cultivos celulares mediante un ensayo colorimétrico con el kit Lactate Assay I (Sigma) y comparado contra una curva estándar de concentraciones conocidas de lactato exógeno. Las muestras fueron leídas en un lector de placas a 570nm. Todas las muestras fueron desproteinizadas con unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 con membrana Ultracel-10 kDa (Millipore). Todos lo experimentos se realizaron por duplicado con 3 replicados técnicos cada uno.

Consumo de lactato intra y extra celular: La concentración de lactato de células mda mb 468 transfectadas con el mimic de miR-342-3p y control negativo (2×10^6 células) sembradas en medio DMEM libre de fenol, colectadas a las 24, 48

y 72hrs post-transfección se determinó mediante el ensayo colorimétrico Lactate Assay Kit I (Sigma) comparado las mediciones con una curva estándar de concentraciones conocidas de lactato de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante. Para el lactato extracelular se colectó el medio del cultivo, mientras que para evaluar el lactato intracelular se colectaron las células del mismo ensayo y se lisaron de acuerdo a las instrucciones del kit. Todas las muestras fueron desproteinizadas con unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 con membrana Ultracel-10 kDa (Millipore). Todos lo experimentos se realizaron por triplicado con 3 replicados técnicos cada uno.

Consumo de glucosa intra y extra celular: La concentración de glucosa de células mda mb 468 transfectadas con el mimic de miR-342-3p y control negativo (2 x10⁶ células) sembradas en medio DMEM libre de fenol, colectadas a las 24, 48 y 72hrs post-transfección se determinó mediante el ensayo colorimétrico Glucose Assay kit (Abcam) comparado las mediciones con un curva estándar de concentraciones conocidas de glucosa de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante. Para la glucosa extracelular se colectó el medio del cultivo, mientras que para evaluar la glucosa intracelular se colectaron las células del mismo ensayo y se lisaron de acuerdo a las instrucciones del kit. Todas las muestras fueron desproteinizadas con unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 con membrana Ultracel-10 kDa (Millipore). Las muestras fueron leídas en un lector de placas a 570nm. Todos lo experimentos se realizaron por triplicado con 3 replicados técnicos cada uno.

Análisis estadísticos: Los métodos estadísticos empleados para comparar las condiciones experimentales consistieron en una prueba de T pareada. La significancia estadística se determinó por un método no pareado de dos colas. Dichos análisis se realizaron en el software Prism v.6

Nota: Los protocolos en extenso se localizan en el anexo 1

Resultados

Muestras clínicas evaluadas

Se evaluaron un total de 133 tumores triple negativos embebidos en parafina evaluados independiente por dos patólogos entrenados. En la tabla 3 se muestran las características clínicas de la cohorte analizada, destacando el porcentaje de pacientes con cursos clínicos agresivos característicos de este subtipo, así como la alta incidencia en mujeres menores de 50 años. De acuerdo a datos de meta-análisis donde se evalúan 3,947 pacientes, los tumores TN presentan una mayor distribución de pacientes menores a 50 años (rango de entre 30 a 45%) , similar a nuestros datos (rango 36 a 49%), comparado con los subtipos luminales y enriquecidos en Her2 con menor presencia de pacientes menores a 50 años (16 a 30%) [118].

Tabla 3: Características clínicas de la cohorte evaluada

	Conjunto de entrenamiento N=82	Conjunto de prueba N=50
Grado		
I	3 (3.66%)	1 (2%)
II	12 (14.63%)	5 (10%)
III	49 (59.76%)	40 (80%)
Desconocido	18 (21.95%)	4 (8%)
Edad de diagnóstico		
<29	1 (1.2%)	1 (2%)
30-39	14 (17.07%)	3 (6%)
40-49	24 (29.27%)	14 (28%)
50-59	19 (23.17%)	17 (34%)
60-69	9 (10.96%)	9 (18%)
>70	9 (10.96%)	2 (4%)
Desconocido	6 (7.3%)	4 (8%)
Media	51.6	54.59
Max	88	84
Min	28	26
Recurrencia		
No	71 (86.58%)	28 (56%)
Si	10 (12.19%)	18 (36%)
Desconocido	1 (1.22%)	4 (8%)
Metástasis		
Distante	10 (12.19%)	11 (22%)
No	71 (86.58%)	35 (70%)
Desconocido	1 (1.22%)	4 (8%)
Muerte		
No	69 (84.14%)	35 (70%)
Si	13 (15.85%)	11 (22%)
Desconocido	0	4 (8%)
Climaterio		
Pre-menopausia	28 (34.15%)	Na
Post-menopausia	43 (52.43%)	Na
Desconocido	11 (13.41%)	Na
Tamaño (mm)		
1 - <10	3 (3.66%)	5 (10%)
10 - <20	14 (17.03%)	15 (30%)
>20	55 (67.07%)	26 (52%)
Desconocido	10 (12.19%)	4 (8%)

Clasificación de tumores triple negativo

La evaluación de agrupamiento jerárquico no supervisada con el algoritmo NMF definió 4 subtipos de tumores TN basados en la expresión de los 179 miRNAs más variables entre los tumores de la corte de entrenamiento (N=82) (Tabla 4) . Para definir el número de grupos presentes en los perfiles de expresión, examinamos el coeficiente de Cophenetic en donde el punto más alto de la curva indica el número ideal de grupos de acuerdo a su estabilidad, la cual no aumenta con el incremento de grupos (Fig. 11A). La matriz de identidades (Fig. 11B) es una representación visual de la proporción de veces en las que 2 muestras se agrupan juntas a través de las iteraciones de re-muestreo. El grupo de muestras que frecuentemente se agrupan una con la otra es representada por los colores rojos o amarillos mientras que las que no se agrupan se muestran en azul. La reproducibilidad de la clasificación fue analizada por otros métodos de agrupamiento no supervisado incluyendo K-means (Fig. 11C) y Consensus Clustering (Fig. 11D) (ambos con 1000 iteraciones), validando la distribución y número de grupos hallados con el algoritmo NMF. Un análisis de componentes principales permite mostrar la diferencias en los perfiles de expresión de miRNAs entre los tumores de cada uno de los subtipos identificados (Fig. 11E).

Con el fin de determinar la reproducibilidad de los subtipos identificados en nuestro grupo de entrenamiento, se analizó el grupo de prueba. Para evitar algún sesgo no biológico (técnico o poblacional) las muestras fueron normalizadas de forma conjunta y ajustadas por COMBAT, posteriormente fueron evaluadas mediante un análisis de componentes principales, lo que nos permitió identificar 5 muestras que no formaban parte de la distribución normal del resto de las muestras y por lo tanto fueron eliminadas (Fig. 12A-B). Así mismo, se evaluó la correlación de la expresión normalizada de los miRNAs entre la cohorte de entrenamiento y la de prueba resultando en una amplia correlación y una distribución no sesgada a población o lote (Fig. 12 C-D). A continuación se analizó este grupo de 46 tumores triples negativos independientes (cohorte de prueba) con el algoritmo NMF, reproduciendo nuevamente 4 grupos estables basados en la expresión de los 179 miRNAs más variables entre los tumores. Finalmente a través de un abordaje de agrupamiento supervisado con maquina de vectores se generó un modelo basado en la expresión de los 179 miRNAs que permite clasificar nuevas cohortes de tumores con una sensibilidad aproximada del 90% (comparando contra los grupos definidos por el algoritmo NMF) .

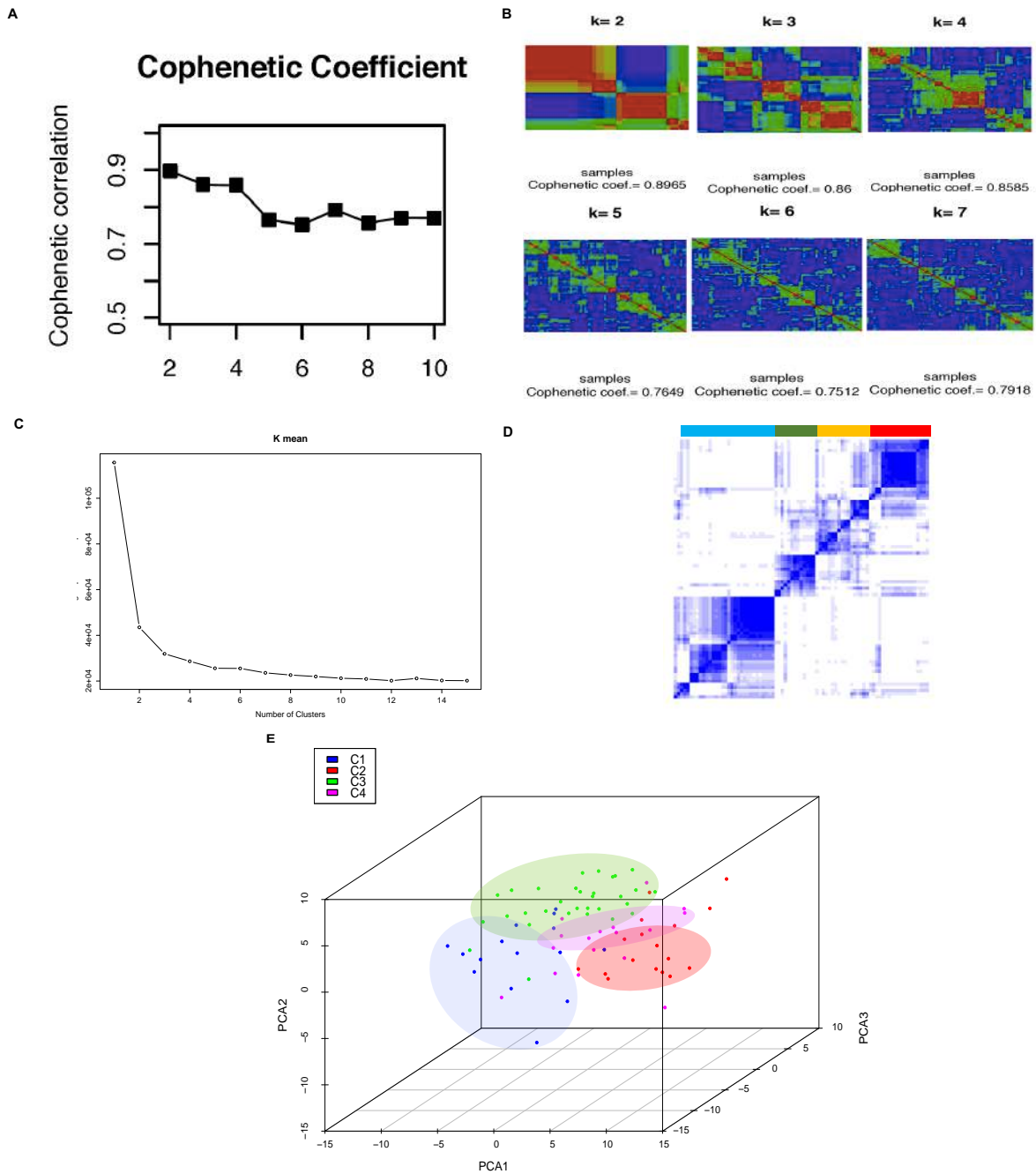


Fig. 10: Análisis de agrupamiento no supervisado mediante el cual se definen 4 grupos de tumores triple negativos. A) Coeficiente copenético del análisis con el algoritmo NMF en tumores triple negativos mostrando la mayor estabilidad con 4 grupos. B) Matriz de identidad del agrupamiento con algoritmo NMF = k2 al k7 C) Curva CDF de análisis K-means que muestra que el número óptimo de grupos es 4 y la cual no cambia con el incremento de grupos (K) validando análisis de NMF . D) Matriz de identidad del agrupamiento de los tumores TN con el algoritmo Consensus Clustering mostrando 4 grupos. E) Análisis de componentes principales que representan diferencias en la expresión de miRNAs entre los subgrupos de tumores TN.

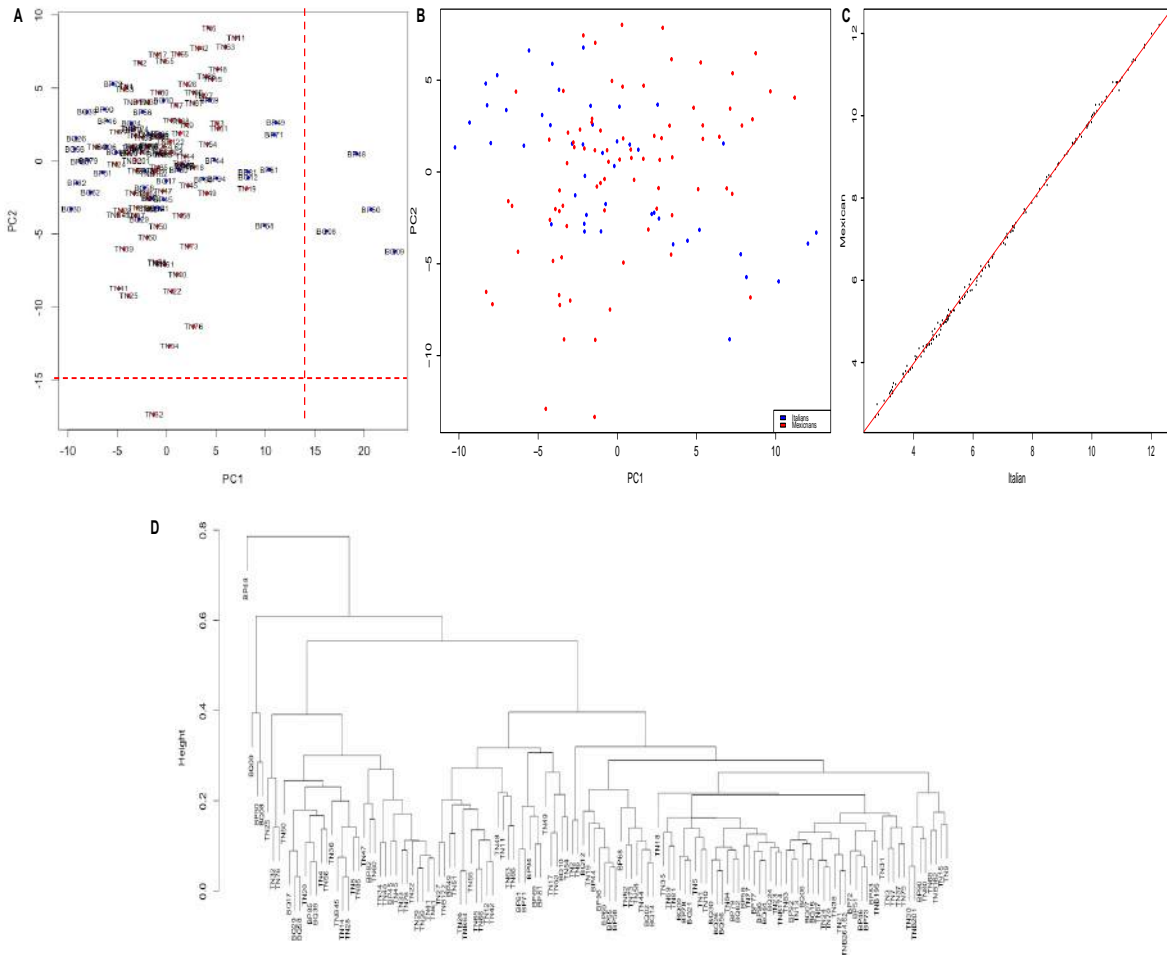


Fig. 12: Controles de calidad de las muestras correspondientes al set de prueba y de validación. A) Análisis de componentes principales de la expresión normalizada de miRNAs de las cohortes de prueba y entrenamiento. B) Análisis de componentes principales excluyendo muestras con valores atípicos C) Gráfica de correlación entre los valores normalizados de la cohorte de prueba (Mex) y entrenamiento (Italianas). D) Dendrograma por correlación de Pearson sin agrupamiento específico para poblaciones o lotes.

de expresión completa y 2) Mediante un análisis de enriquecimiento de rutas con la base de datos KEGG y un análisis de enriquecimiento ontológico con la expresión del RNaM categorizada incluyendo aquellos genes con expresión diferencial (FC:1.5, valor de P= 0.01) en cada subtipo (Fig 13). Los 4 grupos definidos se distinguen cada uno en diversos procesos los cuales representan características biológicas y celulares únicas. Estos análisis se realizaron independientemente para cada cohorte (entrenamiento y prueba) así como de forma conjunta, obteniendo un enriquecimiento de rutas similares, lo cual valida

en un abordaje externo la presencia de 4 grupos de tumores TN basados en la expresión de miRNAs.

Subtipo C1: Las ontologías y rutas celulares enriquecidas para el subtipo C1 corresponden principalmente a procesos del sistema inmune, particularmente a la regulación de la activación del Interferón así como los genes activados por este, contribuyendo a la tolerancia inmune del tumor. El subtipo posee una elevada señalización de RIG 1 (RLRs) el cual favorece el reclutamiento de adaptadores proteicos que promueven la señalización de rutas que permiten la síntesis de Interferón, así como otras citosinas inflamatorias, que son importantes para la respuesta inmune. Por otro lado el enriquecimiento de TRAF6, un miembro de la familia de factores asociados a receptores de necrosis tumoral actúa como señalizador en diversos procesos al mediar la activación de genes efectores del interferón como IRF7, así como en rutas de señalización de receptores parecidos a Toll, los cuales también están enriquecidos en este subtipo tumoral. Finalmente esta ruta de señalización también puede activar a NF- κ B que también se encuentra enriquecida en el grupo C1. Finalmente procesos relacionados con matriz extracelular y adhesiones focales también forman parte de las ontologías y rutas enriquecidas.

Subtipo C2: En este grupo se observa el enriquecimiento de procesos con importancia en el desarrollo y establecimiento del tumor como la transición epitelio mesénquima (EMT), que juega un papel importante en el desarrollo de los tumores y su progresión. Este proceso es caracterizado por la transformación de un fenotipo epitelial a mesenquimal, así como la pérdida del mantenimiento de las uniones celulares como SFRP4, SNAI2, cadherinas y metaloproteasas. El procesos de EMT también permite la migración celular la cual es un proceso significativamente representado en este subtipo. Se presenta también el enriquecimiento de rutas oncogénicas, como la activación de RAS mediante la activación de NMDA, cuya actividad principal se centra en el crecimiento tumoral y favorece un fenotipo agresivo. Finalmente, se describe el enriquecimiento en metabolismo de drogas principalmente por la regulación de transportadores ABC, los cuales se han asociado a mecanismos de resistencia farmacológica lo cual podría promover una menor sobrevida y un porcentaje mayor de pacientes con recurrencia.

Subtipo C3: el subtipo C3 muestra ontologías génicas únicas las cuales incluyen procesos de la células inmunes así como de metabolismo y biosíntesis de glicolípidos. Estos procesos incluyen citotoxicidad mediada por células asesinas naturales, respuesta del sistema adaptativo, regulación de procesos efectores del sistema inmune, activación de linfocitos y proliferación de células T. Este subtipo se evidencia por la expresión génica de señales inmunes tanto innatas como adaptativas las cuales pueden tener un importante papel en el establecimiento de la biología del tumor. Dado que todos las muestras procesadas en este estudio fueron evaluadas por su contenido celular tumoral extrayendo zonas ricas en células neoplásicas es muy probable que estas características inmunológicas sean principalmente del propio tumor y no de infiltrados de células inmunológicas.

Subtipo C4: Este subtipo se caracteriza por el enriquecimiento de la respuesta y señalización de rutas hormonales, incluyendo respuesta estrogénica, metabolismo de ácidos grasos y mediación de transporte vesicular por RE. Este enriquecimiento se observa aun cuando todos los tumores evaluados son RE negativos y presentan abatida la expresión de este receptor. Destacan el enriquecimiento de genes como citosinas y receptor de andrógeno asociados a estos procesos. Así mismo el subtipo presenta una representación significativa de procesos metabólicos implicados en la generación de energía y aprovechamiento de nutrientes.

Características clínicas por subtipo

La asociación de diversos parámetros clínicos con los subtipos de tumores TN demostraron la presencia de grupos de alto y bajo riesgo para la presencia de recurrencia, metástasis y muerte. El riesgo relativo para muerte aumenta significativamente en los grupos C1 y C2 (RR=2.1, Valor de p= 0.043) mientras que los riesgos para recurrencia (RR=1.91, valor de p= 0.053) y metástasis (RR=2.17, valor de p= 0.07) también aumentan en los grupos C1 y C4 , pero no alcanzan significancia estadística, aún cuando si se observa una tendencia, la cual probablemente alcanzaría valores significativos con un mayor número de muestras (Fig. 14A).

