



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**REGULACIÓN DE MicroRNAs EN CÉLULAS TRONCALES
TUMORALES**

TESIS

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

IVÁN URIEL BAHENA OCAMPO

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS,

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ,

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., agosto 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de
“Genómica Funcional del cáncer”
bajo la dirección del
Dr. Jorge Meléndez Zajgla
en la División de Investigación Básica del
Instituto Nacional de Medicina Genómica.**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.

miRNA	micro-RNA	MACS	Del inglés clasificación activada por magnetism
RNA(s)	Ácido desoxiribonucleico	mM	1×10^{-3} Moles
PCR	Del inglés reacción en cadena de la polimerasa	ml	1×10^{-3} litros
qPCR	Del inglés reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	μl	1×10^{-6} litros
qRT-PCR	Del inglés retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	μg	1×10^{-6} gramos
TEM	Transición epitelio mesenquima	PBS	Del inglés solución amortiguadora de fosfatos
CIT	Células iniciadoras tumorales	rh	Recombinante humana
CTN	Células troncales tumorales	Nu/Nu	Del inglés genotipo nudo heterocigoto
NOD/SCID	Del inglés sin obesidad o diabetes/inmunodeficiencia combinada severa	RIPA	Del inglés Amortiguador de radio inmunoprecipitado
iPSC	Del inglés células troncales pluripotentes inducidas	PVDF	Del inglés polifluoruro de vinilideno
EROs	Del inglés especies reactivas de oxígeno	OE	Del inglés sobre expresión
FT	Factor de transcripción	ELDA	Del inglés análisis de diluciones limitantes extremas
RISC	Complejo del silenciamiento inducido por RNA	WT	Del inglés fenotipo silvestre
siRNA	Del Inglés RNA pequeño interferente	dsiRNA	Del inglés RNA pequeño interferente sustrato de dicer
piRNA	RNA de interacción con proteínas PIWI	MUT	Mutante
MRE	Del inglés elemento de respuesta a miRNAs	S473	Residuo de serina en la posición 473
DMEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco	T308	Residuo de treonina en la posición 308
SFB	Suero fetal de bovino	T450	Residuo de treonina en la posición 450
MMLV	Del inglés virus de leucemia murina de Maloney	MACS	Del inglés clasificación activada por magnetism
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético	mM	1×10^{-3} Moles
FACS	Del inglés clasificación activada por fluorescencia	ml	1×10^{-3} litros

CONTENIDO:

	Página
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Cáncer de mama en México y el Mundo.	3
3.2 Reincidencia tumoral.	4
3.3 Células Troncales Tumorales.	5
3.4 La relación entre CTT y metastásis	10
3.5 Regulación de la expresión génica y fenotipos celulares.	11
3.6 Los microRNAs como reguladores pos-transcripcionales de la expresión génica.	13
3.7 Los microRNAs en el control de procesos fisiológicos y patológicos.	18
3.8 MicroRNAs en cáncer Onco-miRs, Supresor-miR y metasta-miRs.	19
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO PRINCIPAL	22
7. OBJETIVOS PARTICULARES	22
8. METODOLOGÍA	23
8.1 Cultivo celular	23
8.2 Extracción de RNA total.	24
8.3 Síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	24
8.4 Citometría de flujo y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).	25
8.5 MACS (clasificación celular activada por magnetos).	25
8.6 Formación de colonias en agar suave.	26
8.7 Ensayo de formación de mamó-esferas.	26
8.8 Ensayos de cicatrización de herida.	26
8.9 Ensayos de tumorigénesis en ratones nu/nu.	26
8.10 Sobre expresión de microRNAs e Inhibición de miRNAs por AntimiRs en líneas celulares.	27
8.11 Ensayos de genes reporteros para la identificación de elementos de respuesta a miRNAs.	28
8.12 Extracción de proteínas totales y Western blot.	29
8.13 Análisis densitométrico.	29
8.14 Ensayo de actividad de cinasa.	29
9. RESULTADOS	30
9.1 Determinación de inmunofenotipos tumorales por citometría de flujo y aislamiento de fracciones enriquecidas por clasificación activada por magnetismo.	30
9.2 Caracterización de células troncales tumorales.	32

9.3	Análisis de expresión de miRNAs en CTT comparadas contra la población total.	38
9.4	Efectos de la inhibición de miR-10b en CTT de MCF-7 y de MDA-MB-231.	41
9.5	Efectos de la sobreexpresión de miR-10b en la línea celular MCF-7 y SKBR-3.	43
9.6	Búsqueda de blancos para miR-10b en CTT.	49
9.7	Validación funcional de blancos para miR-10b en diferentes ensayos de pérdida-ganancia de función.	51
9.8	La mutación del MRE en PTEN bloquea la regulación por miR-10b.	54
9.9	Efectos de la regulación negativa de PTEN y su relación con el fenotipo CTT.	57
9.10	La expresión de miR-10b incrementa la activación de la vía PI3K/AKT en CTT.	60
10.	DISCUSIÓN:	66
10.1	Aislamiento y caracterización de CTT derivadas de líneas celulares de cáncer de mama.	66
10.1	Identificación de metasta-miR reguladores del fenotipo CTT.	67
10.2	La expresión de miR-10b controla la capacidad de autorenovación y la firma de expresión Pluripotencia/EMT en CTT.	68
10.3	La sobreexpresión de miR-10b induce el incremento en la proporción de CTT y el aumento en características troncales en líneas celulares MCF-7 y SKBR-3.	69
10.4	La regulación del fenotipo CTT involucra el control negativo de PTEN por miR-10b.	71
10.5	La expresión de PTEN regula de manera negativa el fenotipo CTT.	72
10.6	La expresión de miR-10b incrementa la activación de AKT.	74
11.	CONCLUSIONES.	78
12.	BIBLIOGRAFÍA.	80
13.	APENDICE:	87
	ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	
	miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation.	
	EMBO Reports 17(7):1081-1081 · July 2016	
	DOI: 10.15252/embr.201642700	

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Heterogeneidad tumoral y principales características del fenotipo troncal tumoral.	6
Figura 2	Biogénesis de los microRNA.	15
Figura 3	Porcentaje de células con inmunofenotipo CD44+/EpCAM+/CD24bajo o nulo en cinco líneas celulares utilizadas.	31
Figura 4	Enriquecimiento por MACS de CTT en líneas celulares.	32
Figura 5	Prueba de crecimiento en ausencia de adherencia y prueba de clonogenicidad.	33
Figura 6	Formación de colonias en agar por células fracciones celulares MCF-7.	34
Figura 7	Cuantificación del número de mamoesferas formadas a través de tres pasajes seriados en las células completas y fracciones enriquecidas.	35
Figura 8	Perfil de expresión relativa de genes de pluripotencia y de transición epitelio mesénquima.	37
Figura 9	Mapa de calor que muestra los nueve miRNAs con cambios compartidos entre las poblaciones MCF-7 CD44+ y MDA-MB-231 EpCAM+.	38
Figura 10	Expresión relativa de miR-10 y perfil de expresión de HOXD10 y RHOC.	40
Figura 11	Efectos de la inhibición de miR-10b a través de la transfección de un AntimiR.	41
Figura 12	Efectos de la inhibición de miR-10b en el perfil de expresión de marcadores troncales y de TEM.	42
Figura 13	Efectos de la inhibición de miR-10b en capacidad clonal y de migración.	43
Figura 14	Efectos de la sobreexpresión de miR-10b en el perfil de expresión de marcadores troncales y de TEM.	44
Figura 15	Efecto de la sobreexpresión de miR-10b en el porcentaje de células positivas a CD44 en las líneas celulares.	45
Figura 16	Efectos de la expresión de miR-10b en células MCF-7.	46
Figura 17	Ensayo de formación seriada de mamoesferas tumorales.	47
Figura 18	Morfología tumoral inducida por xenotransplantes de células MCF-7 con sobreexpresión estable de miR-Scr y miR-10b.	48
Figura 19	Análisis <i>in silico</i> de posibles blancos de miR-10b.	50
Figura 20	Expresión relativa de posibles blancos de miR-10b en ensayos de pérdida y ganancia de función.	51
Figura 21	Ensayos de gen reportero para la evaluación de la interacción de miR-10b con sus posibles mRNA blanco.	53
Figura 22	Análisis de correlación de la expresión de miR-10b contra PTEN o contra PIK3CA.	54
Figura 23	Efectos de la modulación de miR-10b en la expresión de PTEN a nivel proteína.	56
Figura 24	La mutación del MRE de PTEN compensa el efecto de regulación por miR-10b.	57
Figura 25	Efectos del silenciamiento transitorio de PTEN y su relación con el fenotipo CTT en célula MCF-7 miR-Scr OE.	58
Figura 26	Efectos del silenciamiento transitorio de PTEN y su relación con el fenotipo CTT en célula MCF-7 miR-10b OE.	59
Figura 27	Efectos de la regulación negativa de PTEN y miR-10b en la capacidad de formación de mamoesferas.	60
Figura 28	Expresión y activación de AKT medida por Western Blot en las células MCF-7 totales y fracciones CD44- y CD44+.	61
Figura 29	Regulación de los elementos de la vía PI3K/AKT por la sobreexpresión de miR-10b.	63
Figura 30	La capacidad clonal de las CTT está controlada por la activación sostenida AKT.	64
Figura 31	La capacidad clonal de las células MCF-7 miR-10b OE es controlada por la activación de sostenida AKT.	65
Figura 32	. Mecanismo de regulación de la activación de la vía PI3K/AKT mediado por miR-10b en CTT.	77

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	miRNAs relacionados a la progresión del cáncer.	20
Tabla 2	Características presentes en algunas líneas celulares de cáncer de mama.	30
Tabla 3	Eficiencia de formación tumoral en ensayos de diluciones limitantes <i>in vivo</i> .	48

1. RESUMEN.

En las células troncales tumorales (CTT) reside el potencial de autorenovación. Las CTT son más resistentes a los tratamientos antineoplásicos y mantienen la capacidad de formar un nuevo tumor, por lo que se han propuesto como la causa de la recurrencia del cáncer. Por otro lado, los genes pro-metastásicos pueden funcionar como reguladores de CTT. Con base en esta información, este trabajo propone que los miRNAs promotores de la metástasis pueden influenciar el fenotipo troncal tumoral. Para probar esta hipótesis, las CTT de líneas celulares de cáncer de mama fueron enriquecidas y el potencial tumorigénico y de auto renovación en estas células fue validado utilizando diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente se analizó el perfil de expresión de miRNAs maduros mediante qRT-PCR. Uno de los miRNAs sobre-expresados en las CTT fue miR-10b. Este miRNA ha sido reportado como un promotor de la metástasis en cáncer de mama. La inhibición de miR-10b en CTT produjo una disminución en el potencial de auto renovación y en la expresión de marcadores de CTT, mientras que la sobreexpresión ectópica de mir-10b incrementó ambas características. Utilizando un análisis bioinformático, encontramos entre los posibles blancos para miR-10b al homólogo de fosfatasa y tensina (del inglés PTEN), que es un regulador clave de la vía PI3K/AKT involucrada en varios procesos del cáncer. La regulación de PTEN por miR-10b fue confirmada utilizando diferentes ensayos funcionales. De manera importante la inhibición de miR-10b permite un incremento en la expresión de PTEN (mRNA y proteína) que es acompañado de una disminución en la actividad de la vía AKT. El bloqueo de PTEN por siRNA incrementa la expresión de marcadores troncales, mientras que la inhibición farmacológica de la vía AKT compromete varias características de las CTT. En conclusión, miR-10b regula el potencial tumorigénico y de auto renovación de las CTT a través de la inhibición de PTEN y el mantenimiento de la activación de la vía AKT.

2. ABSTRACT.

Tumor self-renewal is dependent on a small population called Cancer Stem Cells (CSC). CSC are resistant to several antitumor treatments and are able to grow new tumors, so it is postulated that CSC is the origin of tumor relapse. On another hand, pro-metastasis genes can function as cancer stem drivers. Accordingly, we propose that miRNAs that function as metastatic promoters may influence the CSC phenotype. To study this, CSC were enriched from two breast cancer cell lines and CSC features were validated by several in vitro and in vivo assays. Then, we compared the expression of miRNAs in CSCs using qRT-PCR analysis. One of the most altered miRNAs was miR-10b, which is a reported promoter of metastasis and migration. Inhibiting miR-10b expression using synthetic antisense RNAs on CSC resulted in a decrease in self-renewal and expression of cancer stem cell markers. Stable overexpression of miR-10b in cell lines promoted higher self-renewal and highest expression of CSC markers. Bioinformatics analyses identified several potential miR-10b mRNA targets, including phosphatase and tensin homolog (PTEN), a key regulator of the PI3K/AKT pathway involved in several cancer processes. The targeting of PTEN by miR-10b was confirmed using functional assays. Importantly, miR-10b depletion not only increased PTEN mRNA and protein expression but also decreased the activity of AKT. Correspondingly, PTEN knockdown increased stem cell markers, whereas AKT inhibitors compromised the self-renewal ability of CSCs and breast cancer cell lines overexpressing miR-10b. In conclusion, miR-10b regulates the self-renewal of the breast CSC phenotype by inhibiting PTEN and maintaining AKT pathway activation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer de mama en México y el Mundo.

El cáncer de mama es la neoplasia maligna en mujeres con mayor incidencia en el mundo y mortalidad en México. GLOBOCAN publicó que en 2015 hubo 1,790,861 casos de cáncer de mama en el mundo, en donde 23,764 pacientes correspondieron a México, con una mortalidad de casi el 30%, lo que sitúa a éste padecimiento como la segunda causa de muerte por enfermedad en nuestro país solo después de las enfermedades cardiovasculares [1, 2].

En México, la mortalidad debido a la enfermedad se ha reducido en los últimos 20 años, debido a que el sistema de salud pública mexicana ha incorporado estrategias en la detección y diagnóstico temprano como las revisiones ginecológicas con una periodicidad frecuente, acompañadas con mastografías. Ésto ha permitido la detección en estadios temprano de la enfermedad, pero al mismo tiempo se ha implementado un mejor abordaje de los tratamientos debido al desarrollo de esquemas de tratamientos personalizados, los cuales se han basado en la clasificación de cinco principales subtipos, definidos por la expresión de receptores celulares como receptor de estrógenos (ER) receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 de factor de crecimiento epidermal (HER2), así como el grado de progresión tumoral 1 o 2. Esta clasificación ha impactado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad [3, 4].

3.2 Reincidencia tumoral.

Uno de los problemas en el tratamiento con mayor relevancia es que en el 23% de las pacientes que reciben un tratamiento con base en quimioterapia y radioterapia, en el tiempo muestran reincidencia en el crecimiento de tumores en alguna zona local o distal; a este proceso se le conoce como recurrencia.

Las células tumorales que forman estos nuevos tumores son altamente resistentes a los tratamientos previos, lo que reduce a un 20% la esperanza de vida a 10 años en las pacientes recidivas [5].

Diferentes factores pueden asociarse a la disminución de la sobrevida de los pacientes con reincidencia, por ejemplo la ausencia o baja expresión de tres receptores hormonales (ER/PR/HER2), un gran tamaño en la masa tumoral, un corto intervalo de tiempo entre el diagnóstico inicial con la aparición de recurrencia local y la evasión de la mastectomía [6].

A nivel celular, la recurrencia puede ser explicada por la heterogeneidad entre las células tumorales producida por diferencias genéticas, epigenéticas, influencia del microambiente y cambios celulares reversibles [7, 8]. Bajo el principio de que es posible explicar que tras la exposición de agentes antineoplásicos algunas células perecen, mientras que otras resisten a los estímulos de muerte.

La heterogeneidad celular indica que las células obedecen a una jerarquía funcional, dentro de la cual cada célula puede tener diferentes capacidades de crecimiento, expresar diferentes marcadores de diferenciación, etcétera. Dentro de esta diversidad celular, existe una población con alto potencial de auto-renovación y una capacidad parcial de diferenciación, a estas células se han denominado células troncales

tumorales (CTT) y más recientemente células iniciadoras tumorales (CIT). Las CTT son más resistentes a los tratamientos convencionales contra el cáncer, como quimio y radio terapia, por lo que se ha propuesto que estas células pueden soportar los esquemas básicos de tratamiento tradicional y posterior a ello cuentan con la capacidad de iniciar un nuevo crecimiento tumoral heterogéneo por lo que se ha propuesto que pueden ser la causa. de la reincidencia tumoral [9].

3.3 Células Troncales Tumorales.

El crecimiento y diferenciación de los órganos adultos está controlado por las células troncales normales (CTN), que pueden auto-renovarse al dividirse de manera simétrica, lo que trae como consecuencia la producción de dos células troncales idénticas lo que asegura el mantenimiento de la poza normal de CTN. Por otro lado, las estirpes celulares más diferenciadas son generadas a través de una división asimétrica, por la cual se conserva una célula troncal hija y simultáneamente se genera una célula progenitora más diferenciada y comprometida a ciertas funciones [10].

En la glándula mamaria adulta es posible distinguir dos principales estirpes celulares: 1) células epiteliales lumbales, capaces de generar estructuras secretoras de la mama como ductos y lóbulos; 2) células mioepiteliales, cuya función contráctil le da forma y sostén a la mama [11, 12]. Las CTT se distinguen de las células troncales adultas por la pérdida en el control en los procesos de auto-renovación y proliferación, este descontrol trae como consecuencia un incremento en la producción de masa celular poco diferenciada, favoreciendo la aparición de estirpes celulares con características de bajo potencial tumorigénico, de invasión, progenitoras e incluso metastásicas [9]. Este modelo pretende explicar el crecimiento y desarrollo tumoral sin dejar a un lado la presión selectiva que ejercen las diferentes mutaciones que surgen durante la carcinogénesis y el

desarrollo tumoral. Las principales características de las CTT son resumidas en la figura 1.

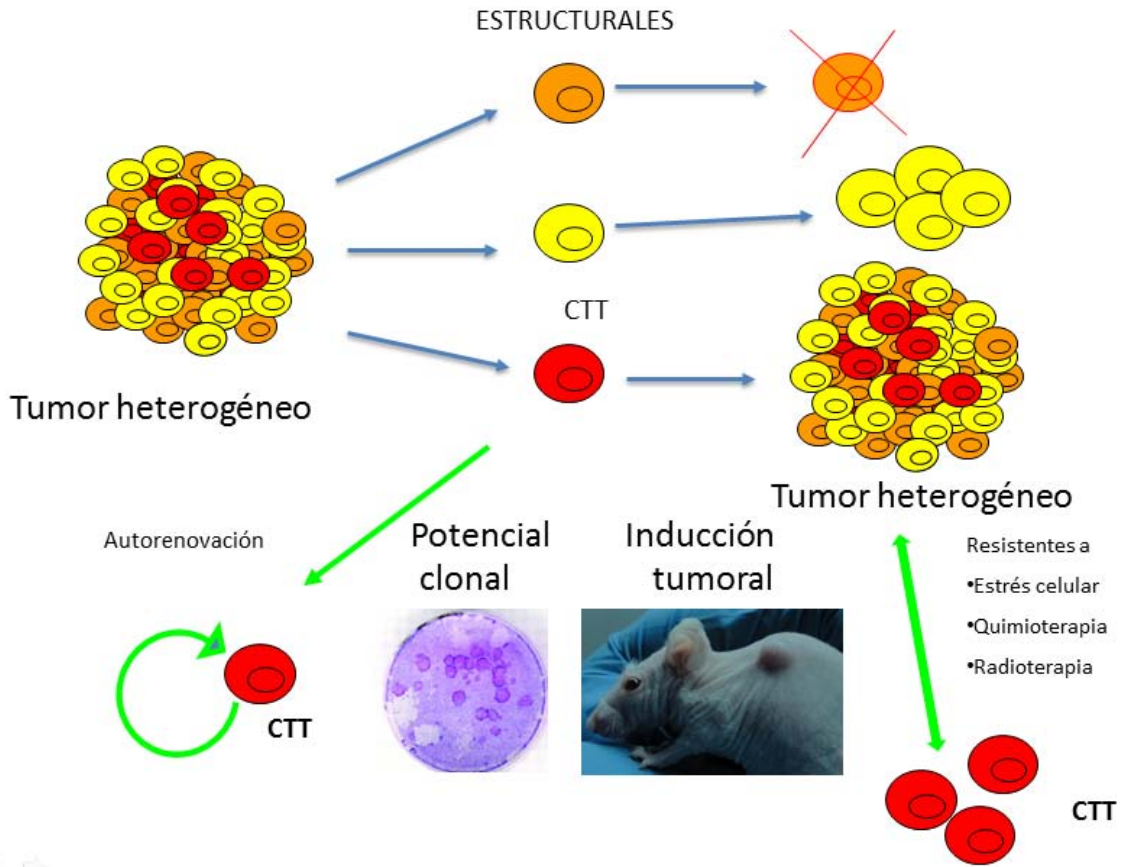


Figura 1. Heterogeneidad tumoral y principales características del fenotipo troncal tumoral. Las células tumorales muestran diferencias morfo-fisiológicas entre sí, este principio establece la heterogeneidad tumoral, dentro de estas diferencias es importante resaltar que solo las CTT tienen capacidad de auto renovación y de dar origen a nuevos tumores heterogéneos. Otras características de las células troncales tumorales son un alto potencial clonal y la resistencia a diferentes estímulos de muerte como el estrés celular, agentes quimioterapéuticos y radioterapia.

Las células troncales tumorales se caracterizan por las siguientes propiedades:

Alto potencial tumorigénico. Uno de los modelos más utilizados en la carcinogénesis es el crecimiento de células tumorales en ratones inmunocomprometidos, para asegurar el correcto crecimiento tumoral las células son inoculadas en dosis de cientos de miles. Sin embargo, el primer reporte que hace referencia a CTT fue presentado en 2003 por Al-Hajj, en él se reporta que 200 células tumorales humanas con fenotipo CD44+/CD24^{-bajo} son suficientes para producir tumores mamarios en ratones NOD/SCID, por el contrario para las poblaciones sin separar son necesarias al menos 50 000 células [13]. Estos resultados han sido demostrados por diferentes grupos de investigación, incluso se ha comprobado que las líneas celulares contienen este tipo de CTT y que 100 células con inmunofenotipo CD44+/CD24^{-bajo}/EpCAM+ son suficientes para la inducción tumoral [14].

El descontrol en la regulación en las CTT puede estar relacionado a la exacerbada activación de vías de auto renovación como Wnt/ β -catenina, Notch, Hedgehog, and TGF- β /BMP, que en conjunto llevan a una incrementada capacidad tumorigénica de las CTT [15].

Expresión de genes de troncalidad. Actualmente se conoce que las células troncales embrionarias y adultas se caracterizan por la expresión de genes como los de los factores de transcripción OCT3/4, SOX2, KLF4, y c-MYC, cuya expresión exógena puede inducir en células diferenciadas como fibroblastos a la pluripotencia (iPSCs) [16]. Este mismo grupo de genes se encuentran sobreactivados en tumores poco diferenciados que se caracterizan a la vez por mal pronóstico y alto contenido de CTTs [17].

La relevancia de la expresión de estos genes en el desarrollo del tumor está apoyada, en que la inhibición por knock out de NANOG o SOX2 es suficiente para bloquear la capacidad tumorigénica en diferentes modelos [18, 19]. Por otro lado, c-MYC

tiene funciones oncogénicas ampliamente descritas. Se estima que c-MYC se encuentra sobre expresado en cerca del 50% de los tumores humanos. En muchos contextos la activación de c-MYC es suficiente para producir tumorigénesis a través de la evasión del arresto proliferativo, de la apoptosis y de la senescencia [20].

Particularmente en la mama adulta humana, se han caracterizado diferentes poblaciones de células con capacidades troncales, siendo el inmunofenotipo $CD44^{\text{alto}}CD24^{\text{bajo}}EpCAM^+$, la población que soporta en mayor medida la diferenciación a todos los linajes de este órgano [21]. Un perfil semejante puede ser utilizado para enriquecer la población de CTT en tumores mamarios descrito como $CD44^{\text{alto}}CD24^{\text{bajo}}EpCAM^+$. Una alta proporción de células con estas características coincide con una mal pronóstico y un perfil pro-metastásico [22]. Sin embargo, muchos grupos de investigación han optimizado la obtención de CTT al utilizar algunos otros marcadores cuando la expresión de CD44 es frecuente o incluso ubicua, por ejemplo en muestras de subtipo basal, entre los marcadores más utilizados están EpCAM, CD133, CXCR4 y PROCR.

Habilidad de formar esferas cuando se siembran en medios condicionados. En condiciones de cultivo ausentes de sustrato sólo las células con capacidad de auto renovación son capaces de proliferar y de formar estructuras 3D, estas células poseen un perfil de expresión relacionado a células progenitoras y troncales, por lo que este ensayo se utiliza para modelar y enriquecer poblaciones de CTT [23]. Las células enriquecidas en estos sistemas frecuentemente presentan la activación de vías de auto renovación como NOTCH, Hedgehog, WNT, P53 y HER2.

Alta resistencia a quimioterapéuticos convencionales y a la radiación. La gran mayoría de las poblaciones troncales de cáncer descritas, normales o tumorales se caracterizan por una incrementada capacidad para expulsar los fármacos desde el citosol

hacia fuera de la membrana celular. Esto impide que los quimioterapéuticos tengan efecto dentro de las CTT y aumenta la disponibilidad para el resto de las células [24]. La exclusión de fármacos por las CTT se explica por la sobreexpresión de casetes transportadores con unión a adenosina (ABC), estos utilizan ATP para expulsar moléculas en contra de gradiente de concentración, algunos de ellos son sustrato-específicos como ABCA3 hacia las antraciclinas, mientras que otros pueden reconocer múltiples blancos como ABCC1, que es capaz de transportar antraciclinas, mitoxantrona, alcaloides de vinca, imatinib, epipodofilotoxinas, camptotecinas, colchicina, saquinivir entre otros [25-27].

Otra vía de detoxificación favorecida en las células troncales es la oxidación irreversible de aldehídos endógenos y exógenos catalizada por enzimas de la súper familia de genes de las Aldehído Deshidrogenasa, formada por 19 proteínas conocidas, La incrementada actividad enzimática de las proteínas de esta familia caracteriza a las poblaciones progenitoras y troncales normales y tumorales en diferentes tejidos [28, 29].

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) mejor conocidas como ROS (por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*), son producto de diferentes procesos fisiológico-celulares. La acumulación de estas especies está relacionada con el envejecimiento y daño al DNA. Las células troncales y progenitoras mantienen un estricto control de los niveles de EROs a través de una sobre regulación en el control antioxidante y del metabolismo de glutatión, esta característica se mantiene en las células troncales tumorales y puede contribuir a la resistencia a fármacos y a la radiación, ya que estos sistemas funcionan a través de la inducción de EROs que pueden producir muerte celular. Sumado al mecanismo de eliminación de EROs se ha demostrado que la maquinaria de diferentes sistemas de reparación de DNA y de la vía de P53 se encuentra

incrementada en poblaciones troncales, comparada contra el resto de las células del mismo tejido [30, 31].

3.4 La relación entre CTT y metástasis.

La metástasis es un proceso complejo que requiere la diseminación de células tumorales. Las células metastásicas deben resistir largos periodos de estrés, tanto al invadir el sistema circulatorio, como al invadir microambientes extraños. Por otro lado, para consolidar el crecimiento tumoral, es necesario que mantengan la capacidad de autorenovación, estas características señalan una relación entre las células iniciadoras de la metástasis y las CTT [32].

Sumado a esto, se ha observado que las células tumorales diseminadas en médula ósea poseen un fenotipo troncal tumoral [33]. Mientras que los marcadores más comunes para la identificación de CTT, como CD44 y ALDH, han sido ampliamente relacionados con un incremento en el potencial metastásico [34, 35].

Estudios de expresión génica global señala que las CTT de mama poseen una firma génica que correlaciona con un incremento en la capacidad metastásica y un mal pronóstico de supervivencia [36]. Entre los genes descritos se encuentran diferentes promotores de la TEM como vimentina, snail y twist. Estos datos se apoyan en el hecho de que la sobreexpresión de promotores metastásicos como RhoC incrementa directamente la proporción de células positivas a ALDH [37].

Regulación de la expresión génica y fenotipos celulares.

En todas las células las características fenotípicas son resultado de un control preciso de la regulación en la expresión génica, es decir los fenotipos celulares se controlan en un primer nivel por la selección de genes activos y la cantidad de cada transcrito producido en un momento y espacio específico. Por otro lado, un segundo nivel de control depende de la tasa de traducción de estos mensajeros a proteínas y de las modificaciones postraduccionales de estas proteínas que pueden definir su función y vida media, todos estos mecanismos cooperan para producir diferencias entre cada célula [38].

La expresión génica es controlada principalmente en dos niveles: el primero depende de la disponibilidad espacial de las secuencias de DNA y es regulado por la estructura de la cromatina; el segundo depende de la expresión y activación de los Factores de Transcripción específicos para cada gen o grupo de genes.

Estructura de la cromatina.

Dentro de una célula, el DNA permanece arreglado en una topología tridimensional y se encuentra enrollado en proteínas de tipo histonas, en un arreglo conocido como cromatina. La estructura de la cromatina regula la accesibilidad de los factores de transcripción a las secuencias de DNA blanco. Las histonas que interactúan con el ADN sufren diferentes modificaciones post-transcripcionales, por ejemplo, la acetilación de histonas produce pérdida de unión histona-histona, produciendo una cromatina laxa que es permisible a la transcripción, mientras que la metilación de histonas puede incrementar o disminuir la acetilación. El balance entre estas y otras modificaciones postraduccionales en las histonas puede controlar la tasa de transcripción de regiones génicas [39].

Los factores de transcripción (FT).

Son proteínas con dominios de unión a DNA, estos pueden activar o inhibir la transcripción del DNA, generalmente reconocen secuencias con una afinidad de 10^6 veces mayor que el resto del DNA, estas secuencias o dominios de unión pueden utilizarse para clasificar a los FT en familias, por ejemplo las proteínas contenedoras de cajas MADS, SOX y POU [40]. Los dominios de unión a FT se localizan en la vecindad de los promotores de cada gen, la unión de un factor de transcripción puede estabilizar o reprimir la unión y la polimerización mediada por la RNA polimerasa II, encargada de la transcripción de RNA de tipo mensajero, mientras que en ausencia de FT la RNA pol II no puede unirse a las secuencias promotoras [41].

Metilación del ADN.

El ADN de las células puede sufrir modificaciones químicas en regiones específicas, una de las más caracterizadas es la metilación en los residuos de citosina, existen evidencias que indican que esta modificación es frecuentemente variable en regiones cercanas a los promotores, y estas diferencias correlación con diferencias de expresión entre distintos fenotipos celulares, la metilación del ADN puede evitar la interacción de FT con su dominio de unión y favorecer la compactación de la cromatina, lo cual influye directamente en la tasa de expresión génica de los locus metilados [42].

Los microRNAs como reguladores pos-transcripcionales de la expresión génica.

Diferentes estudios utilizan los niveles de expresión de mRNA como evidencia de cambio en los niveles de proteína, incluso como evidencia de su actividad. Sin embargo, existen una variedad de mecanismos que pueden modificar la cantidad de proteína que se produce por cada gen transcripcionalmente activo, entre ellas podemos mencionar elementos en *Cis* que controlan la estructura tridimensional del RNA y la interacción del mRNA con la maquinaria de traducción; por otro lado, elementos en *Trans* pueden controlar la tasa de traducción, entre ellos se encuentran proteínas promotoras de la traducción y ARNs reguladores [43].

