



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

Identificación de un panel de microRNAs  
circulantes con posible uso para el  
diagnóstico y pronóstico de cáncer de  
mama.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:  
ALEJANDRO GONZALEZ PEREZ

Asesor Dr. Jorge Meléndez Zajgla

Co-Asesor M. en C. Maritere Domínguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2017.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de un panel de microRNAs circulantes con posible uso para el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama.

Que presenta el pasante: Alejandro Gonzalez Perez

Con número de cuenta: 309111003 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Mayo de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Lucero Paniagua García	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.



## DEDICATORIAS

---

*A mi Padre y mi Madre.*

*Porque sus consejos me ayudaron a tomar las mejores decisiones, porque su esfuerzo ha hecho que no me falte nada y porque su fortaleza y amor son la guía que me han dado para poder enfrentar el mundo. Gracias por estar siempre conmigo, por enseñarme con paciencia y gracias por haberme educado así, estoy orgulloso de ser como soy y se lo debo a ustedes.*

*A mis hermanos Adriana y Mario.*

*Porque con su ejemplo me han enseñado a salir adelante. Quiero agradecerles por su paciencia, por compartir sus vidas, por preocuparse por su hermano menor y sobre todo, por estar siempre en los momentos más importantes de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la UNAM FES Cuautitlán y a todos mis profesores, por darme las mejores herramientas para la vida al haber compartido sus conocimientos y experiencias, por ser parte de mi formación y por los recuerdos que atesoraré.*

*Al Dr. Jorge por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, gracias por su tiempo al dirigir y asesorar mi trabajo.*

*A la Dra. Magali por brindarme sus conocimientos, su tiempo y su paciencia, gracias por su apoyo y motivación.*

*A la Dra. Gisela y a Javier por hacer mi estancia en el laboratorio agradable y por el apoyo que me brindaron al estar siempre disponibles para compartir su conocimiento y despejar mis dudas.*

*A mis amigos Abraham, Jair, Larissa y Paola por crear juntos los mejores momentos, por ser roomies y más que eso, una familia.*

*A mis amigos Alan, Cynthia, Daniela, Gabriela, Luis y Viridiana por vencer la prueba del tiempo seguir siendo amigos como desde el primer momento, gracias por su apoyo incondicional y por qué las reuniones, aunque ahora sean escasas, sean por consecuencia momentos especiales.*

*A la Dr. Martha por ser una fuente de inspiración y motivación, gracias por poner una guía en mi camino.*

*Gracias a toda mi familia y sobre todo a mi tía Kary y tía Tere por permitirme quedarme a vivir un tiempo en sus casas, su apoyo facilitó en gran medida este proceso, muchas gracias.*

# ÍNDICE

---

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN .....	2
2.1.	Cáncer.....	2
2.2.	Características del cáncer.....	2
2.2.1.	Señalización proliferativa sostenida .....	2
2.2.2.	Evasión de supresores de crecimiento .....	2
2.2.3.	Resistencia a la muerte celular .....	3
2.2.4.	Inmortalidad replicativa.....	4
2.2.5.	Angiogénesis.....	4
2.2.6.	Invasión y metástasis.....	5
2.2.7.	Inestabilidad genómica.....	5
2.2.8.	Inflamación.....	5
2.2.9.	Reprogramación metabólica .....	6
2.2.10.	Evasión de la respuesta inmune .....	6
2.3.	Epidemiología. ....	7
2.4.	Cáncer de mama.....	7
2.4.1.	Epidemiología.....	7
2.4.2.	Factores de riesgo.....	8
2.4.3.	Diagnóstico y clasificación.....	9
2.4.4.	MicroRNAs .....	10
III.	ANTECEDENTES .....	13
IV.	JUSTIFICACION .....	17

V.	OBJETIVOS.....	18
5.1.	Objetivo general .....	18
5.2.	Objetivo específico. ....	18
5.3.	Objetivos Particulares.....	18
VI.	MATERIAL Y MÉTODO .....	19
6.1.	Esquema de trabajo .....	19
6.2.	Líneas celulares. ....	19
6.3.	Cultivo celular.....	20
6.4.	Extracción de RNA de líneas celulares. ....	20
6.5.	Obtención de suero. ....	20
6.6.	Sueros de pacientes con CM congelados.....	21
6.7.	Extracción de RNA a partir de suero. ....	21
6.7.1.	QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma kit. ....	21
6.7.2.	Trizol/Glycoblue.....	21
6.7.3.	ZYMO Direct-zol RNA mini Prep kit. ....	21
6.8.	Reacción de retrotranscripción de microRNA (RT Taqman. ....	22
6.9.	Reacción de PCR cuantitativa (qPCR con sondas TaqMan). ....	22
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.1.	Extracción y análisis de calidad de RNA de líneas celulares de CM.....	24
7.2.	Expresión relativa de miRNAs en líneas celulares de CM. ...	26
7.3.	Selección de método de extracción de RNA en suero. ...	28