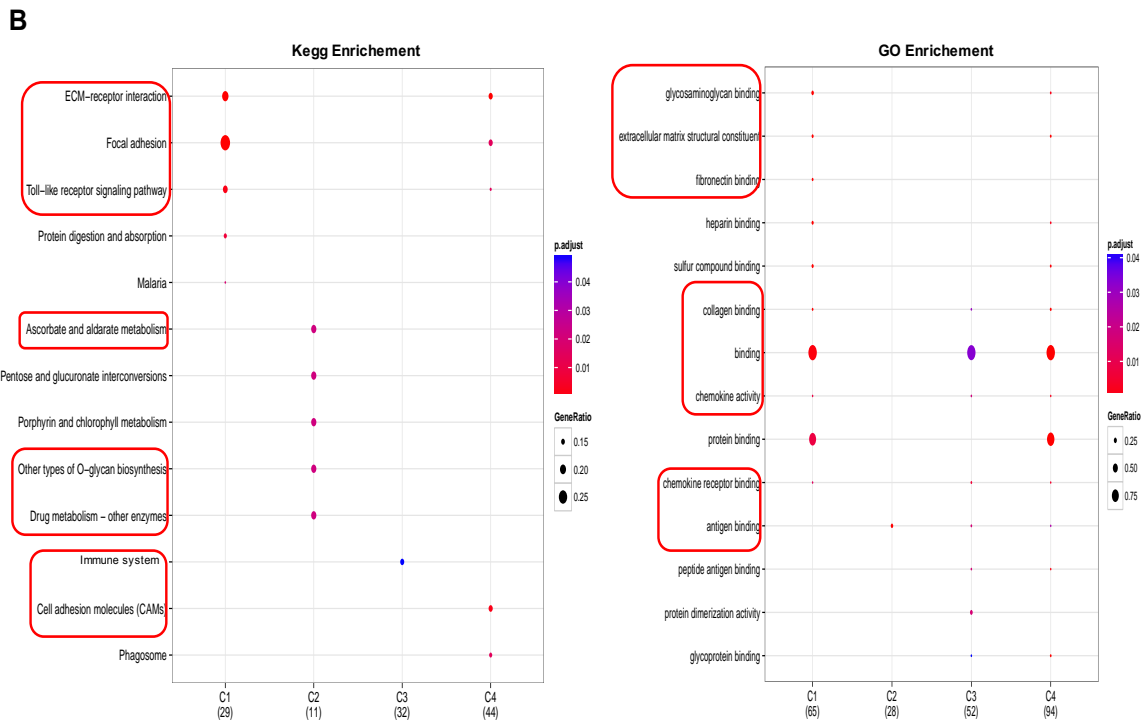
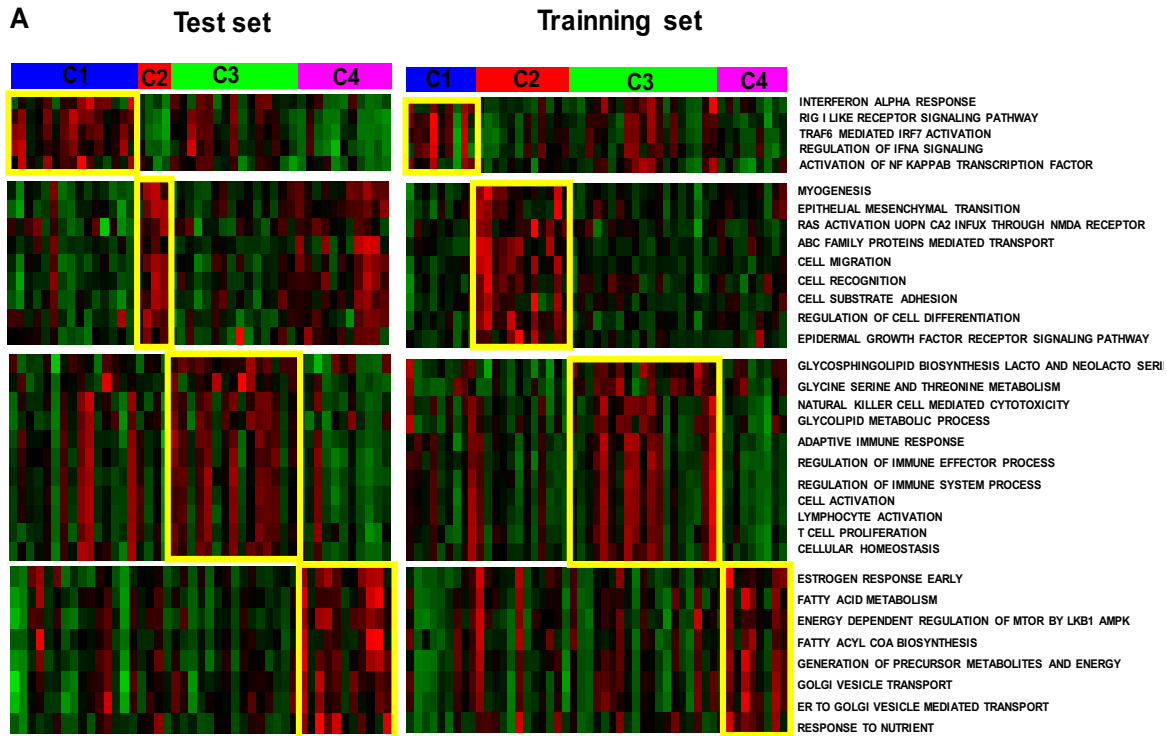


Fig. 13: Enriquecimiento de vías y análisis ontológicos en los grupos de entrenamiento y validación: A) Análisis de GSEA representado en un mapa de calor basado en los niveles de expresión génica (log2) de los genes que se encuentran enriquecido en cada proceso señalado B) Análisis de enriquecimiento de rutas en la base de datos KEGG y enriquecimiento ontológico de los genes diferencialmente expresados en cada subtipo. Marcado con rojo se encuentran los procesos y rutas con relevancia en la carcinogénesis.

Las gráficas de Kaplan-Meier para cada grupo clínico con respecto a sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad (metástasis y recurrencia) muestran una mayor probabilidad a un desenlace catastrófico en los subtipos definidos como de alto riesgo (Fig. 14B). El tamaño del tumor, grado y edad de diagnóstico no mostraron diferencias significativas a lo largo de los subtipos de tumores TN (Fig. 14C), así mismo se realizó un análisis multivariable sin encontrar ninguna dependencia o asociación significativa a edad, tamaño o grado del tumor y estado de climaterio.

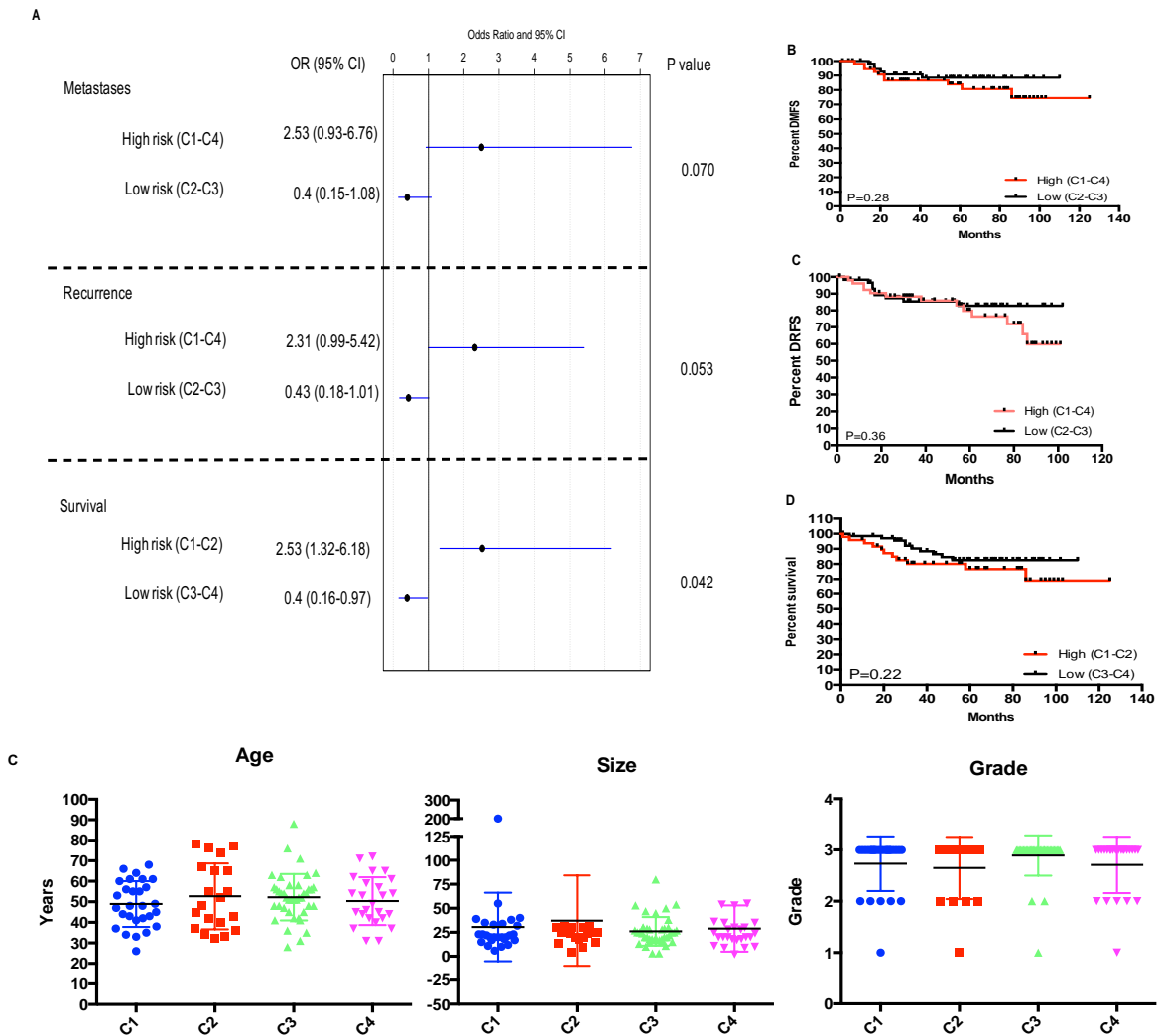


Fig. 14: Caracterización clínica de cada subtipo TN. A) Gráfica de razón de momios para recurrencia, metástasis y muerte para los grupos de alto y bajo riesgo. B) Gráficas de Kaplan-Meier para sobrevida libre de enfermedad: recurrencia y metástasis, y sobrevida general C) Distribución de edad, tamaño del tumor y grado del tumor por subgrupo.

Relación de los subtipos TN basados en expresión de miRNAS con los subtipos de Lehmann basado en expresión de RNAm.

Dado que uno de los clasificadores previamente reportados para la estratificación de los tumores triple negativos con impacto en el entendimiento biológico y clínico es el desarrollado por Lehmann, determinamos la relación entre ambos clasificadores. La figura 15 muestra la distribución de nuestras muestras con el clasificador de Lehmann (Fig. 15A-B) basados en sus perfiles de expresión de RNAm. El subtipo C1 se encuentra enriquecidos en tumores catalogados como inmunomoduladores y no clasificables. El subtipo de C2 esta compuesto mayormente por tumores mesenquimales y mesenquimales parecidos a células troncales, mientras que el C3 por el subtipo inmunomodulador. Finalmente, el C4 presenta una mayoría de tumores mesenquimales y luminales enriquecidos en receptores andrógeno. Aun cuando los subtipos Basal 1 y 2 no representan ninguna mayoría en algún subtipo si están mayormente presente en el subtipo C2 para Basal2 y C3 para Basal1. De forma interesante los subtipos que hemos detectado como de alto riesgo se encuentran enriquecidos en aquellos subtipos de Lehmann reportados como del mal pronóstico. La asociación de ambos clasificadores muestra la robustez de la firma molecular basada en miRNAs donde no sólo se definen subgrupos de interés biológico y clínico, si no que parcialmente recapitula la diversidad observada a nivel de RNAm descrita por Lehmann.

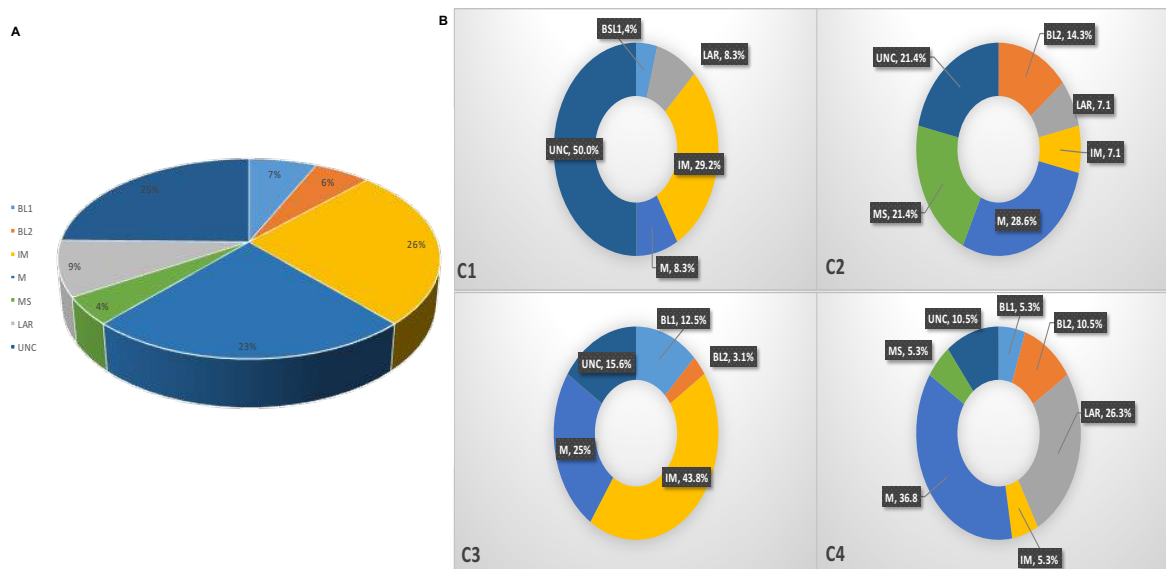


Fig. 15: Clasificación de los tumores TN correspondientes a las cohortes de entrenamiento y prueba con el clasificador de Lehmann. A) Distribución de subtipos de Lehmann en 89 tumores TN B) Distribución de subtipos de Lehmann en los subgrupos de miRNA establecidos

Firma derivada recapitula clasificación de tumores triple negativos

Un objetivo primario de nuestra clasificación de tumores triple negativos basado en miRNAs es desarrollar firmas con el número mínimo de transcritos que recapitulen los subtipos previamente definidos. Para ello se derivó una firma basadas en los miRNAs diferencialmente expresados de cada subtipo (FC: >2, p.value= 0.005), integrando aquellos miRNAs cuya representación se extendiera a varias tecnologías y plataformas para favorecer su futura aplicación. Basados en estos datos, cada miRNA se estandarizó mediante el cálculo de la puntuación Z a lo largo de las muestras evaluadas y se generó una firma que consiste en 67 miRNAs que pueden ser usados para la predicción independiente de las muestras. Así mismo, se desarrolló un modelo de clasificación por máquinas vectoriales el cual esta disponible para integrarse en lo programas de análisis del modulo SVM de de la herramienta en línea Genepattern (<http://genepattern.broadinstitute.org/gp/pages/login.jsf>) para estudios independientes. El modelo fue evaluado en dos cohortes independientes constituidas por datos de expresión de miRNAs de tumores frescos triple negativos evaluados en arreglos de diversas versiones de la plataforma Agilent. La incidencia de los subtipos de tumores triple negativos fue similar a la encontrada en nuestros datos, así mismo la asociación con parámetros clínicos mostró significancia con los grupos de riesgo previamente definidos.

Caracterización de los miRNAs que clasifican los subtipos de tumores TN

A través de un análisis integrativo de varias bases de datos se evaluó el enriquecimiento de los miRNAs que conforman el clasificador analizando grupos y familias de miRNAs, funciones biológicas y su asociación significativa con procesos patológicos. De esta manera hemos identificado la posible relevancia biológica de los miRNAs en rutas celulares como muerte, división y motilidad celular, metabolismo, inflamación y quimiosensibilidad (Tabla 5). Estos procesos son fundamentales para el establecimiento y desarrollo del tumor. Lo anterior sugiere que los miRNAs no sólo permiten distinguir varios grupos tumorales, sino que potencialmente dichos miRNAs podrían también poseer una actividad biológica de relevancia en la oncogénesis.

Tabla 5: Análisis integrativo de los miRNAs que forman parte del clasificador

	Cuenta	Proporción	Valor de P	FDR
Enriquecimiento de grupos y familias				
hsa-let-7e grupo	3	1.00	0.01363212	0.0658
hsa-mir-106a grupo	5	0.83	0.00364992	0.0206
hsa-mir-106b grupo	3	1.00	0.01363212	0.0647
hsa-mir-17 grupo	6	1.00	0.00017609	1.47E-03
hsa-mir-200a grupo	3	1.00	0.01363212	0.0653
mir-15 familia	3	0.75	0.04487449	0.1629
mir-17 familia	7	0.88	0.0002607	1.93E-03
mir-181 familia	3	0.75	0.04487449	0.1618
mir-25 familia	3	1.00	0.01363212	0.0595
mir-29 familia	3	1.00	0.01363212	0.06
mir-30 familia	5	1.00	0.00075506	4.98E-03
mir-8 familia	4	0.80	0.01306971	0.0637
mir-99 familia	3	1.00	0.01363212	0.0605
Metabolismo de lípidos	12	0.60	0.00049444	3.47E-03
Supresores tumorales	22	0.59	0.00000181	2.51E-05
onco-miRNAs	24	0.77	0	6.08E-09
miRNAs y enfermedades asociadas				
Adenocarcinoma	32	0.71	0	1.97E-10
Neoplasias cerebrales	6	1.00	0.00017609	1.44E-03
Cáncer de mama	64	0.59	0	1.15E-16
Carcinoma	26	0.62	5.00E-08	9.68E-07
Colo-carcinoma	4	1.00	0.00321799	0.0183
Neoplasias colo-rectales	24	0.71	0	1.04E-07
Cáncer endometrial	6	0.67	0.00763198	0.0405
Neoplasma esofagal	7	0.78	0.00093726	6.11E-03
Cáncer gástrico	12	0.80	0.00000566	6.96E-05
Glioblastoma	24	0.71	0	9.84E-08
Glioma	18	0.72	2.70E-07	4.57E-06
Cáncer de cabeza y cuello	17	0.57	0.00007813	7.42E-04
Cáncer de hígado	10	0.53	0.00574377	0.0311
Cáncer de pulmón	51	0.54	0	1.80E-10
Linfomas	11	0.69	0.0001527	1.38E-03

Correlación de la expresión de miRNAs y la expresión de RNAm predichos como blancos transcripcionales

Con la finalidad de comprender la actividad de los miRNAs como reguladores post-transcripcionales en cada uno de los subtipos realizamos un análisis integrativo y de correlación entre la expresión global de los miRNAs y la expresión de sus potenciales blancos predichos por los algoritmos PITA, miRanda y Target Scan con la herramienta en línea MAGIA (<http://gencomp.bio.unipd.it/magia/start/>). El análisis pareado incluyó los perfiles de expresión génica (RNAm) y miRNAs de 96 tumores que forman parte de nuestras cohortes de entrenamiento y prueba. Aquellos RNAm con una correlación de Pearson negativa de al menos 0.30 se consideraron como blancos post-transcripcionales (RNAm::miRNA) y se realizó un análisis funcional en la base de datos DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>).

La figura 16 muestra los procesos y rutas celulares en las que los RNAm regulados por los miRNAs están involucrados. Algunos de los procesos se encuentran asociados a rutas con un papel biológico importante en el desarrollo y establecimiento de los programas carcinogénicos con impacto en diversas funciones celulares. Destaca también el enriquecimiento de rutas que previamente fueron detectadas como sobre-representadas en un subtipo específico en los análisis anteriores como: regulación de adhesiones celulares en el subtipo C2 y regulación de procesos de señalización de moléculas efectoras como *ErBb* o *PDFGB*, así como el metabolismo de macromoléculas característico del subtipo C4. Estos datos sugieren que los miRNAs contribuyen en cierta proporción al establecimiento de los programas transcripcionales establecidos en cada subtipo mediante su actividad reguladora de la expresión génica.