Particularmente, algunos RNAs de tamaño pequeño, pueden regular la expresión de genes codificantes, básicamente un complejo multi-proteínico llamado complejo del silenciamiento inducido por RNA (RISC) incorpora estos RNAs y los utiliza para reconocer otros RNAs blanco por apareamiento de pares de bases Watson y Crick. El complejo puede después degradar los RNA blancos o reprimir la traducción de los RNA reconocidos. Este mecanismo fue descrito por primera vez en *C. elegans* y se le dio el nombre de RNA de interferencia [44].

Los tres principales grupos de RNAi son los siRNA (por las siglas en inglés de *small interfering RNA*), piRNA (*Piwi-interacting RNA*) y miRNA (*micro RNA*). Los siRNA son RNAs de 18 a 24 nucleótidos que reconocen sus blancos por un apareamiento completo siRNA-mRNA y generalmente dirigen la degradación de esos mRNA por endonucleasas. Los piRNAs son RNA de hasta 35 nucleótidos, estos interactúan con la proteína PIWI dentro de una variante de RISC, reconocen y silencian principalmente RNA de elementos de transposición. Los miRNAs miden entre 18-25 nucleótidos, particularmente los blancos de los miRNAs en metazoarios son reconocidos por un

apareamiento parcial, por lo que un miRNA puede reconocer múltiples blancos generalmente relacionados entre sí con un fenotipo o función [45].

Biogénesis de miRNAs.

Los miRNAs pueden ser transcritos desde genes individuales con un promotor propio, o pueden estar contenidos dentro de intrones que son liberados por el splicing de mRNAs codificantes (miRtrones), generalmente son transcritos por RNA polimerasas de tipo II, por lo que se sabe son productos génicos regulables por promotores específicos.

Los transcritos primarios a partir de los cuales se genera un miRNA se denomina pri-miRNA, este transcrito es madurado al igual que los RNA codificantes, es decir contiene un capuchón de 7-metil-guanosina en el extremo 5', una cola de poli-A en el extremo 3', y en ocasiones poseen intrones. Estos pri-miRNAs y los miRtrones forman estructuras de doble cadena de tipo horquilla que pueden ser reconocidas por la proteína DGCR8, esta se encuentra unida a la ribonucleasa DROSHA, que produce RNAs más pequeños (70 nt) aproximadamente denominados precursores de miRNAs (pre-miRNAs) [45, 46], las nuevas estructuras son enviadas al citoplasma celular por proteínas transportadoras de tipo exportina (5/6) [47].

Una vez en el citoplasma los pre-miRNAs son reconocidos por un complejo transactivation-responsive RNA-binding protein 2 (TARBP2)/AGO2/DICER1, la ribonucleasa DICER ahora produce un último RNA de doble cadena con ambos extremos sobresalientes, que contiene las estructuras miRNA-miRNA* [48]. Por último, el complejo inductor del silenciamiento mediado por RNA (RISC) separa el dúplex miRNA-miRNA*, cualquiera de las hebras libres puede ser cargada en este complejo y será utilizado como guía de en el reconocimiento de mRNAs que serán silenciados por diferentes

mecanismos, la hebra restante puede ser cargada o degradada por otro complejo RISC [49]. Estos mecanismos se resumen en la figura 2.

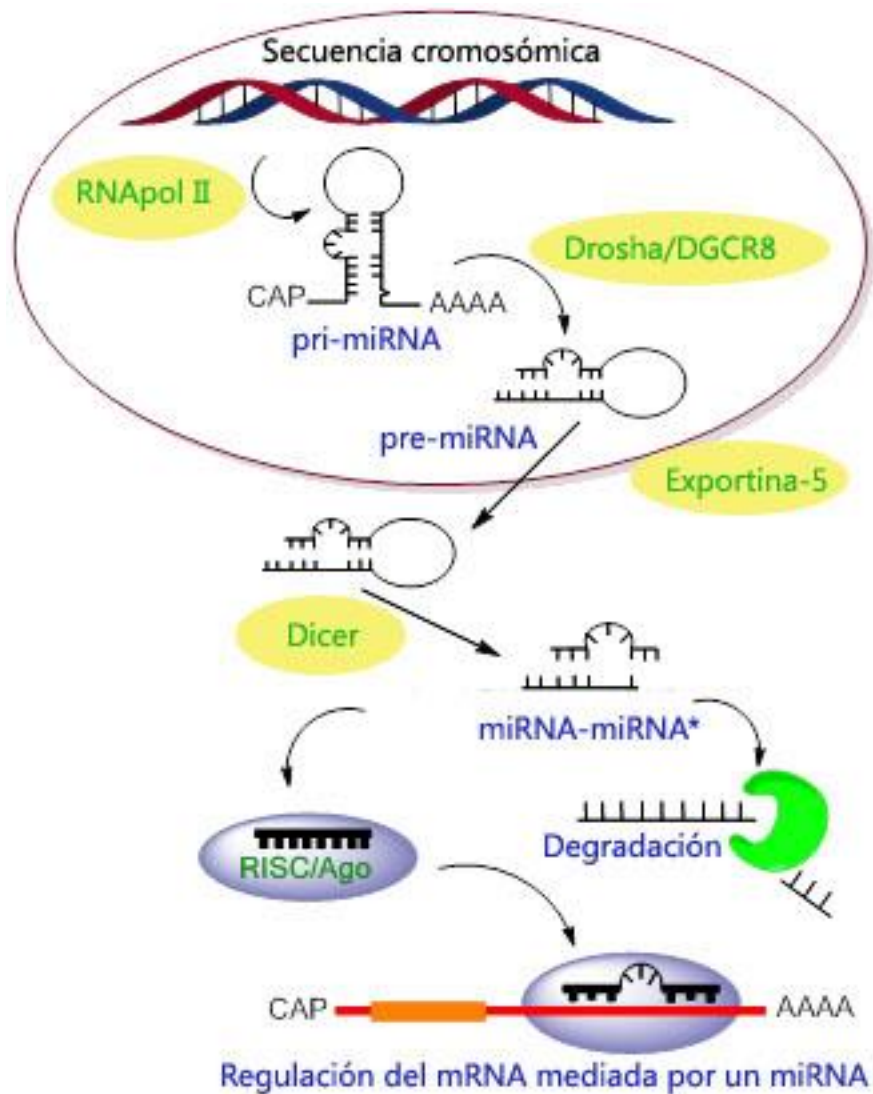


Figura 2. Biogénesis de los microRNA. Los microRNAs son transcritos como unidades individuales en pri-microRNA. Esta estructura se fragmenta mediante el complejo Drosha, a continuación se genera al precursor del microRNA (pre-microARN) el cual es exportado desde el núcleo al citoplasma mediante la exportina 5. Esta molécula recibe un segundo corte realizado por Dicer formando así al microARN maduro. Esta estructura se une al complejo RISC/Ago y de esta manera el microARN es capaz de reprimir la expresión.

Mecanismos de silenciamiento dirigidos por miRNAs.

Una vez que los miRNAs maduros son cargados en el complejo RISC pueden controlar la expresión de genes en un nivel postranscripcional. La hebra cargada es utilizada como molde para el reconocimiento de RNAs mensajeros por apareamiento de pares de bases, aun cuando un miRNA es pequeño, no es necesario un apareamiento completo entre miRNA y mRNA (excepto en vegetales), se sabe que las bases 2-8 en un sentido 5' del miRNA pueden ser suficientes para el reconocimiento de un mRNA blanco, esta secuencia se denomina semilla (seed sequence), pero en ocasiones el reconocimiento puede ser incluso por un apareamiento total [30, 45].

La secuencia de reconocimiento en el mRNA se denomina Elemento de reconocimiento de mRNA (MRE). Los MRE se sitúan generalmente en la región 3' no traducible (3'UTR), pero en excepciones existen en otras regiones del mRNA como 5' UTR y el marco de lectura abierto [50].

Es importante señalar que los miRNA sólo reconocen como blancos a ciertos mRNAs, sin embargo, las funciones catalíticas que regulan la traducción son realizadas por las proteínas del complejo miRISC, entre las principales proteínas del complejo encontramos a la familia de las proteínas Argonauta y las GW182.

Las proteínas de la familia Argonauta interactúan con los miRNAs a través de tres dominios: PAZ, MID y PIWI, que a la vez reconocen los fragmentos 5' terminal, la porción central y el 3' terminal del miRNA. En metazoarios se han identificado cuatro proteínas de esta familia denominadas AGO1 al AGO4, todas participan en mecanismos de silenciamiento, sin embargo, solo AGO2 posee función de endonucleasa, por lo que generalmente es parte del complejo RISC de los RNAi [51, 52].

Otro grupo de componentes de RISC es la familia GW182 (conocidas como TNRC6A, B, C). Este complejo funciona como puente de interacción entre las proteínas AGO y los reguladores río debajo de la vía, la unión de GW182 a un RNA induce el bloqueo de la traducción y/o la inestabilidad y degradación de éste [53, 54]

Los mecanismos de silenciamiento dirigidos por miRNAs son muy diversos, pero pueden dividirse en tres principales niveles: 1) inhibición de la traducción 2) inducción de la inestabilidad de los mRNAs 3) Captura o degradación del mensajero en los cuerpos P.

El primer mecanismo de acción de los miRNAs descrito fue la inhibición de la traducción, sin la degradación del mRNA [45], en este mecanismo las proteínas AGO2 (y tal vez AGO1, 3, 4) reconocen y bloquean la función de factores de inicio de la traducción o el cap de 7-metil guanosina [45, 55]. Un segundo mecanismo propuesto es la represión de la formación del complejo ribosomal por la captura de la subunidad 40S [56].

En el caso de la inducción de la inestabilidad de los mRNAs, cada blanco reconocido por el complejo RISC puede perder la cola poliadenilada, debido a la interacción y secuestro de PABP por GW182 o con otras proteínas accesorias de RISC como PAN2-PAN3; en ambos casos el mRNA puede ser desadenilado por la acción de CCR4-NOT [57, 58]. Posterior a la desadenilación, los mRNA blancos pierden estabilidad y pueden ser capturados por el complejo DCP1–DCP2 y degradados por la exonucleasa 5'-3' XRN1 [59]

Por último, algunos blancos reconocidos son trasladados a los cuerpos P, mediante las proteínas GW182, donde los mRNAs son almacenados para posteriormente ser traducidos, silenciados o desestabilizados por los mecanismos ya mencionados [60].

Los microRNAs en el control de procesos fisiológicos y patológicos.

A la fecha se han identificado 2865 miRNAs maduros en el genoma humano. Se estima que éstos tienen la capacidad para controlar al menos 60% del transcriptoma humano. Diferentes trabajos proponen a algunos miRNAs como reguladores maestros de diferentes procesos celulares, dado que un solo miRNA puede reconocer a múltiples blancos, muchos de ellos están relacionados con procesos celulares específicos. Por ejemplo, mir-145 ha sido descrito como regulador de pluripotencia, ya que reconoce como blancos directos tres de los factores de Yamanaka OCT4, SOX2 y KLF4. La expresión de miR-145 en células troncales embrionarias favorece la diferenciación, mientras que su pérdida puede promover el estado troncal [61].

Por otro lado, los miRNAs pueden formar circuitos de regulación al interactuar con otros reguladores de la expresión génica como los FT. Si un factor de transcripción reprime genes con funciones semejantes a los blancos del miRNA que activa, podríamos hablar de un circuito de alimentación positiva coherente que produce una represión coordinada de un conjunto de genes relacionados. En el caso opuesto, un factor de transcripción podría activar un miRNA y a genes blanco de este último, en este caso se hablaría de una alimentación positiva incoherente.

MicroRNAs en cáncer Onco-miRs, Supresor-miR y metasta-miRs.

Desde el descubrimiento de los miRNAs se han acumulado diferentes evidencias de la participación de los miRNAs en el surgimiento, desarrollo y progresión del cáncer. Es importante mencionar que la función de un miRNA dependerá de los blancos que sea capaz de silenciar, en ese sentido, cuando un miRNA es capaz de regular genes supresores de tumor recibe el nombre de *onco-miR*, y su expresión favorecerá el desarrollo tumoral, varios locus de estos miRNAs se han encontrado amplificados en diferentes tipos de tumores, lo que favorece su sobre regulación en cáncer y por lo tanto, la inhibición de genes supresores de tumor [62].

En contraparte los miRNAs que reconocen y silencian oncogenes se les denomina miR-supresor tumoral, es importante señalar que muchos de estos miRNAs se encuentran localizados en sitios frágiles que pueden perderse por la inestabilidad genética en el cáncer, produciendo una baja o nula expresión de estos miRNAs y la sobreexpresión de los oncogenes blanco [63].

Otro grupo de miRNAs relacionados con la progresión del cáncer son *metasta-miR* está formado por todos aquellos que pueden tener una función promotora (*prometasta-miR*) o antagónica (*antimetasta-miR*) de la metástasis en cualquiera de los procesos que conllevan a la cascada metastásica como son la transición epitelio mesénquima (TEM), evasión de la apoptosis y promoción de la angiogénesis [64].

Algunos ejemplos de miRNAs reguladores de procesos involucrados en cáncer son listados en la tabla 1.

Tabla 1. miRNAs relacionados a la progresión del cáncer.

OncomiRs y Supresor-miRs identificados en cáncer de mama.			
miRNA	Blancos conocidos	Función	Referencia
OncomiRs			
miR-10b	HOXD10, RHOC	Promoción de la proliferación, metástasis y angiogénesis	[65, 66]
miR-21	PDCD4, HIF1A, TPM1, PTEN, TPM3, Maspin, NCAPG, OXR1, SERPINB5, SEC23A, Bcl2	Promoción de la proliferación celular	[67-70]
miR-27a/96	ST14, ZBTB10, Myt1, FOXO1	Promoción de la viabilidad y ciclo celular	[71]
miR-106a/b	AIB1, pRb, p21, BRMS1, RB1	Promoción de invasión y metastasis	[72, 73]
miR-155	RHOA, SOX1, TP53INP1, FOXO3	Promoción de la proliferación celular	[74-77]
miR-221/222	P27, ER α , P57	Promoción de la metástasis	[78, 79]
miR-373/520c	CD44	Promoción de la metástasis	[80]
Supresor-miRs			
Familia Let-7	H-RAS, HMGA2, Lin-28, IL-6	Prevención de la proliferación celular y formación de mamoesferas.	[50, 55, 81, 82]
miR-20a/b	HIF-1 α	Prevención de la angiogénesis y metástasis	[83]
miR-17-5	AIB1	Prevención del crecimiento celular y metástasis	[84]
miR-31	RhoA, WAVE3, RDX, ITGA5, Fzd3, M-RIP, MMP16	Decrecimiento de invasión y metástasis	[85]
miR-34	CCND1, CDK6, E2F3, MYC, Bcl-2, Notch	Prevención de la migración, invasión y metástasis .	[86-89]
miR-125a/b	EPO, EPOR, ENPEP, CK2- α , CCNJ, MEGF-9, ERBB-2/3, HuR, CRAF, MUC1, BAK, RTKN, CYP24, ER α , ELAVL1, BMPR1B, ETS1, MEGF9	Prevención de la proliferación celular e invasión.	[90-93]
miR-126	VEGF, IRS-1, CrK, IGFBP2, MERTK, PTPN13	Prevención del crecimiento celular, angiogénesis y metástasis	[94, 95]
miR-145	PTKN, ER α , MUC1	Prevención de la proliferación celular e invasión.	[96]
miR-146a/b	NF- κ B, STAT3	Represión de la expresión de factores de crecimiento celular	[97, 98]
miR-200 family	ZEB1/2, SNAI1/2	Decremento de TEM y metástasis	[99-101]
miR-205	ERBB3, VEGF-A, E2F1, LAMC1, ZEB1/2, HMGB3	Decremento en proliferación celular, angiogénesis y metástasis .	[102-105]
miR-206	Cyclin D1/D2, Cx43, ER α , SRC-1/2, GATA3, notch3	Represión de ciclo celular y proliferación.	[106-109]

JUSTIFICACIÓN.

Se desconocen la mayoría de las moléculas responsables del mantenimiento de las capacidades iniciadoras tumorales. Se ha descrito que estas CTT expresan factores de transcripción relacionados a TEM y pluripotencia [110], que podrían ser clave en este fenotipo. De manera similar, algunos reguladores de metástasis han sido reportados como importantes contribuyentes del fenotipo CTT. Por ejemplo, la sobreexpresión artificial de RhoC incrementa la proporción de células positivas a ALDH1 [37]. En este sentido otros reguladores maestros de metástasis podrían ser capaces de mantener el fenotipo CTT. En particular diferentes metasta-miRs han sido descritos como reguladores centrales de la invasión tumoral y metástasis, por lo que es importante analizar su posible participación en este fenotipo [64].

HIPÓTESIS:

Con base a lo anterior, propongo la siguiente hipótesis:

Metasta-miRs específicos contribuyen a mantener el fenotipo troncal de las células de cáncer mamario.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Este trabajo pretende identificar los metasta-miRs reguladores de las capacidades iniciadoras tumorales, así como validar su participación en estos procesos mediante ensayos funcionales, utilizando como modelo líneas celulares de cáncer de mama.

Objetivos particulares.

1. Identificar la población troncal tumoral y comparar sus capacidades de clonogenicidad, tumorigenicidad y auto renovación respecto a la línea celular completa.
2. Identificar miRNAs candidatos de la regulación del fenotipo CTT a través de un perfil de expresión de baja densidad.
3. Identificar metasta-miRs en estos miRNAs candidatos.
4. Validar la capacidad de al menos un metasta-miR para controlar el fenotipo CTT, utilizando ensayos de pérdida y ganancia de función.
5. Identificar los posibles blancos de este metasta-miR y validar los blancos de mayor interés.
6. Explorar los efectos de la modulación de al menos un mRNA blanco en la regulación del fenotipo CTT y de las vías de transducción involucradas en tal regulación.

METODOLOGÍA.

Cultivo celular.

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en la colección de la ATCC (American Type Culture Collection, EE. UU.). Todas las células fueron propagadas en cultivo en monocapa utilizando medio DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) (V/V, GIBCO, Bethesda, EE. UU.) para MCF-7, MDA MB 231 y T47-D, y medio McCoy (V/V, GIBCO, Bethesda, EE. UU.) para la línea celular SKBR-3. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal de bovino Fetal (SBF) al 5% (V/V, GIBCO, Bethesda, EE. U.) e incubadas a 37°C en un atmósfera húmeda con 5% CO₂ (V/V). Para los ensayos de cultivo 3D o de esferoides las células fueron sembradas sobre placas de cultivo recubiertas con agarosa 1% en PBS para mantener a las células en suspensión.

Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo con el reactivo Trizol (Life Sciences, Bethesda, EE. UU.) a partir de 1×10^6 de células cultivadas, de acuerdo al proveedor. Para fracciones de células enriquecidas por citometría de flujo o por separaciones magnéticas 1.5×10^5 células fueron lisadas en 350 µl de Trizol, una vez obtenida la fase acuosa el RNA total fue precipitado utilizando GlycoBlue (Applied Biosystems, EE. UU.), acetato de amonio y etanol, de acuerdo a las instrucciones del proveedor, cada muestra de RNA fue analizada en Nanodrop para obtener la concentración y la pureza del RNA con la relación 260 nm/280 nm. Se estableció su integridad en geles de agarosa como se ha descrito previamente [111].

Síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

El análisis por RT-PCR fue realizado por las variantes siguientes:

Para el análisis de expresión de RNA mensajeros. La síntesis del cDNA se realizó a partir de 500 ng de RNA total utilizando hexámeros al azar y la Transcriptasa Reversa MMLV de acuerdo a las instrucciones del fabricante de High Capacity cDNA Transcription kit (Applied Biosystems, EE. UU.). Las reacciones de PCR a punto final fueron desarrolladas en 25 µl de volumen y utilizando la polimerasa Amplitaq Gold y sus respectivas instrucciones (Applied Biosystems, EE. UU.), los productos de cada amplificación fueron resueltos en geles de agarosa (Applied Biosystems, EE. UU.). Para las reacciones en tiempo real, se utilizaron volúmenes finales de 20 µl de reacción y las mezclas maestras MAXIMA SYBR GREEN (Thermo-Fisher, EE. UU.) para oligos sin marcaje y MAXIMA PROBE (Thermo-Fisher, EE. UU.) para las mezclas comerciales de oligos y sondas TAQMAN, las reacciones fueron desarrolladas en los equipos VIA7 y QUANTUM (Applied Biosystems, EE. UU.).

Para el análisis de expresión de miRNA y RNA RiboNucleares. La síntesis de cDNA se realizó partiendo de 100 ng de RNA total, cada RNA pequeño fue retrotranscrito utilizando oligonucleótidos en asa específicos y Transcriptasa Reversa MMLV de acuerdo a las instrucciones del fabricante de microRNA cDNA Transcription kit (Applied Biosystems, Ca, EE. UU.). Para el análisis de expresión por PCR en tiempo Real se utilizaron sondas Taqman (Applied Biosystems, Ca, EE. UU.) en presentación de Arreglo de baja densidad (TaqMan Low Density Assay) o en presentaciones individuales.

Citometría de flujo y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Para ambas metodologías las células fueron propagadas en cultivo en monocapa, y disgregadas utilizando accutasa (BD Biosciences), posterior a ello las células fueron mantenidas en solución balanceada de Hanks con EDTA 0.1 mM y 0.5% albumina de suero de bovino. Para el inmuno-marcaje en fresco, las células fueron incubadas en soluciones con anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los porcentajes de células positivas a cada antígeno fueron determinados por separado y en triples marcajes utilizando el equipo FACS Aria (Applied Biosystems, EE. UU.) y el software de análisis FACS Diva (Applied Biosystems, EE. UU.), las poblaciones de interés fueron seleccionadas con la función de clasificador (sorter) partiendo de 1×10^7 células, utilizando un flujo de solución balanceada de Hanks y recuperadas en la misma solución suplementada con suero fetal bovino al 5%. La pureza de las poblaciones fue determinada después de los primeros 5 minutos de clasificación.

MACS (clasificación celular activada por magnetos).

Las células fueron propagadas en cultivo en monocapa, y disgregadas utilizando accutasa (BD Biosciences), posterior a ello las células fueron mantenidas en solución balanceada de fosfatos con EDTA 0.1 mM y 0.5% albúmina de suero de bovino. Para el inmuno-marcaje en fresco, las células fueron incubadas en soluciones con anticuerpos primarios acoplados a partículas para magnéticas durante 20 minutos a cuatro grados y posteriormente separadas utilizando el sistema miniMACS y las columnas MS (Miltenyi, Alemania). La pureza del enriquecimiento fue determinada utilizando citometría de flujo.

Formación de colonias en agar suave.

Los ensayos de formación de colonias en agar suave fueron desarrollados de acuerdo a lo publicado por Borowicz. y colaboradores [112]. Brevemente, las células fueron disgregadas utilizando accutase (BD Biosciences, EE. UU.) y sembradas a densidad clonal en una matriz semisólida de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en un medio DMEM (V/V, GIBCO, EE. UU.) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) al 5% (V/V, GIBCO, , EE. UU.), previamente las cajas de cultivo fueron preparadas con una matriz inferior de agar al 1% suplementado con las mismas condiciones, las células fueron incubadas a 37°C en un atmósfera húmeda con 5% CO₂ (V/V).

Ensayo de formación de mamoesferas.

Los ensayos fueron realizados de acuerdo al protocolo propuesto por Dontu [23], brevemente, las células fueron disgregadas hasta obtener células individuales utilizando accutase, posteriormente contadas y sembradas a densidad de 2000 células por ml de DMEM: F12 (1:1), libre de suero y suplementado con B27 (invitrogen, EE. UU.), 20 ng/mL EGF rh.

Ensayos de cicatrización de herida.

5x10⁵ células de cada línea se sembraron en cajas de 35 cm de diámetro. 24 horas después se realizó una rasgadura en línea recta utilizando una punta de micropipeta de 200 µl que señaló el diámetro de cada caja, se lavó con PBS 1X y se incubó por 48 horas con medio de cultivo al 5% de SBF. Se contaron todas las células que invadieron la línea en cada condición, después de 24 y 48 horas.

Ensayos de tumorigénesis en ratones nu/nu.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a los procedimientos de operación estándar, aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Autónoma Metropolitana, México. Los ratones Nu/Nu fueron comprados y mantenidos en la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL-UAM, México). Las células cancerosas fueron inyectadas por vía intradérmica en la espalda de los ratones a diferentes dosis (10 000, 50 000, 100 000 y 200 000 células), utilizando como vehículo una mezcla 1:1 de PBS y matrigel reducido en factores de crecimiento (BD, Bioscience, EE. UU.). Los resultados de los ensayos de tumorigénesis fueron utilizados para calcular la abundancia de CTT en las líneas celulares utilizando el programa ELDA de acuerdo con las instrucciones de los autores Hu y Smith [113]

Sobre expresión de microRNAs e Inhibición de miRNAs por AntimiRs en líneas celulares.

Las secuencias de pre-miR-10b en doble cadena fue sintetizada por IDTX y clonada en el vector BLOCK-IT Pol II miR-RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen, EE. UU.). La construcción miRNA-10b y la construcción control sin blancos (Scrambled) fueron transfectadas utilizando Lipofectamina-2000 (Invitrogen, EE. UU.) y las células con sobreexpresión estable fueron obtenidas después de dos rondas de selección con blasticidina 5 mg/ml (Invitrogen. EE. UU.). Para la inhibición de miRNAs, las células fueron sembradas a confluencia de 80% y posteriormente transfectadas con RNAs sintéticos (AntimiRs, Life Technologies, EE. UU.) utilizando lipofectamina 2000 durante 4 horas, 24 horas después del experimento las células fueron analizadas.

Ensayos de genes reporteros para la identificación de elementos de respuesta a miRNAs.

Las secuencias de los MRE en los mRNA de los genes PTEN, PIK3CA, y HOXD10 fueron sintetizadas dentro de secuencias de 50 nucleótidos y posteriormente insertadas entre los sitios de restricción SpeI y HindIII del vector pMIR-Report (Ambion, EE. UU.). 20 000 células MCF-7, SKBR-3 o T-47D fueron transfectadas con los vectores de expresión de expresión de miR-10b o miR-Scrambled (100 ng por pozo) o con los antimiR, 24 horas después estas células fueron co-transfectadas con las construcciones en pMIR-Reporto (50 ng por pozo) y los vectores pLR-SV40 renilla luciferasa (10 ng por pozo) utilizando el agente Escort (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Los lisados celulares fueron preparados utilizando el amortiguador de lisis pasivo (Promega, EE. UU.) 48 horas después de la segunda transfección y la actividad de las luciferasas fue determinada utilizando el Ensayo Reportero Dual Luciferasa (Promega, EE. UU.).

Extracción de proteínas totales y Western blot.

Para este trabajo, se utilizaron proteínas totales, los extractos fueron obtenidos por lisis de al menos 1.5×10^5 células (para fracciones enriquecidas) y hasta 5×10^5 células (para líneas estables) utilizando el amortiguador RIPA (Amortiguador de radio inmunoprecipitado) y los inhibidores de proteasas y fosfatasas (Santa Cruz Biotechnology). Las proteínas se cuantificaron utilizando un micro-método de Bradford. 10-50 μg de proteína, se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y fueron transferidas a membranas de PVDF. Se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes. El anticuerpo unido se detectó utilizando quimioluminiscencia mediante el sistema INMOBILON WESTERN CHEMILUM HRP SUBSTRATE (Millipore, EE. UU.).

Análisis densitométrico.

Las densitometrías mostradas se obtuvieron a través del análisis de las bandas de los geles de agarosa y poliacrilamida con el software ImageJ (NIH, MI, EEUU). Los valores obtenidos se muestran como unidades densitométricas arbitrarias.

Ensayo de actividad de cinasa.

Las células MCF-7, fueron sembradas a 60% de confluencia y se retiró el SFB del medio de cultivo por 18 horas, posteriormente se indujo la activación de la vía PI3K/AKT adicionando 10 µg/ml de insulina por 20 minutos. El efecto de la inducción fue comparado contra condiciones normales de cultivo (suero) y contra células en inanición sin estímulo de insulina. Posterior al tratamiento las células fueron lisadas utilizando el amortiguador de lisis celular (Cell Signaling, Inc), las proteínas totales nativas fueron cuantificadas, 200 µg de proteína fueron incubados toda la noche con fosfo-AKT(S473) acoplado a sefarosa (Cell Signaling, EE. UU.), después de tres lavados, se realizó la reacción de fosforilación *in vitro* se realizó en presencia de 200 µM de ATP frío y 1 µg GSK como sustrato (Cell Signaling, EE. UU.). La fosforilación de GSK-3 fue después cuantificada por Western blot utilizando el anticuerpo fosfo-GSK-3α/β (S21/9) (Cell Signalling, EE. UU.).

Resultados:

Determinación de inmunofenotipos tumorales por citometría de flujo y aislamiento de fracciones enriquecidas por clasificación activada por magnetismo.

Con el objetivo de representar diferentes subtipos de cáncer de mama, se seleccionaron cinco líneas celulares con las características descritas en la Tabla 2. Estas fueron cultivadas bajo las condiciones estándar del laboratorio y utilizando los medios y suplementos de acuerdo a lo mencionado en la metodología.

Utilizando citometría de flujo fue determinada la proporción de células con fenotipo CD44⁺/EpCAM⁺/CD24^{-bajo} de acuerdo a lo reportado previamente por otros autores [13]. La proporción de células con inmunofenotipo troncal tumoral es presentada en la Figura 3, estos datos están en concordancia con lo reportado por otros grupos [110]

Con la finalidad de comparar la expresión de miRNAs en células troncales tumorales con respecto a la población tumoral total, dos líneas celulares de cáncer de mama fueron seleccionadas para representar los dos subtipos de célula epitelial en la mama.

Tabla 2. Características presentes en algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Línea celular	Subtipo	ER	PR	HER2/ERBB2	Origen	Tipo de tumor
MCF7	Luminal	+	+	-	Efusión pleural	Adenocarcinoma metastásico
MDA MB 231	Basal B	-	-	-	Efusión pleural	Adenocarcinoma metastásico
SKBR3	Luminal	-	-	+	Efusión pleural	Adenocarcinoma
T47-D	Luminal	+	+	-	Efusión pleural	Carcinoma ductal invasivo
MDA-MB-468	Basal	-	-	-		

Modificado de Tao, et al. 2009 [114].