7.4.	Expresión relativa de miRNAs en suero de pacientes con CM. ....	30
VIII.	CONCLUSIONES .....	34
IX.	PERSPECTIVAS .....	35
X.	REFERENCIAS.....	36
XI.	ANEXO.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura No. 2.1.	Marcadores de cáncer.....	3
Figura No. 2.2.	Modelo general de la biogénesis y formación de la maquinaria catalítica de los miRNAs.....	11
Figura No. 3.1.	Heat map de expresión de miRNAs en tejido tumoral de CM.....	14
Figura No. 3.2.	Representaciones esquemáticas de las sondas y cebadores utilizados en los ensayos TaqMan de miRNAs.....	15
Figura No. 3.3.	Gráfica de amplificación típica de una reacción de RTqPCR.....	16
Figura No. 7.1.	Longitudes de onda de máxima absorción de los ácidos nucleicos y las proteínas.....	25
Figura No. 7.2.	Análisis de calidad de preparaciones de RNA por electroforesis en gel.....	26
Figura No. 7.3.	Nivel de expresión de miRNAs en líneas celulares de CM.....	27
Figura No. 7.4.	Expresión relativa de mir135, mir224, mir589 y mir133a en muestras de suero.....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla No. 6.1.	Características de los sueros congelados de pacientes con CM.....	20
Tabla No. 6.2.	Ensayos TaqMan de miRNAs utilizados.....	23
Tabla No. 7.1.	Concentración de RNA total de líneas celulares de <b>CM</b> .....	24
Tabla No. 7.2.	Cuantificación de RNA después de su extracción por diferentes métodos, de una muestra de suero control... ..	29
Tabla No. 7.3.	Cuantificación de RNA después de su extracción con Trizol/Glycoblue, de muestras de suero.....	30
Tabla No. 11.1.	Valores de CT obtenidos para cada reacción de <b>RTqPCR</b> .....	40
Tabla No. 11.2.	Media de los valores de CT del gen de referencia RNU6B.....	40
Tabla No. 11.3.	Normalización de los valores de CT de los miRNAs <b>analizados (<math>\Delta</math>CT)</b> .....	41
Tabla No. 11.4.	Valores de $2^{-(\Delta$ CT)} de los miRNAs analizados.....	41

## ABREVIATURAS

---

ATP	Adenosin trifosfato
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CM	Cáncer de mama
CT	Threshold cycle/ Ciclo de umbral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
miRNA	Micro RNA
uL	microlitro
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
PM	Peso molecular
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT	Retrotranscripción
snoRNA	RNAs pequeños nucleolares
SFB	Suero fetal bovino

## I. RESUMEN

---

El cáncer de mama en los últimos años ha cobrado relevancia ya que mundialmente es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres. En México ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años. En etapas iniciales, el cáncer de mama solamente es detectable por estudios de imagen y en menor proporción por clínica, por lo que a la fecha, se han realizado diversos estudios donde se reportan microRNAs regulados diferencialmente entre el tumor y el tejido mamario normal, que sugieren su uso potencial como clasificadores de la enfermedad y herramientas de pronóstico en este campo, además son capaces de permanecer en suero largos periodos de tiempo ya que son altamente resistentes a la degradación por RNasas. En este estudio se propone comparar la expresión de un grupo de microRNAs de la firma genómica encontrada por el grupo de trabajo del laboratorio, en suero de donadores sanos (sueros control) y sueros de pacientes con cáncer de mama diagnosticado, ya que podrían servir como biomarcadores identificables con un método menos invasivo que los métodos actuales. Como resultado, se encontraron diferencias en la expresión relativa de mir224, mir589 y mir133a entre sueros de pacientes con cáncer de mama y sueros control, sabiendo que estos resultados no son concluyentes debido a la población tan pequeña que se utilizó, pero como estudio piloto, se da la pauta para aumentar la población y las mediciones necesarias para establecer a estos y otros microRNAs como biomarcadores de cáncer de mama.

## II. INTRODUCCIÓN

---

### 2.1. Cáncer

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades que pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo y en personas de todas las edades. Los individuos afectados presentan un número único e impredecible de mutaciones que dan como resultado un fenotipo característico de las células tumorales, este puede ser identificado por los 10 marcadores de cáncer propuestos por Hanahan y Weinberg, los cuales son capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del tumor (figura 2.1) (Cairns, R., 2011; Hanahan, D. 2011).

### 2.2. Características del cáncer

#### 2.2.1. Señalización proliferativa sostenida

Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y la liberación de señales promotoras de crecimiento que influyen en la progresión del ciclo celular, garantizando una homeostasis en el número de células que mantienen la arquitectura y funciones normales del tejido. Al desregular estas señales surge un rasgo fundamental de las células cancerosas que implica su capacidad para sostener la proliferación crónica. Esto lo logran de varias maneras, pueden iniciar una estimulación proliferativa autócrina produciendo ligandos del factor de crecimiento entre ellos mismos; o pueden enviar señales que estimulen a las células normales asociadas al tumor para que suministren varios factores de crecimiento (Hanahan, D. 2000).