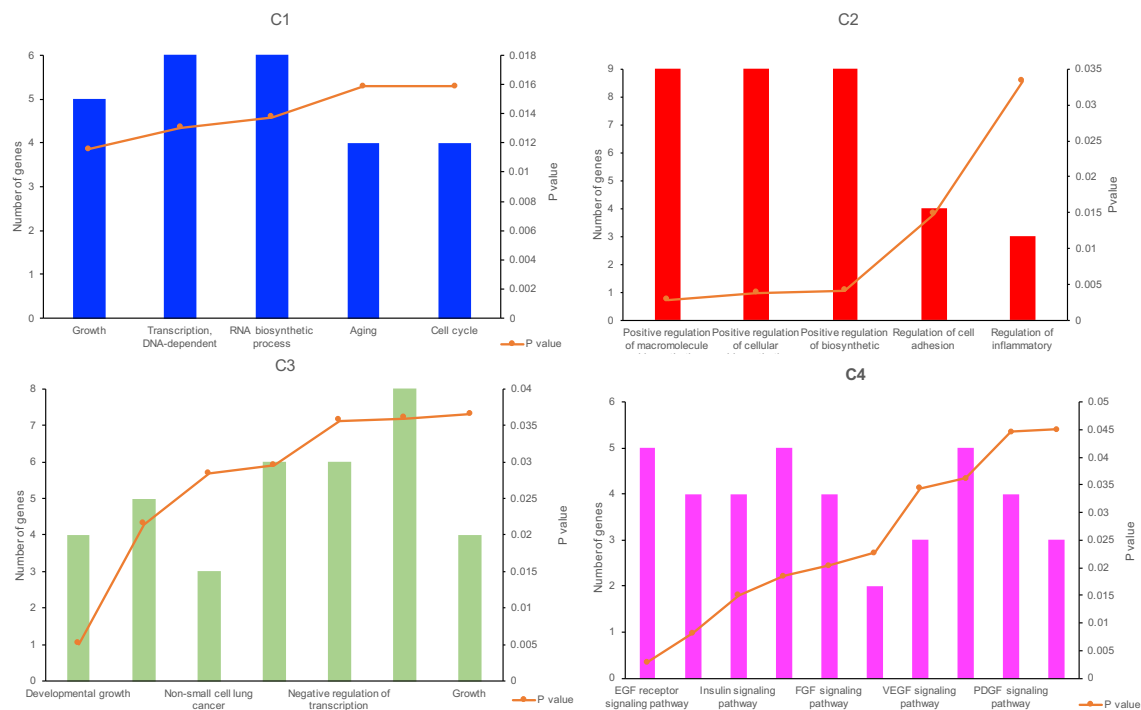


Fig. 16: Análisis de enriquecimiento de rutas y ontologías génicas basada en los RNAm con correlación negativa con la expresión global de miRNAs en cada subtipo de tumores triple negativos

Sub-clasificación de modelos celulares de tumores triple negativos

La evaluación de subtipos tumorales en los modelos celulares es útil para analizar mediante otras metodologías *in vitro* diversos efectos y procesos asociados a los grupos

de tumores triple negativos. Evaluamos tres líneas celulares triple negativas correspondientes a dos subtipos intrínsecos del PAM50: bajos en claudinas y basal, dos subtipos de acuerdo a Neve [119]: Basal A y basal B, y dos subtipos de acuerdo a la clasificación de Lehmann: basal 1 y parecido a mesenquimal. Tras aplicar el modelo de clasificación con el método SVM las líneas se clasificaron en dos grupos: C1 para MDA MB 231 y HS578T, y C4 para MDA MB 468 (Tabla 6).

Tabla 6: Características y agrupación de los modelos celulares triple negativos evaluados

Línea celular TN	Subtipo de miRNA	Subtipo intrínseco	Subtipo basal	Subtipo Lehmann
MDA MB 468	C4	Basal	Basal A	BL 1
MDA MB 231	C1	Bajo en Claudina	Basal B	ML
HS578T	C1	Basal	Basal B	ML

Caracterización de tumores triple negativo y otros inmunofenotipos.

La caracterización de la heterogeneidad de los tumores triple negativo incluyó la comparación de este fenotipo contra otros tipos tumorales (RE+/ RP+/ Her2+) con el fin de detectar miRNAs que jugaran un papel importante en el establecimiento del este fenotipo tumoral. Se obtuvo un perfil diferencial de expresión el cual se representa mediante un mapa de calor en la figura 17. A través de la comparación de los miRNAs diferencialmente expresados entre los subtipos triple negativos y los diversos fenotipos tumorales en el cáncer de mama identificamos varios miRNAs de interés para su posterior análisis funcional. Particularmente, miR-342-3p el cual se encuentra sub-expresado en los tumores triple negativos con respecto al resto de los fenotipos, y también presenta expresión a la baja en los subtipos con mayor riesgo clínico (C1 y C4) (Fig. 17B). Así mismo, miR-342-3p se encuentra diferencialmente expresado en diversos modelos celulares, destacando su sub-expresión en la mayor parte de las líneas celulares triple negativas (Fig. 17C).

Validación independiente de la expresión abatida de miR-342-3p en tumores triples negativos

Para validar los hallazgos con respecto a la expresión a la baja de miR-342-3p se evaluó su expresión mediante un análisis *in-silico* con las bases de datos públicos TCGA y METABRIC que evalúan en conjunto un total de 280 tumores triple negativos y 2000 tumores de mama con diferentes tecnologías como miR-seq y arreglos de expresión de Agilent. La sub-expresión de miR-342-3p en tumores triple negativos fue reproducida en

ambas cohortes (Fig. 18), así mismo se evaluó la posible relación entre el nivel de expresión de miR-342-3p con la sobrevida general sin encontrarse ninguna asociación clínica significativa. Tras validar en cohortes independientes la expresión del miRNA se continuó caracterizando su función biológica en modelos celulares.

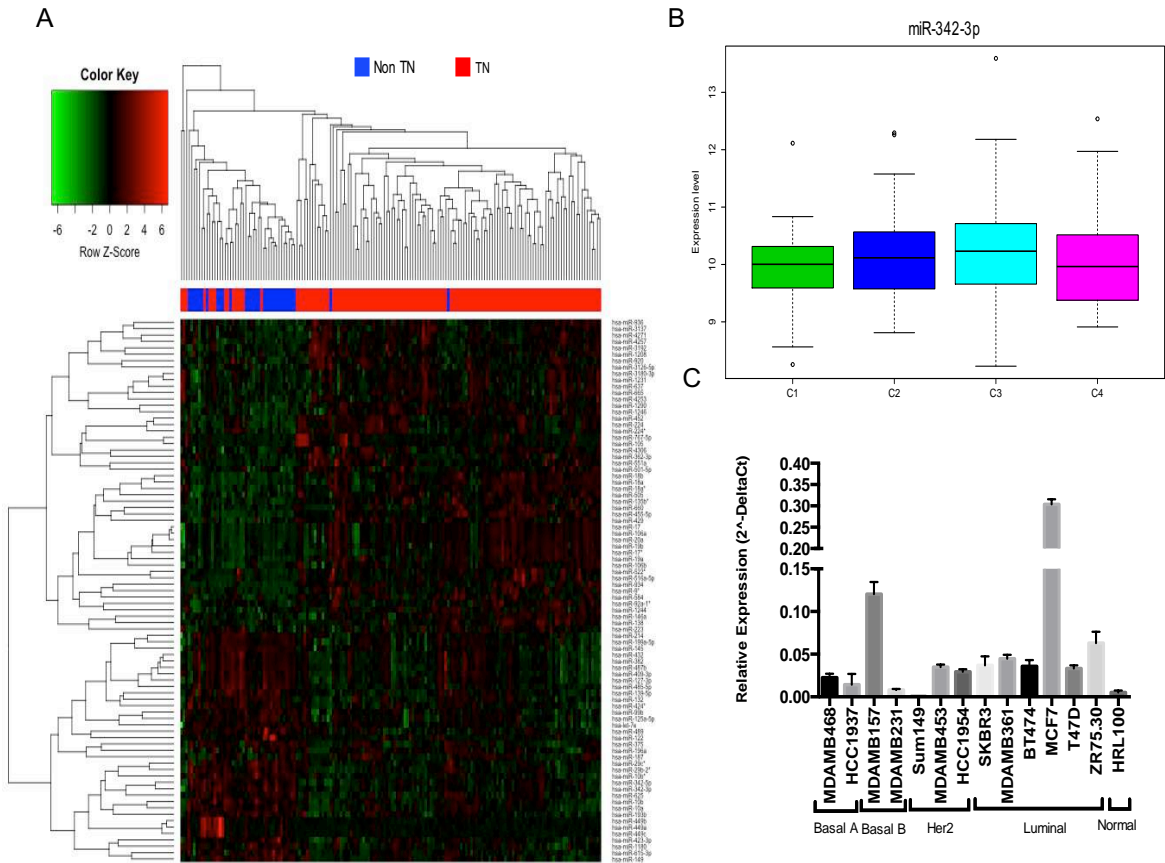


Fig 17: Análisis comparativo de tumores triples negativos con otros subtipos y expresión de miR-342-3p. A) Mapa de calor con los miRNAs diferencialmente expresados entre tumores triple negativo vs otros fenotipos B) Expresión de miR342-3p a lo largo de los subtipos de tumores triple negativo C) Expresión de miR-342-3p a lo largo de modelos celulares con distintos fenotipos

miR-342-3p suprime proliferación, viabilidad y migración de células humanas de tumores triple negativo

Con el fin de investigar la actividad biológica de miR-342-3p en el modelo celular triple negativo MDA MB 468, se transfectó transitoriamente el miRNA para generar un modelo

de ganancia de función y se evaluó como podría afectar el re-establecimiento de su expresión en los procesos de viabilidad, proliferación, migración, invasión, muerte y ciclo

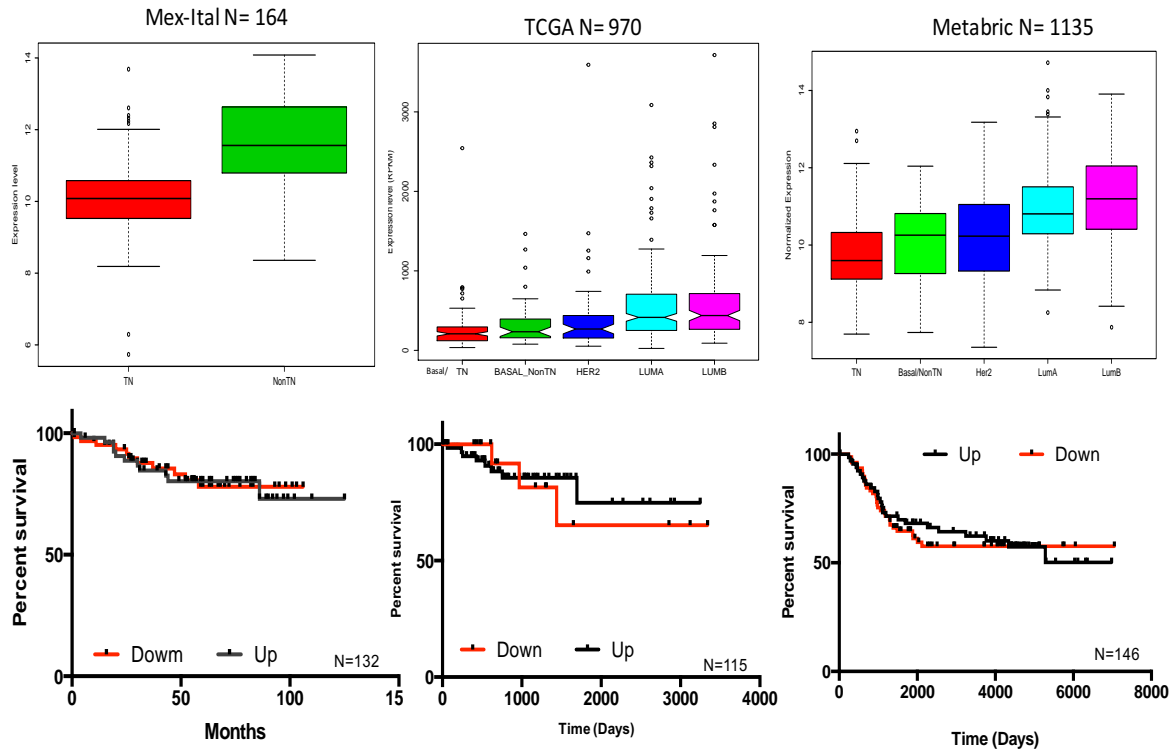


Fig. 18: Expresión normalizada de miR-342-3p evaluada en nuestros datos, la base TCGA y METABRIC. En la zona inferior de muestra la curvas de sobrevida general asociadas a la expresión del miRNA.

celular. La sobre- expresión de miR-342-3p reduce significativamente la viabilidad celular tras 48 hrs pos-transfección (Fig. 19A), así mismo disminuye la proliferación celular (Fig. 19B). También se detectó que la expresión de miR-342-3p disminuye un 30% la migración celular comparado contra el control negativo (Fig. 19C). Finalmente como se muestra en la figura 19D miR-342-3p genera un arresto celular en la fase S tras 48 hrs post transfección. No se detectaron cambios significativos en los procesos de apoptosis e invasión celular. El conjunto de datos de estos resultados indican la posible actividad de miR-342-3p como supresor de tumor en la línea celular triple negativa. Así mismo se evaluó por inmunohistoquímica la expresión de los marcadores hormonales y HER2 después de la transfección de miR-342-3p sin encontrarse ningún cambio en la expresión proteica de estos marcadores.

MCT1 es un blanco directo de miR-342-3p.

Para comprender de forma más amplia los blancos transcripcionales de miR-342-3p que establecen el impacto biológico del miRNA, se realizó un análisis exploratorio del transcriptoma mediante microrarreglos de expresión génica de la línea celular MDA MB 468 transfectada con mimic de miR342-3p contra la línea celular transfectada con una secuencia irrelevante. El análisis diferencial arrojó un total de 103 RNAm alterados, de los cuales se identificaron 15 genes que potencialmente eran blancos directos del miRNA definidos mediante análisis *in silico* con diversos algoritmos dedicados a la predicción de blancos. El enriquecimiento ontológico de los RNAm alterados mostró diversas rutas oncogénicas como el abatimiento de procesos de motilidad celular, respuesta inflamatoria y metabolismo celular (Fig. 21 A-B). De particular interés fue este último proceso, dado que uno de los posibles blancos directos de miR-342-3p es MCT1 (SLC16A1), un transportador de monocarboxilatos, preferencialmente de lactato. Asimismo, *MCT1* ha sido reportado como un gen importante en el flujo metabólico al facilitar la entrada de lactato extracelular favoreciendo la homeostasis energética y metabólica de las células cancerosas en distintos tumores como pulmón y mama. Su expresión alterada también se ha asociado a cursos clínicos agresivos y su inhibición mediante fármacos ha demostrado un efecto significativo en la reducción del tamaño del tumor en modelos *in vivo*.

Para confirmar que miR-342-3p inhibía directamente al oncogen MCT1, evaluamos los niveles de expresión del transcrito y la proteína tras la expresión exógena del miRNA en la línea celular MDA MB 468, detectado una disminución significativa a las 48 y 72 hrs post-transfección en ambos niveles biológicos (Fig. 20A-B). Finalmente, se realizó un ensayo de gen reportero con luciferasa para determinar la asociación directa de miR-342-3p con el 3'UTR de MCT1. Mediante predicciones bioinformáticas detectamos un sitio de unión del miRNA al gen *MCT1*. Las secuencias de unión fueron clonadas en el vector psiCheck río abajo del gen de la luciferasa Renilla (Fig. 20C). Como se muestra en la figura 17 tras la expresión exógena de miR-342-3p la actividad de la luciferasa se ve reducida indicando la hibridación del miRNA al 3 UTR de MCT1.

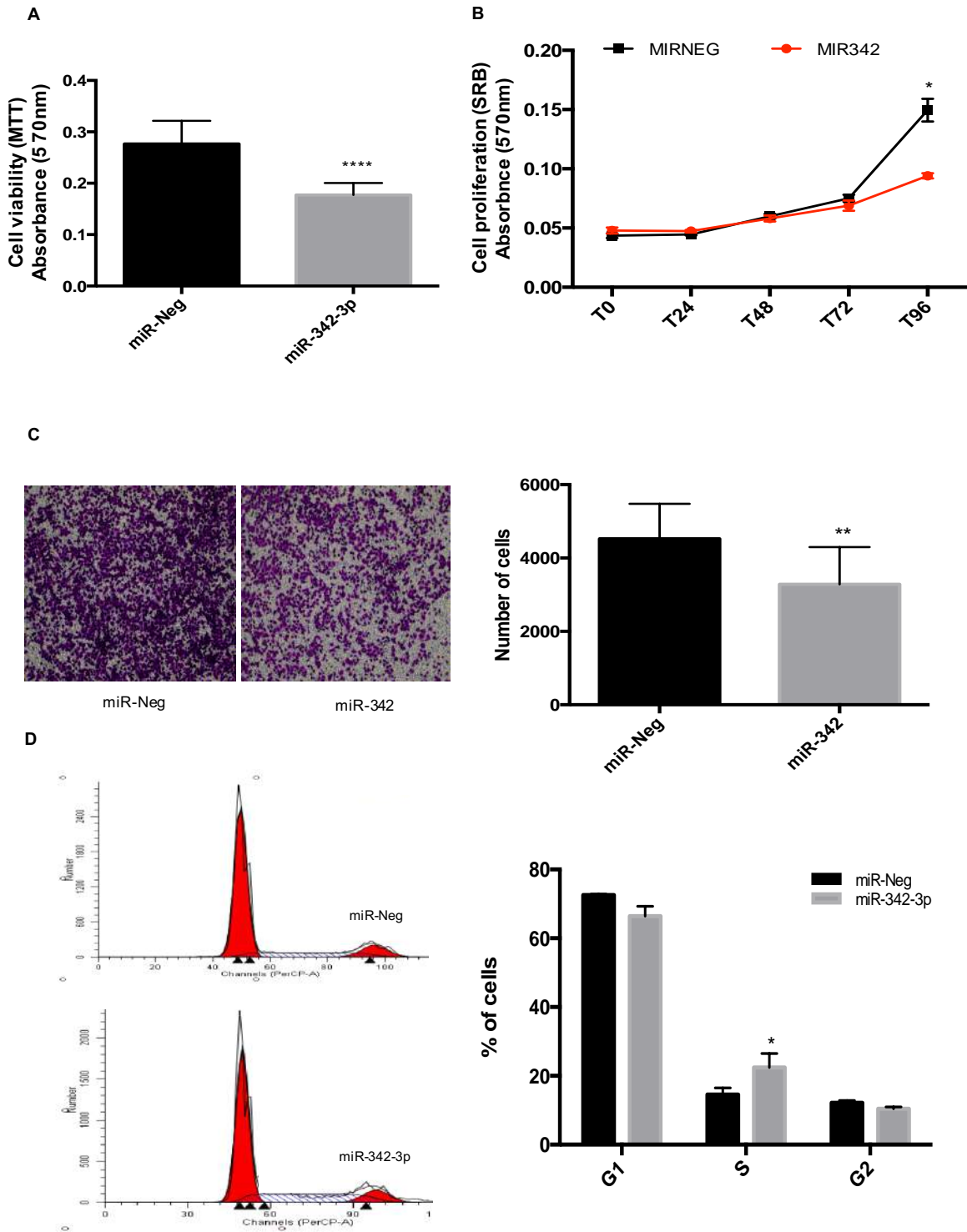


Fig. 19: evaluación funcional de la actividad biológica de miR-342-3p tras su expresión exógena en la línea celular triple negativa md ama 468. A) Análisis de viabilidad celular mediante MTT 48 hrs post-transfección. B) Análisis de proliferación celular mediante SRB creciendo la células hasta 96hrs tras 48hrs post-transfección. C) Ensayo de migración celular con transwell y tinción con SRB. D) Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo.

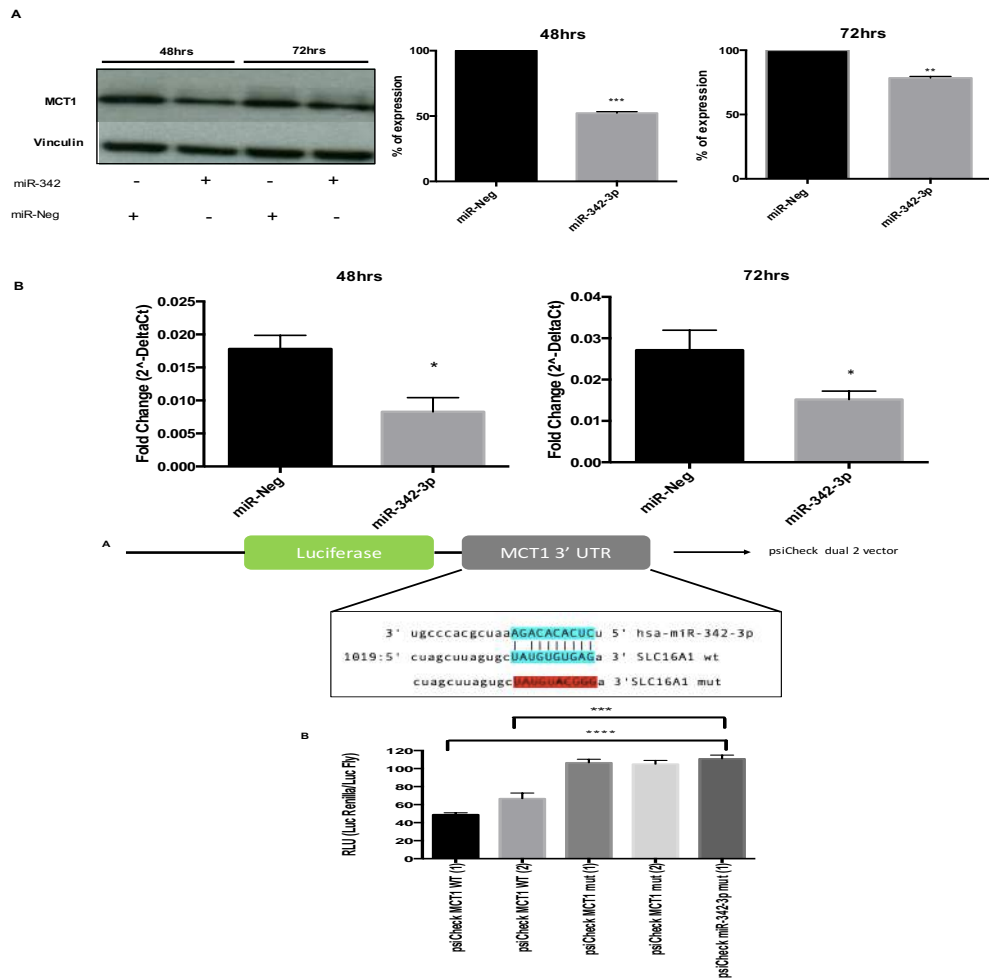


Fig 20: Evaluación de la regulación de MCT1 por miR-342-p mediante análisis de Western blot (A) y PCR en tiempo real (B), así como de gen reportero (C) tras la expresión exógena de miR-342-3p en la línea celular MDA MB 468.