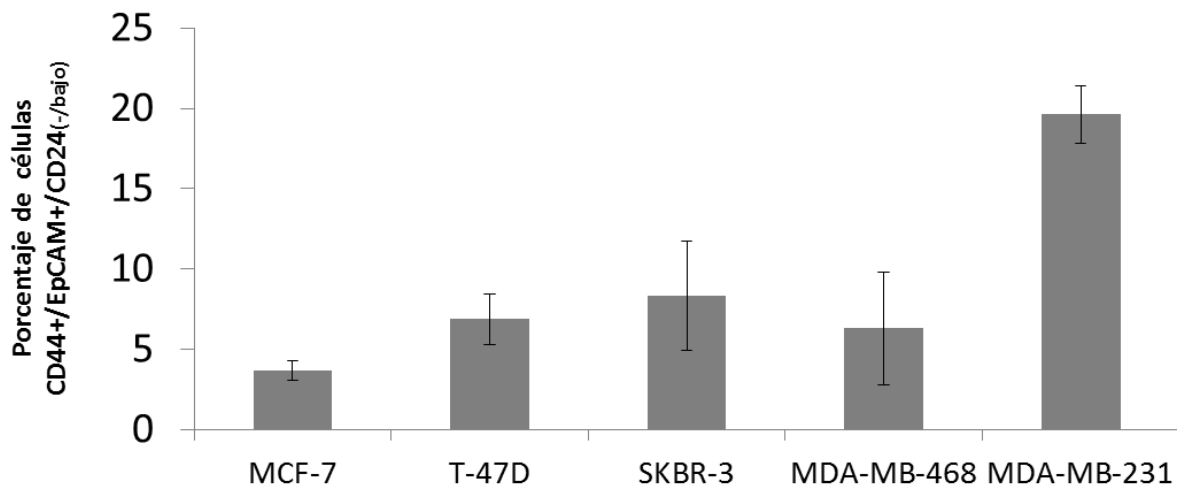


Figura 3. Porcentaje de células con inmunofenotipo CD44+/EpCAM+/CD24bajo o nulo en cinco líneas celulares utilizadas.

Los tumores luminales fueron representados por la línea celular MCF-7, es importante mencionar que en estas células, la expresión de EpCAM es ubicua mientras que la subpoblación CD44+ expresa bajos niveles de CD24, pero en general carece de una subpoblación CD24-.

Por otro lado, los subtipos basales serán representados por la línea celular MDA-MB-231, en esta línea CD44 se expresa prácticamente en el 100%, mientras que la subpoblación EpCAM+ (~19%) es carente o baja en cuanto a la expresión de CD24.

De acuerdo a estos resultados, se determinó que el enriquecimiento de CTT puede realizarse en estas dos líneas a partir de la clasificación con un solo marcador, por lo que resulta adecuado utilizar una técnica como la clasificación activada por magnetismo (MACS), que es un método rápido, sencillo y eficiente, que no requiere de un equipo especializado como el citómetro de flujo. Las células MCF-7 fueron clasificadas de acuerdo a la expresión de CD44 como se muestra en la figura 4, la separación de células

MCF-7 de acuerdo a su expresión de CD44 es eficiente. Mientras que la expresión de EpCAM fue el criterio de clasificación para las células MDA-MB-231.

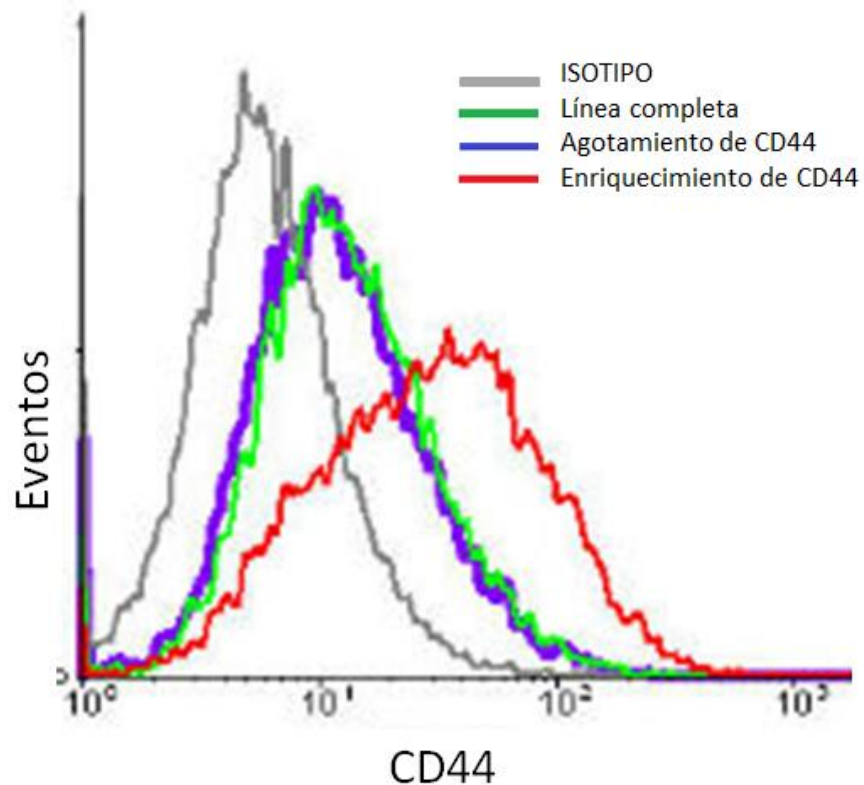


Figura 4. Enriquecimiento por MACS de CTT en líneas celulares. La gráfica muestra la expresión de CD44 en las diferentes fracciones obtenidas por MACS,. Se aprecia la población total de MCF-7 conjugada con un anticuerpo isotipo en gris, la línea completa en verde, la fracción con agotamiento del antígeno CD44 en azul y la población enriquecida en CD44 en rojo.

Caracterización de células troncales tumorales.

Para validar el enriquecimiento de CTT en las fracciones celulares de ambas líneas celulares se utilizó una batería de pruebas que se usó para evaluar la proliferación, la capacidad clonal, capacidad de auto renovación y la expresión de marcadores de pluripotencia/TEM.

La primera prueba consiste en el crecimiento de las fracciones en suspensión, de acuerdo a lo mencionado en el apartado metodología, cada una de las fracciones total,

positiva y negativa fueron sembradas y cultivadas a los 10 días, las diferencias morfológicas pueden ser observadas en el panel superior de las figuras 5 A y B, en donde es posible notar que el enriquecimiento en las fracciones positivas corresponde con un incremento en la formación de estructuras 3D en mayor proporción y de mayor tamaño en comparación con la población sin clasificar. Por el contrario, las fracciones negativas en ambas líneas celulares pierden la capacidad de crecer en estas condiciones.

En la segunda prueba, las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos y posteriormente diluidas de manera seriada a razón de la mitad, hasta llegar a la densidad de 78 células por pozo. En estas condiciones solo las fracciones positivas logran repoblar un pozo con 156 o 78 células para las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente, mientras que las fracciones restantes detienen su proliferación a la densidad de 625 células por pozo como se aprecia en el panel inferior de la figura 5 A y B.

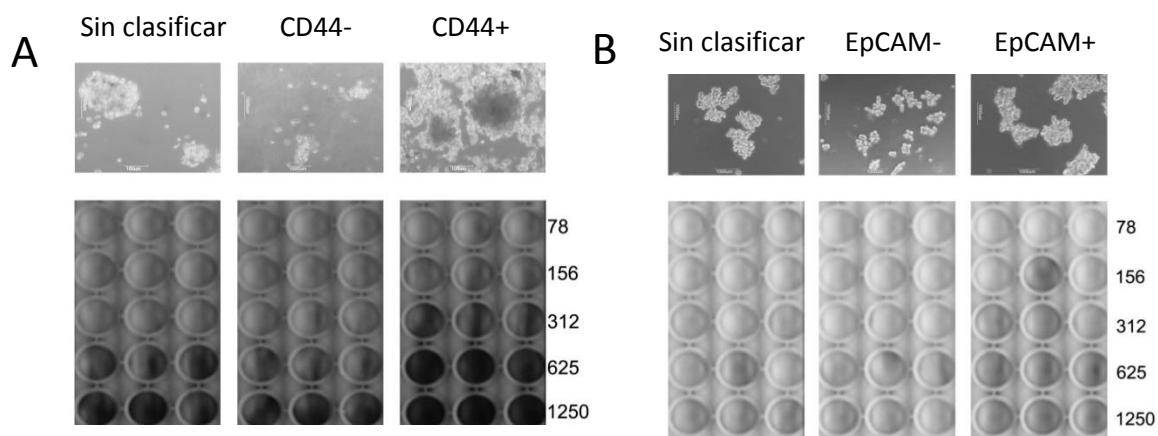


Figura 5. Prueba de crecimiento en ausencia de adherencia y prueba de clonogenicidad por diluciones seriadas comparando las células completas contra fracciones positiva y negativa de A)MCF-7 separadas con base en la expresión de CD44 y B) MDA-MB-231 separadas con base en la expresión de EpCAM.

En la tercera prueba, las fracciones celulares de MCF-7 fueron sembradas a densidad clonal dentro de un medio semisólido (agar suave) y potencial clonal fue comparado través del número de colonias formadas. En la figura 6 es fácil notar que la

fracción CD44+ supera en más del doble el número de colonias en comparación con la fracción negativa o la población total, como se aprecia en la figura. Por otro lado, las células MDA-MB-231 no logran crecer en estas condiciones, razón por la cual no se muestran resultados de esta prueba con dichas células.

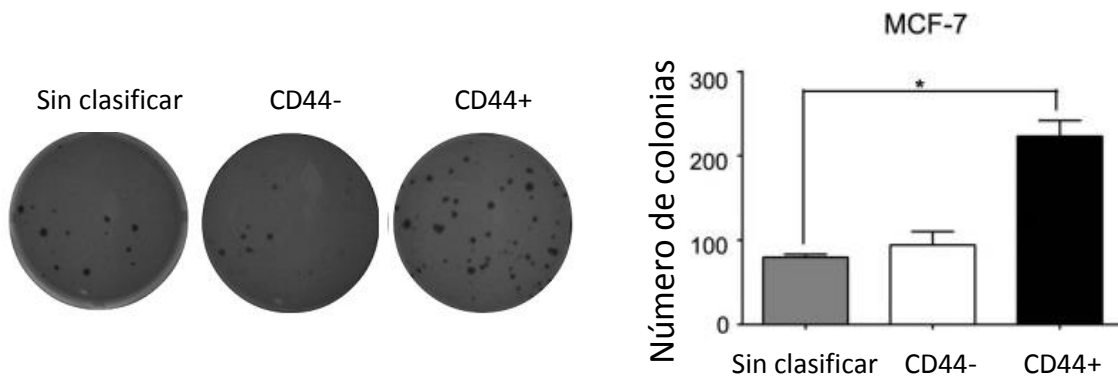


Figura 6. Formación de colonias en agar por células fracciones celulares MCF-7. En el lado derecho se muestra las placas de agar teñidas con cristal violeta, mostrando el incremento en la capacidad clonal y de auto renovación de las células MCF-7 sin clasificar y de las fracciones CD44- y CD44+, del lado derecho se muestra la cuantificación de tres ensayos independientes. $P < 0.05$

Para las dos líneas celulares, cada una de las fracciones fue sembrada en condiciones no adherentes, en un medio condicionado. Bajo estas condiciones, sólo las células con capacidad de auto renovación pueden formar estructuras tridimensionales conocidas como mamoesferas. La capacidad de formar mamoesferas es retada a través de los pases seriados en donde solo las células troncales mantienen la capacidad clonal. Los resultados mostrados en la figura 7 demuestran a través de tres pases seriados, que la población CTT se encuentra enriquecida en las poblaciones CD44+ de la línea MCF-7 y en la población EpCAM+ en la línea MDA-MB-231.

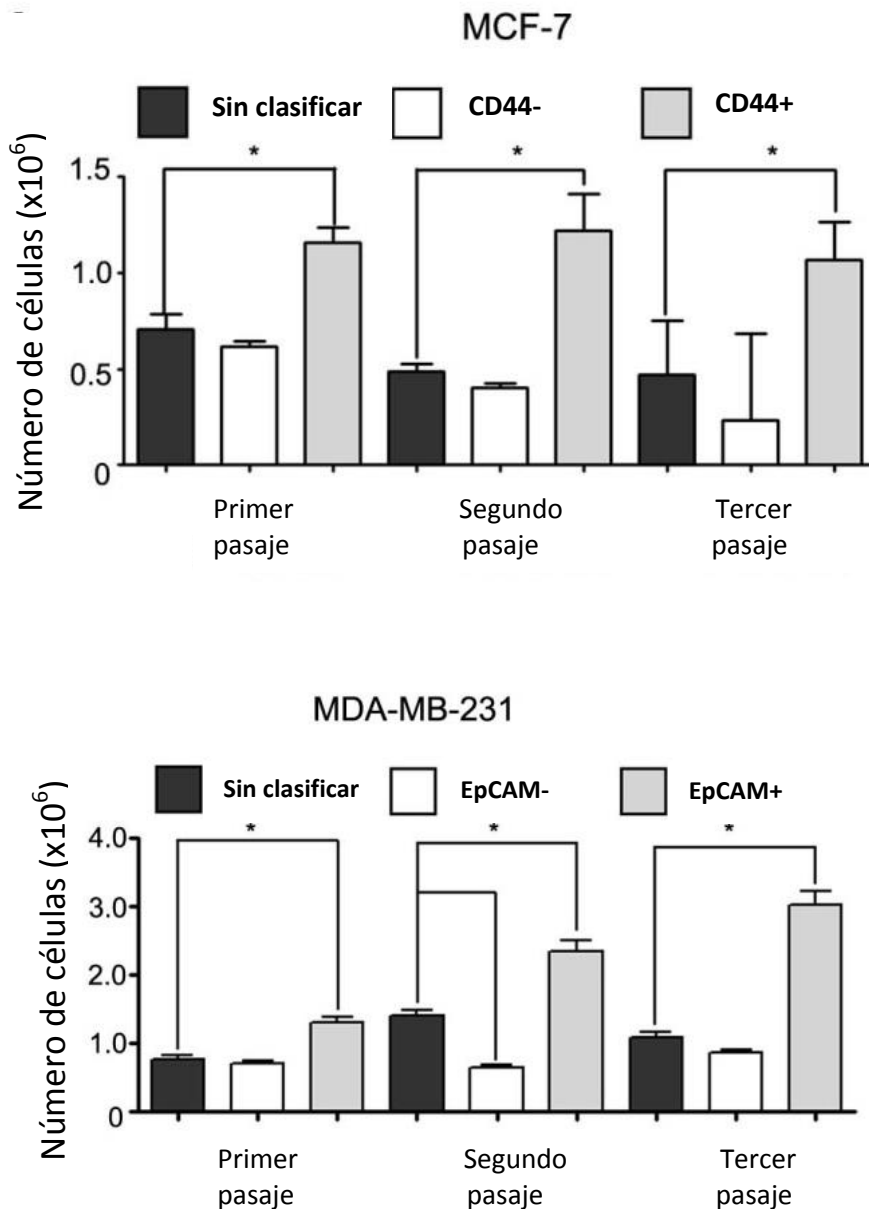


Figura 7. Cuantificación del número de mamoesferas formadas a través de tres pasajes seriados en las células completas y fracciones CD44- y CD44+ para MCF-7 panel superior y para la línea completa y las fracciones positiva y negativa a EpCAM en MDA-MB-231 en el panel inferior. Las barras muestran el promedio y el error estandar del numero de mamoesferas formadas por 4000 células en tres ensayos independientes, los asteriscos marcan una $p < 0.05$.

Por último, la expresión de genes de pluripotencia (SOX2 y OCT4) y de marcadores de transición epitelio mesénquima (SNAIL, VIMENTINA y TWIST) fue comparada entre las fracciones positivas y negativas mediante qPCR para lo cual se

utilizaron las células sin clasificar como calibrador y GAPDH como gen constitutivo (figura 8).

En las células MCF-7/CD44⁻ fue detectado un decremento en la expresión (con una razón de cambio menor a 0.75) de todos los marcadores analizados excepto OCT4. Mientras que en la contraparte MCF-7/CD44⁺ se muestra una mayor expresión de todos los marcadores estudiados (con una razón de cambio mayor a dos), como se muestra en el panel superior de la figura 8. Estos resultados apoyan la hipótesis de un enriquecimiento de CTT en las fracciones positivas a CD44 en la línea celular MCF-7.

Utilizando la misma estrategia, se demostró que las fracciones celulares MDA-MB-231/EpCAM⁺ expresan en mayor medida SOX2, OCT-4 y vimentina, señalando un incremento de CTT en la población clasificada por la expresión de EpCAM.

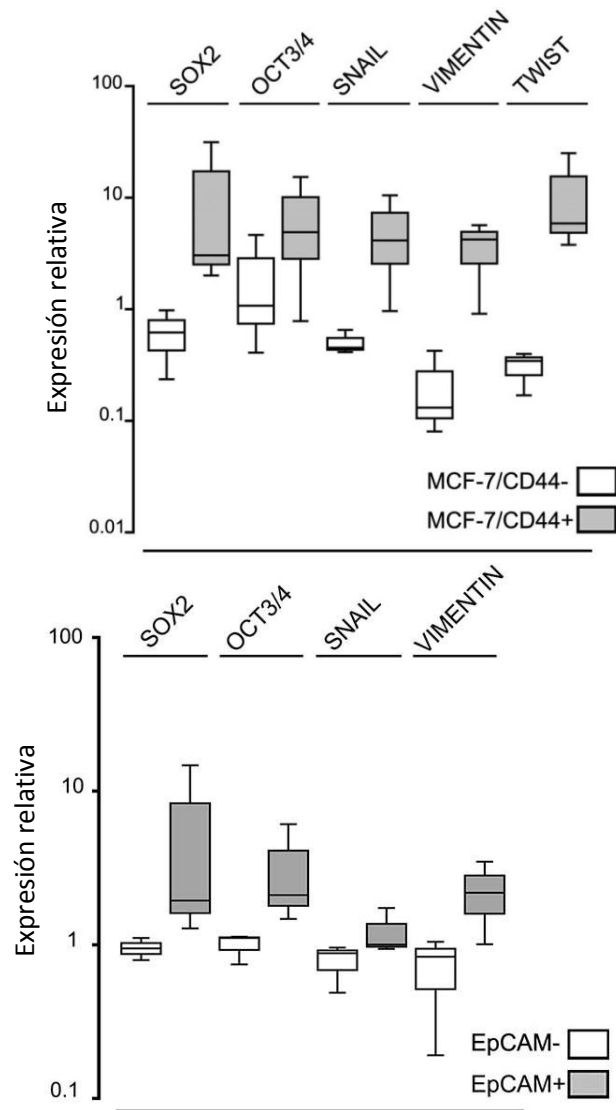


Figura 8. Perfil de expresión relativa de genes de pluripotencia y de transición epitelio mesénquima utilizando GAPDH como gen de referencia. En las fracciones celulares de MCF-7 comparadas contra la línea celular sin separar, panel superior y de las fracciones celulares de MDA-MB-231 de lado izquierdo. Los resultados muestran la media y los cuartiles de tres ensayos independientes.

Análisis de expresión de miRNAs en CTT comparadas contra la población total.

Con la finalidad de encontrar miRNAs reguladores del fenotipo CTT, se comparó la expresión de miRNAs entre la población enriquecida en CTT contra la población total, utilizando una plataforma de arreglo de sondas TaqMan de baja densidad que incluye 368 diferentes sondas para secuencias maduras de miRNAs y tres diferentes RNAs pequeños ribonucleares (RNU6B, RNU44, RNU48). De acuerdo a la literatura, RNU6b es el gen endógeno más estable al comparar muestras en cáncer [115], por lo que la expresión de cada miRNA fue determinada utilizando como RNU6B como control endógeno. Interesantemente, la expresión de RNU44 y RNU48 no se modificó.

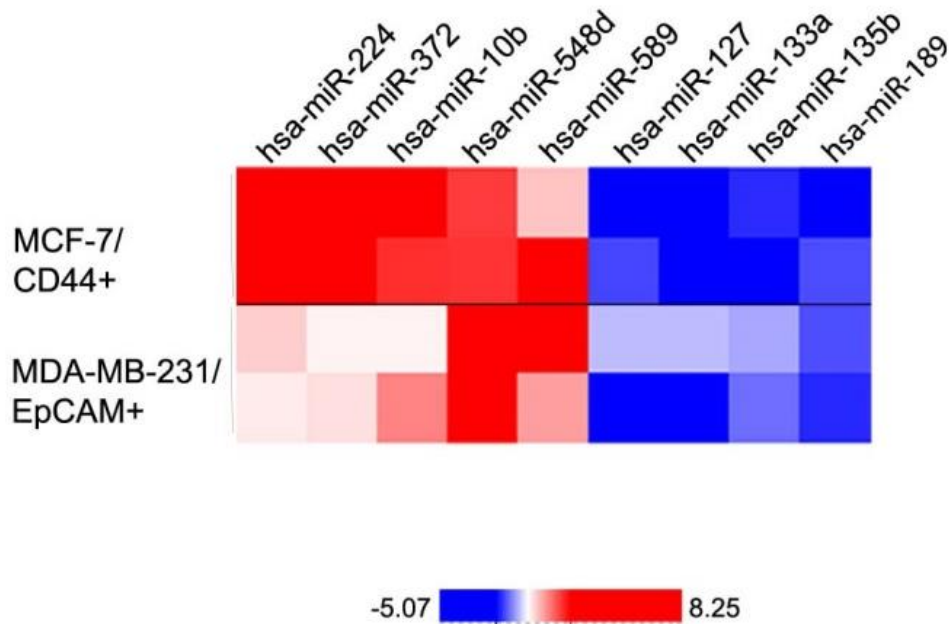


Figura 9. Mapa de calor que muestra los nueve miRNAs con cambios compartidos entre las poblaciones MCF-7 CD44+ y MDA-MB-231 EpCAM+. El perfil de expresión fue realizado utilizando un Arreglo de Sondas Taqman de Baja Densidad, la escala de expresión es mostrado debajo del mapa.

Utilizando esta estrategia fueron encontrados 142 miRNA desregulados en las CTT de la línea MCF-7, entre ellos 119 regulados a la alta y 33 regulados a la baja. Por otro lado, solo nueve miRNAs fueron desregulados en las CTT de MDA-MB-231, dentro de los cuales cinco miRNAs incrementan su expresión y solo cuatro la decrecen, interesantemente, todos los miRNAs desregulados en las CTT basales se encuentran también desregulados en las CTT de células luminales, estos miRNAs compartidos en ambas poblaciones son presentados en la figura 9 a través de un mapa de calor.

En esta lista se incluyen diferentes miRNAs con papeles reguladores de procesos de metástasis o metastamiRs. Sin embargo, a la fecha del primer análisis de estos resultados (abril 2010), solo miR-10b había sido relacionado con la regulación de la invasión metastásica [65, 66].

De manera importante, ha sido reportado que la expresión a la alta de miR-10b está controlada por el factor de transcripción TWIST, a la vez, se ha descrito que miR-10b puede reprimir la expresión otro factor de transcripción HOXD10. A través de esta inhibición puede activarse la expresión de promotores de metatátasis RhoC y Upar. [65]. La firma de expresión reportada para miR-10b fue analizada en las fracciones celulares CD44- y CD44+ de MCF-7 como se muestra en la figura 10 A. Las células CD44+ MCF-7 muestran un perfil de expresión semejante al de las células metastásicas que expresan miR-10b.

El incremento en la expresión de miR-10b en CTT fue comprobado a través de qPCR en ensayos individuales para las dos líneas celulares (figura 10 B y 10 C). En ese sentido se decidió continuar con estudios funcionales para dilucidar si miR10b tenía una participación en la promoción del fenotipo CTT.

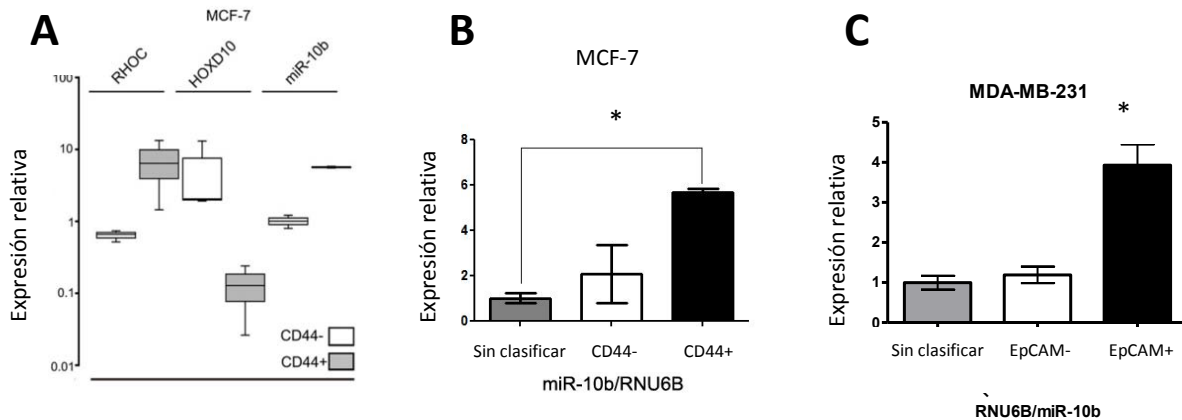


Figura 10. Expresión relativa de miR-10b y perfil de expresión de HOXD10 y RHOC. A) La expresión de RHOC, HOXD10 y miR-10b fue comparada en las fracciones de MCF-7 clasificadas respecto a su expresión de CD44 y comparadas contra la línea total. B) y C) Expresión de miR-10b respecto a RNU6B obtenida en ensayos individuales de qPCR. B) Se muestra la expresión de las células MCF-7 totales y fracción de la clasificación respecto a CD44. C) Se muestra la expresión en MDA-MB-231 y fracción de acuerdo a la expresión de EpCAM. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes y el error estándar, el asterisco indica un valor de $p < 0.05$

Efectos de la inhibición de miR-10b en CTT de MCF-7 y de MDA-MB-231.

Para investigar la participación de miR-10b como regulador troncal tumoral, en las células MCF-7 CD44+ la expresión de miR-10b fue inhibida utilizando un RNA antisentido o Anti-miR [116]. En la figura 11A se muestra el efecto en la inhibición de la expresión en las células MCF-7 CD44+, mientras que en el panel 11B es posible apreciar que la formación de mamoesferas se reduce a menos de la mitad en las células MCF-7 CD44+ con inhibición de miR-10b, este mismo efecto se observa en las células MDA-MB-231 EpCAM+, como se muestra en el panel 11C.

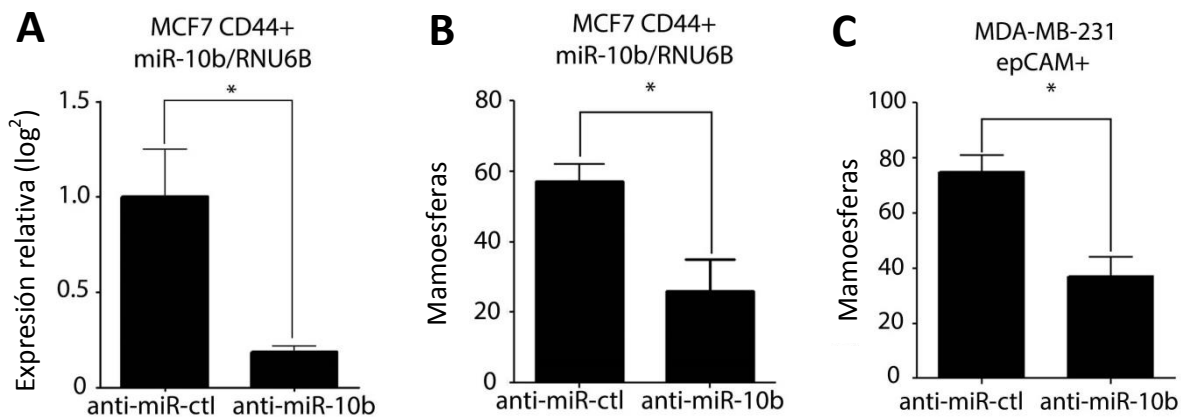


Figura 11. Efectos de la inhibición de miR-10b a través de la transfección de un AntimiR. A) Cuantificación relativa de miR-10b/RNU6B en células MCF-7 CD44+ transfectadas con anti-miR-ctl o Anti-miR-10b. B) Efecto de la inhibición de miR-10b sobre la formación de mamoesferas producidas por 4000 células MCF-7 CD44+ transfectadas con Anti-miR-Ctl o Anti-miR-10b y C) Número de Mamoesferas formadas por 4000 células MDA-MB-231 EpCAM+ transfectadas con Anti-miR-Ctl o Anti-miR-10b Los resultados muestran el promedio de tres ensayos independientes y el error estándar, el asterisco indica un valor de $p < 0.05$.

Uno de los parámetros que caracteriza la población CTT es la sobreexpresión de genes de troncalidad (SOX2 y OCT/4) y transición epitelio mesénquima (SNAIL y VIMENTINA), por tal razón los cambios de expresión de estos marcadores fueron evaluados tras la inhibición de miR-10b en tres diferentes contextos celulares donde miR-10b se expresa de manera sostenida. Los datos de expresión relativa son presentados en la figura 12, en donde el decremento de la expresión fue considerado cuando la razón de cambio es menor a 0.75 y se muestra como punto de corte en dicha gráfica a través de la línea roja punteada.

En la línea celular T-47D el decremento en la expresión de estos genes fue menor a 0.75, de manera semejante en la línea celular MDA-MB-231 se encuentra un decremento en la expresión de los genes estudiados excepto en vimentina. De manera importante la expresión de estos marcadores decrece en las células MCF-7 CD44+ tras la inhibición de miR-10b, con excepción SOX2 cuya razón de cambio no rebasa el valor de punto de corte.

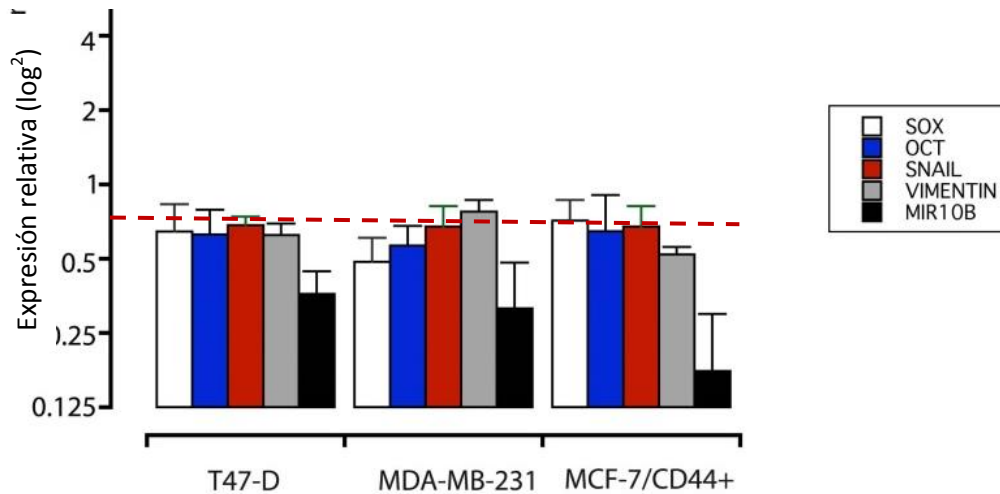


Figura 12. Efectos de la inhibición de miR-10b en el perfil de expresión de marcadores troncales y de TEM. En la figura se muestra la razón de cambio en la expresión de genes de troncalidad y TEM en las transfección de AntimiR-10b respecto a la transfección con AntimiR control. La expresión relativa de genes de pluripotencia SOX2 en barras blancas y de OCT4 en barras azules, y de TEM como SNAIL en rojo y VIMENTINA en gris, fue normalizada con respecto a GAPDH. Mientras que la expresión de miR-10b es relativa a la expresión de RNU6B. La línea rojo punteada muestra el punto de corte (0.75) para considerar una razón de cambio negativa. Los resultados muestran el promedio de tres ensayos independientes y el error estandar.