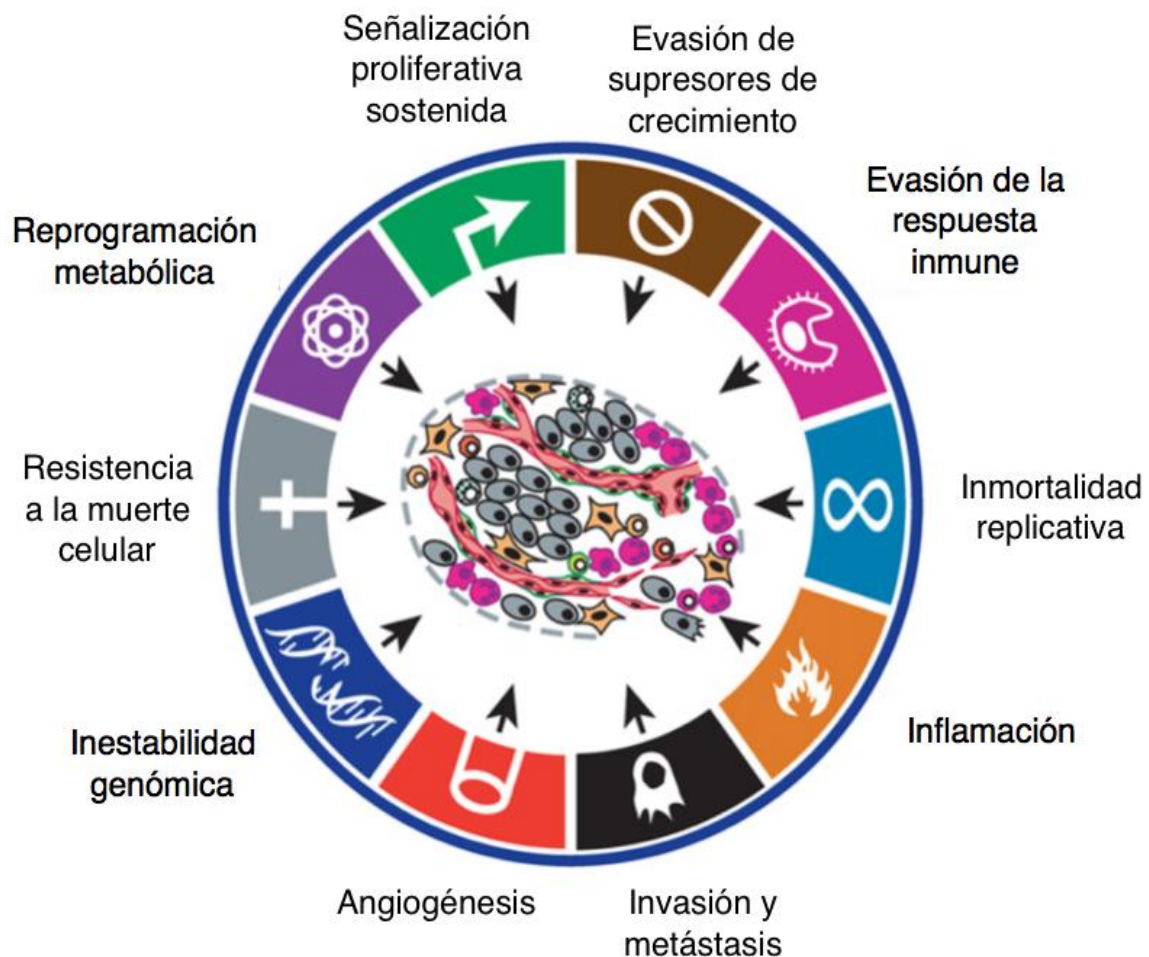
#### 2.2.2. Evasión de supresores de crecimiento

Las células cancerosas poseen la capacidad de eludir potentes programas que regulan negativamente la proliferación celular, muchos de ellos dependen de los genes supresores de tumor, actuando estos de

diversas maneras para limitar el crecimiento y la proliferación celular (Hanahan, D. 2000).

### 2.2.3. Resistencia a la muerte celular

A la muerte celular mediada por un proceso activo y controlado se le llama apoptosis y se encarga de eliminar células no necesarias o dañadas sin una respuesta inflamatoria; es un mecanismo de respuesta biológica a señales procedentes del interior o del exterior de las células (Repetto, M. 2009). Las células tumorales limitan o evitan la apoptosis



**Figura No. 2.1. Marcadores de cáncer.** La imagen muestra las 10 características distintivas para el cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg. Modificado de Hanahan, D. 2011.

mediante múltiples mecanismos; siendo común la pérdida de la función o la eliminación del sensor de daño crítico TP53. Otras alternativas para evadir la apoptosis o para evitar la función de TP53 son la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de señales de supervivencia (Igf1/2); o disminuir los factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) (Hanahan, D. 2000).

#### 2.2.4. Inmortalidad replicativa

Las células normales solo son capaces de pasar por un número limitado de divisiones celulares debido al acortamiento progresivo de los telómeros tras cada generación, estos están compuestos por múltiples repetidos de hexanucleótidos en tándem que protegen al DNA cromosómico, y que al erosionarse, dejan el material genético inestable y la célula entra en apoptosis. En las células cancerosas o inmortalizadas la telomerasa se expresa a niveles funcionales significativos, esta es una polimerasa especializada que añade segmentos de repetidos a los extremos de DNA telomérico, por lo que contrarresta su erosión progresiva (Hanahan, D. 2000).

#### 2.2.5. Angiogénesis

La angiogénesis es el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, en donde células endoteliales crecen hacia un estímulo angiogénico como VEGF-A; debido a que se necesitan capilares en todos los tejidos para el intercambio de nutrientes y metabolitos, este proceso ocurre durante toda la vida (Adair, T. 2010). Los tumores, al igual que los tejidos normales, requieren nutrientes y oxígeno así como la capacidad de evacuar desechos metabólicos, es por eso que durante la progresión tumoral casi siempre se activa un interruptor angiogénico que permanece encendido, provocando que de la vasculatura que permanecía quiescente, broten continuamente y de manera desordenada, vasos



sanguíneos que ayudan a sostener el crecimiento neoplásico (Hanahan, D. 2000).

#### 2.2.6. Invasión y metástasis

El proceso de invasión y metástasis se ha esquematizado como una sucesión de cambios biológicos celulares, comenzando por la invasión local, seguido de la intravasación de células cancerosas en vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, donde las células transitan a través del sistema linfático y sanguíneo, hasta su escape de la lumina, también llamado extravasación, donde se inicia la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micro-metástasis) y finalmente crecen hasta formar tumores macroscópicos (colonización). Debido a la pérdida de la expresión de moléculas de adhesión célula a célula y célula matriz extracelular como la E-cadherina; y la expresión aumentada de moléculas de adhesión asociadas con la migración de células como la N-cadherina, las células cancerosas obtienen la capacidad de realizar este proceso de invasión y metástasis (Hanahan, D. 2000).