En las secuencias donde se insertaron mutaciones en la región semilla del 3' UTR de MCT1 no se detectó ninguna reducción de la actividad de la luciferasa lo que demuestra una actividad específica sobre la secuencia blanco. Estos resultados indican que MCT1 es un blanco directo de miR-342-3p.

MCT1 esta correlacionado negativamente con miR-342-3p en los tumores de mama triple negativo

Para definir la correlación del miRNA con el estatus de expresión de MCT1 en tumores humanos triple negativos se evaluó la base de datos del Atlas del Genoma del Cáncer

(TCGA, por sus siglas en inglés). La expresión diferencial de MCT1 entre los subtipos tumorales se validó observando una significativa sobre-expresión de MCT1 en los tumores TN (Fig. 21C), así mismo se analizó la correlación de la expresión de MCT1 y miR-342-3p en las neoplasias mamarias encontrándose que particularmente aquellos tumores TN o RE negativos tienen un relación inversa, es decir entre menor la expresión de miR-342-3p hay una mayor expresión de MCT1 (Fig. 21D).

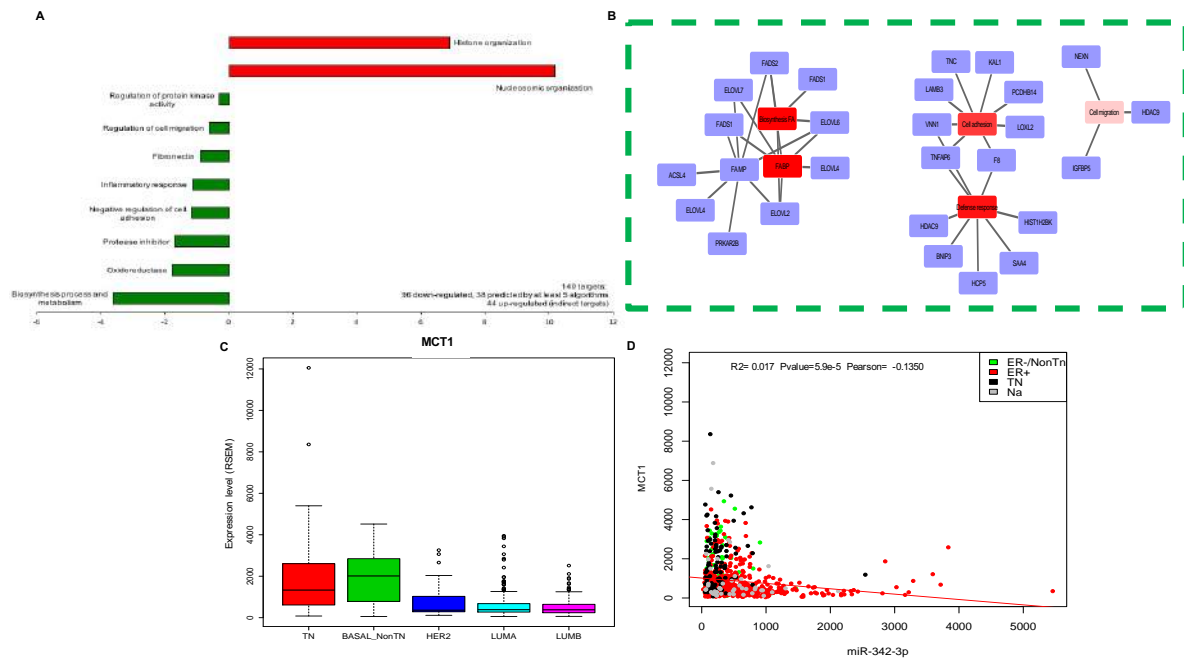


Fig. 21: Evaluación de posibles blancos post-tranccripcionales de miR-342-3p. A) Análisis de enriquecimiento de rutas de los genes alterados tras la transfección transitoria de miR-342-3p B) Box plots con la expresión de MCT1 por subtipo tumoral de la base de datos TCGA. C) Gráfica de correlación entre los niveles de expresión de MCT1 y miR-342-3p de la base de datos TCGA

Empleando la herramienta en línea C biportal (<http://www.cbioportal.org/>) se evaluaron otros mecanismos que podrían estar modificando la tasa de expresión de MCT1 como mutaciones o amplificaciones del gen así como pérdida de metilación de la región promotora, sin embargo ninguno de estos mecanismos están significativamente representados en los tumores que sobre-expresan MCT1, lo que indica que miR-342-3p constituye el principal mecanismo de regulación de la expresión de MCT1 en tumores de mama triple negativos.

miR-342-3p inhibe el consumo de lactato exógeno

Dado que la principal función de MCT1 es probablemente la de transportar lactato del espacio extracelular hacia el interior de la célula, evaluamos el consumo de lactato exógeno (10mM, concentración similar a las reportadas en tumores de mama [117]) en medio bajo en glucosa tras la transfección de miR-342-3p. El rango de consumo fue cuantificado en el medio celular mediante un ensayo enzimático colorimétrico. La cinética de consumo de lactato fue menor en las células transfectadas, detectando diferencias significativas a partir de las 48hrs y hasta el final del ensayo a las 120hrs (Fig. 22A). La expresión exógena de lactato 10mM, favorece la disminución de la proliferación celular (Fig. 22B), sin que se hubiese detectado cambios en el pH del medio a lo largo del tiempo evaluado. Lo anterior sugiere que la sub-expresión de MCT1 por miR-342-3p disminuye la entrada de lactato extracelular, reflejada en la acumulación de esta molécula en el medio.

La cantidad de lactato y glucosa intra y extracelular se alteran con la inhibición de MCT1 por miR-342-3p.

A continuación evaluamos los niveles endógenos de lactato de las células MDA-MB-468 transfectadas con el mimic de miR-342-3p y cultivadas en medio alto en glucosa. Los niveles extracelulares de lactato evaluados en medio mediante un ensayo enzimático colorimétrico mostraron que tanto a las 48 y 72hrs pos-transfección hay una mayor concentración de lactato en el medio de las células transfectadas (Fig. 22C). Lo anterior sugiere que existe una acumulación de lactato en el medio extracelular posiblemente dada por la disminución en la expresión del transportador MCT1 por la acción de miR-342-3p.

También se evaluó la cantidad de lactato al interior de las células, detectando un aumento significativo de lactato a las 72hrs post-transfección. Para definir que no hubiese otros mecanismo que pudieran estar alterando el flujo de lactato se evaluó la expresión de HIF1A, que bajo condiciones hipóxicas o altas en lactato favorece la expresión de *MCT4*, otro posible transportador de lactato con menor afinidad, así como *LDHA*, que permite la conversión de piruvato a lactato, sin embargo no se detectó la sobre-expresión de ninguno de estos genes (Fig. 22E).

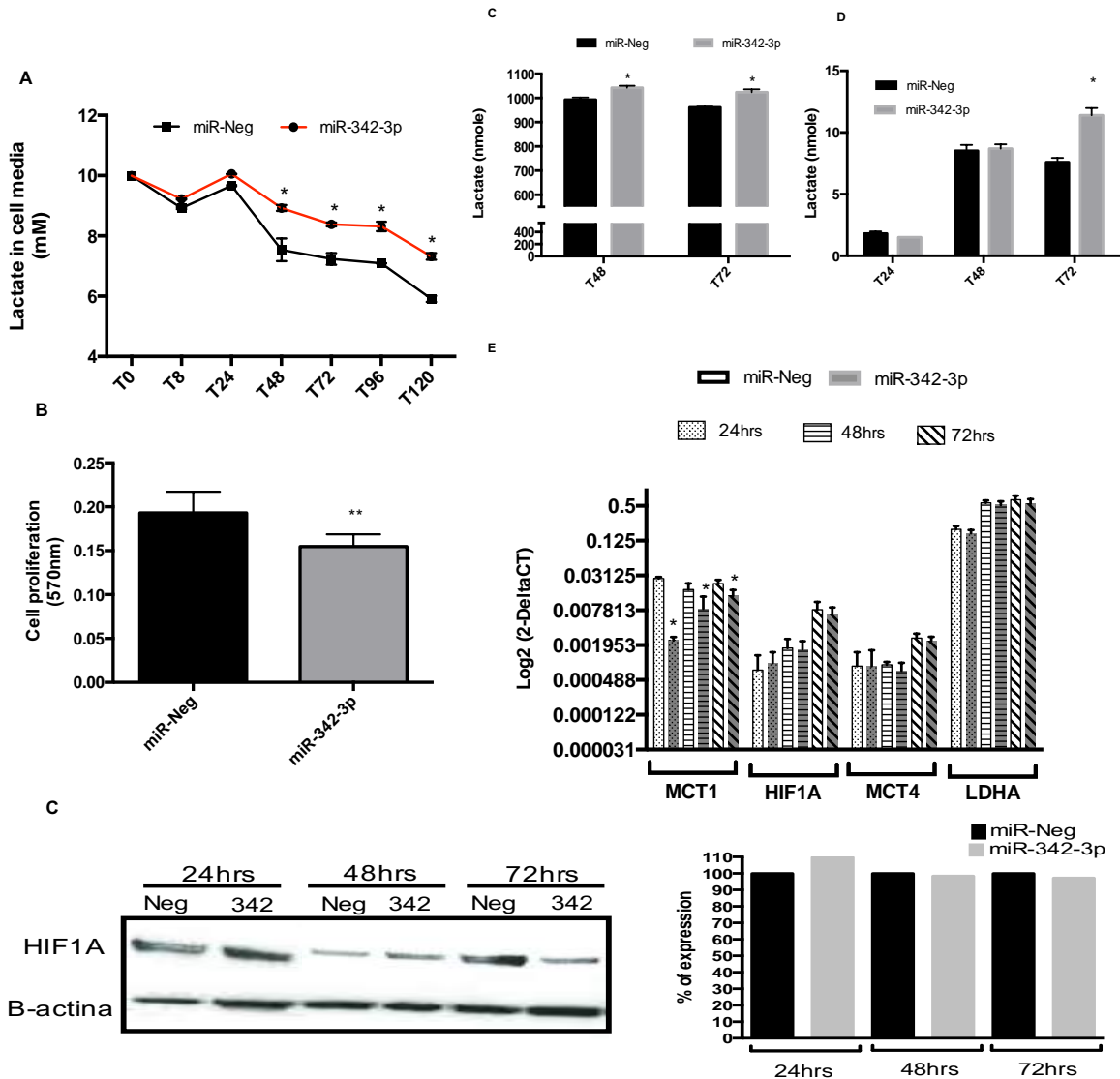


Fig 22: Cuantificación de lactato en modelo *in vitro* transfectedo con mimic de miR-342-3p. A) Cinética de consumo de lactato exógeno (10mM) en células cultivadas en medio bajo en glucosa cuantificado por método enzimático colorimétrico. B) Análisis de proliferación de células cultivadas en medio bajo en glucosa con lactato 10mM. C) Cantidad de lactato extracelular a las 48 y 72 post transfección D) Cantidad de lactato intra celular a las 24, 48 y 72 hrs pos-transfección. E) Niveles de expresión de un panel de genes que podrían modificar el flujo de lactato celular. F) Western Blot de HIF1A en línea mda mb 468 con expresión exógena de miR-342-3p alas 24, 48 y 72hrs.

Dado que inicialmente no esperábamos encontrar un aumento en el lactato intracelular, decidimos evaluar la cantidad de glucosa tanto dentro como fuera de la célula para definir si existían cambios en otras moléculas suministradoras de energía que actúan como sustrato en los procesos de generación de ATP. Para ello medimos en las mismas

muestras la cantidad de glucosa, encontrando una disminución de esta hexosa a nivel extracelular e intracelular a las 72 hrs post-transfección (Fig. 23A-B). Lo anterior sugiere que la célula bajo el efecto de miR-342-3p consume más glucosa extracelular la cual es empleada para generar energía y que posiblemente es convertida en lactato.

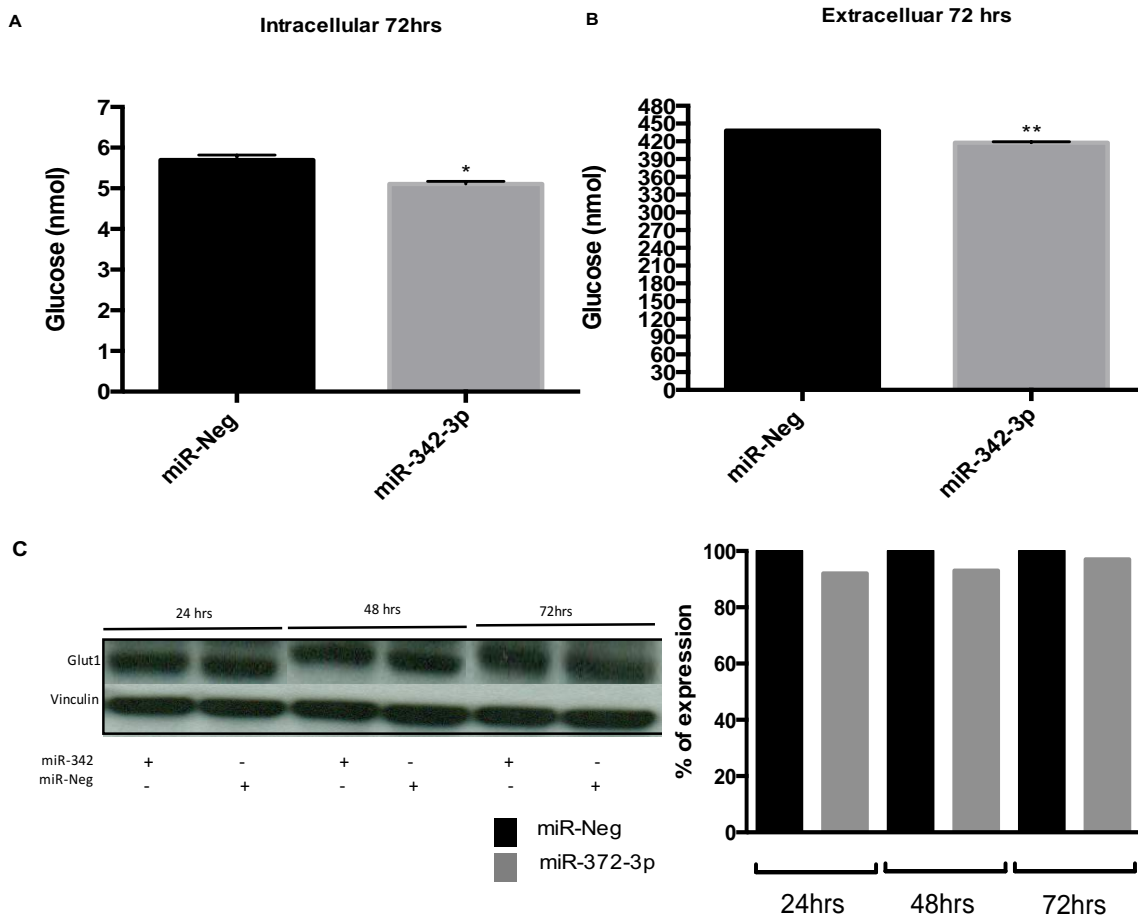


Fig 23: Concentración de glucosa en los modelos celulares triple negativos. A) Niveles de glucosa extracelular medidos por métodos enzimático colorimétrico. B) Niveles de glucosa intracelular medidos por métodos enzimático colorimétrico. C) Western Blot del transportador Glut 1

Para descartar que otros mecanismos pudieran estar alterando la cantidad de glucosa evaluamos la expresión proteica de uno de los transportadores de glucosa (GLUT1) sin encontrar ningún cambio en su expresión en las diversas condiciones analizadas (Fig. 23C).

De esta forma al comparar el modelo in vitro con expresión exógena de miR-342-3p contra el control negativo se puede observar que a nivel intracelular la proporción de

lactato respecto a glucosa es mayor en las células transfectadas a las 72hrs post-transfección, dicho aumento también se observa en el medio extracelular desde las 48 hrs (Fig. 24 A-B). Lo anterior indica que en la célula transfectada con el mimic de miR-342-3p se da una acumulación de lactato exógeno, la cual podría generar un aumento en el consumo de glucosa extracelular. Esto se ve reflejado en la disminución de la glucosa en medio, así como un aumento en lactato intracelular, que pudiera ser resultado de la oxidación de la glucosa durante la glicolisis celular asociada a una disminución en la cantidad de glucosa intra-celular.

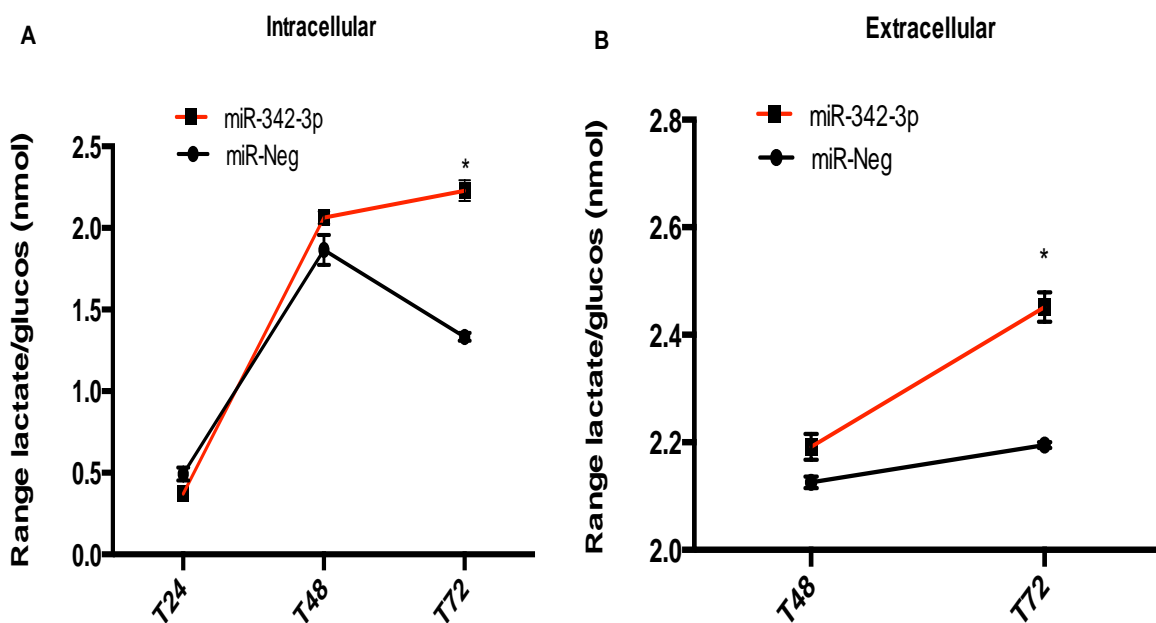


Fig 24: Proporciones lactato glucosa A) Intra y B) extracelular

La expresión de miR-342-3p es promovida por el receptor de estrógenos

Para definir el mecanismo que genera la sub-expresión de miR-342-3p en los tumores de mama triple negativos se analizaron varios mecanismos. Inicialmente se definió la localización genómica del miRNA el cual es un miRtron (miRNA contenido en un intrón) del gen *EVL*. El análisis *in silico* de *EVL* en el Human Genome Browser mostró un enriquecimiento de histonas asociadas al promotor o a regiones transcripcionalmente activas asociadas a los sitios de inicio de la transcripción de *EVL*, así como picos de

Finalmente, con datos de TCGA se evaluó la expresión de *EVL* y miR-342-3p en los distintos subtipos tumorales, principalmente basados en los estados de positividad de RE. La correlación de la expresión de este receptor hormonal con el gen *EVL* y miR-342-3p tiene siempre una asociación positiva entre el estado del RE.