Otros efectos de la inhibición de miR-10b fueron estudiados, entre ellos la disminución de la capacidad clonal medida por ensayos de formación de colonias en agar suave, a través de estos se demuestra que la pérdida de expresión en miR-10b se refleja en una pérdida en la capacidad clonal de las células MCF-7 CD44+ (figura 13A). De la misma forma, la capacidad de migración de las células MDA-MB-231 es afectada tras la inhibición de miR-10b (figura 13B), este último dato corresponde con lo reportado por otros grupos de investigación [65].

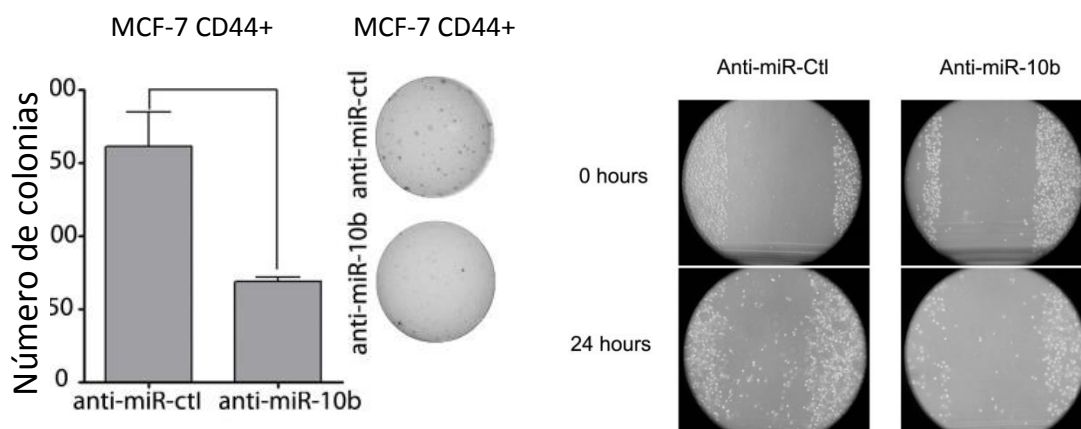


Figura 13. Efectos de la inhibición de miR-10b en A) Capacidad clonal en agar suave de células MCF-7 CD44+, mostrando el promedio de tres ensayos independientes y el error estándar, y en B) capacidad de migración de las células MDA-MB-231.

Efectos de la sobreexpresión de miR-10b en la línea celular MCF-7 y SKBR-3.

Para estudiar los efectos de la sobre-expresión de miR-10b en las células de cáncer de mama y su posible relación con el fenotipo CTT, la secuencia que transcribe para el precursor de miR-10b fue sintetizada *in vitro* y clonada en un vector de expresión con un promotor de respuesta a RNA Pol II (BLOCK-IT Pol II miR-RNAi Expression Vector Kit, Invitrogen).

La transfección transitoria de este vector, efectivamente aumenta la expresión de miR-10b (relativa a RNU6B) en las células MCF-7 y SKBR-3, como puede apreciarse en la figura 14, a la par existe un incremento en la expresión de los marcadores de pluripotencia SOX2 y OCT/4 como también de VIMENTINA (relativa a GAPDH con razón de cambio >2) mientras que SNAIL solo incrementa en la línea celular MCF-7. Estos resultados demuestran una relación entre la expresión de este microRNA y los marcadores del fenotipo CTT.

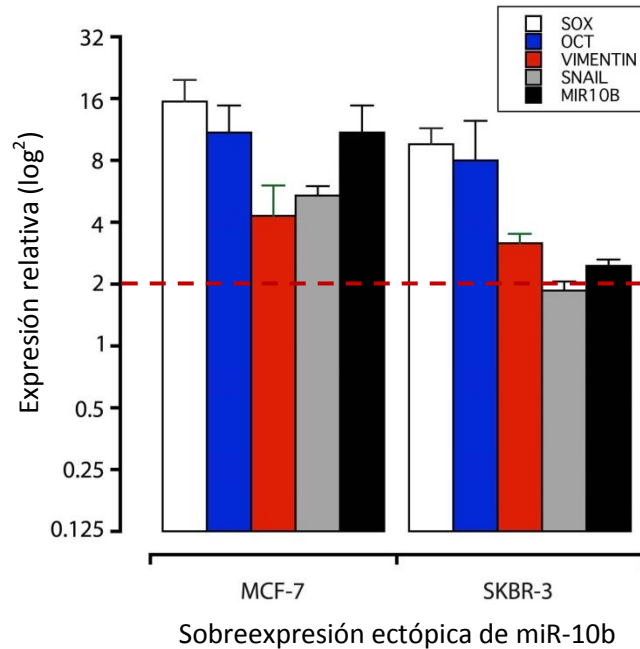


Figura 14. Efectos de la sobreexpresión de miR-10b en el perfil de expresión de marcadores troncales y de TEM. En la figura se muestra la razón de cambio de expresión de las tranfección transitorias de la secuencia precursora de miR-10b respecto a la transfección transitoria de un miR control (scrambled). La expresión relativa de genes de pluripotencia SOX2 en barras blancas y de OCT4 en barras azules, y de TEM como SNAIL en gris y VIMENTINA en rojo, fue normalizada con respecto a GAPDH. Mientras que la expresión de miR-10b es relativa a la expresión de RNU6B. La línea rojo punteada muestra el punto de corte igual a 2 para considerar una razón de cambio positiva. Los resultados muestran el promedio de tres ensayos independientes y el error estándar.

Para determinar los efectos de la sobreexpresión de miR-10b en las líneas celulares, el porcentaje de células positivas a CD44 fue determinado en las líneas celulares con sobreexpresión estable de cada miRNA, en la figura 15 se muestran los cambios en la proporción de células CD44+ en cada una de las líneas celulares, de manera importante, la proporción de CTT incrementa tras la sobreexpresión de miR-10b pasando de 6.8% en MCF-Scrambled OE a 14.5% en MCF-7 miR-10b OE.

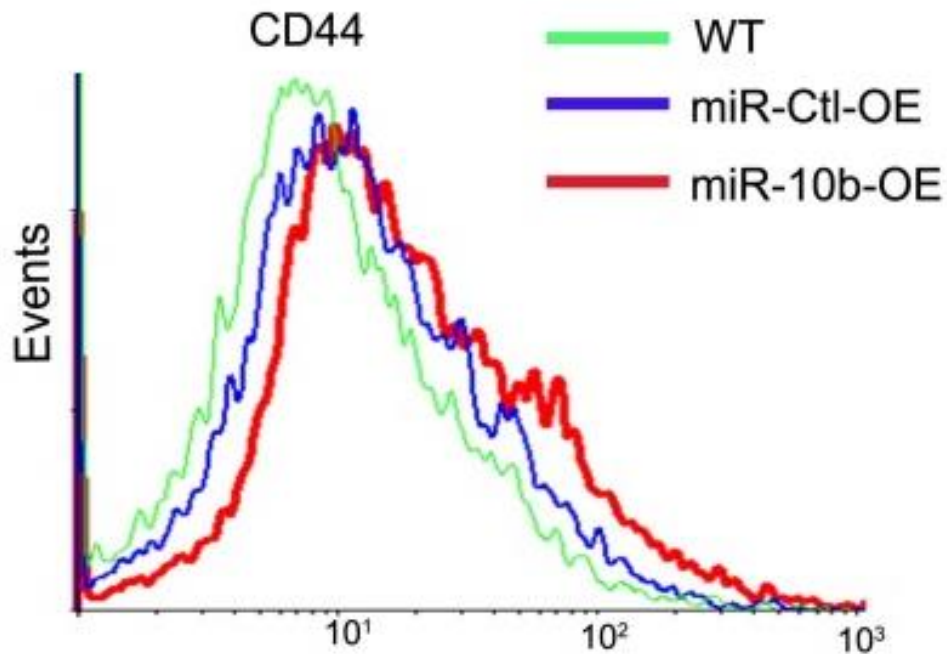


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de miR-10b en el porcentaje de células positivas a CD44 en las líneas celulares. A) Porcentaje de células CD44+ en la línea celular MCF-7 en condiciones nativa (WT en verde), células con sobreexpresión de un microRNA control (azul) y con sobreexpresión de miR-10b en rojo.

De manera importante, la expresión forzada de miR-10b induce un incremento en la capacidad clonal de las células MCF-7, esto fue demostrado por mediante un ensayo de formación de colonias en agar suave que se muestran en la figura 16A. Por otro lado, en condiciones de expresión forzada de miR-10b la proliferación parece aumentar en mayor medida conforme las células se acercan a confluencia, mientras que las células con sobreexpresión control mantienen una tasa de proliferación lenta (figura 16B).

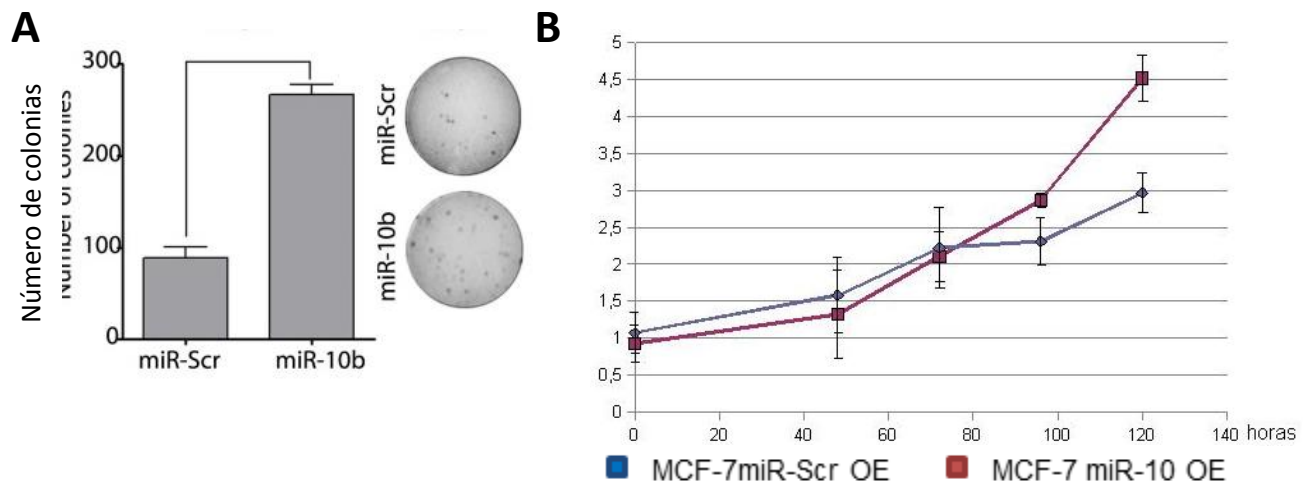


Figura 16. Efectos de la expresión de miR-10b en células MCF-7. A) Incremento en la capacidad clonal en agar suave de las células MCF-7, se muestra el número de colonias formadas en tres ensayos independientes junto con dos placas representativas. B) Incremento en la capacidad de proliferación dirigida por la sobreexpresión de miR-10b en una curva de crecimiento por 120 horas. Los resultados muestran los valores promedio de tres ensayos independientes y el error estándar.

Con la finalidad de comprobar la relación entre la sobreexpresión de miR-10b y el aumento en la capacidad troncal de la línea celular MCF-7 se evaluó la capacidad de auto renovación utilizando el ensayo seriado de formación de mamoesferas de acuerdo a lo reportado por otros autores [117].

Como se muestra en la figura 17, las células con sobre expresión estable de miR-Scr y miR-10b fueron sembradas a densidad clonal en un medio condicionado y condiciones libres de adherencia durante 10 días. El número de mamoesferas fue determinado por un conteo bajo el microscopio invertido, posteriormente estas células fueron disgregadas utilizando acutasa para evaluar la formación de mamoesferas en un segundo y tercer pasaje.

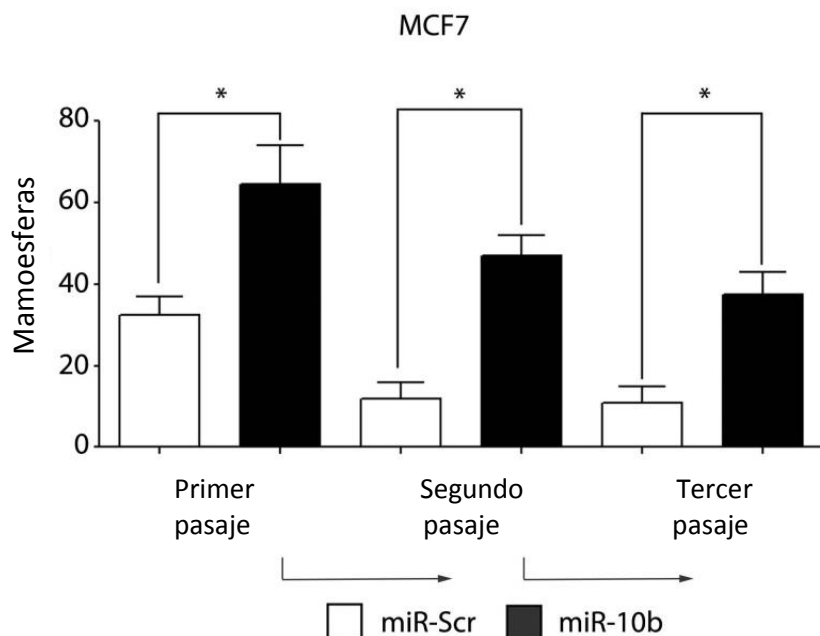


Figura 17. Ensayo de formación seriada de mamoesferas tumorales. El número de mamoesferas formadas por 4 000 células, después de diez días de cultivo y por tres pasajes seriados fue determinado para las líneas células MCF-7 con sobreexpresión estable de miR-Scr en barras blancas y con sobre expresión estable de miR-10b en barras negras. Los resultados muestran el promedio de tres ensayos independientes y el error estándar, los asteriscos representan una $p < 0.05$.

Los datos de la figura 17 demuestran que la capacidad de formación de mamoesferas decrece con los pasajes en ambos contextos celulares, sin embargo, las células con sobreexpresión de miR-10b mantienen siempre una mayor capacidad de formar las estructuras tridimensionales en las condiciones ya mencionadas, lo cual representa un incremento en la capacidad de auto renovación dirigida por el incremento en la sobreexpresión de miR-10b.

Por último, para comprobar la capacidad tumorigénica de las células con sobre expresión estable de miR-10b, se realizaron ensayos de inducción tumoral en ratones Nu/Nu. Esta prueba es considerada el estándar de oro para la determinación la frecuencia de CTT en una población tumoral. Utilizando bajas dosis celulares o diluciones limitadas *in vivo*. Utilizando este abordaje, se encontraron notables diferencias en la capacidad

tumorigénica de las células basados en los niveles de expresión de miR-10b como se resume en la tabla 3.

Tabla 3. Eficiencia de formación tumoral en ensayos de diluciones limitantes *in vivo*.

Diluciones limitantes de células MCF-7 <i>in vivo</i>				Diluciones limitantes de células SKBR-3 <i>in vivo</i>			
Núm- de Células	1×10^3	1×10^4	5×10^4	Núm- de Células	5×10^3	1×10^4	2×10^4
miR-Scr	0/4	1/3	0/3	miR-Scr	0/4	2/3	3/4
miR-10b	1/3	2/3	2/3	miR-10b	3/4	3/4	4/4

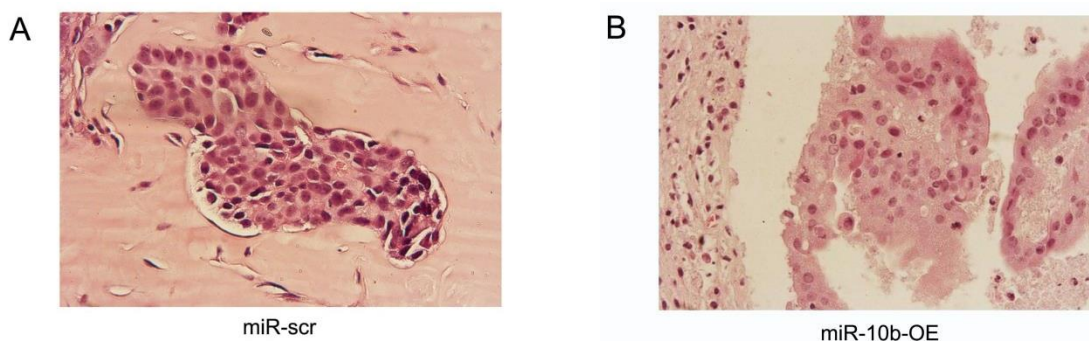


Figura 18. Morfología tumoral inducida por xenotransplantes de células MCF-7 con sobreexpresión estable de A) miR-Scr y B) miR-10b.

Brevemente las células MCF-7 se caracterizan por un bajo potencial tumorigénico, esto se refleja en las inducciones realizadas con las células MCF-7 miR-Scr OE, donde solo 1/3 inoculaciones con 10 000 células logró inducir el crecimiento tumoral. En contraparte la sobreexpresión de miR-10b aumenta la capacidad tumorigénica logrando el crecimiento de al menos un tumor palpable utilizando una dosis celular pequeña (1×10^3 células), mientras que con dosis mayores (1×10^4 y 1×10^4 células) se consiguió un 66% de eficiencia, de manera importante, la morfología de las células tumorales no presenta diferencias importantes como se aprecia en la figura 21. La frecuencia de CTT es de 1/30 000 para MCF-7 miR-10b OE y de 1/200 000 para MCF-7 miR-Scr OE de acuerdo a lo estimado mediante un análisis ELDA como se describe en el apartado metodología.

En cuanto a la capacidad tumorigénica de la línea celular SKBR-3, utilizando ambos trasfondos genéticos se logró obtener tumores palpables con apenas 1×10^4 células miR-Scr (66% de eficiencia) y se estima una frecuencia de CTT de 1/10 000 células. Mientras que las células con sobre expresión de miR-10b logran formar tumores con dosis tan pequeñas como 1×10^4 células, lo cual indica que la frecuencia de CTT dentro de esta línea estable es de 1/5 000.

Búsqueda de blancos para miR-10b en CTT.

En este punto se establece como hipótesis que miR-10b debe controlar la expresión de uno o varios genes supresores de tumor y de esa manera participar como onco-miR. Con el objetivo de encontrar el mecanismo de acción de miR-10b en el mantenimiento del fenotipo CTT, se desarrolló un análisis *in silico* de los blancos teóricos de miR-10b, utilizando las bases de datos de blancos de miRNAs TargetScan, miRanda y Pictar vigentes en el verano de 2010.

Se encontró una gran variedad de blancos compartidos entre los diferentes programas de predicción como se muestra en la figura 19 panel superior. 76 posibles blancos se comparten en las tres bases de datos, sin embargo, ninguno de estos mRNA se describe como gen supresor de tumores de acuerdo a los criterios establecidos por Vogelstein y colaboradores [118], esta situación se repite en los 45 blancos compartidos entre los programas TargetScan y Pictar.

En cuanto a la lista de posibles blancos compartidos entre TargetScan y miRanda, ASLX1, BAP1, GATA3, NCOR y PTEN han sido descritos con un alto índice de mutaciones en cáncer relacionadas con la supresión de tumores, y probablemente la regulación a la baja de uno o varios de estos transcritos puede ser mediada por la sobreexpresión de miR-10b en CTT.

Reportes previos han demostrado un decremento en la expresión de PTEN en CTT comparado con la expresión en el resto de células tumorales en diferentes contextos incluyendo cáncer de mama [70, 119, 120]. Para explorar la hipótesis de que PTEN puede ser controlado por miR-10b, el posible MRE de miR-10b en PTEN fue comparado con el de un blanco ampliamente validado, el MRE de miR-10b en HOXD10, ambos se esquematizan en el panel inferior de la figura 19.

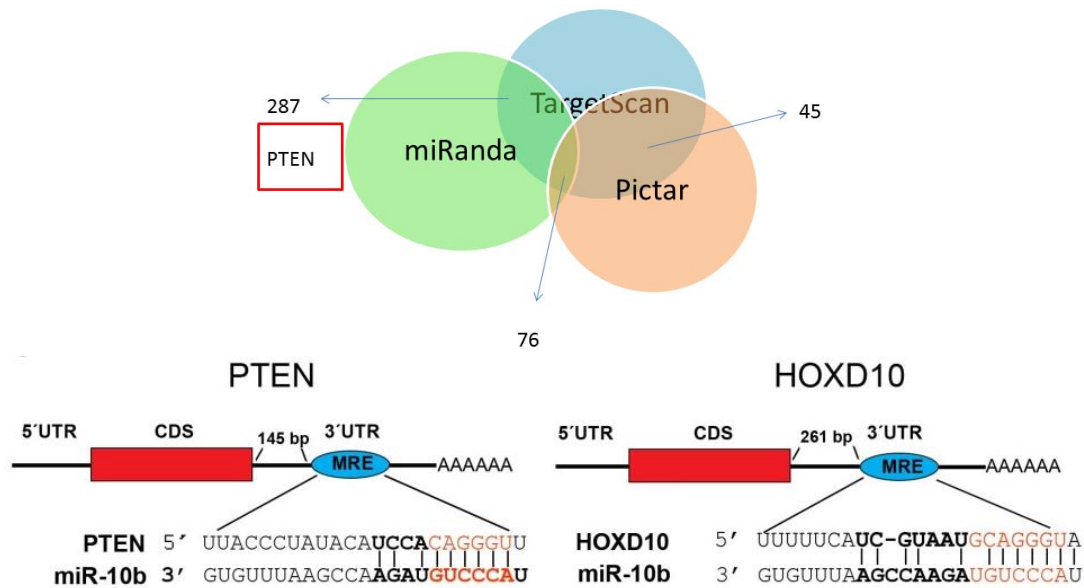


Figura 19. Análisis *in silico* de posibles blancos de miR-10b. En el panel superior se muestra un diagrama de Venn con los blancos propuestos por cada software de predicción y los subconjuntos compartidos entre ellos. En el panel inferior se muestran los MRE propuestos para miR-10 en los transcritos PTEN y HOXD10.

De manera similar un posible MRE fue encontrado en la secuencia 3'UTR de un gen antagónico a PTEN en la vía PI3K/AKT, la Fosfatidilinositol-4,5 bifosfonato cinasa 3 subunidad catalítica alfa (PIK3CA), en este sentido la expresión de ambos genes fue comparada utilizando qPCR en diferentes contextos de regulación de miR-10b.

En la línea celular MCF-7 la sobreexpresión ectópica de miR-10b correlacionó con un decremento en los niveles de mRNA de PTEN, mientras que la expresión de PIK3CA no se vió afectada. Sumado a ésto, un incremento en la expresión de PTEN se observó

en las células MDA-MB-231 tras la inhibición de miR-10 utilizando AntimiRs específicos, de manera interesante la expresión de PIK3CA no presenta cambios significativos (>2 razones de cambio) como se muestra en la figura 20.

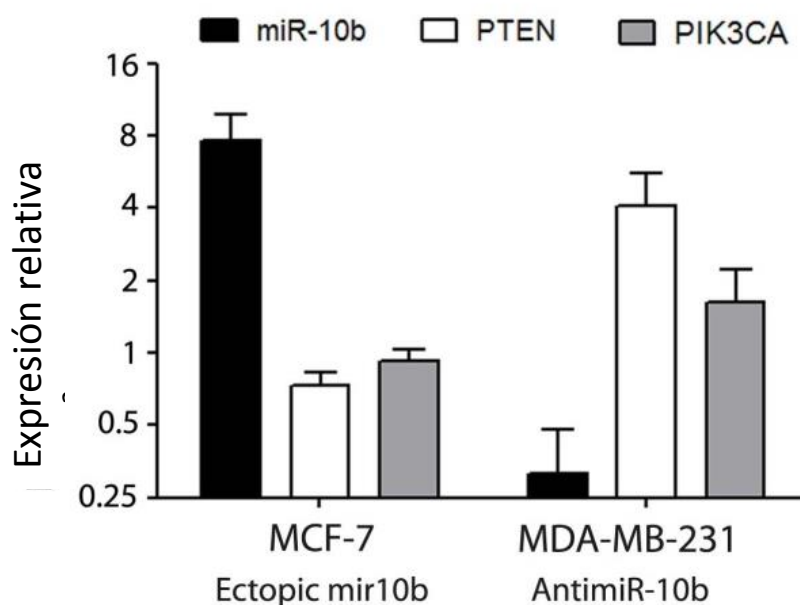


Figura 20. Expresión relativa de posibles blancos de miR-10b en ensayos de pérdida y ganancia de función. La expresión relativa de PTEN y PIK3CA relativa a GAPDH fue determinada tras la sobreexpresión o inhibición de miR-10b en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Las barras indican el promedio y error estándar obtenido de tres ensayos independientes.

Validación funcional de blancos para miR-10b en diferentes ensayos de pérdida-ganancia de función.

Para validar o descartar los posibles blancos de miR-10b, diferentes ensayos funcionales fueron desarrollados. En un primer abordaje el vector de expresión de luciferasa fue modificado introduciendo las posibles secuencias de interacción con miR-10b (23 nucleótidos) presentes en los genes HOXD10 (blanco validado y que fue utilizado como control positivo), PTEN y PIK3CA (genes a evaluar), por último el vector vacío y la secuencia de PTEN con un MRE mutado fueron utilizadas como controles negativos. Cada una de estas construcciones fue co-transfectada por separado con los vectores de

sobreexpresión de miRNAs o con los AntimiR adecuados para estudiar la modulación del reportero en ensayos de pérdida-ganancia de función de miR-10b, los datos son esquematizados en la figura 21.

Los ensayos de pérdida y de ganancia de miR-10b realizados en la línea celular MCF-7 muestran una tendencia (sin significancia estadística) a la modulación negativa de los reporteros que contienen los MRE de HOXD10 y PTEN, mientras que en el resto de las construcciones el radio de actividad de luciferasa permanece sin cambios (~ 1.0), como se observa en la figura 21, panel inferior.

Para esclarecer estos datos, se seleccionaron dos líneas celulares con distinta expresión relativa de miR-10b. SKBR-3 presenta niveles casi nulos de expresión de miR-10b con respecto a MCF-7, por lo que tras la sobreexpresión de este miRNA, es posible observar una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad relativa de luciferasa de las construcciones que contienen los MRE de HOXD10 y PTEN, mientras que el radio de actividad de luciferasa en el resto de las construcciones es cercano a uno, como se aprecia en la figura 21. Este dato indica que la sobreexpresión de miR-10b puede controlar de manera negativa los niveles de PTEN y que esta regulación es mediada por la interacción MRE-miR-10b.

Para confirmar este dato, la línea celular T47-D, que expresa cerca del doble de miR-10b comparado con MCF-7, fue utilizada con un trasfondo de pérdida de función. En este contexto celular, la inhibición de miR-10b induce un aumento en la actividad relativa de luciferasa producido por las construcciones que contienen los MRE de HOXD10 (no significativa, $p > 0.05$) y de PTEN ($p < 0.05$), de manera importante el incremento en este valor se pierde al mutar la secuencia MRE de PTEN. Estos datos señalan la posibilidad de que la inhibición de miR-10b permite un incremento en la tasa de traducción de PTEN y que este efecto es dependiente del MRE para miR-10b.

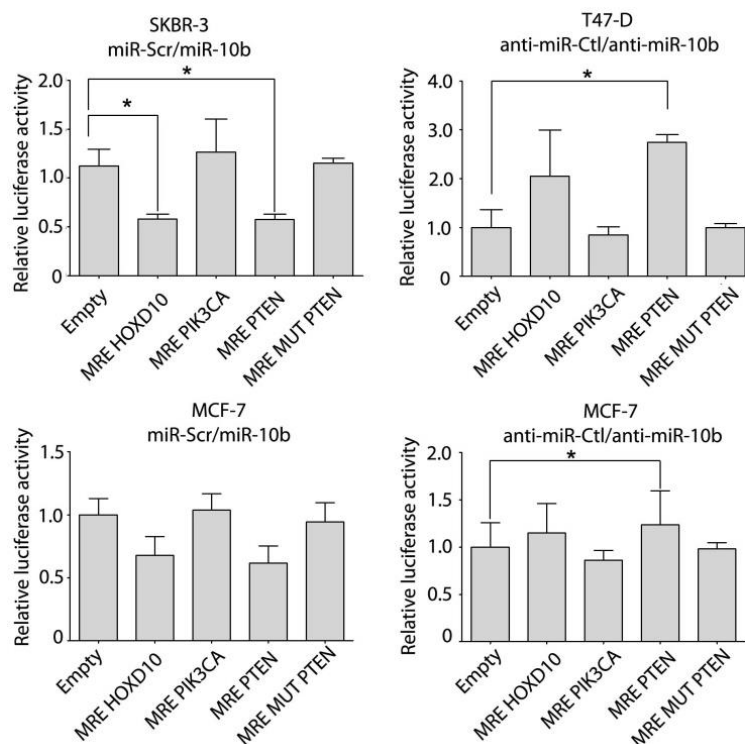


Figura 21. Ensayos de gen reportero para la evaluación de la interacción de miR-10b con sus posibles mRNA blanco. Los MRE de los blancos a evaluar fueron clonados en un vector reportero de expresión constitutiva, la actividad de luciferasa de luciérnaga fue normalizada de acuerdo a la actividad de luciferasa de Renilla. La actividad relativa de luciferasas fue comparada entre las condiciones de pérdida-ganancia de función y su respectivo control. El promedio de actividad se muestra en barras grises, las barras de error muestran el error estándar obtenido de seis ensayos independientes, los asteriscos indican una $p < 0.05$.

Para validar los datos obtenidos mediante los ensayos de gen reportero, una serie de experimentos de pérdida y ganancia de función fueron desarrollados como se describe a continuación. Utilizando los mismos contextos celulares y de modulación de la expresión de miR-10b, los niveles de expresión fueron determinados por RT-qPCR utilizando las transfección control como calibrador. Los cambios de expresión fueron calculados para PTEN o PIK3CA relativos a la expresión de GAPDH y posteriormente graficados contra el cambio de expresión de miR-10b relativo a la expresión de RNU6B. Posteriormente, estos datos fueron utilizados para calcular la correlación entre el cambio de expresión de cada posible blanco contra el cambio de expresión de miR-10b. Como se aprecia en la figura 22, la expresión de PTEN es inversamente proporcional a la expresión de miR-10b ($r=0.8$)

mientras que la expresión de PIK3CA no tiene una correlación significativa con la expresión de miR-10b.

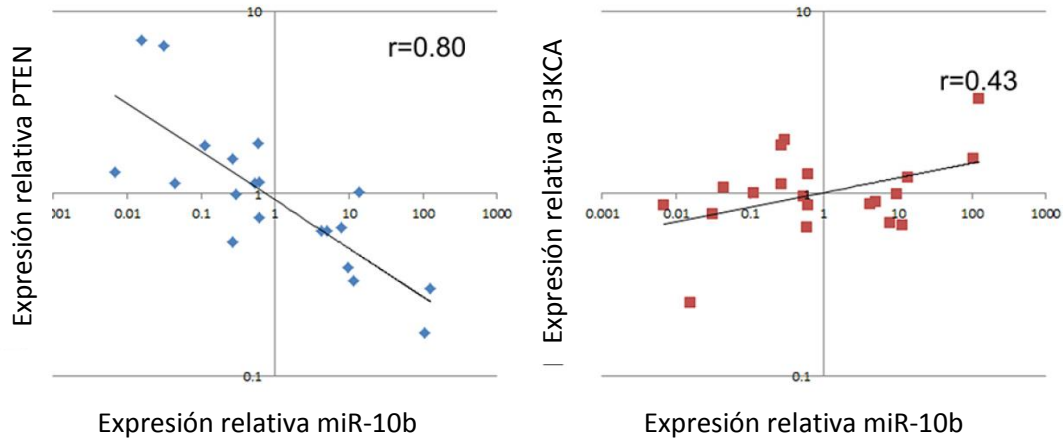


Figura 22. Análisis de correlación de la expresión de miR-10b contra PTEN (en azul) o contra PIK3CA (en rojo) en diferentes contextos celulares y de modulación de la expresión de miR-10b. Las células MCF-7 y SKBR-3 fueron transfectadas de manera transitoria con los vectores de sobre expresión de miRNAs, mientras que las células T-47D y MCF-7 fueron transfectadas con los anti-miR específicos. La expresión de PTEN o PIK3CA fue determinada de manera relativa a GAPDH, mientras que la expresión de miR-10b fue relativa a la expresión de RNU6B. Cada punto de la gráfica representa el cambio de expresión obtenido por la modulación de miR-10b y fue calculado por el método $-2\Delta\Delta CT$ utilizando como calibrador la transfección control. En la parte superior derecha se muestra la correlación de Pearson.