#### 2.2.7. Inestabilidad genómica

La adquisición de las múltiples capacidades antes mencionadas depende de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas, ya que ciertos genotipos mutantes confieren una ventaja selectiva a las subclonas, permitiendo su crecimiento y eventual dominación en el entorno tisular local. Esta inestabilidad genómica es consecuencia de los defectos en el mantenimiento y la reparación del genoma (Hanahan, D. 2011).

#### 2.2.8. Inflamación

Se ha encontrado que los tumores se encuentran infiltrados por células del sistema inmunológico y por tanto reflejan condiciones

inflamatorias que surgen en tejidos no neoplásicos. La presencia de estas células en el tumor tiene un efecto contrario a lo esperado, ya que estas células pueden liberar moléculas de radicales libres como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROs y ERN), siendo activamente mutagénicas para las células cancerosas cercanas, acelerando su evolución genética hacia estados de mayor malignidad (Hanahan, D. 2011).

#### 2.2.9. Reprogramación metabólica

Otto Warburg observó que incluso en presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa, limitándolo en gran medida a la glucólisis, llamando a este estado **“glucólisis aerobia”**. Debido a la relativa mala eficiencia de la generación de ATP por la glucólisis en relación con la fosforilación oxidativa mitocondrial, es difícil encontrar lógica a este cambio metabólico. Actualmente se retomó una hipótesis que explica como el aumento de la glucólisis permite el desvío de intermediarios glucolíticos en varias rutas biosintéticas, incluyendo las que generan nucleósidos y aminoácidos; facilitando, la biosíntesis de las macromoléculas y orgánulos necesarios para el montaje de nuevas células (Hanahan, D. 2011).

#### 2.2.10. Evasión de la respuesta inmune

En teoría las células y tejidos son constantemente monitoreados por el sistema inmunológico y dicha vigilancia se encarga de eliminar a la mayoría de las células cancerígenas incipientes y por tanto a tumores nacientes. Aún se desconoce el mecanismo, pero se cree que los tumores sólidos tienen alguna manera de evitar su detección o ser capaces de limitar el alcance de la muerte inmunológica (Hanahan, D. 2011).

### 2.3. Epidemiología.

En general la edad en la que se presenta el cáncer con mayor frecuencia es en personas mayores a 60 años. En todo el mundo es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, en el 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer; además de que se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En México, en el 2012, se contaba con una mortalidad general de 67.8 por cada 100 000 habitantes y con una incidencia de 127.4 por cada 100 000 habitantes, siendo el sexo femenino el más afectado (GLOBOCAN, 2016).

### 2.4. Cáncer de mama.

#### 2.4.1. Epidemiología

El cáncer de mama (CM) en los últimos años ha cobrado relevancia ya que mundialmente es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres, con cerca de 500 mil decesos cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en desarrollo. En México, a partir de 2006 el CM ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, En el año 2010 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en las ultimas 2 décadas. Esta patología se diagnostica en promedio a los 53 años de edad y es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres de 45 años o menores siendo la tasa de supervivencia para este grupo más baja comparada con su contraparte de mayor edad (Cárdenas, J. 2015).

#### 2.4.2. Factores de riesgo

El principal factor de riesgo para el desarrollo de CM es el aumento de exposición a estrógenos y progestágenos, ya que son hormonas que estimulan el desarrollo y crecimiento del tejido mamario; esto ocurre cuando la vida menstrual es mayor a 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años), por no haber tenido embarazos o el primero a término fue después de los 30 años, por tratamiento hormonal en la perimenopausia o posmenopausia por más de 5 años, por sufrir obesidad, entre otras causas. Además presenta otros factores de riesgo, como es el sexo femenino, el envejecimiento, antecedentes familiares de CM, raza y origen étnico, tejido mamario denso, estar expuesto a radiaciones ionizantes principalmente en el tórax, síndromes hereditarios de CM, entre otros (American Cancer Society, 2016; Cárdenas, J. 2015).

#### 2.4.3. Diagnóstico y clasificación

Después de que se descubre una masa o calcificaciones anormales mediante una mamografía de detección; un bulto o un nódulo en la mama durante un examen clínico o un autoexamen; o con menos frecuencia, se puede observar una mama enrojecida o hinchada; o nódulos debajo del brazo; se inicia una serie de pruebas necesarias para evaluar un posible CM. Se inicia realizando pruebas de diagnóstico por imagen para saber más acerca del área sospechosa encontrada, pero solo una biopsia permite formular un diagnóstico definitivo, esto se refiere a la extirpación de una pequeña cantidad de tejido para su examen a través de un microscopio y otras pruebas histológicas que puedan indicar la presencia de cáncer (Arce, C. 2016; Cancer.net, 2017).

#### 2.4.3.1. Diagnóstico histológico

El examen microscópico del tumor se usa para determinar si es invasivo, ductal *in situ* o lobular *in situ*; y si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos (American Cancer Society, 2017).

#### 2.4.3.2. Grado histológico

Con la biopsia también se determina el grado del tumor, el cual hace referencia a la diferencia que existe entre las células cancerosas y las células sanas y si es de crecimiento rápido o lento. Para determinarlo se analizan tres características histológicas (formación de túbulos, grado nuclear y número de mitosis) y se asigna una puntuación que se utiliza para obtener el grado 1, 2 o 3. En general, un grado con un número menor indica un cáncer de crecimiento más lento, mientras que un número mayor indica un cáncer de crecimiento más rápido, el cual es más probable que se propague (American Cancer Society, 2017; Cárdenas, J. 2015).