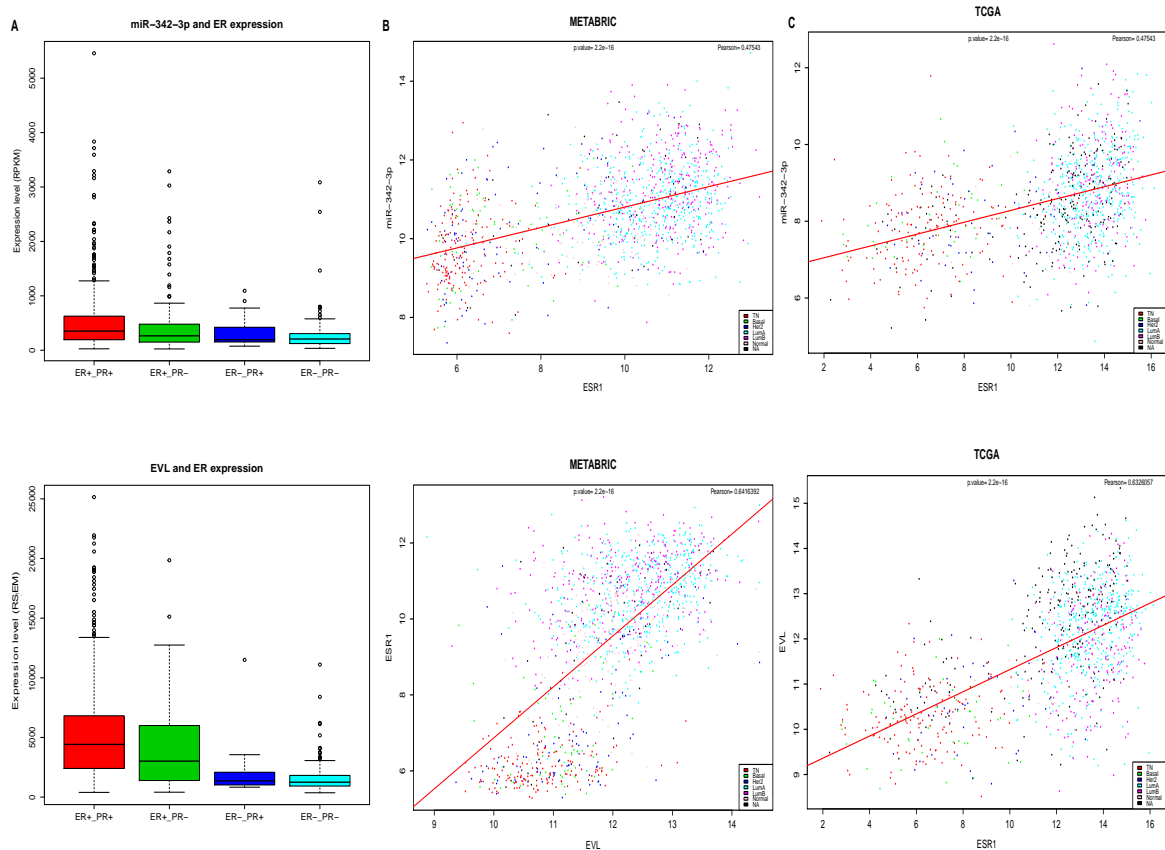


Fig 26: Expresión de *EVL* y miR-3423p en correlación con estatus de receptor de estrógenos. A) Distribución de la expresión de miR-342-3p y *EVL* en distintos grupos de tumores con diversa positividad a los receptores hormonales. Correlación de RE , miR-342-3p y *EVL* en la base de datos B) METABRIC y C) TCGA

Por último, para validar dicha asociación se silenció el RE mediante dos siRNA en la línea celular MCF7 (RE+, RP+ y Her2-) resultando en la sub-expresión del gen *EVL*, el premiRNA de miR-342-3p y el transcrito maduro de este (Fig. 27). Con lo anterior podemos concluir que la sub-expresión de miR-342-2p en el fenotipo TN se debe al silenciamiento del receptor de estrógenos, el cual posiblemente está actuando como un factor transcripcional de *EVL*, el cual es hospedero de miR-342-3p.

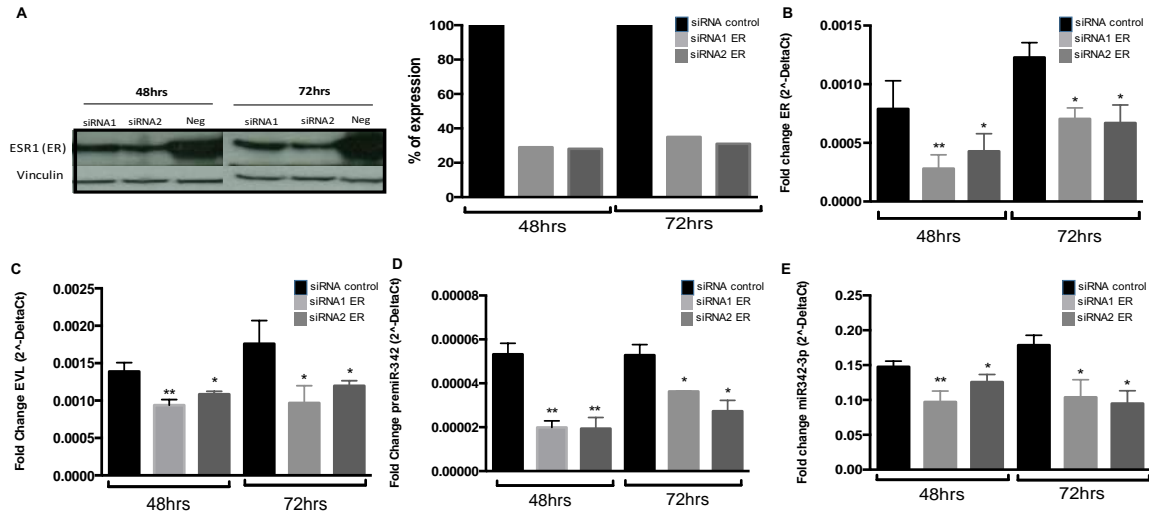


Fig 27: Silenciamiento de receptor de estrógenos afecta la expresión de EVL, premiR-342 y miR-342 en la línea MCF7. A) Análisis de Western Blot de RE tras expresión transitoria de dos siRNAs de RE. B) PCR en tiempo real de RE tras la transfección de siRNAs contra RE. C) Niveles de expresión de RNAm de C) EVL, D) premiR-342-3p y E) miR-342-3p medidos por PCR en tiempo real.

La proteína de biogénesis de miRNAs AGO2 se encuentra sobre-expresada en tumores TN y RE-

Diversos estudios a través del análisis de la expresión génica han indicado que las proteínas de biogénesis de miRNA se encuentran alteradas en varios tipos de tumor [32, 120]. Particularmente, AGO2 se encuentra sobre-expresada en los tumores basales y RE-, presentando una correlación negativa entre el estatus de RE y la expresión del transcrito de AGO2 en cáncer de mama[71][121]. Así mismo, la presencia de variantes génicas como SNPs o variaciones somáticas en el número de copias del gen AGO2, podrían alterar la expresión de AGO2 y por ende influenciar en el procesamiento de los miRNAs y su función[122]. Al analizar el estado de número de copias y el nivel de expresión del transcrito de AGO2 en tumores de mama en la base de datos TCGA, se observó que en los tumores TN hay un enriquecimiento en cuanto al número de tumores que presentan amplificación del gen y sobre-expresión del RNAm representando el 71%. En otros subtipos el porcentaje de tumores con amplificaciones y/o sobreexpresión varía de entre un 30 a un 60% (Fig. 28B). La correlación clínica de la amplificación y sobreexpresión de AGO2 en tumores TN muestra un curso clínico más agresivo con mayor probabilidad de eventos de muerte o recurrencia/metástasis (Fig. 28C). Basado en

los datos anteriores y debido a la limitada información de la expresión de la proteína Ago2 en tumores de mama la evaluamos a través de análisis inmunohistoquímicos en 141 tumores. Apoyando a lo previamente observado a nivel de transcrito, también hay una sobre-expresión a nivel de proteína en los tumores TN, RE- y RP-. Lo anterior valida el posible uso de AGO2 como un marcador inmunohistoquímico para definir agresividad del tumor.

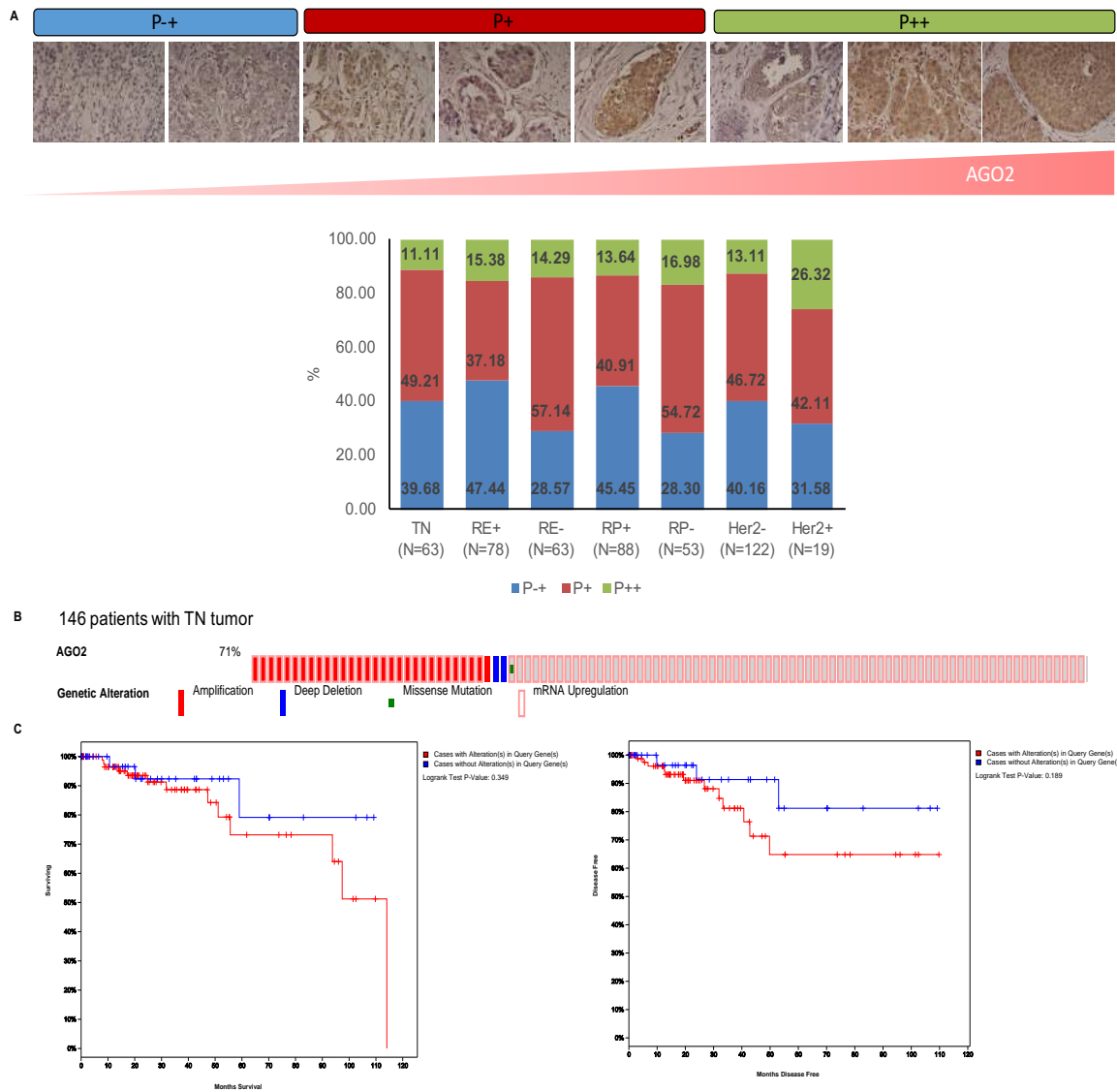


Fig. 28: Expresión y estatus de la proteína de biogénesis AGO2 en tumores de mama. A) Análisis inmunohistoquímico en 146 tumores de mama y distribución de la expresión de AGO2 por estatus de RE, RP y Her2. B) Gráfico donde se muestran las alteraciones presentes en 146 tumores TN de la base de datos TCGA. C) Análisis de sobrevida general y sobrevida libre de enfermedad de acuerdo al estatus de AGO2 (amplificado y/o sobre-expresado). Datos de TCGA

Discusión

El cáncer de mama triple negativo comprende una diversa colección de fenotipos tumorales. El desarrollo de métodos genómicos de alto rendimiento y la implementación de herramientas bioinformáticas ha permitido analizar de forma más profunda la heterogeneidad presente en los diferentes subtipos de cáncer de mama. Estos nuevos conocimientos han tenido gran impacto en el entendimiento de la patología de los tumores triple negativos, sin embargo un estudio más amplio en la diferencias moleculares que caracterizan a cada grupo tumoral es aun necesario para comprender las características biológicas de la diversidad tumoral y la mejor forma de traducir este conocimiento a la práctica clínica[123].

Basado en el análisis de marcadores inmunohistoquímicos se han distinguido al menos dos grupos de tumores triple negativos [75]. También se ha propuesto que la inestabilidad génica de los tumores TN puede favorecer la diversidad en este cáncer. Datos recientes sugieren que la gran mayoría de los tumores TN son multiclonales, lo cual actúa como un factor que incrementa la diversidad de los fenotipos tumorales presentes en el tumor [124-126].

Hace más de una década los estudios de Perou y colaboradores, basados en el análisis de microarreglos de expresión de RNAs mensajeros, describieron de una forma detallada y sistemática la existencia de subtipos intrínsecos del cáncer mama [127], adicionalmente un número de estudios han identificado subtipos adicionales, los cuales están enriquecidos en tumores triple negativos, como por ejemplo los tumores bajos en claudinas [69, 128, 129], así como tumores con enriquecimiento en vías de señalización asociados a interferón [120], tumores con características apócrinas [130, 131], y activación de rutas de receptor de andrógeno [131, 132].

Lehmann y colaboradores, basados en un meta-análisis de datos de expresión de RNAm, describieron la existencia de 7 subtipos de tumores triple negativos [77], recapitulando en parte los subtipos intrínsecos del cáncer de mama al identificar subtipos enriquecidos con características basales, mesenquimales, inmunodulatorias y lumbinales, dirigidos por la actividad del receptor de andrógenos. Si bien, dicho clasificador es robusto, una de sus limitantes es que para obtener los mejores resultados requiere que se utilice tejido fresco para obtener RNAm de alta calidad, lo que representa una colecta de muestra en quirófano y un procesamiento en cadena fría, así como abordajes masivos que permitan evaluar los miles de RNAm que conforman la firma derivada del clasificador, dificultando el uso de muestras incluidas en parafina colectadas de forma retrospectiva.

También existen, reportes que asocian la expresión de un grupo de miRNAs en tumores triple negativos con grupos inmunohistoquímicos específicos, así como desenlaces clínicos particulares. Uno de los estudios que reporta estos agrupamientos [107] presenta una cohorte heterogénea, la cual incluye tumores tratados en adjuvancia y neoadjuvancia con distintos esquemas terapéuticos, lo cual puede representar un serio factor confusor que puede inducir sesgos en el resultado de la firma y en las conclusiones clínicas.

A través de perfiles de expresión de miRNAs y abordajes de agrupamiento no supervisado de 135 tumores triple negativos, hemos sub-clasificado 4 subtipos estables, enriquecidos cada uno de ellos en rutas celulares y patrones de expresión génica específicos. También, usando firmas de expresión de miRNAs, se desarrollaron modelos de clasificación que permiten identificar modelos celulares para algunos de los subtipos descritos.

El subtipo C1 se caracteriza por el enriquecimiento de ontologías y perfiles transcripciones involucrados en la regulación, señalización y actividad del interferón alfa (IFN α). Se destaca el enriquecimiento de la activación de NF- κ B, un factor transcripcional involucrado en la regulación de la respuesta inmune e inflamación, que posee un papel importante en la tumorigénesis de diversos tumores [133, 134]. NF- κ B controla la expresión de un número importante de genes que promueven la tumorigenicidad al estar asociados con procesos como angiogénesis, apoptosis, invasión, migración y supervivencia celular [135-137]. Asimismo, la activación aberrante de NF- κ B también juega un papel en la resistencia a quimioterapia en las células cancerosas. En los tumores triple negativos la activación alterada y sobre-expresión de NF- κ B se ha reportado en diversos estudios [138-140], resultando en la modulación de la expresión de importantes nodos señalizadores del interferón. De esta forma, una elevada actividad de NF- κ B promueve una firma alterada de interferón que podría contribuir con la tumorigénesis de este subtipo particular [141].

Otro regulador importante de la expresión de IFN α es IRF7, el cual a su vez requiere la ubiquitinación de TRAF6 para su activación, proceso que también se encuentra enriquecido en este subtipo. Tanto IRF7 como NF- κ B son efectores de múltiples citosinas pro-inflamatorias que pueden promover el cáncer de mama [142]. TRAF6 es también un importante activador de otros eventos de señalización como el de los receptores RIG-I y parecidos a Toll (TLRs), ambos enriquecidos en este subtipo. Este último se ha asociado a una posible función promotora de la tumorigénesis al participar en la respuesta de daño a DNA que puede favorecer el crecimiento y progresión del tumor. Este subtipo se correlaciona con alto riesgo a muerte, metástasis y recurrencia tumoral y representa el 23% de los tumores evaluados.

Los perfiles de expresión y enriquecimientos ontológicos del subtipo C2 describen la presencia de señalizadores como EGFR, reguladores de la transición epitelio mesénquima, migración y adhesión celular, y activación del oncogén RAS. Estas rutas de señalización comparten varias de las rutas celulares más importantes del subtipo mesenquimal, definido mediante el clasificador de Lehmann. Los factores de crecimiento como EGFR juegan un papel importante en la progresión tumoral, de hecho un porcentaje amplio de tumores TN sobre-expresan EGFR, que a su vez se asocia con una prognosis negativa [143, 144]. De esta forma, EGFR está siendo analizado por diversos estudios clínicos como una de las moléculas blanco para ser modulada con fármacos específicos en diversas malignidades TN [143]. Otro de los mecanismos enriquecidos en este subtipo son los transportadores ABC, los cuales participan en el transporte de diversos fármacos. Dentro de los más caracterizados en cáncer de mama se encuentran las glicoproteínas P y las proteínas de multiresistencia (MRP), las cuales se encuentran alteradas en este subtipo. Estas proteínas dependientes de energía bombean activamente a los fármacos quimioterapéuticos, reduciendo la concentración intracelular del agente, disminuyendo su citotoxicidad [145, 146] y reduciendo el efecto biológico esperado. De forma interesante, este subtipo presenta un fenotipo con un mayor riesgo a muerte y representa el 17% de los tumores TN.

El subtipo C3 está altamente enriquecido en señales celulares del sistema inmune, como respuesta innatas y adaptativas, regulación de efectores del sistema inmune, activación y proliferación de células T y linfocitos. Otros estudios han descrito la presencia de firmas de expresión relacionadas al sistema inmune en los tumores TN, particularmente el subtipo inmunomodulatorio descrito por Lehmann (23, 24, 51). A través de varios estudios se ha definido que aquellos tumores con firmas inmunológicas presentan una prognosis más favorable [147, 148], característica que observamos en este subtipo en

nuestro grupo de datos, al ser un fenotipo de bajo riesgo a metástasis, recurrencia y muerte, con una incidencia del 36%. Así mismo varios de estos genes moduladores del sistema inmune se han planteado como posibles blancos terapéuticos, por ejemplo 1) bloqueadores de los receptores de los puntos de revisión que previenen la activación efectiva del sistema inmune como CTLA-4, BTLA, PD-1 y TIM-3m, o 2) inhibición de factores inmunosupresivos como TGFb , IDO1 y arginasa, y también 3) la activación de co-estimuladores como TNF.

Finalmente el subtipo C4 se caracteriza por la presencia de genes involucrados en rutas de señalización hormonal, donde destacan la expresión de receptor de andrógenos (RA) y su ruta de señalización, así como la actividad de diversos esteroides, junto con elevados niveles de expresión de citoqueratinas luminales como (Cit18, 19 y 8). La firma génica y ontológica es consistente con otros reportes, donde la señalización de RA se encuentra significativamente activada, particularmente el subtipo LAR de Lehmann [77, 130, 131]. Este subtipo también se encuentra enriquecido en rutas de metabolismo de macromoléculas y nutrientes. Los tumores de mama TN presentan alteraciones metabólicas que permiten su adaptación a los diversos escenarios metabólicos, satisfaciendo sus requerimientos energéticos. La alteración de rutas primordiales para el mantenimiento de las células tumorales, plantea diversos blancos terapéuticos, como la inhibición del RA o enzimas asociadas al metabolismo como transportadores de glucosa o lactato, o genes señalizadores de Hlf1a. Este subtipo se caracteriza por tener una sobrevida libre de enfermedad menor y tener una incidencia del 22.22%.

Nuestro estudio indica que los subtipos de tumores triple negativos basados en perfiles de miRNAs pueden también recapitular otros clasificadores basados en RNA mensajero, como del desarrollado por Lehmann, así mismo se pueden distinguir dos grupos con relevancia clínica: grupos de alto y bajo riesgo para metástasis, recurrencia y muerte, los cuales engloban diversos subtipos de tumores TN y en los que las estrategias terapéuticas apropiadas pueden ser sumamente diversas.