Los resultados representados en la figura 23, muestran un decremento de PTEN a nivel proteína tras la sobreexpresión ectópica de miR-10b en ambas líneas celulares (MCF-7 y SKBR3, figura 23 A). Sumado a esto, la inhibición de miR-10b permite un incremento en los niveles de proteína de PTEN en ambos contextos celulares (MCF-7 y T47D, figura 23B), demostrando que la regulación de PTEN por miR-10b puede realizarse a nivel post-transcripcional e influenciar los niveles de mRNA y proteína.

De manera interesante, las células tumorales MCF-7 miR-10b OE pierden la expresión de proteína PTEN en los xenotrasplantes murinos, mientras que los tumores formados por células MCF-7 miR-Scr OE conservan la expresión del gen supresor de tumores (figura 23), demostrando que el aumento en la capacidad tumorigénica de las células miR-10b OE puede estar mediado por los mecanismos de inhibición de PTEN.

La mutación del MRE en PTEN bloquea la regulación por miR-10b.

Por último, el marco de lectura abierta junto con la primera porción del 3'UTR (incluyendo el MRE para miR-10b) de PTEN fue clonada en un vector de expresión en mamíferos y fue denominada PTEN WT. A la par una versión de esta construcción con la secuencia mutada del MRE para miR-10b fue obtenida por mutagénesis dirigida y nombrada como PTEN mt.

Ambas construcciones fueron co-transfectadas transitoriamente junto con el vector de expresión miR-10b en células MDA-MB-468 y la expresión de PTEN relativa a GAPDH y genes de pluripotencia y TEM fue determinada por qPCR, utilizando la transfección del vector PTEN como calibrador.

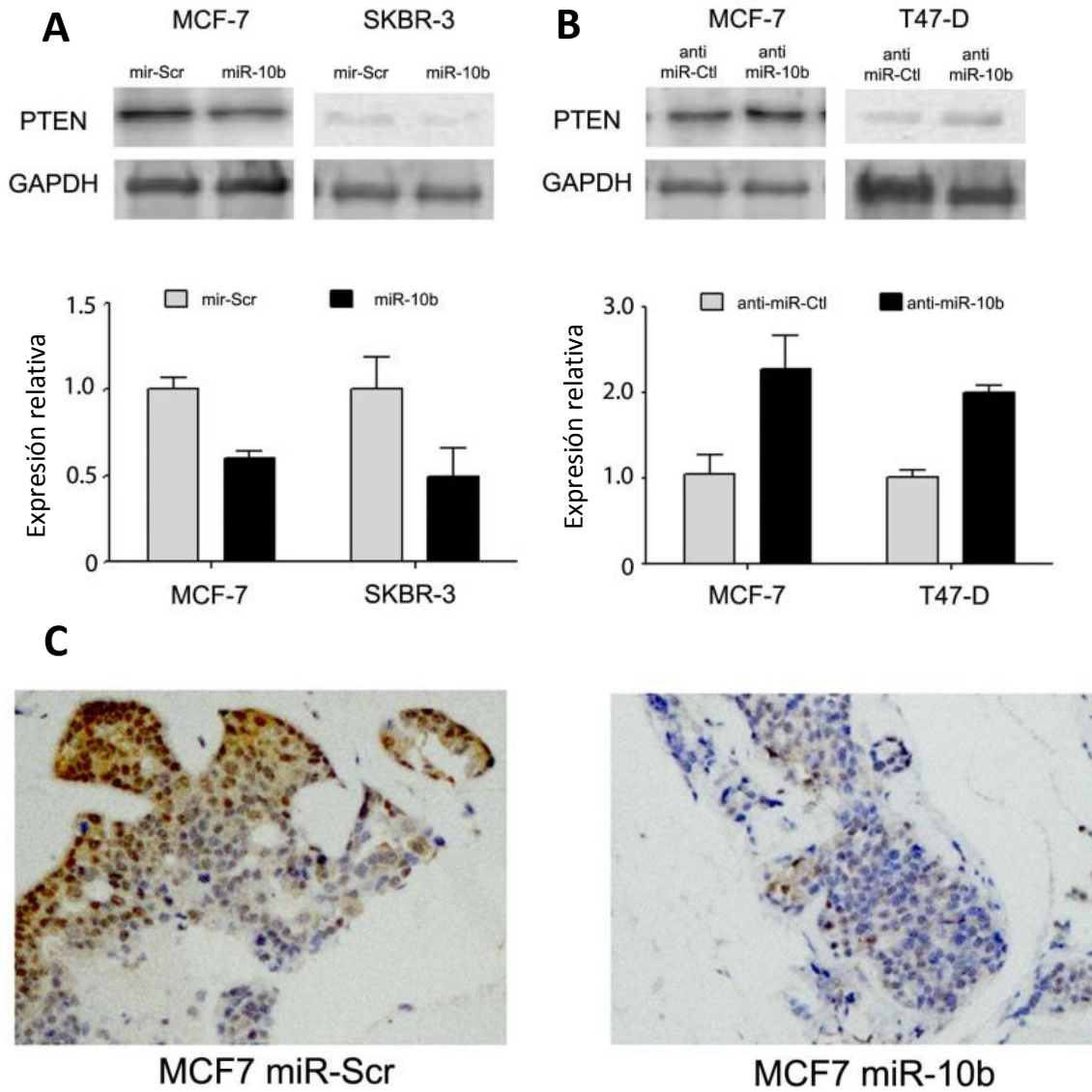


Figura 23. Efectos de la modulación de miR-10b en la expresión de PTEN a nivel proteína. La expresión de PTEN relativa a GAPDH fue determinada en varios contextos celulares en los que la expresión de miR-10b fue modulada. En A) sobreexpresión de miR-10b en B) Inhibición de miR-10b. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los niveles de proteína determinados por Western blot. En la parte inferior se presenta el análisis densitométrico relativo a GAPDH, las barras representan el promedio de tres experimentos independientes y el error estándar. C) Regulación de PTEN en células tumorales xenotrasplantadas en modelos murinos. Los tumores obtenidos por los ensayos de diluciones limitantes *in vivo* fueron procesados para su análisis histológico y la presencia de PTEN fue determinada por inmunohistoquímica. Los tumores formados por células MCF-7 miR-Scr OE se caracterizan por la expresión de PTEN en color marrón, mientras que los tumores formados por células MCF-7 miR-10b OE pierden esta señal.

De manera importante, y como se muestra en la figura 24, la mutación del MRE para miR-10b en PTEN incrementa ligeramente (<2 razones de cambio) la sobreexpresión de PTEN en el contexto de sobreexpresión de miR-10b. El efecto en el incremento de PTEN es suficiente para inducir un decremento en la expresión relativa de SNAIL y SOX2, indicando que la regulación de PTEN es importante en las características de troncalidad de las células que sobreexpresan miR-10b y confirmando que la modulación de PTEN por miR-10b está controlada por el MRE ahora validado.

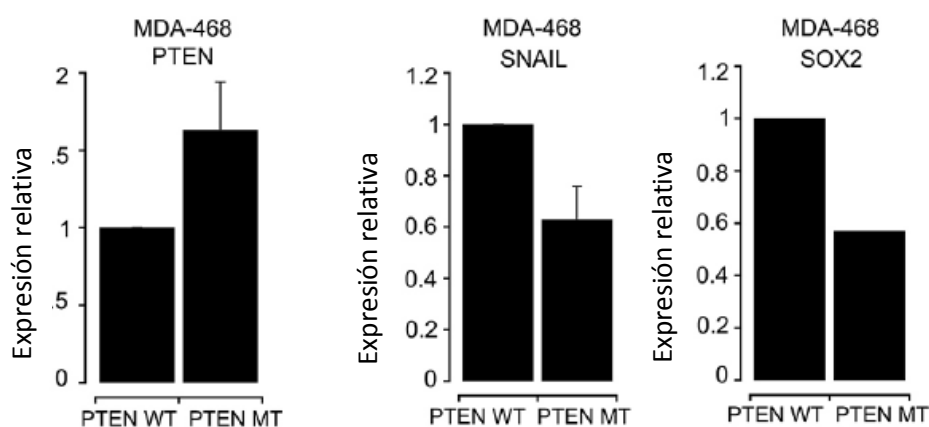


Figura 24. La mutación del MRE de PTEN compensa el efecto de regulación por miR-10b. Las células MDA-MB-468 fueron co-transfectadas con el vector miR-10b y los vectores de expresión PTEN o PTEN MT. La expresión relativa de PTEN y los marcadores SNAIL y SOX2 fue determinada por PCR de punto final utilizando la transfección de PTEN como calibrador. El promedio y error estándar obtenido de tres experimentos independientes es mostrado en las gráficas.

Efectos de la regulación negativa de PTEN y su relación con el fenotipo CTT.

Para probar la importancia de la pérdida de expresión de PTEN en el fenotipo CTT, se utilizó una estrategia de RNA interferente contra PTEN. Tres diferentes secuencias de RNA sustratos de DICER (dsiRNA), fueron evaluadas para inducir el silenciamiento de PTEN. El dsiRNA con mayor eficiencia de silenciamiento fue utilizado para analizar los efectos de la inhibición de PTEN y su relación con el fenotipo CTT.

Primero las células MCF7-miR-Scr OE fueron transitoriamente transfectadas con el PTEN dsRNA, y los efectos en la regulación de genes de pluripotencia y TEM fueron evaluados 24 horas después de la transfección. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 25A, la inhibición de PTEN (<0.25 razones de cambio) induce un incremento (>5 razones de cambio) en la expresión de OCT4 y SNAIL, pero no afecta a SOX2 y VIMENTINA. Este datos señalan que la inhibición de PTEN es importante para el mantenimiento parcial del fenotipo CTT.

Para apoyar estos datos, se evaluó la formación de mamoesferas por las células MCF-7 miR-Scr OE transfectadas de manera transitoria con PTEN dsRNA o su control, en un pasaje único, encontrando incremento significativo del número de mamoesferas formadas con la inhibición de PTEN (figura 25B).

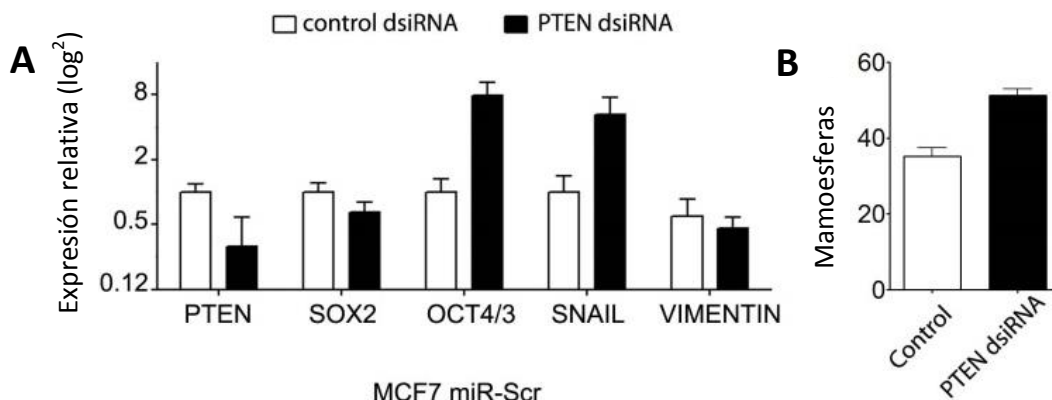


Figura 25. Efectos del silenciamiento transitorio de PTEN y su relación con el fenotipo CTT en células MCF-7 miR-Scr OE. A) perfil de expresión relativa a GAPDH de los genes de PTEN, marcadores de pluripotencia y de TEM. B) Número de mamoesferas formadas a partir de 2000 células después de diez días de cultivo. Las barras muestran el promedio obtenido de tres ensayos independientes y el error estandar.

En un segundo abordaje, se realizó la transfección transitoria de PTEN dsRNA en las células MCF-7 miR-10b OE, 24 horas después se comparó el efecto de la inhibición de PTEN (<0.5 razones de cambio, p<0.05) con la expresión de los genes de pluripotencia y

TEM. Como se muestra en la figura 26A, cambios de expresión significativos (>2 razones de cambio, $p < 0.05$) para los cuatro marcadores. Sin embargo, cuando se evaluó la capacidad de formar mamoesferas en estas condiciones no se encontraron diferencias significativas entre la transfección control y la condición PTEN dsiRNA, de acuerdo a lo presentado en la figura 26B.

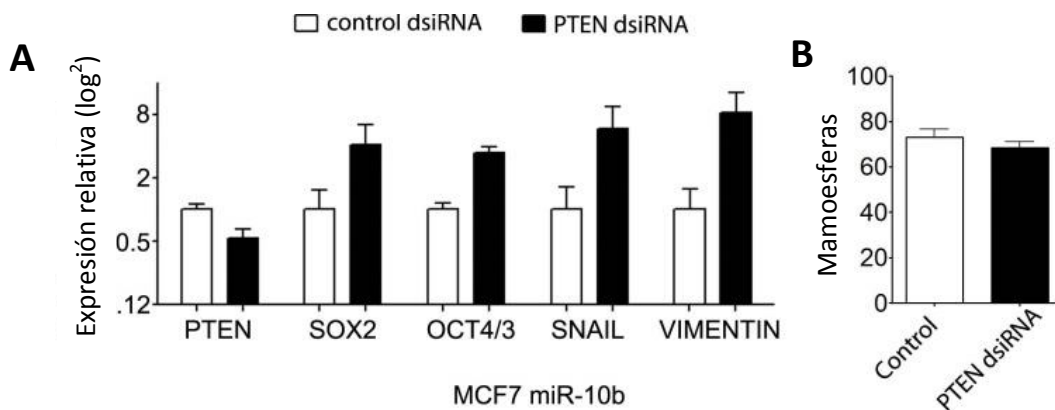


Figura 26. Efectos del silenciamiento transitorio de PTEN y su relación con el fenotipo CTT en células MCF-7 miR-10b OE. A) perfil de expresión relativa a GAPDH de los genes de PTEN, marcadores de pluripotencia y de TEM. B) Número de mamoesferas formadas a partir de 2000 células después de diez días de cultivo. Las barras muestran el promedio obtenido de tres ensayos independientes y el error estándar.

Por último, utilizamos la línea celular T47-D, cuya expresión relativa de miR-10b es casi del doble con respecto a MCF-7. En este contexto celular fue evaluada la capacidad de formación de mamoesferas utilizando diferentes fondos genéticos que se muestran en la figura 27.

Todas las condiciones fueron comparadas contra la transfección transitoria de un dsiRNA control. Brevemente, la inhibición de miR-10b inducida por la transfección transitoria del AntimiR-10b induce un decremento en el número de mamoesferas después de diez días de cultivo, demostrando que la capacidad de auto renovación puede ser mantenida por la expresión de miR-10b en la línea celular T-47D.

Por el contrario, la inhibición de PTEN dirigida por un dsiRNA aumenta considerablemente el número de mamoesferas con respecto a la transfección control, demostrando que la pérdida de PTEN puede favorecer la capacidad de auto renovación. De manera interesante, el incremento en la formación de mamoesferas dirigido por la pérdida de PTEN se mantiene a pesar de la cotransfección del anti-miR-10b.

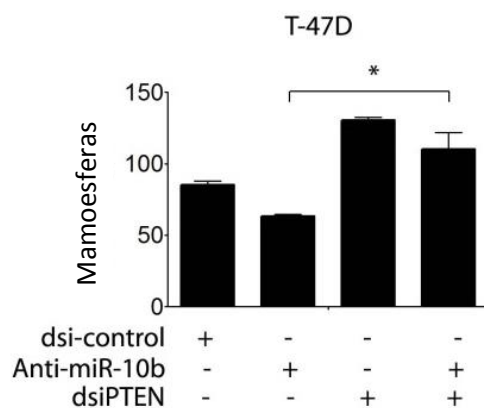


Figura 27. Efectos de la regulación negativa de PTEN y miR-10b en la capacidad de formación de mamoesferas formadas a partir de 2000 células T47D durante diez días. Las barras muestran el promedio de tres experimentos independientes y el error estándar. El asterisco marca un valor $p < 0.05$.

La expresión de miR-10b incrementa la activación de la vía PI3K/AKT en CTT.

PTEN ha sido catalogado como un gen supresor de tumores, su función mas descrita está relacionada al control negativo de la vía PI3K/AKT. A la vez esta vía de señalización ha sido reportada como un componente clave en el mantenimiento de las CTT de leucemia, así como de Cáncer de próstata y de mama [70, 119, 120].

Para analizar la participación de AKT en nuestro modelo, se utilizó un análisis de Western blot comparando la cantidad de AKT y su forma activa p-AKT (S473) en las células MCF7 sin clasificar y las fracciones celulares CD44- y CD44+, lo que se muestran en la figura 28. Un ligero incremento en la cantidad de AKT total puede apreciarse en las

células CD44+, pero de manera importante la forma activa es ligeramente visible o no detectada en las células totales o en la fracción CD44-, mientras que los niveles de p-AKT (S473) son fáciles de apreciar en la fracción enriquecida en CTT (MCF-7 CD44+). Esto indica que la activación de AKT puede ser mantenida en las CTT por algún mecanismo endógeno.

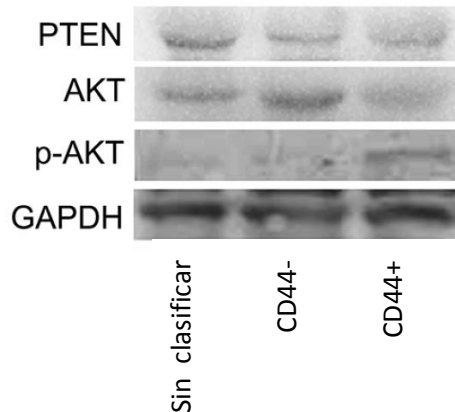


Figura 28. Expresión y activación de AKT medida por Western Blot en las células MCF-7 totales y fracciones CD44- y CD44+ (enriquecida en CTT).

Para evaluar si la expresión de miR-10b puede controlar la activación de AKT, las células con sobreexpresión de miRNAs fueron sometidas a un ensayo de activación de la vía PI3K/AKT. Brevemente, las células fueron cultivadas en ausencia de suero durante 18 horas y posteriormente expuestas, o no, a un estímulo de 20 $\mu\text{g/ml}$ de insulina [121]. Los niveles de proteína de diferentes efectores de la vía de señalización fueron determinados mediante Western Blot, como se muestra en la figura 29.

De manera semejante a lo reportado en apartados anteriores de esta tesis, los niveles de PTEN decremantan en las células MCF-7 miR-10b OE, En el mismo sentido, los niveles de PIK3CA, un regulador positivo rio arriba de AKT y la proteína total de AKT aumentan tras la expresión forzada de miR-10b. Sin embargo, p-AKT (S473) es

practicamente no detectable en las células MCF-7 miR-Scr OE cultivadas en ausencia de suero, pero se detecta tras la activación por suero o insulina.

En contraparte, la forma activa de AKT es detectable en las células MCF-7 miR-10 OE cultivadas con o sin suero (con una señal débil), indicando que la sobre expresión de miR-10b es suficiente para dirigir la activación de esta vía. De manera semejante, el estímulo de insulina incrementa notablemente la activación de AKT en el contexto de sobreexpresión de miR-10b, comparado con el efecto inducido en el contexto miR-Scr OE. Estos datos muestran una relación entre la expresión de miR-10b y la activación de AKT.

Para corroborar que la activación de la vía PI3K/AKT puede ser dirigida por la sobreexpresión de miR-10b, se realizó un ensayo de actividad de cinasa *in vitro*, que se muestra en el panel inferior de la figura 29. La forma activa de AKT (p-AKT S473) fue inmuno-precipitada a partir de los extractos celulares obtenidos en el ensayo de activación de AKT vía insulina. Posteriormente, fue probada la actividad de cinasa *in vitro*, de cada inmunoprecipitado en un sistema al cual se agregó como sustratos una proteína recombinante GSK3 (α - β fusionadas) y ATP frío, la reacción se incubó treinta minutos a 30°C. En este sistema la cantidad de p-GSK3 es un reflejo de la actividad de cinasa y el producto de reacción fue determinado por un inmunoblot contra la proteína p-GSK3 (S21/9).

Como se observa en el panel inferior de la figura 29, la actividad de cinasa fue detectada solo en los lisados de células MCF-7 miR-10b OE cultivadas en presencia de suero o con el estímulo de insulina, de manera interesantemente la fosforilación de GSK3 es mas marcada en condiciones de suero. La cantidad de AKT total y GSK3 total fue determinada en el lisado previo a la inmunoprecipitación.

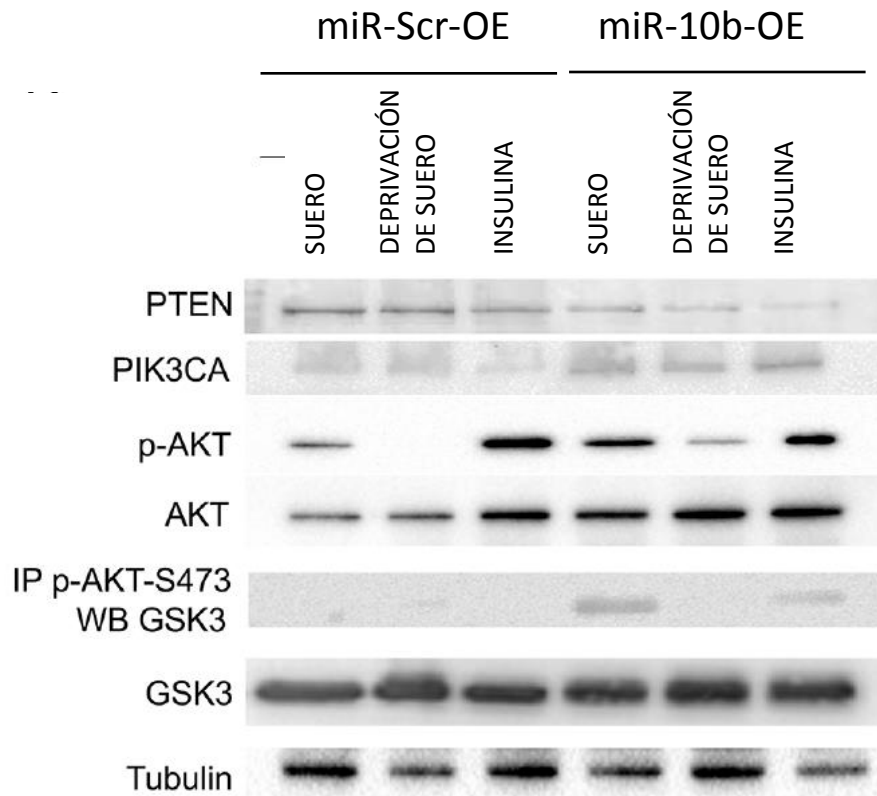


Figura 29. Regulación de los elementos de la vía PI3K/AKT por la sobreexpresión de miR-10b. Las células MCF-7 miR-Scr OE y MCF-7 miR-10b OE fueron cultivadas en ausencia de suero por 18 horas y posteriormente estimuladas con insulina para inducir la activación de AKT. Los niveles de proteína PTEN, PIK3CA, p-AKT fueron analizados por WB. En el panel inferior. Se realizó un ensayo de actividad de cinasa AKT, utilizando un inmunoprecipitado de p-AKT (S473) y una proteína quimérica GSK3 α - β como sustrato en una reacción *in vitro*. Los niveles de GSK-3 y tubulina muestran el control de carga del lisado original.

Para probar el impacto de la modulación de la AKT en la capacidad clonal de las CTT, las células MCF-7 fueron transfectadas de manera transitoria con Anti-miRs y posteriormente sembradas en un ensayo de formación de colonias en agar suave en presencia de diferentes moduladores de la vía PI3K/AKT; el número de colonias formadas en cada condición se muestra en la figura 30. Como activador de la vía fue utilizada la insulina a una concentración de 20 μ g/ml [121], mientras que la inhibición fue ensayada por tratamientos con Wortmannina y LY294002 [122, 123].

En las células CD44+ transfectadas con el AntimiR control la insulina no afecta la formación de colonias en comparación con el control sin tratamiento (mock). Sin embargo,

la inhibición de PI3K por Wortmannina y LY294002 induce un decremento marcado en el número de colonias formadas ($p < 0.05$), demostrando que la activación de la vía PI3K/AKT es importante para la capacidad clonal de las CTT. El decremento en la capacidad clonal producido por la inactivación en la vía es comparable con el efecto de la inhibición de miR-10b en CTT. De manera importante, el estímulo de insulina rescata parcialmente el efecto de la inhibición de miR-10b ($p < 0.05$), pero la inactivación de la vía no es aditiva a la inhibición del miRNA ($p > 0.05$).

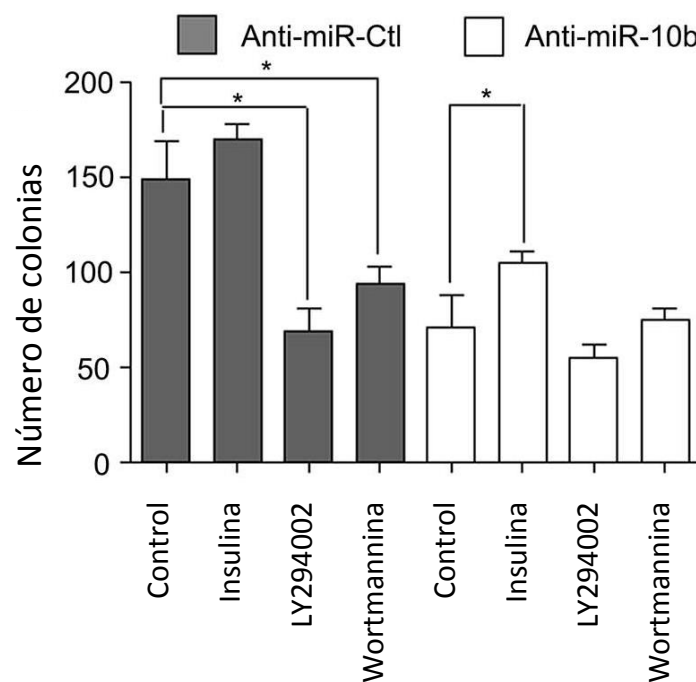


Figura 30. La capacidad clonal de las CTT está controlada por la activación sostenida AKT que a la vez es mantenida por sobreexpresión de miR-10b. Las células CD44+ fueron transfectadas con AntimiR correspondientes y sembradas en un ensayo de agar suave condicionado con tratamientos de activación (insulina) o inhibición (Wortmannina y LY294002) de la vía PI3K/AKT. * $p < 0.05$.

Por último, para comprobar que la modulación de la vía AKT producida por la sobreexpresión de miR-10b puede tener efectos en las capacidades troncales, las células con sobreexpresión estable de miRs fueron sembradas en ensayos de formación de colonias en agar suave en condiciones de activación o inhibición de la vía PI3K/AKT.

Los resultados mostrados en la figura 31, demuestran que la capacidad clonal de las células MCF-7 miR-Scr OE son limitadas, pero estas células son afectadas aún más por la inactivación de la vía PI3K/AKT. De forma interesante, las células MCF-7 miR-10b OE incrementan su capacidad clonal respecto a su control, pero este aumento puede ser parcialmente bloqueado a través de la inactivación de la vía PI3K/AKT a través de los tratamientos con Wortmannina y LY294002. Este dato indica que la activación de la vía AKT es indispensable para el mantenimiento de la exacerbada capacidad clonal de las células MCF-7 miR-10b-OE.

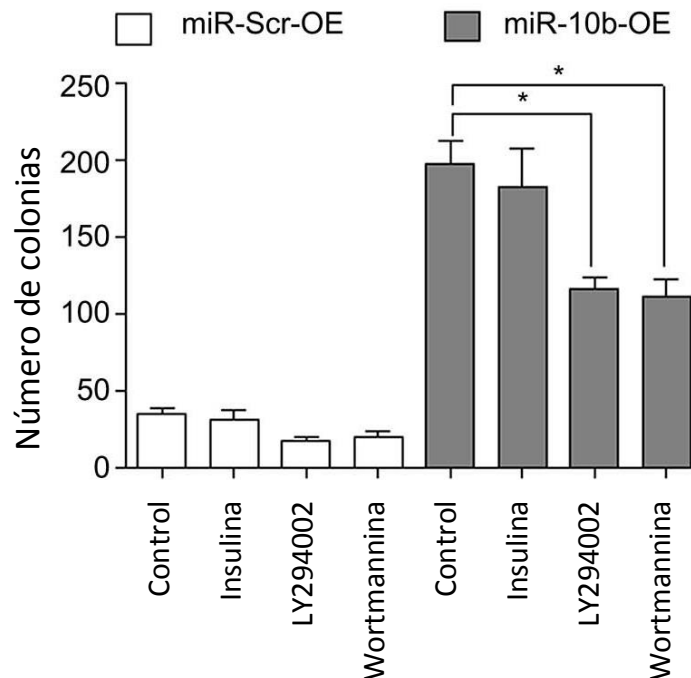


Figura 31. La capacidad clonal de las células MCF-7 miR-10b OE es controlada por la activación de sostenida AKT. Las células MCF-7 miR-Scr OE y MCF-7 miR-10b OE fueron sembradas en un ensayo de agar suave condicionado con tratamientos de activación (insulina) o inhibición (Wortmannina y LY294002) de la vía PI3K/AKT.

DISCUSIÓN:

Aislamiento y caracterización de CTT derivadas de líneas celulares de cáncer de mama.

De acuerdo a diferentes reportes, es posible aislar CTT a partir de líneas celulares establecidas, este hecho nos permitió trabajar con una fuente constante de CTT con diferentes características dependiendo de la línea celular de origen. Los inmunofenotipos determinados en este trabajo, corresponden con los reportados por varios grupos de investigación [110]

De manera importante, el análisis de estos inmunofenotipos abrió la posibilidad de enriquecer poblaciones CTT utilizando clasificaciones celulares basadas en la expresión de un solo antígeno. La clasificación celular activada por magnetismo es un método sencillo y de alto rendimiento que nos permite obtener poblaciones enriquecidas en CTT en cantidad suficiente para el desarrollo de pruebas funcionales y no requiere de equipo especializado como los sistemas clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Las capacidades troncales de las poblaciones enriquecidas fueron probadas a través de una batería de pruebas que nos permite evaluar las características del fenotipo troncal tumoral, es decir un incremento en las capacidades clonal, tumorigénica, de plasticidad celular y de potencial de auto renovación. En todas las pruebas la fracción CD44+ de la línea celular MCF-7 muestra ser la fracción enriquecida en CTT, este dato corresponde con reportes de otros grupos de investigación [13, 124].

Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231, todas las pruebas realizadas indican que la fracción EpCAM+ posee un enriquecimiento de CTT. La expresión de

EpCAM ha sido utilizada para reconocer poblaciones CTT en tumores de adenocarcinomas mamarios de origen basal y triples negativos [125, 126].

Identificación de metasta-miR reguladores del fenotipo CTT.

Una vez identificadas las poblaciones celulares enriquecidas en CTT, el perfil de expresión de 353 miRNA maduros fue comparado entre las poblaciones CTT y la línea celular completa. En el análisis de expresión es fácil notar que existen más diferencias de expresión en la comparación entre poblaciones luminales, donde 142 miRNAs tienen una razón de cambio significativa. Estos resultados pueden explicarse con base en el bajo contenido de CTT en la línea celular MCF-7. Por otro lado, las células luminales son poco agresivas y mantienen un estado de diferenciación dependiente de estrógenos, por lo que su perfil global de expresión debe ser muy distinto al de las CTT [114].

En contraparte, la línea celular MDA-MB-231 ha sido reportada con un perfil de expresión semejante al de progenitores luminales y con una alta cantidad de CTT [12, 127]. En este sentido, es fácil intuir que los cambios de expresión global serán discretos entre la línea total y las CTT (~19% de la población). Es importante resaltar que los cambios de expresión de marcadores de pluripotencia y TEM son menos marcados en la población CTT de MDA-MB-231, comparada con su control. Solo 9 miRNAs tienen una razón de cambio significativa en la comparación de células basales. Interesantemente todos estos miRNA son regulados también en la CTT luminales, como se muestra en la figura 9.

En un primer análisis, la lista de miRNAs que comparten cambios de expresión con respecto a su control muestra varios reguladores del fenotipo metastásico. De manera importante, se ha reportado que la activación de TWIST puede controlar de manera positiva la expresión de uno de estos miRNAs. La participación de TWIST en la

metástasis tumoral de mama, en la TEM y en el control del fenotipo CTT, ha sido ampliamente descrita en la literatura [128, 129].

La firma de expresión reportada para miR-10b fue analizada en las fracciones celulares CD44- y CD44+ de MCF-7. En este contexto, la sobreexpresión de TWIST y RHOC fue confirmada en la población enriquecida en CTT como se muestra en la figura 8 en el panel superior y 10A respectivamente, mientras que la expresión de HOXD10 disminuye en la población CTT (Figura 10 A). Estos datos indican la sobreexpresión de miR-10b en CTT y establecen que este miRNA puede ser un regulador común en células metastásicas y CTT.

El incremento en la expresión de miR-10b en CTT con respecto a la línea total fue comprobado para las dos líneas celulares a través de qPCR en ensayos individuales (figura 10B y 10 C).

La expresión de miR-10b controla la capacidad de auto renovación y la firma de expresión Pluripotencia/TEM en CTT.

Para determinar si la expresión de miR-10b puede regular el fenotipo troncal tumoral, se desarrolló un abordaje de pérdida-ganancia de función. En la primera parte, las células enriquecidas en CTT de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 fueron transfectadas de manera transitoria con antagomiR sintéticos. Utilizando métodos de transfección comunes es posible introducir antagomiRs en cerca del 100% de las células, mientras que la inhibición de la expresión es cercana al 75%.(figura 11).

La participación de miR-10b en el mantenimiento de la capacidad de auto renovación es demostrada por la pérdida en la capacidad de formación de mamoesferas producida tras la inhibición de la expresión de miR-10b en ambas poblaciones de CTT.

De manera importante estos datos se apoyan en los cambios de expresión de producidos por la regulación negativa del miRNA en tres contextos celulares distintos. Como se muestra en la figura 14, la expresión relativa de los marcadores de pluripotencia y TEM decrece tras 24 horas de inhibición de miR-10b. Estos datos demuestran la importancia de la expresión de miR-10b para el correcto mantenimiento de las capacidades tumorales de diferentes células, sin embargo, es de resaltar que en la población CTT los cambios son más discretos y solo OCT4 y VIMENTIN tienen una razón de cambio significativa.

Otras características del fenotipo CTT son también afectadas tras la inhibición de miR-10b, como la capacidad clonal demostrada por los ensayos de formación de colonias en agar suave, o la metástasis estudiada por ensayos de cicatrización. En conjunto, todos estos datos muestran la importancia de miR-10b en el mantenimiento de las capacidades que definen a una CTT.

La sobreexpresión de miR-10b induce el incremento en la proporción de CTT y el aumento en características troncales en líneas celulares MCF-7 y SKBR-3.

Sumado a lo que ocurre tras la inhibición de miR-10b en CTT, la sobreexpresión de miR-10b puede inducir el incremento en diferentes características de troncalidad. En un primer abordaje, se analizaron los cambios de expresión producidos por la sobreexpresión de miR-10b. De manera interesante, la sobreexpresión de miR-10b induce la sobreexpresión de SOX2, OCT4 y VIMENTIN en las líneas celulares MCF-7 y SKBR-3, mientras que SNAIL incrementa solo en el contexto de MCF-7. Estos cambios de expresión podrían ser un reflejo del incremento en las capacidades troncales de cada línea celular.

Sumado a los cambios de expresión ya mencionados, el porcentaje de CTT incrementa en cada línea celular tras la sobreexpresión de miR-10b, determinada por el número de células positivas a CD44. El incremento de CTT en la línea celular está acompañado por un incremento en la capacidad clonal y de proliferación de MCF-7, por lo que podemos concluir que la sobreexpresión forzada de miR-10b incrementa la proporción de CTT en la línea celular, pero también incrementa las capacidades troncales en la línea celular completa.

Para reforzar estos datos, las células MCF-7 con sobreexpresión de miR-10b fueron seleccionadas para obtener un sistema de sobreexpresión estable de miR-10b (MCF-7 miR-10b OE). Estas células, fueron retadas a formar mamoesferas en medios condicionados por tres pasajes seriados. Las células con sobreexpresión de miR-Scrambled o control muestran una menor capacidad de formación de colonias en comparación del contexto de sobreexpresión de miR-10b, en cada pasaje, demostrando que la sobreexpresión de miR-10b puede incrementar la capacidad de auto renovación en las células MCF-7.

Finalmente el incremento en el número de CTT fue confirmado a través de un ensayo de diluciones limitantes *in vivo* utilizando ratones nu/nu, el aumento en el número de CTT es significativo ($p=0.04$) en las células miR-10b OE respecto al control miR-Scr OE. Este comportamiento no es exclusivo de una línea celular ya que la sobreexpresión de miR-10b en células SKBR-3 también produce un incremento significativo en la cantidad de CTTs determinado por ensayos *in vivo* ($p=0.007$). Estos datos proponen que miR-10b puede mantener el fenotipo CTT en diferentes subtipos de cáncer de mama.

La regulación del fenotipo CTT involucra el control negativo de PTEN por miR-10b.

Diferentes argumentos apuntan a PTEN como un posible blanco de miR-10b con implicaciones en el mantenimiento del fenotipo CTT.

Primero, pocos oncogenes se encuentran en la lista de posibles blancos de miR-10b.

Segundo, TargetScan, miRanda y ComiR coinciden en la predicción de PTEN como blanco.

Tercero, ha sido demostrado que la regulación negativa de PTEN puede mantener el fenotipo CTT en próstata y leucemia [130, 131].

Cuarto, la inducción de miR-10b y la regulación a la baja de PTEN ha sido demostrada como efecto de la exposición de TGF- β en células de glioblastoma [132].

En este sentido fue analizada la posibilidad de que miR-10b pueda mantener el fenotipo CTT a través de la inhibición de PTEN. Sin embargo, dentro de los posibles blancos compartidos por los mismos programas podemos encontrar a PI3KCA cuyo papel descrito es opuesto al de PTEN. Para resolver esta incognita se desarrolló una serie de experimentos para la validación de blancos de miR-10b, que se muestran en el apartado de resultados.

Utilizando un diseño de ensayos reporteros en los que la actividad de luciferasa puede ser reflejo de la modulación de miR-10b, se demostró que el MRE de PTEN pero no el de PIK3CA puede ser reconocido por miR-10b, produciendo una disminución en los niveles de actividad de luciferasa de manera semejante a lo que ocurre con la presencia del MRE de HOXD10.

Para demostrar la regulación de PTEN por miR-10b, se utilizó una serie de estudios de análisis de pérdida y ganancia de función de miR-10b, en los que la regulación de PTEN y PIK3CA fue analizada a nivel de mRNA y proteína. Utilizando 5 contextos de regulación génica, (sobrexpresión de miR-10b en MCF-7 y SKBR-3, inhibición de miR-10b en T-47D, MDA-MB-231 y MCF-7 CD44+) a través de este abordaje se demostró que los niveles de PTEN correlacionan de manera inversa con la expresión de miR-10b ($r=-0.8$) mientras que no se encuentra una correlación significativa entre la

expresión de PIK3CA y miR-10b ($r=0.43$), este dato muestra que la relación entre miR-10b y PTEN se da en diferentes contextos celulares de cáncer de mama y que implica un mecanismo de regulación de la cantidad de RNAs.

Sumado a esto, los niveles de proteína de PTEN fueron analizados por Western Blot tras la modulación de miR-10b, de manera importante la sobreexpresión de miR-10b en SKBR-3 y MCF-7 produce una disminución de PTEN a nivel de proteína, mientras que la transfección con anti-miR-10b permite un incremento en los niveles de proteína en MCF-7 y T-47D. La modulación de PTEN por miR-10b fue confirmada también en las muestras de tumores inducidos por las células miR-10b EO, la regulación de miR-10b de manera efectiva controla a nivel de mRNA la expresión de PTEN, esta regulación consolida un control de los niveles de PTEN en las células de cáncer de mama.

Estos datos sustentan la regulación de PTEN por miR-10b y proponen que este mecanismo puede explicar la participación de miR-10b como factor de troncalidad en el cáncer de mama.

La expresión de PTEN regula de manera negativa el fenotipo CTT.

Para corroborar que la regulación de PTEN puede ser dirigida por miR-10b a través del MRE caracterizado. El marco de lectura abierto de PTEN mas una fracción del 3'UTR que contiene el MRE fue clonado y sobreexpresado en un contexto celular de MDA-MB-468 con sobreexpresión de miR-10b, encontrando que la sobreexpresión de PTEN es favorecida tras la mutación del MRE. Este aumento de expresión fue acompañado de la modulación negativa de SNAIL y SOX2.

Es importante establecer que si bien la interacción de miR-10b ha sido atribuida al MRE y validada a través de los ensayos reporteros, resulta trascendental demostrar que la regulación PTEN por miR-10b ocurre en el mRNA de PTEN y no solo en un sistema artificial. Esta hipótesis fue probada a través de ensayos de sobreexpresión del mRNA de PTEN.

Utilizando una construcción de expresión ectópica de PTEN que incluye el marco de lectura abierto y la fracción del 3'UTR que contiene el MRE para miR-10b, y una variante de esa construcción donde el MRE se encuentra mutado, se demostró que la

disminución de PTEN por miR-10b depende de la secuencia MRE, ya que la mutación de esta secuencia permite un incremento en los niveles de mRNA de PTEN que va acompañado de un decremento de la expresión de algunos de los factores de troncalidad como SNAIL y SOX2. Este experimento demuestra que la secuencia MRE en PTEN es suficiente para inducir el silenciamiento de este mRNA por miR-10b y que la regulación no es un artefacto detectado por el sistema de expresión de genes reporteros.

El papel de regulación negativa de PTEN en el fenotipo CTT ha sido establecido en diferentes modelos, sin embargo, no ha sido relacionado con la regulación por miR-10b. Para evaluar esta idea en un primer abordaje las células MCF-7 miR-Scr OE fueron transfectadas con un RNAi para PTEN. La interferencia de PTEN consigue el incremento en la expresión de OCT4 y SNAIL, así como un aumento en el número de mamoesferas que es reflejo del incremento de la capacidad de auto renovación. Estos cambios corresponden parcialmente con el efecto conseguido por la sobreexpresión de miR-10b.

Por otro lado, la interferencia de PTEN es menor en el trasfondo genético de sobreexpresión de miR-10b, probablemente por un efecto competitivo entre el siRNA y miR-10b. Sin embargo esta disminución de PTEN favorece la expresión de todos los marcadores del fenotipo troncal tumoral, pero no afecta la capacidad de auto renovación de las células MCF-7 miR-10b OE, este resultado indica que la regulación de PTEN que puede estar relacionada con el control de la expresión de los marcadores CTT, pero también muestra que la inhibición de este gen no ejerce un efecto aditivo en la capacidad de auto renovación producida por la sobreexpresión de miR-10b.

Por último, la inhibición de miR-10b produce la disminución de mamoesferas en CTT de MCF-7, pero también en células T-47D, al contrario la interferencia de PTEN induce un incremento en la capacidad de auto renovación en esta línea. De manera interesante, la interferencia de PTEN rescata parcialmente la pérdida en el potencial de auto renovación producido por la inhibición de miR-10b demostrando que la capacidad de auto renovación inducida por miR-10b puede ser mantenida a través de la inhibición de PTEN.

La expresión de miR-10b incrementa la activación de AKT.

La sobre activación de la cinasa AKT es una marca frecuente del proceso de transformación celular y es el posible mecanismo por el que la sobreexpresión de miR-10b puede estar relacionada con un incremento en el potencial tumoral. La fosforilación en la serina 473 ha sido demostrada como una marca de la activación de AKT [133].

La fosforilación S473 en AKT en células CTT pero no en otras fracciones celulares, fue demostrada a través de ensayos de Western Blot mostrados en la figura 28, este hecho coincide con la sobre expresión de miR-10b en estas mismas células por lo que surge la hipótesis de que la regulación de PTEN por miR-10b podría ser un mecanismo de regulación positivo en la activación de la vía PI3K/AKT.

Diferentes datos apoyan esta idea, por ejemplo, la activación de AKT fue estudiada a mayor detalle en las células MCF-7 con sobreexpresión estable de miRNAs, en estas células, se probó la capacidad de activar la vía utilizando cultivos en condiciones libres de suero y un estímulo inductor de la vía de señalización en cuestión. Los niveles de proteína de PTEN (bajos), de PIK3CA y de AKT total (altos) corresponden con un estado de activación de AKT en los sistemas con sobreexpresión de miR-10b.

De manera importante la activación de AKT es favorecida por la sobreexpresión de PTEN en todos los tratamientos cuando se compara con los niveles de activación en las células con sobreexpresión del miRNA-Scrambled. Es importante resaltar que la sobreexpresión de miR-10b es suficiente para mantener la activación de AKT a pesar de las condiciones de cultivo libre de suero, mostrando que la sobreexpresión de miR-10b puede favorecer la activación de esta vía o al menos la fosforilación de la serina 473 en AKT.

La regulación de la actividad de AKT depende al menos de diferentes modificaciones postraduccionales, entre ellas la fosforilación de tres residuos de aminoácidos como son treonina 308 (T308), treonina 450 (t450) y serina 473 (S473). Si bien la activación de la cinasa está relacionada con la fosforilación en S473, la fosforilación en T308 puede estabilizar esta actividad necesaria para la transformación celular [133]. Por tales motivos, es posible que la fosforilación de la serina 473 no sea necesariamente un indicio de actividad de cinasa, para descartar esta idea, se analizó la actividad de cinasa *in vitro* de un inmunoprecipitado de anti-p-AKT Ser473, de manera

importante, la actividad de cinasa solo fue demostrada en los extractos de células MCF-7 miR-10b OE con algún estímulo de activación de AKT, es decir crecidas en suero o con insulina, pero no en inanición. Este resultado es la prueba fehaciente de que la sobreexpresión de miR-10b puede inducir la activación de la vía de señalización PI3K/AKT a través del control de PTEN, el regulador negativo de esta vía en cuestión.

Las implicaciones en la regulación de la vía PI3K/AKT son diversas, y algunas se han abordado a lo largo de este trabajo. Si la modulación de la expresión de miR-10b en las CTT puede impactar en la activación de la vía PI3K/AKT, es posible que algunas de las características de este fenotipo puedan ser controladas a través de la modulación de la vía.

La participación de la vía PI3K/AKT ha sido ampliamente revisada en cáncer. Diferentes inhibidores han sido desarrollados con posibles fines de tratamiento para diferentes tipos de cáncer, entre ellos Wortmannina y LY294002 son dos moléculas ampliamente descritas como inhibidores de la función de PI3KCA [122, 123]. Los datos presentados en este trabajo, demuestran que las células CTT son sensibles a estos tratamientos. El potencial clonal en estas células disminuye tras la inhibición de PI3KCA.

La inhibición de miR-10b induce también un decremento en la capacidad clonal de las CTT, de manera interesante. La inducción de la vía PI3K/AKT por un estímulo de insulina, rescata parcialmente la pérdida en el potencial clonal tras la inhibición de miR-10b, estableciendo una relación entre la expresión de este microRNA y la activación de la vía. Por otro lado, no existe un afecto sumatorio entre el tratamiento con los inhibidores de PI3KCA y la inhibición de miR-10b, por lo que es probable pensar que existen otros mecanismos que mantienen el potencial tumoral cuando se inhibe la vía PI3K/AKT.

La relación entre la expresión de miR-10b y la activación de la vía PI3K/AKT fue ampliamente discutida en este trabajo. La sobreexpresión de miR-10b y la activación de la vía incrementan la capacidad clonal de las células de cáncer de mama, sin embargo, no es posible encontrar un efecto sumatorio a través de los tratamientos conjuntos. Este hecho es probablemente un indicio de que la activación de la vía a través de la sobreexpresión de miR-10b es suficiente para inducir el mismo efecto que provoca el estímulo de insulina.

El efecto de la sobreexpresión de miR-10b en el incremento del potencial clonal es dependiente de la correcta activación de la vía PI3K/AKT, esto se respalda en la pérdida de la capacidad clonal de las células MCF-7 miR-10b OE tratadas con los inhibidores Wortmaninina y LY294002. Por lo tanto, la regulación de miR-10b controla la activación de la vía PI3K/AKT a través de la regulación negativa de PTEN.

El papel de miR-10b en la regulación del fenotipo CTT es resumido en la figura 32. Brevemente, las CTT luminales se caracterizan por la expresión de CD44 en su membrana celular, CD44 es un receptor de ácido hialurónico que puede interactuar con otros receptores membranales, entre ellos los receptores de unión a factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) y receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR) [134, 135]. Estos factores de crecimiento pueden dirigir la señalización de PI3K/AKT. La activación de esta vía puede ser mantenida por la sobreexpresión de miR-10b quien a la vez regula de manera negativa la expresión de PTEN y permite la activación de AKT. La regulación de la expresión de miR-10b puede ser mantenida en las CTT a través de la participación de TWIST [65] y probablemente por la activación de la vía NF- κ B, de acuerdo a un análisis de predicción de unión de factores de transcripción en el promotor individual de miR-10b. La activación de AKT puede a la vez activar la vía de NF- κ B, por lo que es probable que el mantenimiento de este circuito de regulación miR-10b/AKT/NF- κ B funcione como un mecanismo de regulación positiva en las células que expresan CD44.

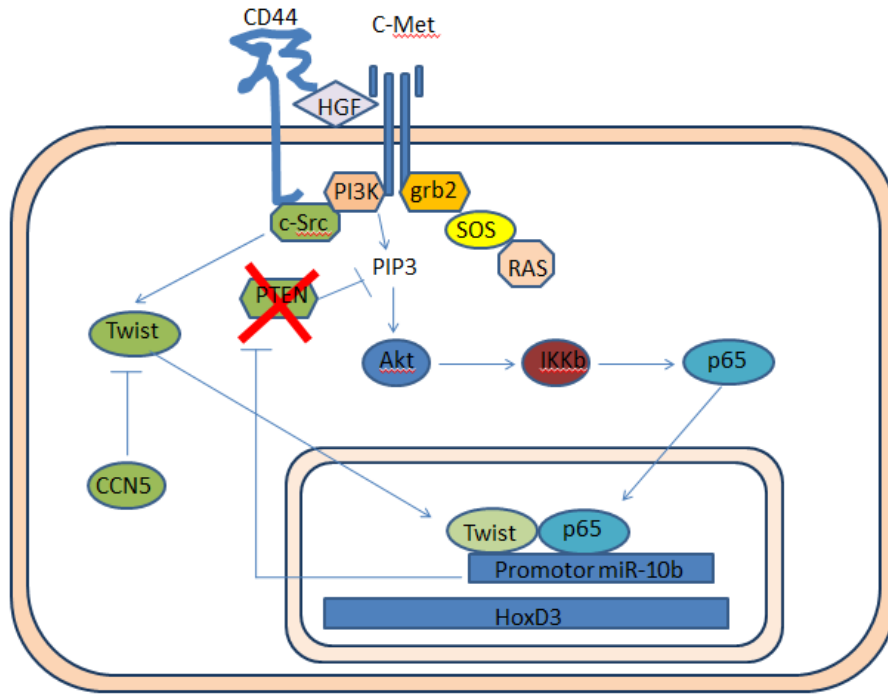


Figura 32. Mecanismo de regulación de la activación de la vía PI3K/AKT mediado por miR-10b en CTT.

CONCLUSIONES:

En la última década, el estudio de las CTT ha logrado cambiar la visión de la biología del cáncer, particularmente el fenómeno de reincidencia, la formación de tumores secundarios y el surgimiento de tumores quimio y radio resistentes pueden ser explicados a través de un modelo jerárquico del cáncer.

El estudio de las CTT puede ser abordado a través de su obtención en líneas celulares ya establecidas y particularmente el uso de marcadores adecuados es un tema que aún debe ser estudiado. En el presente trabajo el uso de diferentes marcadores membranales permitió enriquecer la cantidad de CTT a través de ensayos de MACS, este hecho permitió obtener cantidades de CTT suficientes para diferentes análisis funcionales y moleculares.

Los perfiles de expresión de las poblaciones enriquecidas en CTT son muy distintos en comparación con el perfil de expresión de la línea celular de la cual derivan, esto permite utilizar la expresión de marcadores de pluripotencia y TEM como indicadores de diferentes características troncales de nuestras poblaciones estudiadas.

De manera importante la expresión de miRNAs cambia en las CTT con respecto a la línea de la cual derivan. Los miRNAs diferencialmente expresados pueden ser reguladores de los procesos adecuados para el mantenimiento del fenotipo CTT. Particularmente miR-10b fue seleccionado para un estudio más profundo por su documentada participación en la promoción de la metástasis.

Los datos presentados en este trabajo sustentan la hipótesis de la participación de miR-10b en el control de los procesos necesarios para el mantenimiento del fenotipo CTT. Particularmente la modulación de miR-10b de manera positiva mantiene la capacidad de auto renovación, la expresión de marcadores troncales, el potencial clonal y el potencial de auto renovación.

La expresión de miR-10b está relacionada a las CTT, particularmente en los tumores luminales la expresión de este miRNA se encuentra favorecida en células CD44+, de manera semejante la expresión forzada de miR-10b induce un aumento en la proporción de células CD44+.

Los efectos de miR-10b en la regulación del fenotipo CTT son dirigidos por la inhibición de PTEN, un gen supresor de tumores ampliamente estudiado. La modulación de PTEN puede también regular las capacidades troncales de las células de cáncer de mama, ya que la inhibición por dsiRNA incrementa dichas capacidades mientras que la sobreexpresión del marco de lectura abierto regula al menos la sobreexpresión de marcadores troncales.

Por último, la regulación de PTEN incide directamente en el control de la señalización de PI3K/AKT, esta vía ha sido descrita como un importante regulador de la transformación celular, favoreciendo la evasión de la apoptosis, el potencial tumorigénico y la metástasis. La modulación de miR-10b corresponde con la regulación positiva de esta vía, es importante resaltar que la sobreexpresión de miR-10b de manera eficiente induce la sobre activación de la función de cinasa de AKT de manera semejante a los efectos obtenidos a través de su activación por la insulina.

La alta expresión de miR-10b ha sido relacionada con un mal pronóstico y reincidencia en cáncer de mama a través de un análisis retrospectivo partiendo de los datos de dos estudios [136, 137]. Estos datos proponen que la participación de miR-10b puede ser utilizado como un marcador la presencia de CTT en tumores mamarios. La aplicación de estrategias producción y liberación de antimiRs ha sido evaluada en modelos murinos con la finalidad de atacar células metastásicas [66], sin embargo, nuestros datos sugieren que la inhibición de miR-10b podría ser una estrategia para combatir las CTT de mama y la reincidencia tumoral.

El uso de inhibidores de PI3K para la inactivación de AKT podría ser empleado como terapia contra CTT, diferentes compuestos pueden favorecer la entrada de fármacos a las CTT. Por ejemplo el uso de probenecid mas cisplatino, favorece la muerte de CTT de diferentes tumores [138]. Por lo que esquemas de tratamiento de inhibidores de la vía PI3K/AKT mas probenecid podrían ayudar en el control de la reincidencia tumoral producida por las CTT.

Bibliografía.

1. Knaul, F.M., et al., *Breast cancer in Mexico: a pressing priority*. *Reprod Health Matters*, 2008. **16**(32): p. 113-23.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*.
3. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-752.
4. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
5. Pérez-Michel, L.M.d.I.A.G.-L., Martha;Ornelas-Aguirre, José Manuel, *Recurrencia de cáncer de mama en mujeres del Noroeste de México*. *Cirugía y Cirujanos*, 2009. **77**(3): p. 179-185.
6. Braunstein, L.Z., et al., *Outcome following local-regional recurrence in women with early-stage breast cancer: impact of biologic subtype*. *Breast J*, 2015. **21**(2): p. 161-7.
7. Brooks, M.D., M.L. Burness, and M.S. Wicha, *Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer*. *Cell Stem Cell*, 2015. **17**(3): p. 260-71.
8. Koren, S. and M. Bentires-Alj, *Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy*. *Mol Cell*, 2015. **60**(4): p. 537-46.
9. Dawood, S., L. Austin, and M. Cristofanilli, *Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy*. *Oncology-New York*, 2014. **28**(12): p. 1101-+.
10. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-111.
11. Shackleton, M., et al., *Generation of a functional mammary gland from a single stem cell*. *Nature*, 2006. **439**(7072): p. 84-88.
12. Keller, P.J., et al., *Defining the cellular precursors to human breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(8): p. 2772-7.
13. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
14. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(2): p. R25.
15. Munoz, P., M.S. Iliou, and M. Esteller, *Epigenetic alterations involved in cancer stem cell reprogramming*. *Molecular Oncology*, 2012. **6**(6): p. 620-636.
16. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
17. Ben-Porath, I., et al., *An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors*. *Nature Genetics*, 2008. **40**(5): p. 499-507.
18. Wang, M.-L., S.-H. Chiou, and C.-W. Wu, *Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor*. *Oncotargets and Therapy*, 2013. **6**: p. 1207-1220.
19. Stolzenburg, S., et al., *Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(14): p. 6725-40.
20. Gabay, M., Y. Li, and D.W. Felsher, *MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014. **4**(6).
21. Chaffer, C.L., et al., *Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(19): p. 7950-5.
22. Honeth, G., et al., *The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(3): p. R53.

23. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. *Genes Dev*, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
24. Moitra, K., H. Lou, and M. Dean, *Multidrug Efflux Pumps and Cancer Stem Cells: Insights Into Multidrug Resistance and Therapeutic Development*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2011. **89**(4): p. 491-502.
25. Goodell, M.A., et al., *Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species*. *Nature Medicine*, 1997. **3**(12): p. 1337-1345.
26. Hirschmann-Jax, C., et al., *A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(39): p. 14228-14233.
27. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters*. *Nature Reviews Cancer*, 2002. **2**(1): p. 48-58.
28. Ma, I. and A.L. Allan, *The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells*. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2011. **7**(2): p. 292-306.
29. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(5): p. 555-567.
30. Zhang, M., et al., *Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer*. *Cancer Research*, 2008. **68**(12): p. 4674-4682.
31. Zhang, M., R.L. Atkinson, and J.M. Rosen, *Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(8): p. 3522-3527.
32. Luo, M., M. Brooks, and M.S. Wicha, *Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance*. *Curr Pharm Des*, 2015. **21**(10): p. 1301-10.
33. Balic, M., et al., *Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(19): p. 5615-21.
34. Thapa, R. and G.D. Wilson, *The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 2087204.
35. Rodriguez-Torres, M. and A.L. Allan, *Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors*. *Clin Exp Metastasis*, 2016. **33**(1): p. 97-113.
36. Liu, R., et al., *The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(3): p. 217-26.
37. Rosenthal, D.T., et al., *RhoC impacts the metastatic potential and abundance of breast cancer stem cells*. *PLOS One*, 2012. **7**: p. e40979.
38. Phillips, T., *Regulation of Transcription and Gene Expression in Eukaryotes*. *Nature Education* 2008. **1**(1): p. 199-201.
39. Sproul, D., N. Gilbert, and W.A. Bickmore, *The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(10): p. 775-81.
40. Remenyi, A., H.R. Scholer, and M. Wilmanns, *Combinatorial control of gene expression*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(9): p. 812-5.
41. Struhl, K., *Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes*. *Cell*, 1999. **98**(1): p. 1-4.
42. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(6): p. 465-76.
43. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(24): p. 3966-73.

44. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
45. 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.
46. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
47. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
48. Diederichs, S. and D.A. Haber, *Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1097-108.
49. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
50. Lytle, J.R., T.A. Yario, and J.A. Steitz, *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9667-72.
51. Peters, L. and G. Meister, *Argonaute proteins: mediators of RNA silencing*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 611-23.
52. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
53. Zipprich, J.T., et al., *Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression*. Rna, 2009. **15**(5): p. 781-93.
54. Eulalio, A., F. Tritschler, and E. Izaurralde, *The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing*. Rna, 2009. **15**(8): p. 1433-42.
55. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
56. Wang, B., A. Yanez, and C.D. Novina, *MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5343-8.
57. Braun, J.E., et al., *GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets*. Mol Cell, 2011. **44**(1): p. 120-33.
58. Wahle, E. and G.S. Winkler, *RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(6-7): p. 561-70.
59. Houseley, J. and D. Tollervey, *The many pathways of RNA degradation*. Cell, 2009. **136**(4): p. 763-76.
60. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde, *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 9-22.
61. Xu, N., et al., *MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells*. Cell, 2009. **137**(4): p. 647-58.
62. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
63. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
64. Hurst, D.R., M.D. Edmonds, and D.R. Welch, *Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7495-8.
65. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. Nature, 2007. **449**: p. 682-688.
66. Ma, L., et al., *Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(4): p. 341-7.