#### 2.4.3.3. Sistema TNM

Es un sistema de estadificación convencional para el CM, que representa su estadio o etapa, basado en la extensión y propagación del tumor. La T se refiere al tumor primario, N indica que hay propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos cercanos y la M se refiere a metástasis. Una vez que las categorías T, N y M se han determinado, la información se combina para asignar una etapa general que se expresan en números romanos desde I, la etapa menos avanzada, hasta IV, la etapa más avanzada; el cáncer no invasivo (carcinoma *in situ*) se reporta como etapa 0 (American Cancer Society, 2017; Cárdenas, J. 2015).

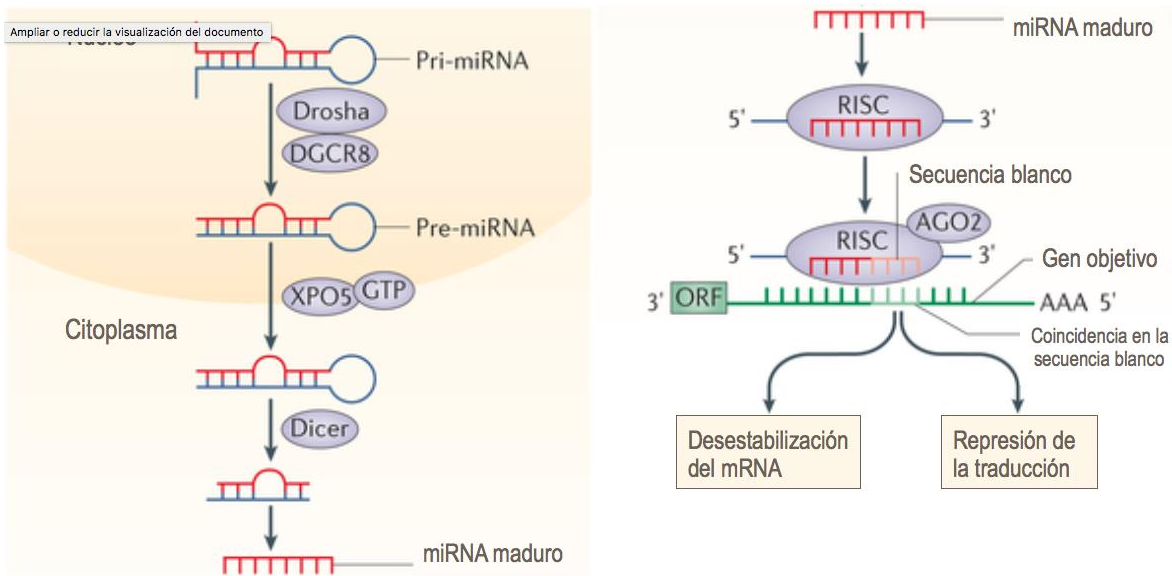
#### 2.4.3.4. Expresión de receptores

Se puede clasificar al cáncer de mama basándose en la expresión de receptores de estrógeno o progesterona y en la cantidad de la proteína HER2 presentes en los tumores. Saber el estado de estos receptores es importante para decidir las opciones de tratamiento; ya que células de cáncer de seno con receptores de hormonas positivos pueden ser tratados con terapia hormonal que reduce los niveles de estrógeno y/o progesterona. En cambio la terapia hormonal no es útil para los cánceres triple negativo, estos tienden a crecer y propagarse más rápido, además de ser más comunes en mujeres jóvenes.

#### 2.4.4. MicroRNAs

En el 2002 Sydney Bernner, Robert Horvitz y John Sulston ganaron el premio nobel de medicina por identificar en su trabajo, pequeñas moléculas de RNA no codificante de alrededor de 22 nucleótidos, que regulaban el desarrollo de *C. elegans*. Después Tuschl, Bartel y Ambros lograron identificar numerosas moléculas de RNA de 22 nt en humanos, moscas y gusanos; nombrándolas microRNA (miRNAs). Estas moléculas pequeñas de RNA no codificante actúan como reguladoras de la expresión al unirse a RNA mensajeros (mRNAs), degradándolos o alternativamente, inhibiendo su traducción a proteínas. Estos miRNAs presentan una gran diversidad de dianas y funciones, entre las que podemos destacar el control de la proliferación y muerte celular (Appasani, K. 2005; Navarro, A. 2008). Los miRNAs son la clase más abundante de moléculas reguladoras génicas en organismos multicelulares; sus genes están distribuidos a lo largo del genoma y se encuentran localizados en exones e intrones de RNA no codificante y RNA codificante, estos últimos se

pueden correlacionar con la regulación transcripcional de su gen huésped (Carmichael, G. 2010; Lugo, A. 2009).



**Figura No. 2.2. Modelo general de la biogénesis y formación de la maquinaria catalítica de los miRNAs.** La imagen muestra el proceso que necesitan los transcritos de Pri-miRNAs para su maduración y las asociaciones indispensables con proteínas para que puedan llevar a cabo su función. Modificado de Issler, O. 2015.

Los miRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II, que transcribe una larga molécula de RNA (~80 nt) conocida con el nombre de miRNA primario (pri-miRNA) la cual es procesada en el núcleo por el complejo proteico denominado "microprocesador", formado por la enzima RNasa III "Drosha" y la proteína de unión a RNA de doble cadena "DGCR8" (en humanos), generando un precursor más pequeño conocido como pre-miRNA (~65 nt). Estos son exportados al citoplasma al ser reconocidos por el factor nuclear de exportación Exportina-5 (Exp5) junto con la proteína de unión a GTP Ran. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por la endonucleasa Dicer, dando lugar a un miRNA dúplex, formado por una cadena de miRNA maduro y una cadena de miRNA complementaria (miRNA\*). Una proteína Argonauta se une al miRNA maduro para incorporarlo al complejo inductor de silenciamiento de

miRNA (miRISC), el cual está formado por la proteína de unión al RNA sensible a la transactivación (TRBP) y Dicer. La maquinaria catalítica es guiada por la proteína Argonata y la familia de proteínas GW182 a el mRNA diana complementario para su silenciamiento génico post-transcripcional mediante la degradación y/o de la inhibición de la traducción (figura 2.2) (Lugo, A. 2009; Navarro, A. 2008; Lin, S. 2015).