Generar clasificadores basados en miRNAs plantea varias ventajas tanto metodológicas como biológicas. En primera instancia, los miRNAs son moléculas pequeñas acompañadas generalmente de complejos proteicos, lo que favorece que su tasa de degradación sea baja, permitiendo evaluar muestras donde la calidad del RNA no es óptima, como aquellos embebidos en parafina. Esta situación facilita significativamente la colecta y caracterización de las muestras, permitiendo análisis retrospectivos y mejores análisis de correlación con variables clínicas y tiempos de seguimiento más adecuados. Adicionalmente, hemos comprobado que el análisis de miRNAs en RNA proveniente de tejido incluido en parafina es altamente reproducible y tiene una alta correlación con datos generados con RNA de alta calidad proveniente de tumores frescos, evitando de esta forma sesgos relacionados con el procesamiento de la muestra y que no tienen que ver con las características biológicas de los tumores. Así mismo el estudio de moléculas reguladoras de la expresión génica, plantea no sólo la identificación de moléculas clasificadoras, sino también de moléculas que participan en el establecimiento de un estado transcripcional específico. De esta forma, a través de diversos análisis integrativos definimos rutas transcripcionales que potencialmente están moduladas por la actividad de diversos miRNAs y que impactan de forma importante el fenotipo final de cada subtipo tumoral, resaltando la actividad regulatoria de estas moléculas que participan en el establecimiento de los procesos carcinogénicos. Así mismo el análisis

inmunohistoquímico de proteínas de biogénesis de miRNAs pueden robustecer la estratificación de los tumores triple negativos y su identificación en subtipos con relevancia clínica.

Los análisis integrativos entre los miRNAs diferencialmente expresados en los tumores triple negativos y otros inofenotipos, así como el patrón de miRNAs que conforman el clasificador de subtipos TN permitió identificar miRNAs que por un lado participan en el establecimiento del fenotipo triple negativo y por otro permiten distinguir distintos subtipos tumorales. Así, miR-342-3p surgió como un candidato interesante, el cual ha sido previamente reportado como sub-expresado en tumores triples negativos [149] y validado en las bases de datos METABRIC y TCGA, y se encuentre expresado a la baja en el subtipo de alto riesgo para metástasis y recurrencia, C4. La literatura acerca de su función en este fenotipo particular es limitada, y hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que evalúa su actividad biológica en cáncer de mama.

A través de validaciones funcionales en ensayos de rescate en un modelo *in vitro* correspondiente al subtipo C4, pudimos concluir la posible función supresora tumoral de miR-342-3p al disminuir viabilidad, proliferación y migración de las células tumorales mda-mb-468. Lo anterior coincide con reportes de la literatura donde se ha observado inhibiciones significativas de estos y otros procesos tumorigénicos en neoplasias como colon y cérvix cuando se sobre-expresa el miRNA [150, 151]. Particularmente, en los tumores de mama luminales, donde la expresión del miRNA es mayor, se le ha asociado a mecanismos de aumento de sensibilidad a terapia anti-hormonal con tamoxifeno, pues su expresión promueve la expresión de receptor de estrógenos [149] lo que sensibiliza a

la célula. Este es un ejemplo claro de cómo un miRNA puede modular distintas rutas de acuerdo al contexto celular y transcripcional, y su papel biológico puede ser diverso.

Mediante análisis globales de la expresión génica, pudimos definir el posible papel de miR-342-3p en la regulación post-transcripcional en el fenotipo triple negativo, mostrando un importante enriquecimiento a la baja de rutas metabólicas. Los experimentos funcionales permitieron definir que MCT1, un importante transportador de lactato, es uno de los blancos directos de este miRNA. Aunado a ello, estudios recientes sobre el proteoma y metaboloma de estos tumores han confirmado que los tumores TN tiene un perfil metabólico único^[152] y la sobre-expresión de MCT1 en tumores TN se ha confirmado en diversos estudios. La alteración del metabolismo tumoral ha sido reconocida como una de las características primordiales de las células neoplásicas [4]. Particularmente, los tumores TN presentan un mayor número de células glicolíticas que producen como sub-producto lactato, el cual no es sólo un desecho celular si no también una molécula de señalización que permite la evasión del sistema inmune [153] y una importante fuente energética. Consecuentemente, un aumento en la concentración de lactato se asocia con agresividad tumoral, metástasis y resistencia a tratamientos, por lo que el lactato es un marcador de prognosis de la enfermedad en distintos tumores [154-156].

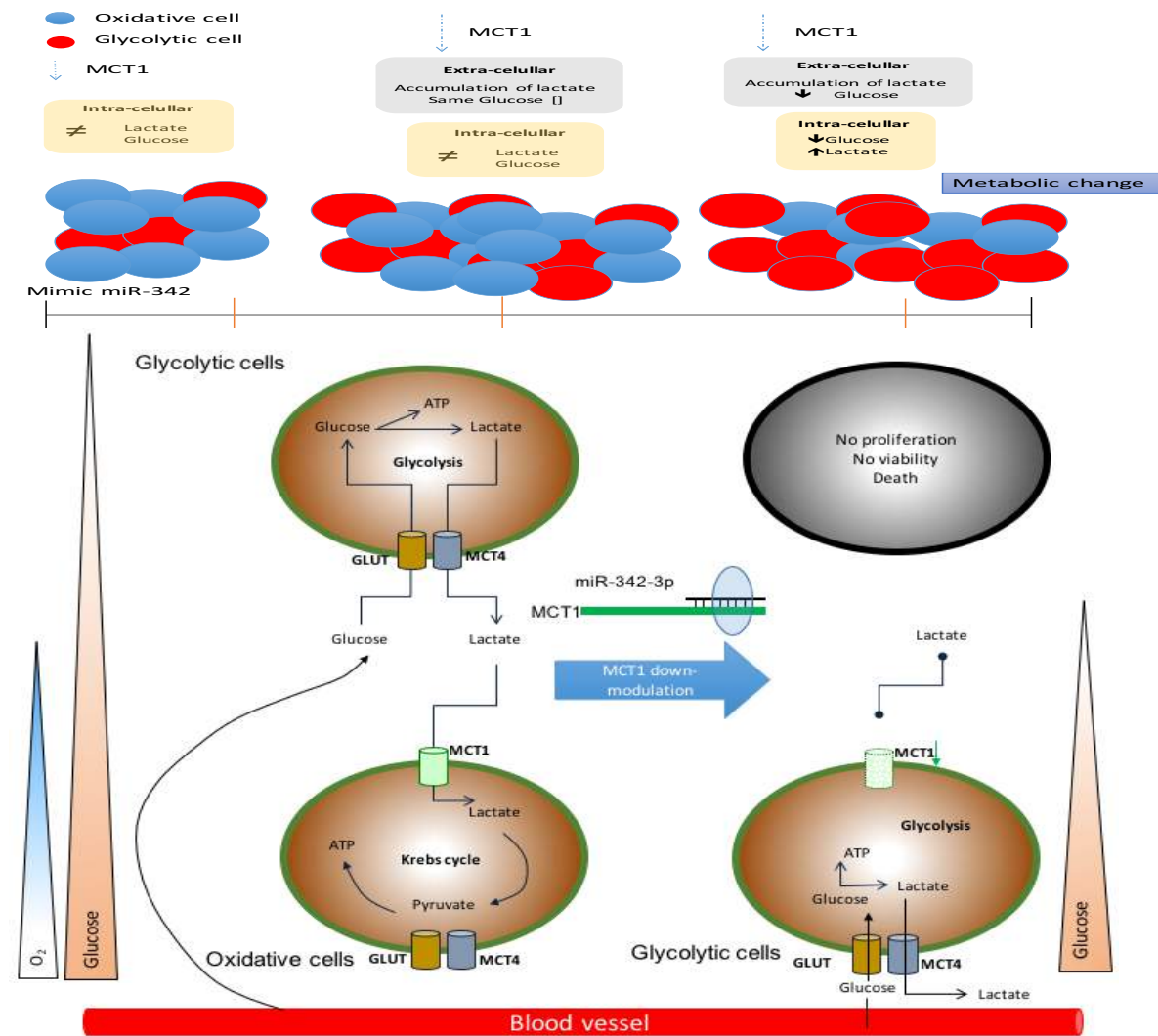
La producción de lactato favorece la producción de transportadores de lactato, los cuales previenen su acumulación y que proveen un sustrato para la obtención de energía. La mayor parte del lactato es transportado por la familia de transportadores de monocarboxilatos (MCT) que son responsables de facilitar su difusión por la membrana celular [157, 158], principalmente MCT1 que posee mayor afinidad por él [159-161].

El metabolismo celular en cáncer se ha observado alterado y se han propuestos diversos modelos donde la homeóstasis celular permite y favorece la coexistencia de células con diversos estados metabólicos. Las células de cáncer pueden presentar un estado glicolítico incluso en condiciones de normoxia, lo cual genera como subproducto el lactato el cual es exportado al espacio extracelular por MCT4 y es tomado por las células oxidativas mediante MCT1, las cuales a través de LDHA convierten el lactato en piruvato el cual es incorporado en la fosforilación oxidativa. Si el lactato extracelular no fuera consumido por las células oxidativas se generaría una acidosis láctica que resultaría en la muerte celular. De esta manera, las células con diversos estados metabólicos no solo co-existen sino que dependen una de la otra [162-164] [165].

De este modo el metabolismo de lactato es crítico para el mantenimiento celular. MCT1, se encuentra sobre-expresado en tumores triple negativos y su expresión se asocia a cursos clínicos con riesgo a muerte y metástasis en tumores de mama [166], ovario [167], gástrico [168], y colorectal [169]. La inhibición farmacológica de MCT1 en modelos in vitro e in vivo genera acumulación extracelular de lactato, así como aumento en los niveles de lactato intracelular, de igual manera la inhibición de MCT1 tiene efectos significativos sobre tamaño de tumor y supervivencia en modelos animales [170].

A través de nuestro abordaje experimental nosotros proponemos que miR-342-3p regula a la baja la expresión de MCT1 y con ello afecta los flujos de lactato, impactando en el metabolismo de las células tumorales. Cuando MCT1 es sub-expresado por el miRNA resulta una acumulación de lactato extracelular, ya que no puede incorporarse a la célula (falta de transportadores) y por ello no puede ser empleado como fuente energética, esto favorece un cambio metabólico de glicolítico a oxidativo, lo cual se refleja en un mayor consumo de glucosa (extra e intracelular), el cual es acompañado de una mayor

producción de lactato intracelular. Este cambio metabólico presupone una competencia por glucosa y con ello genera zonas de aporte limitado de glucosa en las cuales, eventualmente, las células dejarán de proliferar y finalmente morirán. Dado que los tumores TN son altamente glicolíticos, la intervención terapéutica sobre estos mecanismo podría ser empleada para desarrollo de fármacos dirigidos a blancos específicos [171].



Conclusión

Este trabajo permitió conocer el perfil de expresión de miRNAs en muestras tumorales triple negativas, identificando 4 firmas de expresión únicas que definen subtipos tumorales con una biología particular, así como diversas asociaciones clínicas. La clasificación de los tumores triple negativos basado en los perfiles de expresión de miRNAs enfatiza la heterogeneidad de este fenotipo, como lo ejemplifica la variedad de rutas y procesos celulares definidos en cada grupo descrito. También, las firmas de miRNAs pueden ser marcadores pronósticos de supervivencia y supervivencia libre de enfermedad, sugiriendo que este tipo de abordajes pueden contribuir a mejorar la prognosis y el manejo clínico.

Las nuevas tecnologías masivas de microarreglos y secuenciación han permitido la generación de miles de datos moleculares para caracterizar a los tumores humanos. Los diversos consorcios internacionales han promovido el uso e integración de estos datos en los diversos esfuerzos científicos, por ello la validación en datos provenientes de miles de tumores brinda mayor poder estadísticos y biológico, lo que permitió reproducir los hallazgos reportados en este trabajo.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren la importancia de comprender y determinar la función de los miRNAs con el fin de conocer y tener una idea más clara de las alteraciones genéticas ocurridas en el cáncer de mama TN. La caracterización funcional del miRNA mir-342-3p ha permitido la identificación de un RNA regulatorio de procesos importantes para la carcinogénesis de los tumores triple negativos y constituye uno de los primeros ejemplos de circuitos regulatorios del metabolismo celular en cáncer, proceso que se ha propuesto no sólo como una característica de las células neoplásicas si no también como un interesante blanco terapéutico.

Bibliografía

1. Arraztoa, J., *La mama diagnóstico y tratamiento*. 2 ed2004, Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo. 1-14.
2. Bland K. I., C.E.M., *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 3 ed2007, Buenos Aires: Imprenta Médica Panamericana. 900.
3. Roses D., *Breast cancer*. 2 ed2005, Estados Unidos: Elsevier/Churchill Livingstone. 812.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
6. NationalCancerInstitute. *Breast Cancer Trial Result*. 2012 [cited 2015; Available from: <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/results/breast>
7. AmericanCancerSociety. *CAUSES, RISK FACTORS, AND PREVENTION TOPICS*. 2015 [cited 2015; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>.
8. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. Int J Cancer, 2013. **132**(5): p. 1133-45.
9. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 2013* [cited 2015; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
10. Stewart B. W., W.C.P., *World Cancer Report 2014*, Estados Unidos: IARC Nonserial Publication Stewart. 362-373.
11. Secretaría de Salud. *Rendición de Cuentas en Salud, 2012*. 2012 [cited 2015; Available from: <http://www.dged.salud.gob.mx>
12. INEGI. *Sistema de Información de los Objetivos de Desarrollo del Milenio*. 2013 [cited 2015; Available from: <http://www.objetivosdesarrollodemilenio.org.mx>
13. Knaul F. M., N.G., Lozano R., Arreola-Ornelas H., Langer A. y Frenk J, *Breast cancer in Mexico: a pressing priority*. Vol. 16. 2008: Reproductive Health Matter. 113-123.
14. Boveri, T., *Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris*. J Cell Sci, 2008. **121 Suppl 1**: p. 1-84.
15. Stehelin, D., et al., *DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*. Nature, 1976. **260**(5547): p. 170-3.
16. Tabin, C.J., et al., *Mechanism of activation of a human oncogene*. Nature, 1982. **300**(5888): p. 143-9.
17. Garraway, L.A. and E.S. Lander, *Lessons from the cancer genome*. Cell, 2013. **153**(1): p. 17-37.
18. Ramaswamy, S., et al., *Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15149-54.
19. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
20. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer*. Eur J Cancer, 2008. **44**(18): p. 2753-9.
21. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
22. Tarpey, P.S., et al., *A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 535-43.
23. Eldering, E., et al., *Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(23): p. e153.
24. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 517-29.
25. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
26. Cannell, I.G., Y.W. Kong, and M. Bushell, *How do microRNAs regulate gene expression?* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 6): p. 1224-31.
27. Rana, T.M., *Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 23-36.
28. Ambros, V. and H.R. Horvitz, *Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans**. Science, 1984. **226**(4673): p. 409-16.
29. Wightman, B., et al., *Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development*. Genes Dev, 1991. **5**(10): p. 1813-24.

-
30. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
 31. Cheng, A.M., et al., *Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(4): p. 1290-7.
 32. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
 33. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
 34. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
 35. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
 36. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
 37. Altuvia, Y., et al., *Clustering and conservation patterns of human microRNAs*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(8): p. 2697-706.
 38. Ying, S.Y. and S.L. Lin, *Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs)*. J Biomed Sci, 2006. **13**(1): p. 5-15.
 39. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
 40. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
 41. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. Curr Biol, 2004. **14**(23): p. 2162-7.
 42. Lin, S.L., D. Chang, and S.Y. Ying, *Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly*. Gene, 2005. **356**: p. 32-8.
 43. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
 44. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
 45. Daniels, S.M., et al., *Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference*. BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 38.
 46. Kloosterman, W.P., et al., *Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(21): p. 6284-91.
 47. Han, J., et al., *Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8*. Cell, 2009. **136**(1): p. 75-84.
 48. Triboulet, R., et al., *Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor*. RNA, 2009. **15**(6): p. 1005-11.
 49. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1885-98.
 50. Eulalio, A., et al., *Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2558-70.
 51. Teixeira, D., et al., *Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs*. RNA, 2005. **11**(4): p. 371-82.
 52. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
 53. Romero-Cordoba, S.L., et al., *miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(11): p. 1444-55.
 54. Lehmann, U., et al., *Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer*. J Pathol, 2008. **214**(1): p. 17-24.
 55. Lujambio, A., et al., *A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13556-61.
 56. Goel, A. and C.R. Boland, *Epigenetics of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2012. **143**(6): p. 1442-1460 e1.
 57. Chang, S., et al., *Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1275-82.
 58. Kuchen, S., et al., *Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis*. Immunity, 2010. **32**(6): p. 828-39.
 59. Klinge, C.M., *Estrogen Regulation of MicroRNA Expression*. Curr Genomics, 2009. **10**(3): p. 169-83.
 60. Piovan, C., et al., *Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer*. Mol Oncol, 2012. **6**(4): p. 458-72.

61. Ahmed, S., et al., *Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 585-90.
62. Navin, N., et al., *Tumour evolution inferred by single-cell sequencing*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 90-4.
63. Huebschman, M.L., et al., *Molecular heterogeneity in adjacent cells in triple-negative breast cancer*. Breast Cancer (Dove Med Press), 2015. **7**: p. 231-7.
64. Lehmann, B.D. and J.A. Pietenpol, *Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer*. Breast, 2015.
65. Yuan, Y., *Modelling the spatial heterogeneity and molecular correlates of lymphocytic infiltration in triple-negative breast cancer*. J R Soc Interface, 2015. **12**(103).
66. Abramson, V.G. and I.A. Mayer, *Molecular Heterogeneity of Triple Negative Breast Cancer*. Curr Breast Cancer Rep, 2014. **6**(3): p. 154-158.
67. Irshad, S., P. Ellis, and A. Tutt, *Molecular heterogeneity of triple-negative breast cancer and its clinical implications*. Curr Opin Oncol, 2011. **23**(6): p. 566-77.
68. Heneghan, H.M., et al., *MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer*. J Oncol, 2009. **2009**: p. 950201.
69. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R68.
70. Patsialou, A., et al., *Selective gene-expression profiling of migratory tumor cells in vivo predicts clinical outcome in breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(5): p. R139.
71. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
72. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
73. von Minckwitz, G., et al., *Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2012. **30**(15): p. 1796-804.
74. Heitz, F., et al., *Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases*. Eur J Cancer, 2009. **45**(16): p. 2792-8.
75. Cheang, M.C., et al., *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1368-76.
76. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
77. Lehmann, B.D., et al., *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2750-67.
78. Jezequel, P., et al., *Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response*. Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 43.
79. Masuda, H., et al., *Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(19): p. 5533-40.
80. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
81. Thomson, J.M., et al., *Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2202-7.
82. Di Leva, G. and C.M. Croce, *Roles of small RNAs in tumor formation*. Trends Mol Med, 2010. **16**(6): p. 257-67.
83. Mendell, J.T. and E.N. Olson, *MicroRNAs in stress signaling and human disease*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1172-87.
84. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
85. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(1): p. 13-21.
86. Melo, S.A., et al., *Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 707-21.
87. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
88. Schwarzenbach, H., *Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(5): p. 211.
89. Schwarzenbach, H., D.S. Hoon, and K. Pantel, *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(6): p. 426-37.
90. Hanke, M., et al., *A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer*. Urol Oncol, 2010. **28**(6): p. 655-61.

-
91. Park, N.J., et al., *Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5473-7.
 92. O'Driscoll, L., *Expanding on exosomes and ectosomes in cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(24): p. 2359-62.
 93. Singh, R. and Y.Y. Mo, *Role of microRNAs in breast cancer*. Cancer Biol Ther, 2013. **14**(3): p. 201-12.
 94. Aydogdu, E., et al., *MicroRNA-regulated gene networks during mammary cell differentiation are associated with breast cancer*. Carcinogenesis, 2012. **33**(8): p. 1502-11.
 95. Gregory, P.A., et al., *MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition*. Cell Cycle, 2008. **7**(20): p. 3112-8.
 96. Howe, E.N., D.R. Cochrane, and J.K. Richer, *Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(2): p. R45.
 97. Howe, E.N., et al., *miR-200c targets a NF-kappaB up-regulated TrkB/NTF3 autocrine signaling loop to enhance anoikis sensitivity in triple negative breast cancer*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49987.
 98. Wang, C., et al., *MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2012. **31**: p. 58.
 99. Korner, C., et al., *MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKCepsilon)*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8750-61.
 100. Mackiewicz, M., et al., *Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **130**(2): p. 663-79.
 101. Chong, M.M., et al., *Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery*. Genes Dev, 2010. **24**(17): p. 1951-60.
 102. Taylor, M.A., et al., *TGF-beta upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 150-63.
 103. Bisso, A., et al., *Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer*. Cell Cycle, 2013. **12**(11): p. 1679-87.
 104. Garcia, A.I., et al., *Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(5): p. 279-90.
 105. Liu, H., et al., *Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1*. Tumour Biol, 2013. **34**(3): p. 1713-22.
 106. Cascione, L., et al., *Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55910.
 107. Gasparini, P., et al., *microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers*. Oncotarget, 2014. **5**(5): p. 1174-84.
 108. Hammond, M.E., et al., *American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. J Oncol Pract, 2010. **6**(4): p. 195-7.
 109. Wolff, A.C., et al., *Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update*. J Clin Oncol, 2013. **31**(31): p. 3997-4013.
 110. Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic, *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. Biostatistics, 2007. **8**(1): p. 118-27.
 111. de Rinaldis, E., et al., *Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 643.
 112. Dvinge, H., et al., *The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer*. Nature, 2013. **497**(7449): p. 378-82.
 113. Curtis, C., et al., *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 346-52.
 114. Sales, G., et al., *MAGIA, a web-based tool for miRNA and Genes Integrated Analysis*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Web Server issue): p. W352-9.
 115. Altman, D.G., *Practical statistics for medical research* 1991, London: Chapman and Hall.
 116. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. pl1.
 117. Walenta, S., et al., *Tissue gradients of energy metabolites mirror oxygen tension gradients in a rat mammary carcinoma model*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(3): p. 840-8.
 118. Jenkins, E.O., et al., *Age-specific changes in intrinsic breast cancer subtypes: a focus on older women*. Oncologist, 2014. **19**(10): p. 1076-83.
 119. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. Cancer Cell, 2006. **10**(6): p. 515-27.