67. Zhu, S., et al., *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis*. Cell Res, 2008. **18**(3): p. 350-9.
68. Si, M.L., et al., *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2799-803.
69. Qi, L., et al., *Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 163.
70. Han, M., et al., *Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39520.
71. Guttilla, I.K. and B.A. White, *Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23204-16.
72. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
73. Ivanovska, I., et al., *MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(7): p. 2167-74.
74. Zhang, C.M., J. Zhao, and H.Y. Deng, *MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1*. J Biomed Sci, 2013. **20**: p. 79.
75. Kong, W., et al., *MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(22): p. 6773-84.
76. Kong, W., et al., *MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17869-79.
77. Jiang, S., et al., *MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3119-27.
78. Rao, X., et al., *MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways*. Oncogene, 2011. **30**(9): p. 1082-97.
79. le Sage, C., et al., *Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation*. Embo j, 2007. **26**(15): p. 3699-708.
80. Huang, Q., et al., *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 202-10.
81. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
82. Iliopoulos, D., H.A. Hirsch, and K. Struhl, *An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation*. Cell, 2009. **139**(4): p. 693-706.
83. Cascio, S., et al., *miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells*. J Cell Physiol, 2010. **224**(1): p. 242-9.
84. Hossain, A., M.T. Kuo, and G.F. Saunders, *Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 8191-201.
85. Sossey-Alaoui, K., et al., *WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade*. Int J Cancer, 2011. **129**(6): p. 1331-43.
86. Welch, C., Y. Chen, and R.L. Stallings, *MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells*. Oncogene, 2007. **26**(34): p. 5017-22.

87. Kato, M., et al., *The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in C. elegans and in vitro in human breast cancer cells.* *Oncogene*, 2009. **28**(25): p. 2419-24.
88. Christoffersen, N.R., et al., *p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC.* *Cell Death Differ*, 2010. **17**(2): p. 236-45.
89. Sun, F., et al., *Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest.* *FEBS Lett*, 2008. **582**(10): p. 1564-8.
90. Saetrom, P., et al., *A risk variant in an miR-125b binding site in BMPR1B is associated with breast cancer pathogenesis.* *Cancer Res*, 2009. **69**(18): p. 7459-65.
91. Hofmann, M.H., et al., *A short hairpin DNA analogous to miR-125b inhibits C-Raf expression, proliferation, and survival of breast cancer cells.* *Mol Cancer Res*, 2009. **7**(10): p. 1635-44.
92. Guo, X., Y. Wu, and R.S. Hartley, *MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer.* *RNA Biol*, 2009. **6**(5): p. 575-83.
93. Feliciano, A., et al., *miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2-alpha, CCNJ, and MEGF9.* *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76247.
94. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis.* *Nature*, 2008. **451**(7175): p. 147-52.
95. Png, K.J., et al., *A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells.* *Nature*, 2012. **481**(7380): p. 190-4.
96. Wang, S., et al., *miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN.* *Int J Oncol*, 2009. **34**(5): p. 1461-6.
97. Xiang, M., et al., *STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF-kappaB to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes.* *Sci Signal*, 2014. **7**(310): p. ra11.
98. Bhaumik, D., et al., *Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells.* *Oncogene*, 2008. **27**(42): p. 5643-7.
99. Burk, U., et al., *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells.* *EMBO Rep*, 2008. **9**(6): p. 582-9.
100. Bracken, C.P., et al., *A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition.* *Cancer Res*, 2008. **68**(19): p. 7846-54.
101. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.
102. Piovan, C., et al., *Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer.* *Mol Oncol*, 2012. **6**(4): p. 458-72.
103. Iorio, M.V., et al., *microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer.* *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2195-200.
104. Gandellini, P., et al., *miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon.* *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2287-95.
105. Elgamal, O.A., et al., *Tumor suppressive function of mir-205 in breast cancer is linked to HMGB3 regulation.* *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76402.
106. Zhou, J., et al., *miR-206 is down-regulated in breast cancer and inhibits cell proliferation through the up-regulation of cyclinD2.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **433**(2): p. 207-12.
107. Kondo, N., et al., *miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer.* *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5004-8.

108. Fu, Y., et al., [*Hsa-miR-206 inhibits the migration and invasion of breast cancer by targeting Cx43*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2013. **93**(36): p. 2890-4.
109. Elliman, S.J., et al., *Selective repression of the oncogene cyclin D1 by the tumor suppressor miR-206 in cancers*. *Oncogenesis*, 2014. **3**: p. e113.
110. Mani, S.A., et al., *The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells*. *Cell*, 2008. **133**: p. 704-715.
111. Wood, E.J., *Molecular cloning. A laboratory manual by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. \$48 ISBN 0-87969-136-0*.
112. Borowicz, S., et al., *The soft agar colony formation assay*. *J Vis Exp*, 2014(92): p. e51998.
113. Hu, Y. and G.K. Smyth, *ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays*. *J Immunol Methods*, 2009. **347**(1-2): p. 70-8.
114. Kao, J., et al., *Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6146.
115. Das, M.K., et al., *Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016. **13**(1): p. 63-68.
116. Stenvang, J., et al., *Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides*. *Silence*, 2012. **3**(1): p. 1.
117. Shaw, F.L., et al., *A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2012. **17**(2): p. 111-7.
118. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. *Science*, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
119. Moon, S.H., et al., *PI3K/Akt and Stat3 signaling regulated by PTEN control of the cancer stem cell population, proliferation and senescence in a glioblastoma cell line*. *Int J Oncol*, 2013. **42**(3): p. 921-8.
120. Li, H., et al., *The PTEN/PI3K/Akt pathway regulates stem-like cells in primary esophageal carcinoma cells*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **11**(11): p. 950-8.
121. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. *Embo j*, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
122. Franke, T.F., et al., *The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 727-36.
123. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(7): p. 5241-8.
124. Shipitsin, M., et al., *Molecular definition of breast tumor heterogeneity*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(3): p. 259-73.
125. Hwang-Verslues, W.W., et al., *miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1*. *Oncogene*, 2011. **30**: p. 2463-2474.
126. Martowicz, A., et al., *Phenotype-dependent effects of EpCAM expression on growth and invasion of human breast cancer cell lines*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 501.
127. Prat, A., et al., *Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **142**(2): p. 237-55.
128. Ansieau, S., et al., *TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein*. *Oncogene*, 2010. **29**(22): p. 3173-84.
129. Wu, K.J. and M.H. Yang, *Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection*. *Biosci Rep*, 2011. **31**(6): p. 449-55.

130. Wang, S., et al., *Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation*. Proc Natl Acad Sci USA 2006. **103**: p. 1480-1485.
131. Guo, L., et al., *Blockage of glutaminolysis enhances the sensitivity of ovarian cancer cells to PI3K/mTOR inhibition involvement of STAT3 signaling*. Tumour Biol, 2016.
132. Liu, S., J. Sun, and Q. Lan, *TGF-beta-induced miR10a/b expression promotes human glioma cell migration by targeting PTEN*. Mol Med Rep, 2013. **8**(6): p. 1741-6.
133. Hart, J.R. and P.K. Vogt, *Phosphorylation of AKT: a mutational analysis*. Oncotarget, 2011. **2**(6): p. 467-76.
134. Tsatas, D., et al., *EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines*. J Clin Neurosci, 2002. **9**(3): p. 282-8.
135. Martin, J.A., et al., *Co-localization of insulin-like growth factor binding protein 3 and fibronectin in human articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(7): p. 556-63.
136. Gyorfy, B., et al., *An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(3): p. 725-31.
137. Buffa, F.M., et al., *microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5635-45.
138. Campos-Arroyo, D., et al., *Probenecid Sensitizes Neuroblastoma Cancer Stem Cells to Cisplatin*. Cancer Invest, 2016. **34**(3): p. 155-66.



miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation

Ivan Bahena-Ocampo, Magali Espinosa, Gisela Ceballos-Cancino, Floria Lizarraga, Denise Campos-Arroyo, Angela Schwarz, Vilma Maldonado & Jorge Melendez-Zajgla*

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are linked to metastasis. Moreover, a discrete group of miRNAs (metastamiRs) has been shown to promote metastasis. Accordingly, we propose that miRNAs that function as metastatic promoters may influence the CSC phenotype. To study this issue, we compared the expression of 353 miRNAs in CSCs enriched from breast cancer cell lines using qRT-PCR analysis. One of the most altered miRNAs was miR-10b, which is a reported promoter of metastasis and migration. Stable overexpression of miR-10b in MCF-7 cells (miR-10b-OE cells) promoted higher self-renewal and expression of stemness and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers. In agreement with these results, inhibiting miR-10b expression using synthetic antisense RNAs resulted in a decrease in CSCs self-renewal. Bioinformatics analyses identified several potential miR-10b mRNA targets, including phosphatase and tensin homolog (PTEN), a key regulator of the PI3K/AKT pathway involved in metastasis, cell survival, and self-renewal. The targeting of PTEN by miR-10b was confirmed using a luciferase reporter, qRT-PCR, and Western blot analyses. Lower PTEN levels were observed in CSCs, and miR-10b depletion not only increased PTEN mRNA and protein expression but also decreased the activity of AKT, a downstream PTEN target kinase. Correspondingly, PTEN knockdown increased stem cell markers, whereas AKT inhibitors compromised the self-renewal ability of CSCs and breast cancer cell lines overexpressing miR-10b. In conclusion, miR-10b regulates the self-renewal of the breast CSC phenotype by inhibiting PTEN and maintaining AKT pathway activation.

Keywords hsa-miR-10b; microRNAs; non-coding RNAs; tumor-initiating cancer cells

Subject Categories RNA Biology; Signal Transduction; Stem Cells

DOI 10.15252/embr.201540678 | Received 20 May 2015 | Revised 20 February 2016 | Accepted 4 March 2016

Introduction

Studies in cancer biology support the existence of a small proportion of cancer cells with high self-renewal and differentiation potential. These cells, called cancer stem cells (CSCs), are responsible for tumor initiation and maintenance [1]. Whether these CSCs arise by mutations in normal tissue stem cells or progenitor cells or from differentiated cells from different cancer subtypes is currently unknown [2]. These cells have been proposed to promote tumor relapse and metastasis because of their intrinsic resistance to anti-oncogenic treatments, their self-renewal, and their potential for multi-lineage differentiation [3].

Breast adenocarcinomas and cell lines derived from them have been shown to contain functional CSCs [4]. In these cells, diverse metastatic features have been uncovered, such as epithelial-mesenchymal transition (EMT) signatures and overexpression of master stem cell transcription factors [5]. Similarly, metastasis drivers can enhance CSC properties [6]. For example, forced expression of a metastasis effector, such as Ras homolog family member C (RhoC), increased the proportion of stem/progenitor cancer cells identified by the aldehyde dehydrogenase (ALDH) marker [7]. In this sense, other master regulators of metastasis could sustain the CSC phenotype.

MicroRNAs (miRNAs) are a group of small RNAs that can negatively control gene expression through the RNA-induced silencing complex (RISC). A single miRNA can control several different mRNAs and promote or suppress specific cellular processes [8,9]. Aberrant miRNA expression is associated with diverse pathophysiological conditions, including cancer. In particular, miRNAs that control central metastasis regulators have recently been shown to regulate cell invasion. These metastamiRs have been reviewed elsewhere [10,11]. We propose that miRNAs acting as metastasis promoters may influence CSC capabilities such as self-renewal and differentiation.

To test this hypothesis, we analyzed the expression profiles of 353 miRNAs in CSCs of the luminal and basal breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231, respectively, and compared them to the expression profiles of non-stem cells. We detected numerous

deregulated miRNAs; prominent among these differentially expressed miRNAs, we found the previously described metastamiR miR-10b. *In vitro* and *in vivo* assays demonstrated that miR-10b promotes CSC features such as self-renewal and stemness. With the aid of target predictors and a luciferase reporter assay, we found that phosphatase and tensin homolog (PTEN) is a bona fide miR-10b target. Lower PTEN levels were observed in CSCs, and depletion of miR-10b in several cell lines not only increased PTEN mRNA and protein expression but also decreased AKT activity, a downstream PTEN target kinase. Finally, both activation of PTEN and AKT inhibition decreased the self-renewal ability of CSCs and breast cancer cells overexpressing miR-10b (miR-10b-OE cells).

Results

miRNA expression in breast CSCs

To analyze the expression of miRNAs in CSCs derived from breast cancer cell lines, we used magnetic-activated cell sorting (MACS) and a panel of cell surface proteins. For luminal breast cancer cells, we used CD44, a cell membrane glycoprotein that facilitates cancer cell invasion and metastasis and that has been widely used as a CSC marker in breast cancer [12,13]. The left panel of Figs 1A and EV1A shows that CSC enrichment was successful, as assessed by serial mammosphere-forming assays. Similar results were observed using extreme limiting dilution assays (ELDAs) [14] (Figs 1B and EV1C). In addition, higher expression of two stemness markers, SRY-box2 (SOX2) and POU class 5 homeobox 1 (OCT4), three EMT markers, snail family zinc finger 1 (SNAIL), twist family bHLH transcription factor 1 (TWIST) and vimentin, and the metastasis marker RhoC was observed in these cells (Fig 1C and D). Because basal breast cancer has a stem-like phenotype, CD44 is expressed in almost 100% of MDA-MB-231 cells. Nevertheless, a subpopulation defined by the cell surface marker epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) has an enhanced stemness phenotype [15,16], including higher expression of stemness and EMT markers (Fig 1E), an increased number of stem-like cells, as assessed by serial mammosphere-forming assays (Figs 1A, right panel and EV1B), and a higher number of colony-forming cells, as assessed by ELDA (Figs 1F and EV1C). In both CSC-enriched populations, we analyzed 353 miRNAs by qRT-PCR using TaqMan Low Density Arrays (TLDA) (Dataset EV1). In these assays, we found 142 deregulated miRNAs (119 up-regulated and 33 down-regulated) in MCF-7 luminal CSC and nine deregulated miRNAs (five up-regulated and four down-regulated) in MDA-MB-231 basal CSCs. Nine miRNAs were regulated in both cell lines (Fig 1G), including miR-10b. It has been previously reported that this miRNA is regulated by TWIST [17], a central stemness transcription factor in breast cancer [18]. In addition, miR-10b has been proposed to target Homeobox D10 (HOXD10), which promotes the activation of metastasis drivers such as RhoC. We corroborated this finding with a similar gene signature observed in MCF-7/CD44⁺ cells (Fig 1D). Metastasis is a key cancer hallmark that is intimately associated with the stem cell phenotype [6]. For these reasons and because no direct relationship between miR-10b and stemness functions has been proposed, we analyzed this potential relationship.

miR-10b expression controls self-renewal capacity and an EMT/CSC signature

To determine whether miR-10b regulates the CSC stemness phenotype, we performed loss- and gain-of-function experiments. CD44⁺ MCF-7 or EpCAM⁺ MDA-MB-231 breast cancer cells were transiently transfected with a synthetic anti-miR-10b. This anti-miR induced a significant decrease in miR-10b expression and a concomitant loss of the mammosphere-forming ability of enriched CSCs (Fig 2A, upper panel). Similarly, miR-10b inhibition decreased the number of mammospheres in sorted EpCAM⁺ MDA-MB-231 cells (Fig 2B). Additionally, as previously reported, miR-10b inhibition in MDA-MB-231 cells reduced migration (Fig EV2A) [19,20]. Finally, we found that depleting miR-10b in CD44⁺ MCF-7 cells decreased the number of colonies in soft agar assays (Fig EV2B), another surrogate marker for stem cell phenotypes [21]. These data indicate that miR-10b represents an important component of the clonal potential and migration capabilities of breast CSCs.

For gain-of-function studies, the pre-miR-10b sequence was cloned and stably transfected into MCF-7 breast cancer cells (creating MCF-7-miR-10b-OE cells) and HER2⁺ SKBR-3 cells (creating SKBR-3-miR-10b-OE cells). miR-10b overexpression increased the percentage of CD44⁺ MCF-7 cells from 6.8 to 14.5% (Fig EV2C). Similarly, SKBR-3-miR-10b-OE cells presented an increase in the number of ALDH-positive cells, from 12.0 to 16.6% (Fig EV2E). As expected, serial mammosphere assays showed a reproducible increase in mammosphere-forming ability in these cells (Fig 2A, lower panel). miR-10b also regulated the anchorage-independent growth of MCF-7 cells and CSCs derived from them, a reported cancer stem cell phenotypic trait (Fig EV2B, lower panel, and D) [21]. In addition, miR-10b overexpression increased the levels of E-cadherin, a well-known marker for mammosphere formation [22] (Fig EV2G). Finally, we found a significant ($P = 0.04$) increase in the number of CSCs in the MCF-7-miR-10b-OE cell line, as assessed with an *in vivo* limiting dilution assay using nu/nu mice (Figs 2C, left panel and EV2F upper panel). This effect was not restricted to a single cell line, as overexpression of miR-10b in SKBR-3 cells also increased the number of CSCs in *in vivo* assays ($P = 0.007$) (Figs 2C, right panel and EV2F, lower panel). Tumor morphology between cell lines was similar (Fig EV3).

We then hypothesized that stemness and EMT factors could be modified by miR-10b overexpression. We performed experiments with either miR-10b overexpression or inhibition in four breast cancer cell lines and in the CD44⁺ MCF-7 subpopulation. Twenty-four hours after transient transfection of miR-10b in MCF-7 and SKBR-3 cells, OCT4/3, SOX2, vimentin, and SNAIL expression increased compared with the miR-Scr-OE control, which resembled the expression pattern of isolated CSCs (Fig 2D). We then selected two cell lines with high miR-10b expression (T47-D and MDA-MB-231 cells, Fig EV3C), as well as CD44⁺ MCF-7 cells, and transiently transfected specific anti-miRs. After 24 h, we observed decreased (< 0.75) expression of stemness and EMT genes after anti-miR-10b transfection compared with the anti-miR-control. These results support the participation of miR-10b in the stemness phenotype. Interestingly, the regulation of miR-10b by TWIST [17], a central EMT and stemness transcription factor in breast CSCs [18], further supports this hypothesis.

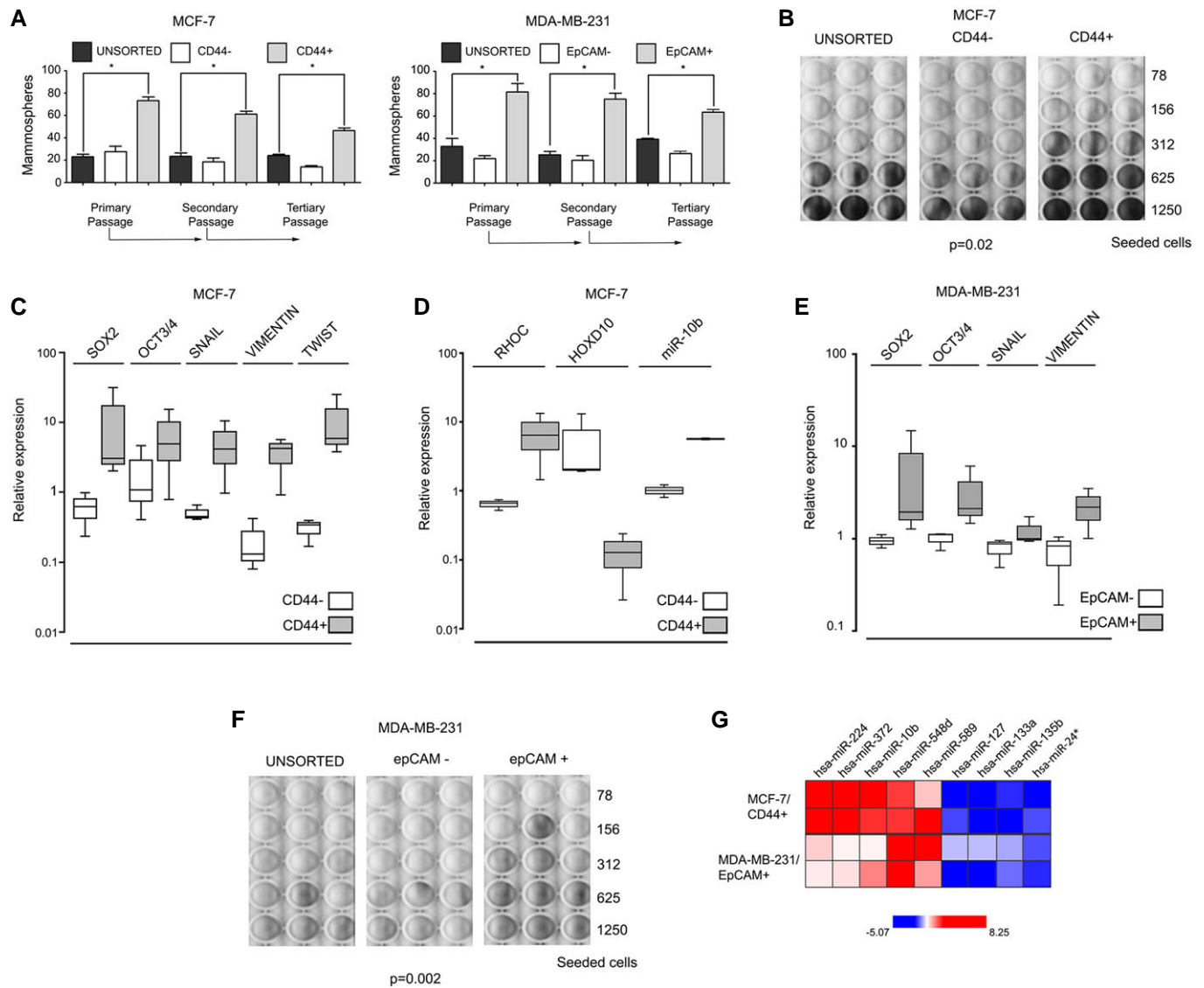


Figure 1. Breast CSC enrichment and miRNA expression.

- A** Breast cancer cell lines were sorted using CD44 for luminal MCF-7 cells (left panel) or EpCAM for MDA-MB-231 cells (right panel). Serial mammosphere assays were performed using 4,000 cells for each cell fraction, counting spheres after 3 weeks. Plots show the mean \pm SEM of mammospheres formed with 4,000 cells from three independent experiments performed in triplicate. An ANOVA and Dunnett's multiple comparison test was used to compare the groups ($*P < 0.05$).
- B** Extreme limiting dilution assay (ELDA) of MCF-7 cells. Sorted cells were serially diluted (1,250, 625, 312, 156, and 78 cells) and then seeded in 96-well plates. After 1 week, the cells were fixed, stained, and counted. The lower limit for well repopulation in CD44⁺ cells was 312 cells, compared with 615 cells for both unsorted and CD44⁻ populations. The data obtained were evaluated using the ELDA software. *P*-values that test the single-hit hypothesis using the likelihood ratio test are shown. The curves are depicted in Fig EV1.
- C** Relative expression of the stemness factors SOX2 and OCT4/3 and the EMT markers SNAIL, vimentin, and TWIST in MCF-7/CD44⁺ cells. The fold change was calculated using GAPDH as an internal control using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method comparing stem or non-stem cells versus the total cell line. The box and whiskers graph shows the range, median, and quartile interval values from three independent experiments.
- D** miR-10b overexpression affecting stemness and EMT factors. Relative quantification of miR-10b (relative to RNU6B), HOXD10 and RHOC (relative to GAPDH) was performed in MCF-7/CD44⁺ fractions compared to non-enriched cells. Box plots show the range, median, and quartile interval values from three independent experiments.
- E** Relative expression of stemness factors SOX2 and OCT4/3 and EMT markers SNAIL and vimentin in MDA-MB-231/EpCAM⁺ cells. The fold change was calculated using GAPDH as an internal control using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method comparing stem or non-stem cells versus the total cells. The box and whiskers graph shows the range, median, and quartile interval values from three independent experiments.
- F** Extreme limiting dilution assay (ELDA) of MDA-MB-231 cells. Sorted cells were serially diluted (1,250, 625, 312, 156, and 78 cells) and then seeded in 96-well plates. After 1 week, the cells were fixed, stained, and counted. The lower limit for well repopulation in EpCAM⁺ cells was 156 cells compared with 625 cells for both unsorted and EpCAM⁻ populations. The data obtained were evaluated using the ELDA software. *P*-values that test the single-hit hypothesis using the likelihood ratio test are shown. The curves are depicted in Fig EV1.
- G** Nine miRNAs are commonly regulated in both CD44⁺ and EpCAM⁺ breast cancer cells. Quantitative RT-PCR of miRNAs was performed on sorted MCF-7 and MDA-MB-231 cell populations using TaqMan Low Density Arrays (TLDA). Results were plotted as a heat map comparing CD44⁺ to CD44⁻ cells (MCF-7) and EpCAM⁺ to EpCAM⁻ cells. The scale is shown below the map.

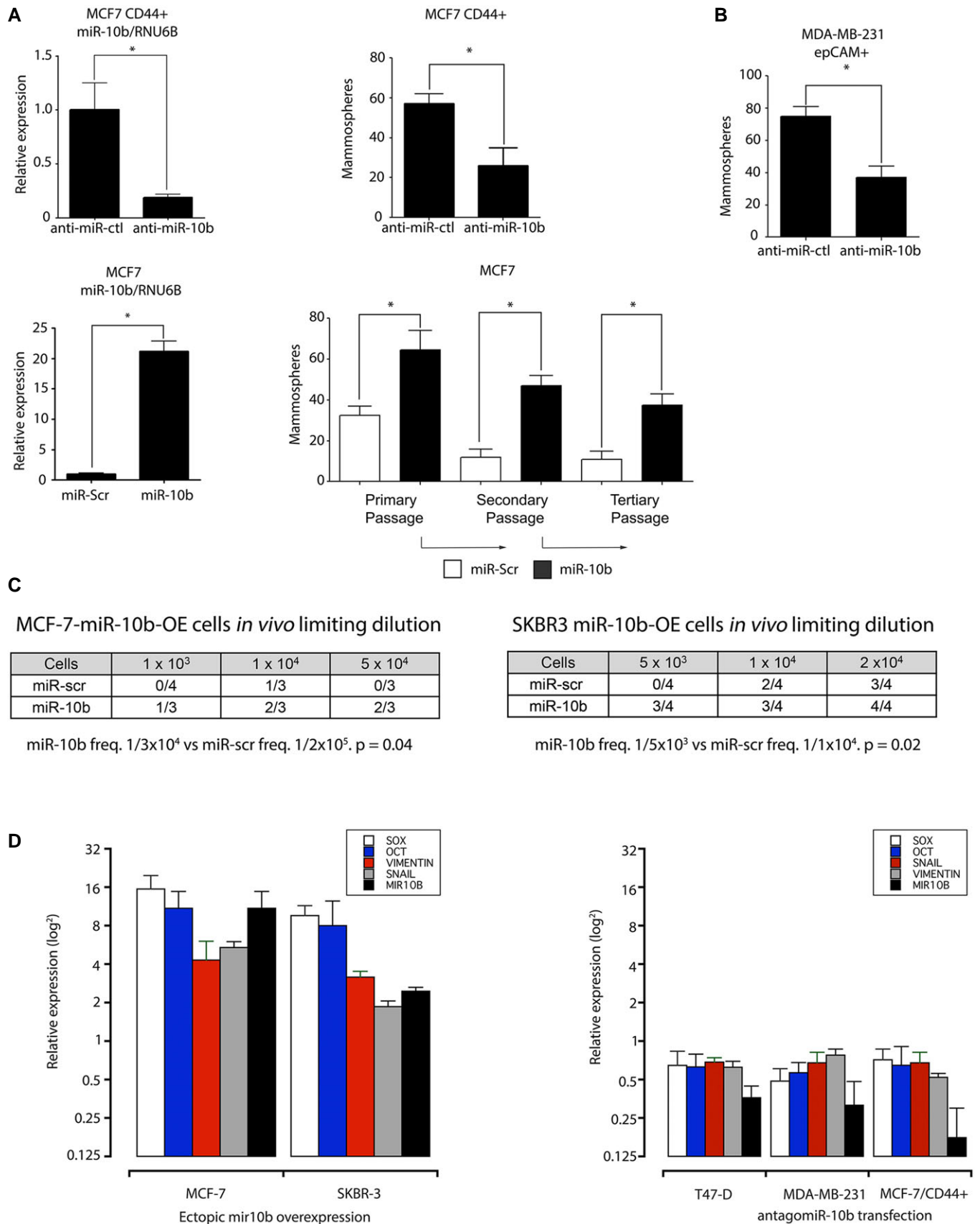


Figure 2.

Figure 2. Self-renewal ability is controlled by miR-10b expression in MCF-7 cells.

- A Upper panel, left: MCF-7/CD44⁺ cells were transfected with anti-miR-10b or a scrambled control, and qRT-PCR was performed. Upper panel, right: An aliquot of these cells was subjected to mammosphere-forming assays. The graph shows the mean \pm SEM of the number of formed mammospheres per 4,000 seeded cells in three independent experiments. Lower panel, left: Expression of miR-10b relative to RNU6B in MCF-7 cells stably transfected with a plasmid containing the miR-10b gene versus an empty vector. Results are the mean \pm SEM values from three independent experiments. Lower panel, right: miR-10b-overexpressing MCF-7 cells analyzed by serial mammosphere assays. The mean \pm SEM of the number of formed mammospheres per 4,000 seeded cells in three independent experiments was plotted on each bar.
- B Mammosphere formation was performed by seeding 4,000 MDA-MB-231/EpCAM⁺ cells, and after 3 weeks, the cells were disaggregated, counted, and reseeded. Stable miR-10b-overexpressing cells from three independent clones were tested in three passages, and cell number was plotted as the mean \pm SEM.
- C *In vivo* limiting dilution assays. miR-10b-OE or control cells were subcutaneously injected in the backs of mice at three doses (1,000, 10,000, and 50,000 cells for MCF-7 and 5,000, 10,000, and 20,000 for SKBR-3). Mice were sacrificed after 8 weeks, and tumor burden was analyzed using the ELDA software. Plots are depicted in Fig EV2. The tables show the number of mice with tumors versus the total number of mice injected. Below the tables, the estimated frequency (freq) of stem cells for each group and *P*-values are shown. Stem cell frequency for MCF-7 cells was 1 in 34,252 (range 94,888–12,364) in miR-10b-OE cells versus 1 in 238,965 (range 1,817,801–31,414) in miR-scr cells. Stem cell frequency for SKBR-3 cells was 1 in 5,013 (range 11,135–2,257) in miR-10b-OE cells versus 1 in 18,778 (range 45,397–7,767) in miR-scr cells.
- D Stemness and EMT marker mRNA levels following miR-10b modulation. miR-10b, OCT4/3, SNAIL, and vimentin expression, was quantified in breast cancer cell lines using transient transfection of miR-10b versus a miR-Scr vector (left) or anti-miR-10b versus anti-miR-ctl (right). Log-scale plots show the mean and SEM for the relative expression of each gene from triplicate independent transient transfections, each performed three times. A Mann–Whitney *U*-test was used to compare expression between groups. SOX2, OCT4/3 and vimentin were significantly modulated by up- or down-regulation of miR-10b (*P* = 0.0043, *P* = 0.0054 and *P* = 0.000908, respectively).

Data information: A two-tailed Student's *t*-test was used to compare the two groups (**P* < 0.05).