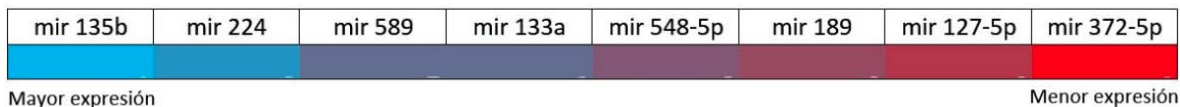
### III. ANTECEDENTES

En estudios recientes se ha señalado la importancia de los miRNAs ya que están implicados en múltiples procesos celulares realizando un gran número de funciones reguladoras. Los miRNAs con función oncogénica o supresora de tumor han tomado relevancia ya que la modificación de su expresión se ha asociado con carcinogénesis, metástasis y a la respuesta a tratamientos. Muchos estudios han identificado perfiles de expresión diferencial entre el tejido sano, los tumores e incluso entre sus subtipos histológicos, por lo que dichos perfiles pueden ser utilizados para diferenciar entre lesiones malignas y pre-malignas además de poder predecir el comportamiento biológico y clínico del tumor (Frixia, T. 2015).

Se han reportado miRNAs que se expresan diferencialmente entre el tejido normal y los tumores mamarios; además de otros que al sobreexpresarse o inhibirse se relacionan con características y funciones específicas en las células cancerosas (López, C. 2014). Además se conoce que los miRNAs pueden encontrarse en suero por largos periodos de tiempo ya que son altamente resistentes a la degradación por RNAsas. Arroyo menciona que esta característica es debida a su capacidad de asociación con proteínas, por lo que se podrían convertir en importantes biomarcadores para el cáncer y otras enfermedades ya que la obtención de sangre es menos invasiva que la obtención de una biopsia (Arroyo, J. 2011).

**En el grupo de trabajo del laboratorio de "Genómica Funcional del Cáncer"** dentro del INMEGEN, mediante el análisis de datos de microarreglos de diversos estudios, se ha identificado una firma genómica de miRNAs con la capacidad de predecir sobrevida de la enfermedad y sobrevida total. Esta firma genómica ha sido probada en tumores mamarios embebidos

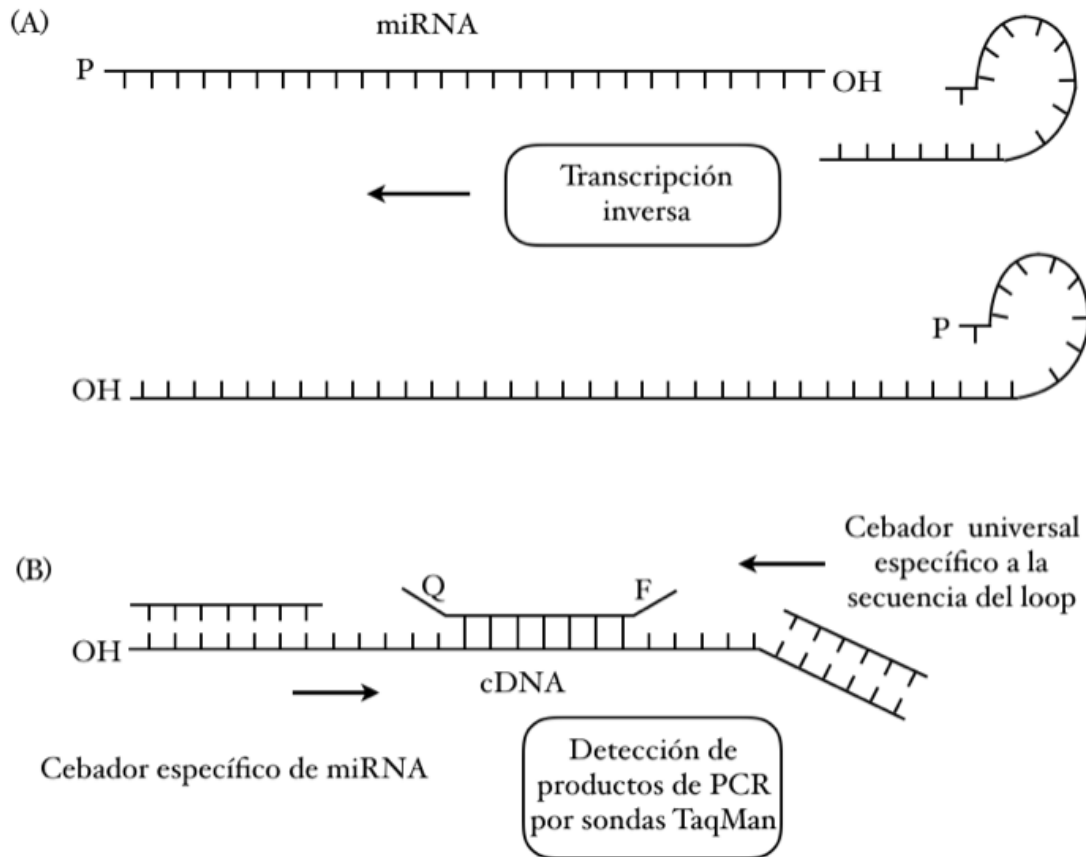
en parafina de pacientes diagnosticados con CM por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa de Transcripción Inversa (RTqPCR) con ensayos TaqMan, obteniendo el nivel de expresión de los miRNAs en estas muestras (Figura 3.1).