120. Hu, Z., et al., *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 96.
121. Adams, B.D., K.P. Claffey, and B.A. White, *Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 14-23.
122. Sung, H., et al., *Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 195.
123. Turner, N.C. and J.S. Reis-Filho, *Tackling the diversity of triple-negative breast cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(23): p. 6380-8.
124. Shah, S.P., et al., *The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 395-9.
125. Ding, L., et al., *Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 999-1005.
126. Nik-Zainal, S., et al., *The life history of 21 breast cancers*. Cell, 2012. **149**(5): p. 994-1007.
127. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
128. Hennessy, B.T., et al., *Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4116-24.
129. Herschkowitz, J.I., et al., *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. R76.
130. Farmer, P., et al., *Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4660-71.
131. Doane, A.S., et al., *An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen*. Oncogene, 2006. **25**(28): p. 3994-4008.
132. Guedj, M., et al., *A refined molecular taxonomy of breast cancer*. Oncogene, 2012. **31**(9): p. 1196-206.
133. Pikarsky, E., et al., *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 461-6.
134. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr., *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB*. Science, 1996. **274**(5288): p. 784-7.
135. Biswas, D.K., et al., *NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10137-42.
136. Van Antwerp, D.J., et al., *Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB*. Science, 1996. **274**(5288): p. 787-9.
137. Sharma, H.W. and R. Narayanan, *The NF-kappaB transcription factor in oncogenesis*. Anticancer Res, 1996. **16**(2): p. 589-96.
138. Biswas, D.K., et al., *Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8542-7.
139. Nakshatri, H., et al., *Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3629-39.
140. Kendellen, M.F., et al., *Canonical and non-canonical NF-kappaB signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells*. Oncogene, 2014. **33**(10): p. 1297-305.
141. Yang, C.H., A. Murti, and L.M. Pfeffer, *Interferon induces NF-kappa B-inducing kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor-dependent NF-kappa B activation to promote cell survival*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31530-6.
142. Goldberg, J.E. and K.L. Schwertfeger, *Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(9): p. 1133-46.
143. Crown, J., J. O'Shaughnessy, and G. Gullo, *Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 6**: p. vi56-65.
144. Corkery, B., et al., *Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer*. Ann Oncol, 2009. **20**(5): p. 862-7.
145. Doyle, L. and D.D. Ross, *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7340-58.
146. Staud, F. and P. Pavek, *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 720-5.
147. Desmedt, C., et al., *Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5158-65.
148. Disis, M.L. and S.E. Stanton, *Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2015. **35**: p. e25-30.

-
149. He, Y.J., et al., *miR-342 is associated with estrogen receptor-alpha expression and response to tamoxifen in breast cancer*. *Exp Ther Med*, 2013. **5**(3): p. 813-818.
 150. Li, X.R., et al., *miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer*. *FEBS Lett*, 2014. **588**(17): p. 3298-307.
 151. Grady, W.M., et al., *Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(27): p. 3880-8.
 152. Gamez-Pozo, A., et al., *Combined Label-Free Quantitative Proteomics and microRNA Expression Analysis of Breast Cancer Unravel Molecular Differences with Clinical Implications*. *Cancer Res*, 2015. **75**(11): p. 2243-53.
 153. Hirschhaeuser, F., U.G. Sattler, and W. Mueller-Klieser, *Lactate: a metabolic key player in cancer*. *Cancer Res*, 2011. **71**(22): p. 6921-5.
 154. Fulham, M.J., et al., *Mapping of brain tumor metabolites with proton MR spectroscopic imaging: clinical relevance*. *Radiology*, 1992. **185**(3): p. 675-86.
 155. Kennedy, K.M. and M.W. Dewhirst, *Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation*. *Future Oncol*, 2010. **6**(1): p. 127-48.
 156. Yokota, H., et al., *Lactate, choline, and creatine levels measured by vitro 1H-MRS as prognostic parameters in patients with non-small-cell lung cancer*. *J Magn Reson Imaging*, 2007. **25**(5): p. 992-9.
 157. Halestrap, A.P. and N.T. Price, *The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) familia: structure, function and regulation*. *Biochem J*, 1999. **343 Pt 2**: p. 281-99.
 158. Ovens, M.J., et al., *AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10*. *Biochem J*, 2010. **425**(3): p. 523-30.
 159. Halestrap, A.P. and D. Meredith, *The SLC16 gene familia-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 619-28.
 160. Juel, C. and A.P. Halestrap, *Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter*. *J Physiol*, 1999. **517 (Pt 3)**: p. 633-42.
 161. Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap, *The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9030-7.
 162. Bonen, A., *The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle*. *Eur J Appl Physiol*, 2001. **86**(1): p. 6-11.
 163. Dubouchaud, H., et al., *Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **278**(4): p. E571-9.
 164. Manning Fox, J.E., D. Meredith, and A.P. Halestrap, *Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle*. *J Physiol*, 2000. **529 Pt 2**: p. 285-93.
 165. Kennedy, K.M., et al., *Catabolism of exogenous lactate reveals it as a legitimate metabolic substrate in breast cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e75154.
 166. Sonveaux, P., et al., *Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(12): p. 3930-42.
 167. Chen, H., et al., *Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression*. *Clin Exp Metastasis*, 2010. **27**(8): p. 557-69.
 168. Pinheiro, C., et al., *The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(13): p. 2418-24.
 169. Pinheiro, C., et al., *Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas*. *Virchows Arch*, 2008. **452**(2): p. 139-46.
 170. Bola, B.M., et al., *Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(12): p. 2805-16.
 171. McClelland, M.L., et al., *An integrated genomic screen identifies LDHB as an essential gene for triple-negative breast cancer*. *Cancer Res*, 2012. **72**(22): p. 5812-23.

Anexos

Anexo 1

RECOVER ALL

Protocolo para la Extracción de RNA a partir de 8 cortes de 10micras para tejido o 16 cortes de 10micras para línea celular

Proceso de Desparafinación

- 1.- Cortar el cilindro de parafina en piezas pequeñas.
- 2.- Incubar durante 5 minutos en 1 ml de xilol a 50 °C con agitación (500 rpm).
- 3.- Retirar el xilol y agregar 1 ml de xilol e incubar a 50 °C con agitación (500 rpm) durante 5 minutos.
- 4.- Lavar en 1 ml de alcohol al 100 % durante 5 minutos en agitación.
- 5.- Retirar el alcohol.
- 6.- Lavar de nuevo con 1 ml de alcohol al 100 % durante 5 minutos en agitación.
- 7.- Retirar el alcohol y dejar secar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Proceso para la Extracción de RNA Total, a partir del Total Nucleic Acid Isolation Kit Recover All (Ambion)

- 1.- Agregar 200 ul (para buenas cantidades de tejido) o **100ul para línea celular o poco tejido** de buffer de digestión.
- 2.- Agregar 4 ul de proteasa y mezclar por pipeteo.
- 3.- Incubar a 50 °C durante 15 minutos
- 4.- Incubar a 80 °C durante 15 minutos. (aumentar SOLO 5 min si no se ha disgregado por completo la parafina, un mayor tiempo puede degradar aun mas el RNA).
- 5.- Preparar el siguiente master mix de acuerdo al número de muestras procesadas
Cantidades por muestra
 - 240 ul de isolation additive.
 - 550 ul de etanol al 100 %.
- 6.- Agregar 790ul por tubo y mezclar por pipeteo
- 7.- Transferir 700 ul a la columna.
- 8.- Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm a temperatura ambiente.
- 9.- Descartar el sobrenadante.
- 10.- Repetir con el resto de la muestra.
- 11.- Agregar 700 ul de Wash 1
- 12.- Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm.
- 13.- Descartar el sobrenadante.
- 14.- Agregar 500 ul de Wash 2/3.
- 15.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
- 16.- Descartar el sobrenadante.
- 17.- Centrifugar durante 30 segundos para eliminar el residuo del fluido.
- 18.- Hacer el siguiente mix para cada muestra:
 - 6 ul de 10XDNase Buffer.
 - 4 ul de DNase.
 - 50 ml de agua libre de RNA'asas.
- 19.- Agregar 60 ul del mix anterior al centro del filtro e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 20.- Agregar 700 ul de Wash 1.
- 21.- Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- 22.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
- 23.- Descartar el sobrenadante.

-
- 24.- Agregar 500 ul de Wash 2/3.
 - 25.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
 - 26.- Descartar el sobrenadante.
 - 27.- Repetir desde el paso número 23.
 - 28.- Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm para mover el residuo del fluido.
 - 29.- Cambiar columna a nuevo tubo.
 - 30.- Eluir en 25 ul con agua libre de RNAsa.
 - 31.- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
 - 32.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
 - 33.- Retirar la columna.
 - 34.- Colocar el sobrenadante en hielo.
 - 35.- Cuantificar el sobrenadante

Protocolo para la Extracción de RNA a partir de Muestras de Cilindros de Parafina

Proceso de Desparafinación

- 1.- Cortar el cilindro de parafina en piezas pequeñas.
- 2.- Incubar durante 10 minutos en 1 ml de xilol a 50 °C con agitación (500 rpm).
- 3.- Retirar el xilol y agregar 1 ml de xilol e incubar a 50 °C con agitación (500 rpm) durante 10 minutos.
- 4.- Lavar en 1 ml de alcohol al 100 % durante 5 minutos en agitación.
- 5.- Retirar el alcohol.
- 6.- Lavar de nuevo con 1 ml de alcohol al 100 % durante 5 minutos en agitación.
- 7.- Retirar el alcohol y dejar secar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Proceso para la Extracción de RNA Total, a partir del Total Nucleic Acid Isolation Kit Recover All (Ambion)

- 1.- Agregar 200 ul de buffer de digestión.
- 2.- Agregar 4 ul de proteasa y mezclar por pipeteo.
- 3.- Incubar a 50 °C durante 15 minutos
- 4.- Incubar a 80 °C durante 15 minutos. (aumentar SOLO 5 min si no se ha disgregado por completo la parafina, un mayor tiempo puede degradar aun mas el RNA).
- 5.- Prepar el siguiente master mix de acuerdo al número de muestras procesadas
Cantidades por muestra
 - 240 ul de isolation additivve.
 - 550 ul de etanol al 100 %.
- 6.- Agregar 790ul por tubo y mezclar por pipeteo
- 7.- Transferir 700 ul a la columna.
- 8.- Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm a temperatura ambiente.
- 9.- Descartar el sobrenadante.
- 10.- Repetir con el resto de la muestra.
- 11.- Agregar 700 ul de Wash 1
- 12.- Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm.
- 13.- Descartar el sobrenadante.
- 14.- Agregar 500 ul de Wash 2/3.
- 15.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
- 16.- Descartar el sobrenadante.
- 17.- Centrifugar durante 30 segundos para eliminar el residuo del fluido.
- 18.- Hacer el siguiente mix para cada muestra:
 - 6 ul de 10XDNase Buffer.

- 4 ul de DNase.
 - 50 ml de agua libre de RNA'asas.
- 19.- Agregar 60 ul del mix anterior al centro del filtro e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - 20.- Agregar 700 ul de Wash 1.
 - 21.- Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
 - 22.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
 - 23.- Descartar el sobrenadante.
 - 24.- Agregar 500 ul de Wash 2/3.
 - 25.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
 - 26.- Descartar el sobrenadante.
 - 27.- Repetir desde el paso número 23.
 - 28.- Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm para mover el residuo del fluido.
 - 29.- Cambiar columna a nuevo tubo.
 - 30.- Eluir en 25 ul con agua libre de RNAsa.
 - 31.- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
 - 32.- Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.
 - 33.- Retirar la columna.
 - 34.- Colocar el sobrenadante en hielo.
 - 35.- Cuantificar el sobrenadante.

Apoptosis: Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit PREPARAR:

1. 1x Annexin binding buffer, por ejemplo para 10 ensayos agregar 1ml 5x de annexin binding buffer a 4ml de agua. **COMPONENTE A**

Reacciones	ul 5x buffer annexin	ul agua
1	100	400
2	200	800
3	300	1200
4	400	1600
5	500	2000
6	600	2400
7	700	2800
8	800	3200
9	900	3600
10	1000 (1ml)	4000
11	1100(1.100ml)	4400
12	1200	4800
13	1300	5200
14	1400	5600
15	1500	6000
16	1600	6400
17	1700	6800
18	1800	7200
19	1900	7600
20	2000	8000

NOTA: NO SE PUEDE ALMACENAR, PREPARAR SOLO LO QUE SE EMPLEA

2. Working solution: Preparar solución de trabajo PI a 100 μ g/mL diluyendo 5ul de 1mg/mL de PI stock (**Componente B**) a 45ul de 1x anexin-binding buffer.

NOTA: SE PUEDE ALMACENAR YA DILUIDO

Protocolo para 1 000 000 de células

1. Transfectar células
2. Colectar células: Tripzinar las células con 200ul de tripzina y 1 min de incubación. Inactivar con 15ul de suero. Ojo: lavar bien cada uno de los pozos y depositar las células en un tubo Eppendorf de acuerdo a diseño experimental.
3. Centrifugar 4 min a 10 000 rpm, descartar sobrenadante.
4. Resuspender la células en 1ml de PBS frío.
5. Centrifugar 4 min a 10 000 rpm, descartar sobrenadante.
6. Resuspender en 100ul de 1x annexin-binding buffer.
7. Agregar 5ul de FITC annexinV(Componente A) y agregar 1ul de 100 μ g/mL PI working solution
8. Incubar a temperatura ambiente por 15 min
9. Agregar 400ul de 1x anexin buffer y mezclar gentilmente
10. Llevar inmediatamente a citometría

Transformación con vector psichedual 2

Antes de iniciar:

- Diluir oligos 1ug/ul

Clonación de vector

Linearización del vector co-digestión con enzimas XhoI y NOTI

Nota:

Cantidades calculadas (total 20ul) para 0.2-1.5ug de sustrato de DNA

No hacer digestiones por toda una noche ya que se fragmenta DNA

1. Hacer el siguiente Master mix

Reactivo	Cantidad (para una reacción con una enzima)	Cantidad para doble digestión
Agua	16.3ul	32.6ul
RE, 10x Buffer	2ul	4ul
Acetylated BSA, 10ug/ul	0.2ul	0.4ul
DNA, 1ug/ul	1ul	2ul

2. Mezclar por pipeteo
3. Agregar 0.5ul de enzima de restricción XHOI a 10U/ul .
4. Agregar 0.5ul de enzima de restricción NOTI a 10U/ul , para un total de 40ul
5. Mezclar por pipeteo
6. Incubar a 37C por 2hrs.
7. Inactivar enzimas a 65°C por 10min
8. Extraer vector linearizado con QIAEXII Gel extracción Kit (OPCIONAL). Si el vector será empleado directamente si extracción proseguir al paso de ligación.

Extracción de vector a partir de gel de agarosa (PASO OPCIONAL –NO SE REALIZÓ)

1. Cortar banda de gel con bisturí
2. Pesar el fragmento del gel y añadir 3 volúmenes de Buffer QX1 y 2 volúmenes de agua
3. Mezclar la muestras por 30 segundos
4. Agregar QIAEXII

Peso (ug)	Volumen de QIAEXII (ul)
2	10
2-10	30
+10, por cada 10ug adicionales	Agregar 30ul adicionales

5. Incubar 10 min por 50C para solubilizar la agarosa. Mezclar cada 2 min.
6. Si la solución no es amarilla y tiene un color naranja o violeta agregar 10ul 3M de acetato de sodio, pH5 y mezclar e incubar por al menos otros 5 minutos

7. Centrifugar 30s y remover el sobrenadante
8. Lavar la pastilla con 500ul de buffer QX1. Mezclar
9. Centrifugar 30s y remover sobrenadante
10. Lavar la pastilla con 500ul de buffer PE. Mezclar
11. Centrifugar por 30s y remover el sobrenadante
12. Secar la pastilla de 10-15 min hasta que la pastilla se vuelva blanca. Si se emplearon 30ul de QIAEXII secar la pastilla por 30 minutos
13. Eluir en buffer TE
14. Incubar 5 min a 50C para 4-10kb
15. Centrifugar 30s y recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo. El sobrenadante contiene el DNA purificado

Alineamiento de Oligos

1. Diluir oligonucleotidos a 1ug/ul en agua
2. Combinar 2ul de cada oligonucleótido con 46ul de Oligo Annealing Buffer
3. Calentar a 90 °C por 3 minutos
4. Transferir a baño María a 37°C por 15 minutos
5. Almacenar a -20°C o utilizar inmediatamente

Ligación – Digestión con enzimas de restricción

1. Preparar el siguiente master mix

Reactivo	Extremos pegajosos
Vector linearizado de DNA (44ng/ul)	100 ng
Inserto de DNA (oligos) 3:1 (150ng/ul) **	Se puede modificar 1:1 hasta 5:1 en un rango molar sobre el vector
10x T4 DNA ligase buffer	24ul
T4 DNA ligasa (#EL0014)	0.2ul (1u)
Agua	Completar a 20ul

2. Para extremos pegajosos: Incubar toda la noche a temperatura ambiente
3. Usar hasta 5ul de la mezcla para transformación de 50ul de células competentes
4. Inactivar a 65°C por 10 min.
5. Almacenar a -20C

NOTAS:

Para incrementar el numero total de colonias transformantes prolongar la reacción hasta toda la noche

LA T4 DNA ligasa se inactiva calentado a 65C por 10 min o 70C por 5 min.

**Nota:
$$\frac{(ng \text{ vector}) * (Kb \text{ inserto})}{Kb \text{ vector}} \times \frac{\text{inserto}}{\text{Vector}}$$

$$\frac{(100ng = 2ul \text{ de vector}) * (0.04kb)}{6kb} \times \frac{3}{1} = 3.3ng$$

Transformación en dos días con kit TransformAid Bacterial Transformation

NOTAS:

Hacer TODOS los procedimientos en hielo

No dejar la células por más de 5 min a temperatura ambiente

No usar mas de 5ul de producto de ligación

PROCOLO PARA 2 TRANSFORMACIONES

Día 1

1. Sembrar cultivo mediante inoculación de 2mL de C-medio con una sola colonia de bacteria en tubos. Usar solamente bacterias frescas. ESTE CULTIVO ES SUFICIENTE PARA 26 TRANSFORMACIONES. EL CULTIVO PUEDE SER ALMACENADO A 4C HASTA POR UNA SEMANA
2. Incubar a 37C en shaker toda la noche

Día 2

NOTA: Incluir controles de experimento: plásmido sin inserto y controles de esterilidad (Medio líquido sin colonia)

1. Atemperar los tubos de cultivo con 1.5 ml de C-medio para 2 transformaciones, a 37C por 20 min
2. Atemperar cajas con LB agar suplementado con antibiótico a 37C por lo menos 20 minutos antes de sembrar
3. Preparar la solución T: Descongelar solución T (A) y (B): Mezclar 250ul de A y 250ul de B en mantener tubo en hielo
4. Agregar 150ul de cultivo incubado toda la noche (DIA 1) a 1.5 mL de C-medio pre-atemperado.
5. Incubar 20 min a 37C en shaker
6. Centrifugar 1 min a 10 000 g y descartar sobrenadante
7. Resuspender células en 300 ul de solución T.
8. Incubar en hielo 5 min
9. Centrifugar 1 min a 10 000 g y descartar sobrenadante
10. Resuspender células en 120ul de solución T
11. Incubar 5 min en hielo
12. Agregar hasta 5ul de mezcla de ligación (10-100ng de DNA) o 1ul de supercoiled DNA (10-100pg) A UN NUEVO TUBO.
13. Incubar en hielo por 2 min
14. Agregar 50ul de las células preparadas (paso 10) a tubos de paso 12.
15. Incubar 5 min en hielo
16. Sembrar inmediatamente en platos pre atemperados con agar LB con ampicilina .
17. Incubar toda la noche a 37C
18. Dibujar cuadrantes en caja, seleccionar y numerar la colonias que se picaran para propagarlas
19. Seleccionar colonias resistentes a ampicilina y propagarlas en 1.5ml de medio líquido lb a 37°C toda la noche en agitación

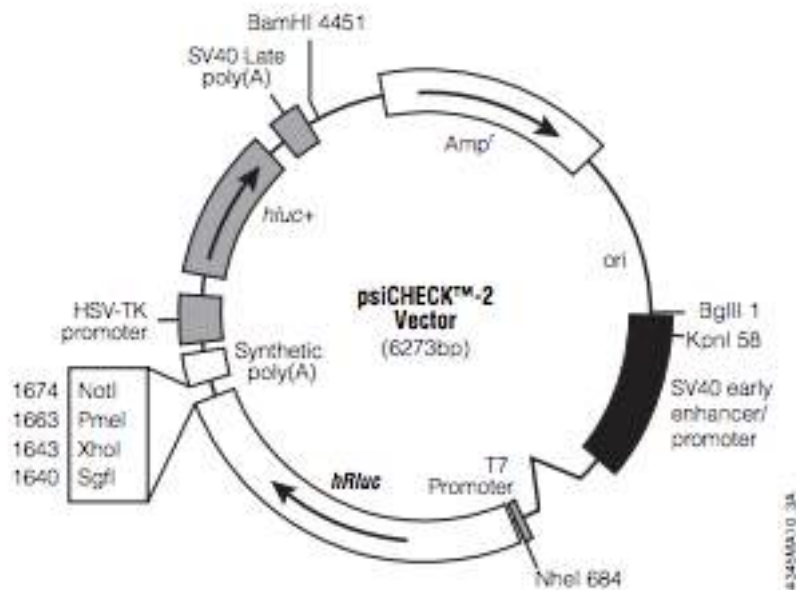
Preparación de medios para 1lt de solución:

Medio sólido de agar LB 32g por 1 lt de agua, adicionar Ampicilina

Medio líquido Broth LB 20g por 1 lt de agua

Protocolo de extracción de plásmido de colonias bacterianas con el kit Zyppy Plasmid Miniprep .