Targeting PTEN with miR-10b sustains AKT activation and promotes self-renewal in MCF-7 CSCs

To further explore miR-10b's mechanism of action, we performed an *in silico* search for putative targets using the ComiR and TargetScan tools. Both programs reported higher scores for the mRNAs of the cancer-related genes ASXL1, BAP1, GATA3, NCOR1, PI3KCA, and PTEN. Because PTEN has previously been shown to be required to sustain breast CSCs [11,23] is co-regulated with miR-10b after TGF β exposure [24] and its levels decreased in stem cells derived from MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines (to 81.4% in MDA-MB-231/EpCAM⁺ cells and less than 1% in MCF-7/CD44⁺ cells by quantitative RT-PCR), we chose to focus on this gene and the pathway it regulates. Figure 3A shows that a conserved miRNA regulatory element (MRE) for miR-10b is found 145 bp downstream of the PTEN coding sequence (ComiR and TargetScan scores of 0.875 and -0.21 , respectively). Similarly, a miR-10b MRE is located 170 bp downstream of the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) coding sequence. Therefore, these two putative targets of miR-10b, which are related to the AKT pathway, were assessed using 3'-UTR luciferase reporter assays. Briefly, firefly luciferase was engineered to examine the 3'-UTR MRE of PTEN, PIK3CA, or HOXD10 (positive control). These constructs were transiently cotransfected with anti-miR-10b or anti-miR-ctl in MCF-7 and T47-D cells. In T47-D cells, which have higher miR-10b expression levels (Fig EV3C), miR-10b inhibition increased PTEN and HOXD10 reporter activities, whereas miRNA overexpression in SKBR-3 cells inhibited reporter activity (Fig 3B). The luciferase activity of a UTR with a mutated miR-10b MRE seed sequence was not modulated by either miR-10b inhibition or overexpression. Although not statistically significant, we also found that using anti-miR-10b or miRNA overexpression, miR-10b regulation induced similar changes in MCF-7 cells, which express lower levels of this miRNA (Fig 3B). No changes were observed in PIK3CA reporter activity, demonstrating that miR-10b's effects are restricted to PTEN in this signaling pathway.

To further support the specific regulation of PTEN by miR-10b, we performed a series of gain- or loss-of-function analyses using a panel of breast cancer cell lines. In these experiments, we inhibited or overexpressed miR-10b and measured PTEN or PIK3CA

expression by qRT-PCR. As shown in Fig 3C, miR-10b overexpression decreased PTEN expression, but not PIK3CA expression, in MCF-7 cells, whereas inhibition of miR-10b in MDA-MB-231 increased PTEN expression. We next expanded the analysis to a larger panel of cell lines (SKBR-3, T47-D, CD44⁺ MCF-7, MCF-7, and MDA-MB-231 cells), performing both gain- and loss-of-function experiments in each cell line or subpopulation and plotted the relative levels of miR-10b and PTEN. Figure 3D shows that miR-10b expression levels were inversely correlated with PTEN levels ($r = -0.80$), whereas PIK3CA expression was not ($r = 0.43$). This result was also corroborated by Western blot analyses, where gain- or loss-of-expression assays showed that miR-10b regulated PTEN in four cellular backgrounds (Fig 3E). To support these data, PTEN immunohistochemistry was performed on tumor xenografts in mice with MCF-7 cells stably overexpressing miRNAs. Lower PTEN protein expression was observed in tumors from MCF-7/miR-10b-OE cells (Fig 3F).

Next, to assess the importance of PTEN on the stemness phenotype, we inhibited this protein using RNA interference with Dicer-substrate RNAs and measured the expression of stem cell markers. As shown in Fig 3G left panel, inhibiting PTEN increased the expression of the stem markers OCT4 and SNAIL, supporting the role of PTEN in the breast CSC phenotype. Overexpressing miR-10b in PTEN-depleted cells only increased the levels of SOX2 and vimentin, without further affecting OCT4/3 and SNAIL levels (Fig 3G, right panel). This could be due to a larger decrease in PTEN levels due to the additive effects of miR-10b and the PTEN shRNA, which in turn could regulate additional genes. These results, and the fact that miR-10b overexpression and PTEN depletion did not induce an additive increase in mammosphere formation, support the notion that miR-10b acts through PTEN (Fig 3G, right panel). Furthermore, PTEN knockdown in an additional cell line (T47-D) induced a recovery in the mammosphere depletion produced by miR-10b inhibition (Fig 3H). We next cloned the PTEN open reading frame, including the miR-10b MRE in its 3'-UTR or an alternative version containing a mutated miR-10b MRE. As expected (Fig 3I), we found that cells expressing the mutated version of PTEN presented higher PTEN levels. In line with this, expressing the mutated version of PTEN decreased the stem cell phenotype as assessed by the stem cell marker SNAIL.

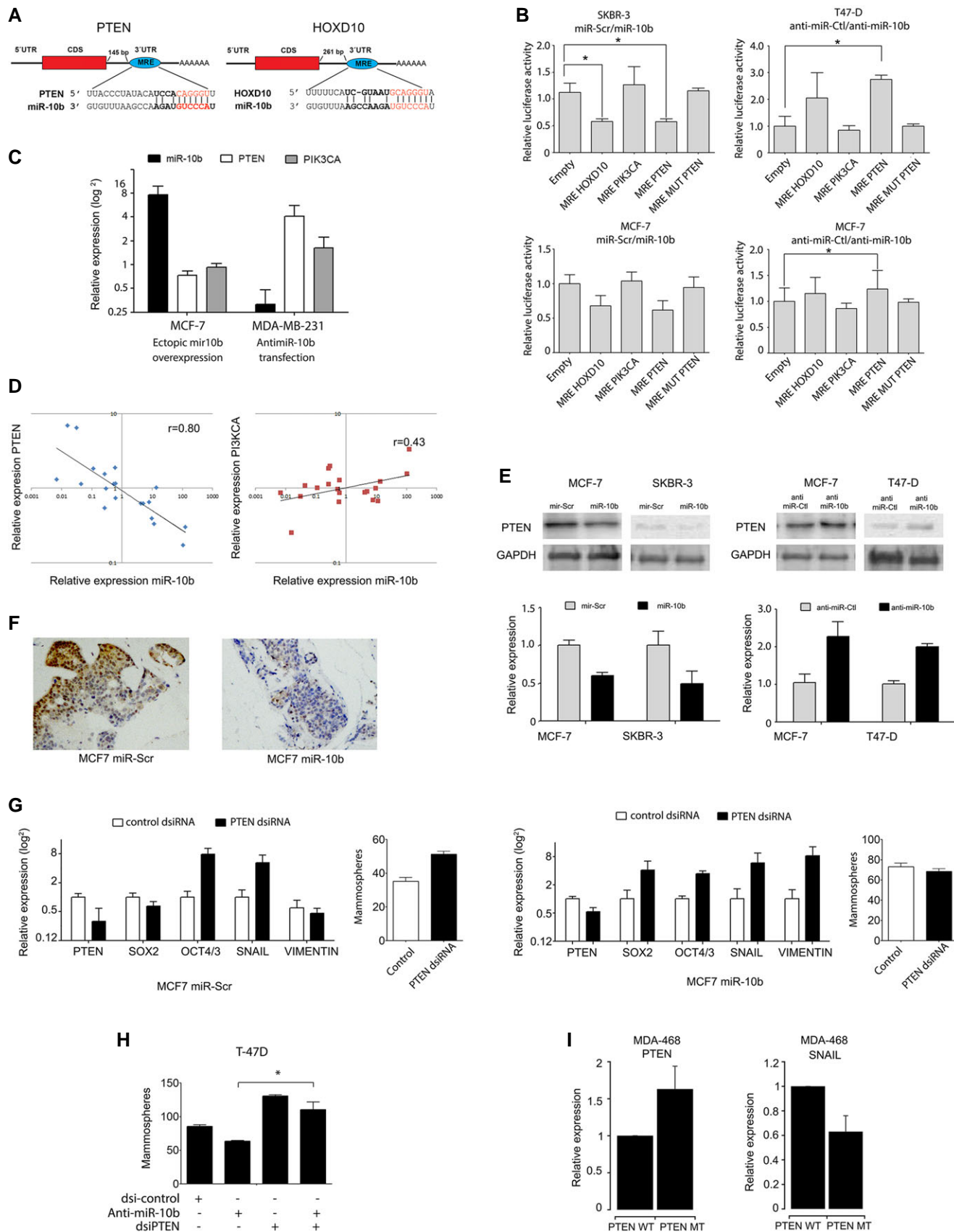


Figure 3.

Figure 3. miR-10b targets PTEN but not PIK3CA mRNA.

- A miR-10b miRNA recognition elements (MREs) in the 3'-UTRs of PTEN and HOXD10 genes. The coding DNA sequence (CDS) and MRE are shown in red and blue, respectively. The new PTEN MRE is located 145 bp downstream of the CDS, with its pairing sequence located between nucleotides 2,388 and 2,410 of the main PTEN transcript isoform. Below each depiction, an alignment of each mRNA and miR-10b is shown.
- B MCF-7, SKBR-3, and T47-D breast cancer cells were transfected with gain- or loss-of-function constructs/shRNAs and their respective controls (a miR-10b-OE plasmid or anti-miR-10b). MREs of the validated target HOXD10 and of the putative targets PTEN and PIK3CA were cloned into pMIR-Report, and dual luciferase reporter assays were performed. A mutated control miR-10b (MRE MUT PTEN) was also included. Bars show the mean \pm SEM from six independent transfections. A two-tailed Student's *t*-test was used to compare the differences between groups ($*P < 0.05$).
- C PTEN and PIK3CA expression after miR-10b modulation. Left panel shows miR-10b, PTEN, and PIK3CA expression by qRT-PCR in MCF-7 cells with ectopic miR-10b expression. Right panel shows miR-10b, PTEN, and PIK3CA expression by qRT-PCR in MDA-MB-231 cells after antagomiR-10b transfection. Data (mean \pm SEM) are from three independent transient transfections performed by triplicate.
- D To further confirm PTEN targeting, we performed gain- or loss-of-function experiments in breast cancer cell lines (MCF-7, MCF-7/CD44⁺, SKBR-3, and T47-D) by overexpressing miR-10b or inhibiting it with a miR-10b-OE plasmid or anti-miR-10b shRNAs. PTEN and miR-10b levels were measured by qRT-PCR. The log₂-fold change of PTEN (left panel) and PIK3CA (right panel) mRNA levels obtained through the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method were plotted against their respective miR-10b expression levels. Correlation analysis was performed [PTEN ($r = -0.80$), PIK3CA ($r = 0.43$)].
- E PTEN protein modulation by miR-10b. Upper panel: PTEN protein levels in SKBR-3 and MCF-7 cells were analyzed by Western blot. GAPDH was used as a loading control with cells cultured as in (B). Lower panel: Densitometric analysis of Western blot assays performed with three biological replicates. Bars represent mean \pm SEM.
- F PTEN immunohistochemical analysis of MCF-7-miR-10b-OE or control MCF-7-miR-Scr-OE tumor xenografts.
- G miR-10b overexpression does not increase mammosphere formation in PTEN-depleted cells. MCF-7-miR-Scr-OE cells (left panels) and MCF-7-miR-10b-OE (right panels) were transfected with a Dicer-substrate RNA directed toward PTEN, and after 24 h, quantitative RT-PCR assays for PTEN, SOX2, OCT4/3, SNAIL, and vimentin were performed. Additionally, the same cells were analyzed for mammosphere formation. The graph shows the mean and standard error of the relative increase of each marker or number of mammospheres in PTEN-depleted cells (black bars) and in cells transfected with a scrambled control (white bars) in three independent biological experiments performed in triplicate.
- H T47-D cells were transfected with antagomiR-10b, a dsi-RNA for PTEN or both and mammospheres produced as described in the Material and Methods. Bars show mean and SEM from three independent experiments. $*P = 0.003$ by Student's *t*-test, after ANOVA showing statistical differences in groups.
- I PTEN overexpression compensates for miR-10b overexpression. Left panel: MDA-468 cells were transfected with a plasmid overexpressing wild-type PTEN or a version containing a mutated MRE in its 3'-UTR, with or without a plasmid containing miR-10b and PTEN mRNA expression was measured by end-point RT-PCR. Right panel: Relative expression of stemness factor SNAIL. The plots show the relative expression from biological triplicate analyses (mean and SE shown).

These results, together with previous results showing that PTEN depletion induces the expression of stem markers and the expansion of prostate and leukemia CSCs [11,25], further demonstrate the importance of this miRNA in CSC maintenance.

miR-10b expression increases AKT activation

Constitutive activation of the PI3K pathway has been previously reported as a key component of breast and prostate CSC maintenance [23,25,26]. To assess whether miR-10b inhibition of PTEN could regulate this cascade, we analyzed AKT activation, a key downstream kinase in this pathway. Thus, p-AKT (Ser473) levels were analyzed in CD44⁺/sorted cell fractions using Western blot analysis in MCF-7 cell line. As shown in Fig 4A and B, AKT phosphorylation was detected in CD44⁺ cells but barely or not at all in CD44⁻ or non-sorted cells. We then exposed cells overexpressing miR-10b to insulin and measured several PI3K signaling molecules. As expected, p-AKT was barely detectable in MCF-7/miR-Scr-OE cells exposed to serum compared with cells overexpressing miR-10b, where serum increased AKT phosphorylation in MCF-7/miR-10b cells. Insulin induced phosphorylation in both control and miR-10b-overexpressing cells (Fig 4B, upper panel). To support these results, AKT kinase assays for a downstream PI3K effector, GSK-3, were performed. As shown in Fig 4B upper panel, AKT kinase activity was detected only in MCF-7/miR-10b-OE cells exposed to serum or insulin. We then assessed the effect of PTEN expression in cells overexpressing miR-10b. As shown in Fig 4B lower panel, PTEN enforced expression decreased the levels of p-AKT in SKBR-3 cells overexpressing miR-10b. In line with this, cells overexpressing both miR-10b and PTEN presented higher p-AKT levels than cells overexpressing only PTEN.

To assess the functional impact of this pathway on the stemness effects of miR-10b, CD44⁺ cells were transiently transfected with

anti-miRs, and clonogenic assays were performed in the presence of PI3K activators or inhibitors. Although insulin did not significantly affect the colony-forming ability of anti-miR-ctl-transfected cells, PI3KCA inhibitors significantly reduced the number of colony-forming cells. These results demonstrate the importance of the PI3K/AKT pathway in CD44⁺ CSCs. Moreover, miR-10b inhibition did not produce any additive effects on the clonal inhibition mediated by PI3KCA inhibitors (Fig 4C). Finally, we measured the impact of PI3K modulation on the miR-10b overexpression effects on clonogenicity. As expected, even though we detected no differences in the number of colonies after an insulin stimulus, PI3K inhibitors had a significant negative effect on the self-renewal capacity of MCF-7 miR-10b-OE cells (Fig 4D).

Interestingly, although insulin induced a similar degree of AKT phosphorylation, only cells overexpressing miR-10b effectively phosphorylated the downstream GSK-3 kinase. At least three different phosphorylation sites can activate the AKT kinase. In particular, phosphorylation at Thr308 can stabilize kinase functions and induce cell transformation, suggesting that additional phosphorylation events are needed for miR-10b to complete AKT signaling [27]. The lack of differential changes in clonogenic assays in cells with overexpressed or repressed miR-10b after blocking the PI3K cascade supports the role of this pathway in miR-10b's stem cell effects.

A recent report revealed that PTEN-deficient prostate and breast tumors depend on AKT2 for maintenance [28]. Because the phenotype elicited by miR-10b could be reminiscent of PTEN disruption, miR-10b overexpression may render cancer cells sensitive to AKT2 inhibition. Conceivably, even with functional PTEN tumors, AKT2 inhibition could be used to target CSCs if this alteration proves to be synthetically lethal. Further studies are required to test this idea. With the advent of new PI3K inhibitors [29] now in clinical trials, elucidating potentially informative therapeutic response markers, including miR-10b, should be pursued.

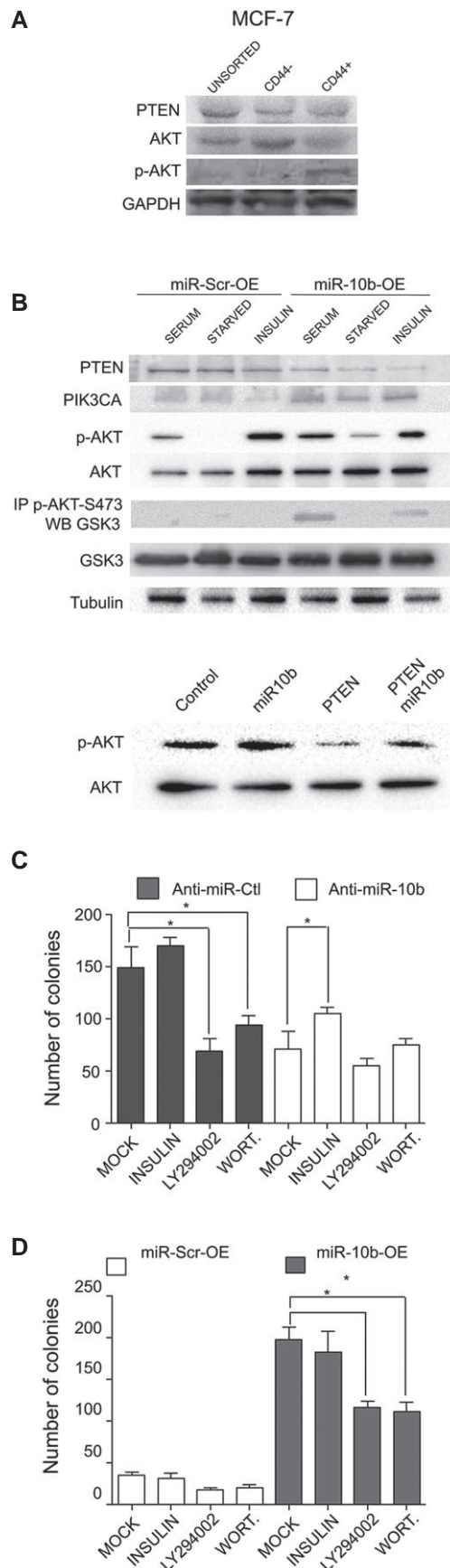


Figure 4. The effects of miR-10b on stemness are mediated by the PI3K pathway.

- A** AKT phosphorylation in CSCs from MCF-7 cells sorted by CD44. GAPDH protein levels were used as a loading control.
- B** Upper panel: Cultures were serum-starved for 18 h and then stimulated with insulin. PTEN, PI3KCA, GSK-3, and phospho-AKT Ser473 protein levels were analyzed by Western blot. GAPDH was used as a loading control. AKT kinase activity was analyzed in these cells by immunoprecipitating phosphorylated AKT proteins with a p-AKT-Ser473 antibody and using chimeric GSK-3 as a substrate. Lower panel: SKBR-3 cells were transiently transfected with a plasmid containing an open reading frame of PTEN, miR-10b or both and phospho-AKT, AKT or tubulin levels analyzed by Western blot assays. Control is empty vector-transfected cells.
- C** Clonogenic ability of miR-10b-depleted CD44⁺ MCF-7 cells after PI3K pathway inhibition. Cultures were serum-starved for 18 h and then stimulated with insulin or exposed to the PI3K pathway inhibitors wortmannin or LY294002. Cells transfected with anti-miR-10b or a scrambled control (anti-miR-ctl) were seeded in soft agar at clonal density and exposed to insulin or PIK3CA inhibitors. After 3 weeks, colonies were quantified. Bars show the mean \pm SEM for three independent experiments.
- D** miR-10b overexpression does not induce additional changes in cell colony numbers in response to insulin or PI3K inactivation. MCF-7 stable miR-Scr-OE or miR-10b-OE cells were seeded in soft agar at clonal density and exposed to insulin or PIK3CA inhibitors. After 3 weeks, colonies were quantified. Bars show the mean \pm SEM for three independent experiments.
- Data information: A two-tailed Student's *t*-test was used to compare the two groups ($*P < 0.05$).

Further supporting the importance of PTEN regulation by miR-10b, we analyzed the possible correlation between PTEN and miR-10b expression and prognosis in two previously published breast cancer cohorts [30,31]. Figure EV4 shows that patients with tumors with low PTEN mRNA levels had a higher relapse probability than those whose tumors had higher levels. Thus, patients whose tumors presented higher miR-10b expression had a higher distant relapse probability.

In conclusion, our results show for the first time that by modulating the PTEN/PI3K/AKT pathway, miR-10b is a *bona fide* regulator of stemness in breast cancer cells. More research is required to investigate the possible use of this miRNA as a biomarker.

Materials and Methods

Cell culture, cell sorting, flow cytometry, and pharmacological treatments

MCF-7, MDA-MB-231, T47-D and SKBR-3 human cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA.) and cultured in the recommended medium. Cell lines were dissociated using Accutase (Millipore, Darmstadt, Germany), and magnetic cell sorting was performed using the MiniMACS separator, LS columns and CD44-MicroBeads (human) or EpCAM-Microbeads (human) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The proportion of CD44- and EpCAM-positive cells was estimated using flow cytometry (FACS ARIA and FACS DIVA software, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). For ALDH^{br} cell flow cytometry, one million SKBR3-control and SKBR3-miR-10b cells were grown in 12.5 cm² plates under gentle agitation for 3 days. Upon cell

disaggregation, ALDH enzymatic activity was measured according to ALDEFLUOR assay manufacturer's guidelines (StemCell Technologies, BC, Canada). DEAB (diethylaminobenzaldehyde), an ALDH inhibitor, was used at a 1.5 mM concentration as a control. Insulin (100 µg/ml), wortmannin (100 nM), and LY294002 (50 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as described.

Mammosphere assays

Single cells were plated in 6-well plates (Corning) covered with 1% agarose at a density of 2,000 cells/ml at each passage. Cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with B27 (Invitrogen), 20 ng/ml EGF, 5 mg/ml insulin (BD Biosciences), and 0.5 mg/ml hydrocortisone. Mammospheres were collected by gentle centrifugation (130 g) after 7–10 days and dissociated enzymatically (10 min in 0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na; Invitrogen). For stable cell lines and MACS fractions, we used three serial passages. The number of mammospheres after 10 days was counted manually using an inverted microscope. For immunohistochemistry, mammospheres were fixed in 4% formaldehyde in PBS and embedded in paraffin. Tissue sections were deparaffinized, hydrated, and, after blocking, incubated with an anti-E-cadherin antibody (Cell Signaling, #31955, MA, USA). Antibody binding was visualized with an HRP-conjugated secondary antibody (SignalStain Boost IHC Detection Reagent, Cell Signaling #8114, MA, USA).

Soft agar for colony formation assays

Cells (1,250) suspended in DMEM with 0.33% UltraPure™ Low Melting Point Agarose and 5% fetal bovine serum (FBS) were overlaid on 24-well plates containing a 0.5% agar base with DMEM and 5% FBS (Life Technologies, CA, USA). All samples were plated in triplicate. The plates were incubated at 37°C in a humidified incubator for 21 days. For visualization, 0.01% crystal violet was added, and the cells were incubated overnight at 4°C. Colonies were counted using ImageJ. For AKT modulation, recombinant human insulin (100 µg/ml), wortmannin (100 nM), and LY294002 (50 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) were used in suspension with the agar base and soft agar.

Extreme limiting dilution assays

In vivo and *in vitro* limiting dilution assays were analyzed using the Extreme limiting dilution assay (ELDA) software [14], which uses a generalized linear model to compare active cell frequencies (stem cells) in cell populations.

RNA isolation and qRT-PCR

RNA was purified from the cell lines using the TRIzol (Invitrogen, CA, USA) and GlycoBlue co-precipitant reagents. Reverse transcription of miRNA was performed using multiplex pools for miRNA expression analysis (miRNA Reverse Transcription kit, Life Technologies, CA, USA). miRNA profiling analysis was performed using a TaqMan Low Density Array 1.0 (Life Technologies, CA, USA). qRT-PCR for miR-10b, RNU6B, PTEN, and TWIST was performed using specific TaqMan probes. The remaining mRNAs were quantified using the Maxima SYBR Green/ROX kit (Fermentas Inc., MA, USA).

Constructs, transfections, knockdowns, and luciferase assays

A pre-miR-10b sequence was synthesized by IDTX and cloned into a BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector (Invitrogen, CA, USA). The miR-10b construct and a non-targeting (scrambled) control were transfected into MCF-7 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA), and stable cell lines were obtained after two rounds of selection using 5 µg/ml blasticidin (Invitrogen, CA, USA). The putative miR-10b MREs of the human PTEN, PIK3CA, and HOXD10 mRNAs were synthesized as 50-nt oligonucleotides and inserted between the SpeI and HindIII sites of the pMIR-Report plasmid. A mutated version of PTEN was constructed in the same way, but the core 5 nt of the MRE were deleted. MCF-7 cell lines with stable overexpression of miR-10b or a non-targeting control were seeded onto 96-well plates (1×10^4 cells/well). Cells were transfected with pMIR-Report constructs (50 ng/well) and pRL-SV40 *Renilla* luciferase (10 ng/well). All transfections were performed at least in triplicate using the Escort Reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA). Cell lysates were prepared with Passive Lysis Buffer (Promega) 48 h after transfection, and luciferase activities were measured using the Dual Luciferase Reporter Assay kit (Promega, WI, USA). MCF-7 cell fractions were maintained in DMEM, grown to 60% confluency, transfected with anti-miRs using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, CA, USA) for 4 h, and then incubated 24 h before each experiment. For PTEN knockdown assays, Dicer-substrate RNA duplexes (TriFecta, IDT Technologies, Coralville, IA) directed against PTEN were transfected into MCF-7-miR-Scr-OE cells using Lipofectamine 2000. We then selected the best performing dsRNA (with a decrease of 69%) to analyze stemness markers by qRT-PCR. For miR-10b function recovery experiments, the complete open reading frame and the 3'-UTR including the miR-10b MRE of PTEN were obtained by RT-PCR using the oligonucleotides 5'-CAGCAGCTTCTGCC ATCTCT and 5'-AGGTATATACATGACACAGCTACAC and cloned into pcDNA3.1 vector to obtain pcDNA-PTEN plasmid. Then, the MRE for miR-10b was mutated using the QuickChange Lightning kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used were as follows: forward: 5'-CCC TAT ACA TCC AGA **ATT** CTT TGA CAC TTG TTG TCC reverse: 5'-GGA CAA CAA GTG TCA AAG AAT TCT GGA TGT ATA GGG (in bold the mutation site).

Western blot and kinase assays

MCF-7 cell fractions and stable cell lines were serum-starved for 16 h and then treated with 10 ng/ml of rh-insulin (R&D Systems, MN, USA) in serum-free medium. Cell lysates were obtained using RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail consisting of PMSF (100 µM) and Na_3VO_4 (0.2 mM) (Thermo Scientific Inc., MA, USA). Antibodies directed against p-AKT Ser473 (#9271, Cell Signaling Technologies, MA, USA), PTEN (D4.3, #9188, Cell Signaling Technologies, MA, USA), PI3KCA (C73F8, #4249, Cell Signaling Technologies, MA, USA), and GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) were used for Western blot analyses. Cell extracts were analyzed by IP/Kinase assay; kinase reactions were performed in the presence of 200 µM of cold ATP and 1 µg of GSK-substrate. GSK-3 phosphorylation was measured by Western blot using phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9, 37F11) (Cell Signaling Technologies, #9327, MA, USA).

Animal studies

All mouse experiments were conducted in accordance with standard operating procedures approved by the University Committee on the Use and Care of Animals at the Metropolitan Autonomous University, Mexico. The nu/nu mice were purchased and maintained at UPAEL-UAM or INCan (Instituto Nacional de Cancerología) (DF, Mexico). Cancer cells were subcutaneously injected in the backs of mice at three doses (50,000, 100,000, and 200,000 cells), and 100 μ l of a mixture of 1:1 PBS and growth factor-reduced (GFR) Matrigel (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) was used as a vehicle. Results were analyzed with the ELDA software (see above).

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$. The specific statistical tests used are mentioned in the Figure legends. Analyses were performed using GraphPad Prism for Windows version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

Funding was provided by Grant 132931 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Ivan Bahena Ocampo is a Doctoral student from programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Autonoma de Mexico (UNAM) and received fellowship 220651 from CONACyT.

Author contributions

IB-O, ME, GC-C, FL, DC-A, and AS provided experimental data and reagents. IB-O, VM, and JM-Z carried out data analysis. IB-O, VM, and JM-Z designed experiments and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Visvader JE (2009) Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 23: 2563–2577
2. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K et al (2011) Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7950–7955
3. Lin Y, Zhong Y, Guan H, Zhang X, Sun Q (2012) CD44⁺/CD24⁻ phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 59
4. Fillmore CM, Kuperwasser C (2008) Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 10: R25
5. Mani SA, Guo W, Liao M, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shiptsin M et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715
6. Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, Wen S, Chang Y-F, Bachmann MH, Shimono Y et al (2010) Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18115–18120
7. Rosenthal DT, Zhang J, Bao L, Zhu L, Wu Z, Toy K, Kleer CG, Merajver SD (2012) RhoC impacts the metastatic potential and abundance of breast cancer stem cells. *PLoS ONE* 7: e40979
8. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64–71
9. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15–20
10. Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR (2009) Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res* 69: 7495–7498
11. Wang S, Garcia AJ, Wu M, Lawson DA, Witte ON, Wu H (2006) Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1480–1485
12. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV (2008) Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 18: 260–267
13. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M et al (2007) Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 11: 259–273
14. Hu Y, Smyth GK (2009) ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods* 347: 70–78
15. Hwang-Verslues WW, Chang P-H, Wei P-C, Yang C-Y, Huang C-K, Kuo W-H, Shew J-Y, Chang K-J, Lee EY-HP, Lee W-H (2011) miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1. *Oncogene* 30: 2463–2474
16. Martowicz A, Spizzo G, Gastl G, Untergasser G (2012) Phenotype-dependent effects of EpCAM expression on growth and invasion of human breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 12: 501
17. Li X, Xu F, Chang C, Byon J, Papayannopoulou T, Deeg HJ, Marcondes AM (2013) Transcriptional regulation of miR-10a/b by TWIST-1 in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 98: 414–419
18. Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Raman V (2009) Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* 11: 1318–1328
19. Jin H, Yu Y, Chrisler WB, Xiong Y, Hu D, Lei C (2012) Delivery of microRNA-10b with polylysine nanoparticles for inhibition of breast cancer cell wound healing. *Breast Cancer (Auckl)* 6: 9–19
20. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449: 682–688
21. Chumsri S, Phatak P, Edelman MJ, Khakpour N, Hamburger AW, Burger AM (2007) Cancer stem cells and individualized therapy. *Cancer Genomics Proteomics* 4: 165–174
22. Manuel Iglesias J, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguara A, Cufi S, Pavon A, Menendez JA, Dopazo J et al (2013) Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS ONE* 8: e77281
23. Zhou J, Wulfkühle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E, Zhang Y (2007) Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16158–16163

24. Liu S, Sun J, Lan Q (2013) TGF-beta-induced miR10a/b expression promotes human glioma cell migration by targeting PTEN. *Mol Med Rep* 8: 1741–1746
25. Perry JM, He XC, Sugimura R, Grindley JC, Haug JS, Ding S, Li L (2011) Cooperation between both Wnt/catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes Dev* 25: 1928–1942
26. Dubrovska A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira S-M, García-Echeverría C, Schultz PG, Reddy VA (2009) The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 268–273
27. Hart JR, Vogt PK (2011) Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget* 2: 467–476
28. Chin YR, Yuan X, Balk SP, Toker A (2014) PTEN-deficient tumors depend on AKT2 for maintenance and survival. *Cancer Discov* 4: 942–955
29. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J (2013) Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 10: 143–153
30. Buffa FM, Camps C, Winchester L, Snell CE, Gee HE, Sheldon H, Taylor M, Harris AL, Ragoussis J (2011) microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Res* 71: 5635–5645
31. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 123: 725–731
32. Aguirre-Gamboa R, Trevino V (2014) SurvMicro: assessment of miRNA-based prognostic signatures for cancer clinical outcomes by multivariate survival analysis. *Bioinformatics* 30: 1630–1632