**Figura No. 3.1. Heat map de expresión de miRNAs en tejido tumoral de CM.** La expresión de los miRNAs en tejido tumoral fue medido por RTqPCR utilizando ensayos TaqMan de miRNAs. Se utilizó una escala en donde el color azul representa el miRNA con mayor expresión y el color rojo el de menor expresión. Datos no publicados.

Debido a los desafíos que existen para convertir miRNAs maduros en DNA complementario (cDNA), los ensayos TaqMan ocupan un método de síntesis de cDNA más preciso que los sistemas de retrotranscripción convencionales; en donde los miRNAs se transcriben de forma inversa individualmente utilizando cebadores específicos (RT) los cuales están diseñados para reconocer no más de 6 a 8 nucleótidos del extremo 5´ de la secuencia objetivo y alargarla con una secuencia universal, la cual se encuentra en forma de tallo-bucle (loop) para evitar el reconocimiento de otros miRNAs o sus formas pre- y pri-miRNAs (Figura 3.2.a). El resultado es un cDNA utilizado como sustrato en la reacción de PCR cuantitativa (qPCR), y para esta reacción se utiliza una mezcla que contiene un cebador específico para la secuencia universal del loop, un cebador específico para el miRNA y una sonda específica de la región central del cDNA (o sonda de hidrolisis), diseñada con un indicador fluorescente en el extremo 5´ y un quencher o extintor de la fluorescencia en el extremo 3´ (figura 3.2.b); la estrecha proximidad de estas moléculas impide la fluorescencia de la molécula reportera, siendo necesaria la degradación de la sonda de hidrólisis por medio de la DNA polimerasa con actividad exonucleasa 5´-3´ para que la molécula indicadora pueda emitir su señal.

Comúnmente las sondas TaqMan ocupan la molécula carboxifluoresceína (FAM) la cual es un colorante fluorescente con una longitud de onda de absorción de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 517 nm

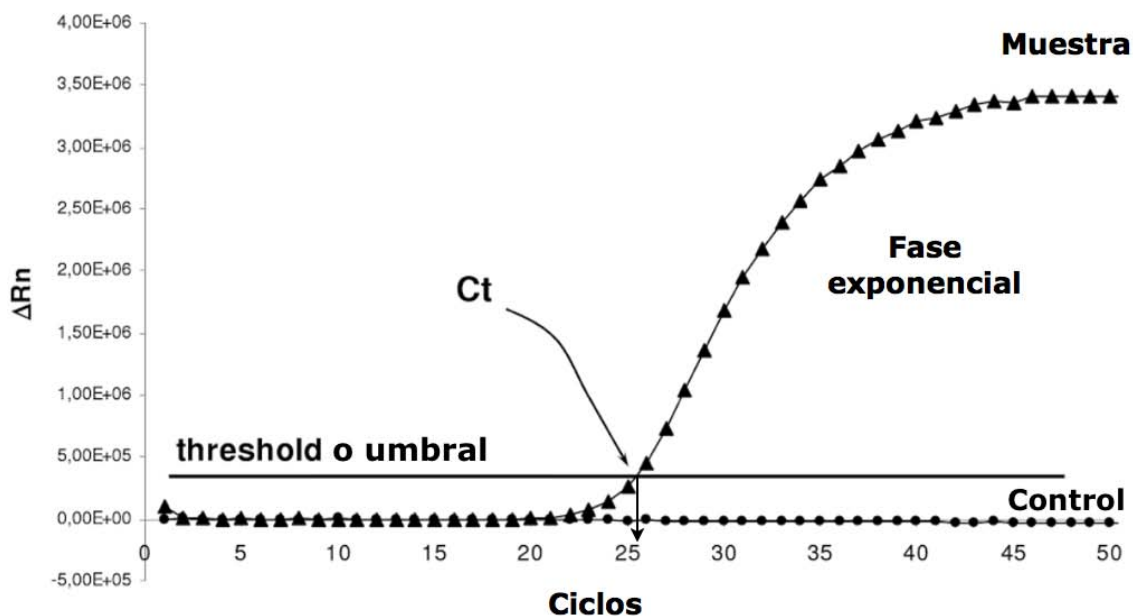


**Figura No. 3.2. Representaciones esquemáticas de las sondas y cebadores utilizados en los ensayos TaqMan para RTqPCR de miRNAs.** (A) Transcripción inversa de miRNAs utilizando un cebador RT en loop o tallo-bucle específico. (B) Detección de amplicón utilizando una molécula fluorescente unida a una sonda de hidrólisis. Modificado de Nolan 2013.

(Nolan, T. 2013).

El principio de la reacción de qPCR se basa en la detección, en tiempo real, de la fluorescencia de la molécula reportera y cuya intensidad es correlacionada con la cantidad de DNA presente en cada ciclo de

amplificación. El punto en el cual la fluorescencia de la reacción supera la fluorescencia basal, se considera como el ciclo de umbral (CT, por sus siglas en inglés, threshold cycle), considerando este valor como inversamente proporcional a la expresión del gen analizado (figura 3.3). Para comparar la expresión de los miRNAs entre diferentes muestras es necesario normalizar los datos obtenidos utilizando genes de referencia como lo son el gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa (GAPDH),  $\beta$ -actina (ACTB) o  $\alpha$ -tubulina (TUBA1); los cuales son frecuentemente utilizados para la normalización de mRNA, pero para la normalización de miRNAs es común utilizar RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), como lo es RNU6B, o se realizan micro arreglos para identificar miRNAs expresados constantemente en todas las muestras para que sean utilizados como genes de referencia (De Alba, D. 2013; Nolan, T. 2013).