1. Centrifugar el tubo con el cultivo bacteriano 5 min a 5000rpm a temperatura ambiente.
2. Descartar el sobrenadante y agregar 600ul de agua para resuspender el botón bacteriano.
3. Agregar 100ul de 7x Lysis Buffer (azul) e mezclar delicadamente invirtiendo el tubo 4-6 veces. (Proceder al siguiente paso en no mas de 2 minutos)
4. Agregar 350ul de Neutralización Begger (amarillo) FRIO y mezclar invirtiendo de 2-3 veces. La muestra debe virar a amarillo y generar un precipitado cuando se ha neutralizado por completo.
5. Centrifugar a 16,000g por 4 min
6. Transferir el sobrenadante (aprox 900ul) a una columna Zymo Spin II
7. Centrifugar 15 segundos a 16,000g
8. Descartar el sobrenadante
9. Agregar 200ul de Endo Wah Buffer centrifugar 30 segundos según a 16 000g
10. Agregar 400ul de Zyppy Wash Buffer a la columna, Centrifugar por 1 min a 16 00 g
11. Transferir la columna a uno nuevo tubo de colecta
12. Añadir 20ul de Zyppy Elution Buffer incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente
13. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min para eluir el DNA.



Western Blot
Extraer proteína

1. Lisis celular con Ripa 150ul por cada pastilla.
2. Vortex de 1 min
3. Incubar muestra durante 1hr a 4°C en agitación
4. Centrifugar tubo 15min 13000rpm a 4°C y RECUPERAR sobrenadante

LA ELECCIÓN DEL BUFFER DEPENDE DE:

Protein location	Buffer recommended
Whole cell	NP-40 or RIPA
Cytoplasmic (soluble)	Tris-HCl
Cytoplasmic (cytoskeletal bound)	Tris-Triton
Membrane bound	NP-40 or RIPA
Nuclear	RIPA or use nuclear fraction protocol*
Mitochondria	RIPA or use mitochondrial fraction protocol*

Cuantificación

PROCESO SE REALIZA EN CAMPANA

1. Preparar curva con azul de Coomasie (Thermo #23238): 500ul agua más 500ul de azul de Coomasie por cubeta. Las muestras se miden por duplicado excepto la curva. INCLUIR BLANCO.
2. Poner 1ml buffer de cuantificación en cada cubeta
3. BSA (OJO VER QUE NO SEA EL STOCK SI NO LA DILUSIÓN, se diluye a 1M/M): 1ul, 2ul and 3ul
4. Agregar 3ul de proteína y agitar poniendo un pedazo pequeño de parafilm (SE DEBE OBSERVAR CAMBIO DE COLOR EN EL BUFFER)
5. Leer en espectro (TENER CUIDADO DE CÓMO SE ACOMODAN LAS CUBETAS): colocar las muestras en sentido opuesto a la manillas del reloj.
 - a. Programa 4-Protein
 - b. Programa 4 protein sinza standard

Si la curva no sale considerar lo siguiente con respecto a BSA

1ng/ul ----- 0.1 absorbancia

x ----- absorbancia muestra

x= ng/ul de proteína en muestra

Corrida en gel cámara horizontal

Prender thermoblock a 95°C

1. Verificar en literatura cantidad de proteína de la que parten
2. Generar el siguiente master mix:

Reactivo	Cantidad
Loading buffer (4x)	12
DTT (reduce los puentes disulfuro permitiendo que la proteína adopte una conformación random para la separación por tamaño en el gel)	4.8
Muestra (Xng hasta en 31.2ul)	----
Agua	X para 31.2

-
3. Mezclar con vortex
 4. Calentar muestras durante 5-10 min a 95°C en thermoblock (para desnaturalizar)
 5. Mezclar con vortex
 6. Diluir buffer de corrida MOPS a 1x con agua. Stock esta a 20x en un litro de agua.
 7. Sacar gel 4-12% Bis-Tris Gel del paquete cuidando de no escurrir. **HACERLO EN TARJA.**
NOTA: La selección del gel se realiza de acuerdo al buffer de corrida y el corrimiento de la proteína a evaluar.
Bis es un agente que favorece el cross-linking en el gel
 8. Quitar plástico inferior del gel
 9. Poner buffer MOPS1x en la cámara
 10. Colocar gel en la cámara.
NOTA: SI SE TRABAJAN DOS GELES, EL GEL DE ATRÁS VA EN SENTIDO CONTRARIO AL GEL DE ENFRETE (NOMBRE EN SENTIDO CONTRARIO)
 11. Retirar con cuidado los peines. **NO MOVER DE FORMA LATERAL SOLO JALAR HACIA ARRIBA**
 12. Limpiar pozos y buffer
 13. Poner 500ul de antioxidante en medio
 14. Cargar muestras : 10ul de escalera y 48ul de muestra. Entre cada proteína a evaluar poner escalera.
 15. Correr a 90v por 30 min para permitir llegue a stock (aprox. 1/3 del gel)
 16. Correr a 120v hasta que casi se salga el colorante.

Transferencia- Membrana

1. Cortar membrana 8 de alto por 7 de ancho
2. Cortar dos papeles filtro por gel de 8 de alto por 7 de ancho
3. Preparar solución de transferencia.
HACERLO EN CAMPANA

700ml de agua
100ml de tris glicina 10x
200ml metanol
4. Activar la membrana 1 min en metanol (solo parte blanca) y enjuagar 1 min con agua 3 veces en agitación.
5. Poner el gel en buffer de transferencia frio.
6. Colocar aditamentos para cámara de transferencia
7. Poner aprox. 5min membrana y papel filtro en solución de transferencia.
8. Sacar gel y despegar cartuchos con espátula
9. Cortar zona de peine y zona inferior del gel con espátula
10. Mojar espátula y dedos para separar el gel y transferirlo a caja con solución de transferencia.
11. Permitir atemperar al gel durante 3-5 minutos en buffer de transferencia frio.
12. Colocar aditamento en el siguiente orden: NEGRO -> esponja -> filtro -> gel -> membrana -> filtro -> esponja.
13. **Pasar pipeta para evitar burbujas en una sola dirección al poner membrana y segundo papel filtro.**
14. Poner negro con negro

15. Correr en frio a 350mA por 1 o 2 hrs o a 24 volts toda la noche a 4°C.

Solución de bloqueo

1. Preparar 50ml solución de bloqueo
Diluir TBS de 10x a 1x para un total de 50ul: **5ml de TBX10x mas 45ml de agua**
Leche 5%: **Pesar 2.5g de leche**
0.1% Tween en TBS 1x: **5ul de tween**

PASO OPCIONAL: Tinción con Ponceo

1. Verter aprox. 40ml de tinción de Ponceo e incubar 1 min en movimiento
2. Verificar tinción y bandas
3. Lavar 2 veces con agua

Bloqueo

1. Incubar 1hr en agitación en shaker suave
2. Preparar 1lt de TBS + 0.1% de tween: 1lt de TBS1x + 1ml de tween
3. Quitar solución de bloqueo y lavar con tbs + 0.1% de tween 2 veces por 3 min en shaker fuerte

Anticuerpo primario

- Nota: 1% es 1g de leche en 100ml, para 3% es 1.5g en 50ml

Incubar anticuerpo de control de carga. Si no hay dilución el stock esta en refri de -20°C (Diluir stock 10ul de anticuerpo en 10ml de tbs + leche 3%).

- NOTA: CUIDADO DE QUE NO SE SOBRELAPEN POR PESO MOLECULAR LAS PROTEÍNAS evaluadas y las de control de carga .

- a. B Actina 60kDa
- b. GAPDH
- c. Vinculina 110kDa

NOTA: SI EL ANTICUERPO PARA CONTROL DE CARGA ESTA PEROXIDADO NO SE DEBE INCUBAR CON ANTICUERPO SECUNDARIO Y SE PUEDE INCUBRA 1HR EN LUGAR DE TODA LA NOCHE

1. Diluir anticuerpo primario en leche 3% con TBS1x + 0.1% Tween. Nota: en caso de que se vean bandas inespecificas se puede intentar corregir con leche al 5%. Preparar 10 ml mínimo 8ml
2. Si se evalúan distintas proteínas o concentraciones se debe cortar el gel comenzando por el marcador, poniendo muesca en la esquina inferior izquierda y poner en distintas cajas.
3. Incubar toda la noche a 4°C en shaker suave (37).
4. Lavar 4 veces durante 5 min con TBS1x +0.1% de tween en agitación fuerte para remover residuos de anticuerpo primario

Anticuerpo secundario. No tocar membrana con los dedos

Incluir control del control de carga

NOTA: SI EL ANTICUERPO PARA CONTROL DE CARGA ESTA PEROXIDADO NO SE DEBE INCUBAR CON ANTICUERPO SECUNDARIO Y SE PUEDE INCUBRA 1HR EN LUGAR DE TODA LA NOCHE

1. Diluir 1:5000 anticuerpo secundario en 3% leche en TBS1x +0.1% tween.
 $5000\text{mml}/8\text{ml} = 625$ $1000\text{ml}/625 = 1.6$
Poner 8ml de 3% leche en TBS1x +0.1% tween y 1.6ul de anticuerpo secundario.
NOTA: TENER CUIDADO DE QUE SEA ANTI RATON O ANTI CONEJO de acuerdo a lo que se este empleando.
2. Incubar los 8ml + anticuerpo por 1hr a TA en shaker ligero
3. Lavar 3 veces con TBS1x+0.1% tween
4. Lavar 2 veces con TBS1x

Enhancer

1. Pegar plástico en mesa
2. Preparar solución enhancer 3ml por membrana
Enhancer solution 1.5ml
Peroxide solution 1.5ml
3. Incubar 1 min en solución enhancer
4. Retirar solución escurriendo la membrana
5. Colocarla en caja de radiografía. Acomodar de acuerdo a la escalera y corte del pedazo del endógeno.

Protocolo Migración

Transwell:6.5mm Transwell® with 8.0µm Pore Polyester Membrane Insert, Sterile
(Product #3464)

Día 1

1. Sembrar 200 000 células por pozo en placa de 6
2. Transfectar miRNA
3. Colectar y cuantificar las células en 1ml de medio SIN suero
4. Depositar 700ul de medio suplementado con suero al 10% en la cámara inferior del transwell
5. Depositar volumen con 100 000 células en la cámara superior del transwell
6. Completar el volumen superior a 500ul de medio sin suero
7. Sembrar la misma cantidad de volumen sembrada en transwell en placa de 96 como control de siembra. Recolectar a las 6 hrs de haber se sembrado y teñir con SRB
8. Incubar toda la noche a 37°C

Día 2

9. Limpiar transwells con PBS
10. Fijar células con alcohol 100% incubando al menos 1hr a -20°C
11. Lavar con PBS
12. Teñir con SRB por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad
13. Lavar exceso de colorante con ácido acético a l 1%
14. Con un hisopo lavar zona superior del transwell retirando colorante de esa zona
15. Tomar fotografías abarcando 4 campos evitando las orillas
16. Disolver en 300ul de Tris 10mM durante 15 min y leer placa a 570nm en espectofotometro

Protocolo Invasión

Transwell:6.5mm Transwell® with 8.0µm Pore Polyester Membrane Insert, Sterile
(Product #3464)

MatrigelBD: Growth Factor Reduced (GFR) Matrigel Invasion Chambers in two 24-well plates, 8.0 µm 354483

Día 1

1. Sembrar 200 000 células por pozo en placa de 6
2. Transfectar miRNA
3. Colectar y cuantificar las células en 1ml de medio SIN suero
4. Hacer coating con 50ul de matrigel diluido 1:10
5. Depositar 700ul de medio suplementado con suero al 10% en la cámara inferior del transwell
6. Depositar volumen con 100 000 células en la cámara superior del transwell
7. Completar el volumen superior a 500ul de medio sin suero
8. Sembrar la misma cantidad de volumen sembrada en transwell en placa de 96 como control de siembra. Recolectar a las 6 hrs de haber se sembrado y teñir con SRB
9. Incubar toda la noche a 37°C

Día 2

10. Limpiar transwells con PBS
11. Fijar células con alcohol 100% incubando al menos 1hr a -20°C
12. Lavar con PBS
13. Teñir con SRB por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad

■

14. Lavar exceso de colorante con ácido acético a l 1%
15. Con un hisopo lavar zona superior del transwell retirando colorante de esa zona
16. Tomar fotografías abarcando 4 campos evitando las orillas
17. Disolver en 300ul de Tris 10mM durante 15 min y leer placa a 570nm en espectofotómetro

Publicaciones

- **Citas a publicaciones:**

Citas a Noviembre de 2015: 468

Web of Science

<http://www.researcherid.com/rid/A-2246-2014>

- **Publicaciones: 12**

1. Ana Elvira Zacapala-Gómez, Oscar Del Moral- Hernández, Nicolás Villegas-Sepúlveda, Alfredo Hidalgo-Miranda, **Sandra Lorena Romero-Córdoba**, Fredy Omar Beltrán-Anaya, Marco Antonio Leyva-Vázquez, Luz del Carmen Alarcón-Romero, Berenice Illades-Aguiar. **Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells.** *Virology*. Aceptado
2. Ramiro José González-Duarte, Verna Cázares-Ordoñez, **Sandra Romero-Córdoba**, Lorenza Díaz, Víctor Ortíz, Julio Augusto Freyre-González, Alfredo Hidalgo-Miranda, Fernando Larrea, Euclides Avila. **Calcitriol increases Dicer expression and modifies the microRNAs signature in SiHa cervical cancer cells.** *Biochemistry and Cell Biology*. 10.1139/bcb-2015-0010.
3. **Sandra L Romero-Cordoba**, Ivan Salido-Guadarrama, Mauricio Rodriguez-Dorantes, Alfredo Hidalgo-Miranda. **miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer.** *Cancer biology & therapy* 08/2014; 15(11).
4. Borgonio Cuadra VM, González-Huerta NC, **Romero-Córdoba S**, Hidalgo-Miranda A, Miranda-Duarte A. **Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways.** *PLoS One*. 2014 Jun 5;9(6):e97690. doi: 10.1371/journal.pone.0097690. eCollection 2014.
5. Salido-Guadarrama I, **Romero-Cordoba S**, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodríguez-Dorantes M. **MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer.** *Onco Targets Ther*. 2014 Jul 21;7:1327-38. doi: 10.2147/OTT.S61562. eCollection 2014. Review.
6. M. Martínez-Pacheco, A. Hidalgo-Miranda, **S. Romero-Córdoba**, M. Valverde, E. Rojas **mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects.** *Gene*, 2014, 533(2) 508-514
7. Akinyemi I. Ojesina, Lee Lichtenstein, Samuel S. Freeman, Chandra Sekhar Pedamallu, Ivan Imaz-Rosshandler, Trevor J. Pugh, Andrew D. Cherniack, Lauren Ambrogio, Kristian Cibulskis, Bjørn Bertelsen, **Sandra Romero-Cordoba**, Victor Treviño, Karla Vazquez-Santillan, Alberto Salido Guadarrama, Alexi A. Wright, Mara W. Rosenberg, Fujiko Duke, Bethany Kaplan, Rui Wang, Elizabeth Nickerson, Heather M. Walline, Michael S. Lawrence, Chip Stewart, Scott L. Carter, Aaron McKenna, Iram P. Rodriguez-Sanchez, Magali Espinosa-Castilla, Kathrine Woie, Line Bjorge, Elisabeth Wik, Mari K. Halle, Erling A. Hoivik, Camilla Krakstad, Nayeli Belem Gabiño, Gabriela Sofia Gómez-Macías, Lezmes D. Valdez-Chapa, María Lourdes Garza-Rodríguez, German Maytorena, Jorge Vazquez, Carlos Rodea, Adrian Cravioto, Maria L. Cortes, Heidi Greulich, Christopher P. Crum, Donna S. Neuberg, Alfredo Hidalgo-Miranda, Claudia Rangel Escareno, Lars A. Akslen, Thomas E. Carey, Olav K. Vintermyr, Stacey B. Gabriel, Hugo A. Barrera-Saldaña, Jorge Melendez-Zajgla, Gad Getz, Helga B. Salvesen, Matthew Meyerson. **Landscape of Genomic Alterations in Cervical Carcinomas** *Nature*. 2013 Dec 25. doi: 10.1038/nature12881. [Epub ahead of print]

-
8. Enoc M Cortés-Malagón, José Bonilla-Delgado, José Díaz-Chávez, Alfredo Hidalgo-Miranda, **Sandra Romero-Cordoba**; Aykut Üren, Haydar Çelik, Matthew McCormick, José A Munguía-Moreno, Eloisa Ibarra-Sierra, Jaime Escobar-Herrera; Paul F Lambert, Daniel Mendoza-Villanueva, Rosa M Bermudez-Cruz, Patricio Gariglio. **Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue.** *Virology*, 2013, 447 (1-2) 155-165
 9. Palacios-Reyes CP, Espinosa AE, Contreras AC, Ordonez RO, Hidalgo-Miranda A, Rubio-Gayosso IR, Garcia-Alonso PG, Benitez-King GB, Ramirez-Rodriguez GR, Najera NN, Ita-Islas II, Araujo A, **Romero-Cordoba SR**, Palma I. **Williams neural stem cells: new model for insight into microRNA dysregulation.** *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jun 1;E5:1057-73.
 10. Gustavo Ramírez; Alfredo Cruz; Luis Jiménez; Enrique Espinosa; Blanca Ortiz-Quintero; Teresa Santos-Mendoza; Teresa Herrera; Elsy Canché-Pool; Criselda Mendoza; José L Bañales; Sara García-Moreno; Juan Morán; Carlos Cabello; Lorena Orozco; Irma Aguilar-Delfin; Alfredo Hidalgo-Miranda; **Sandra Romero**; Benjamin T Suratt; Moises Selman; Zúñiga J. **Seasonal and Pandemic Influenza H1N1 Viruses Induce Differential Expression of SOCS-1 and RIG-I genes and Cytokine/Chemokine Production in Macrophages** *Cytokine*. 2013 Apr;62(1):151-9.
 11. Shantanu Banerji, Kristian Cibulskis, Claudia Rangel-Escareno, Kristin K. Brown, Scott L. Carter, Abbie M. Frederick, Michael S. Lawrence, Andrey Y. Sivachenko, Carrie Sougnez, Lihua Zou, Maria L. Cortes, Juan C. Fernandez-Lopez, Shouyong Peng, Kristin G. Ardlie, Daniel Auclair, Veronica Bautista-Piña, Fujiko Duke, Joshua Francis, Joonil Jung, Antonio Maffuz-Aziz, Robert C. Onofrio, Melissa Parkin, Nam H. Pho, Valeria Quintanar-Jurado, Alex H. Ramos, Rosa Rebollar-Vega, Sergio Rodriguez-Cuevas, **Sandra L. Romero-Cordoba**, Steven E. Schumacher, Nicolas Stransky, Kristin M. Thompson, Laura Uribe-Figueroa, Jose Baselga, Rameen Beroukham, Kornelia Polyak, Dennis C. Sgroi, Andrea L. Richardson, Gerardo Jimenez-Sanchez, Eric S. Lander, Stacey B. Gabriel, Levi A. Garraway, Todd R. Golub, Jorge Melendez-Zajgla, Alex Toker#, Gad Getz, Alfredo Hidalgo-Miranda, and Matthew Meyerson. **Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes.** *Nature*. 2012 Jun 20;486(7403):405-9.
 12. **Sandra Romero-Cordoba**, Sergio Rodriguez-Cuevas, Rosa Rebollar-Vega, Valeria Quintanar-Jurado, Antonio Maffuz- Aziz, Gerardo Jimenez-Sanchez, Veronica Bautista Piña, Rocio Arellano-Llamas, Alfredo Hidalgo-Miranda. **Identification and Pathway Analysis of microRNAs with no Previous Involvement in Breast Cancer.** *PLoS ONE* 7(3): e31904. doi:10.1371/journal.pone.0031904, 2012.

Próximos a publicarse

1. **Expression and role of autoimmune regulator gene (AIRE) in breast cancer cells**
2. **Effects of tumor-secreted miR-9 on human breast fibroblasts**