**Figura No. 3.3. Gráfica de amplificación típica de una reacción de RTqPCR.** Se identifica una línea base seguida de una fase exponencial, el CT es identificado cuando la fluorescencia cruza el threshold o umbral.

Modificado de (Patrinos, G. 2005)

#### IV. JUSTIFICACION

El CM en etapas iniciales se presenta de manera subclínica en la mayoría de los casos, es decir que solamente es detectable por estudios de imagen y en menor proporción por clínica. A la fecha, se han reportado diversos estudios que identifican miRNA regulados diferencialmente entre el tumor y el tejido mamario normal, que sugieren su uso potencial como clasificadores de la enfermedad y herramientas de pronóstico en este campo. (Arce, C. 2016; López, C. 2014). Este estudio propone comparar la expresión de un grupo de miRNAs de la firma genómica encontrada por el grupo de trabajo del laboratorio, en suero normal y sueros de pacientes con CM diagnosticado, ya que podrían servir como biomarcadores identificables con un método menos invasivo que los utilizados actualmente.

## V. OBJETIVOS

---

### 5.1. Objetivo general

Analizar la expresión de un grupo de miRNAs presentes en suero de pacientes con CM utilizando RTqPCR para establecer su posible uso como biomarcadores.

### 5.2. Objetivo específico.

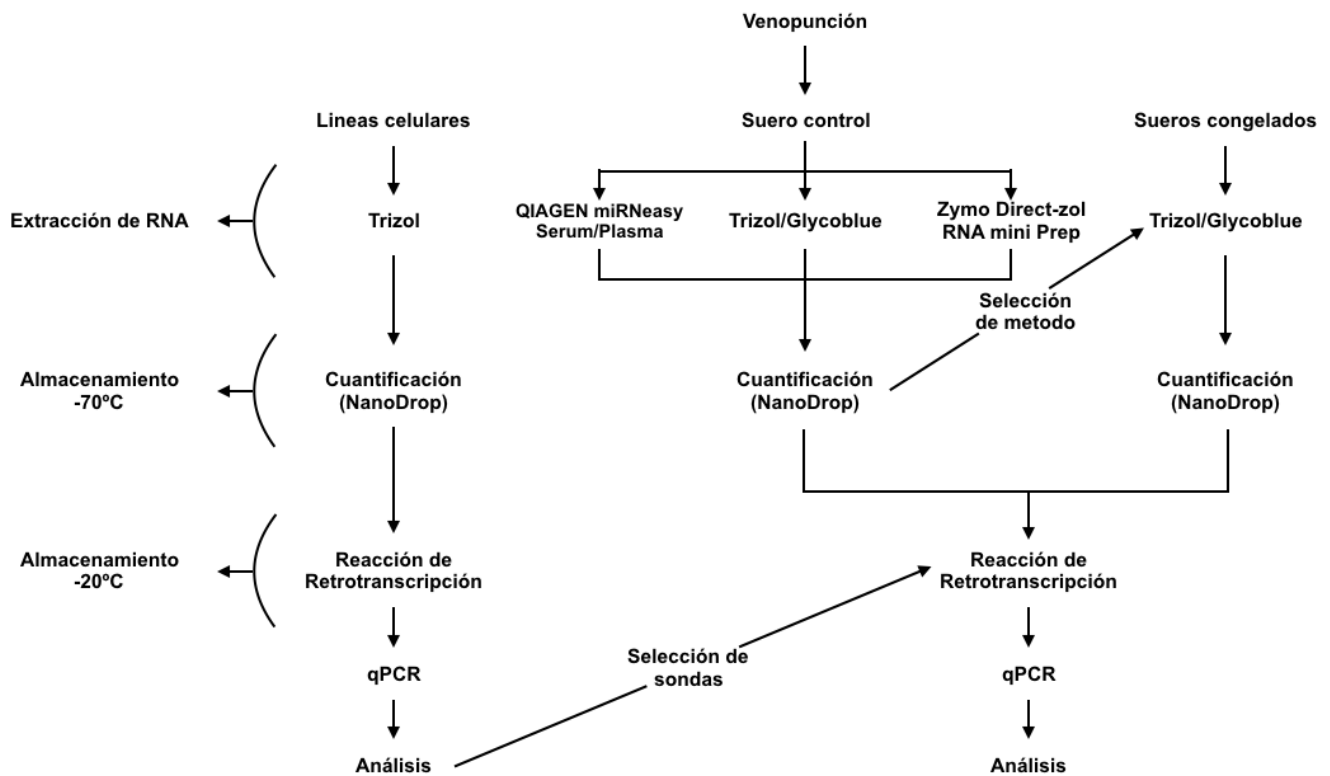
Comparar la expresión de un grupo de miRNAs medidos en suero de pacientes con CM contra los de pacientes control utilizando los resultados de RTqPCR con sondas TaqMan para identificar un perfil de expresión diferencial.

### 5.3. Objetivos Particulares

- Medir la expresión del grupo de miRNAs mir135b, mir189 y mir589 en líneas celulares derivadas de carcinoma de tejido mamario mediante RTqPCR para identificar una posible relación con estudios previos en tejido tumoral de CM.
- Comparar métodos de extracción de RNA de suero comerciales utilizando un suero control fresco y midiendo la concentración de RNA mediante espectrometría para poder utilizar el más eficiente con los sueros problema.
- Medir la expresión del grupo de miRNAs mir135b, mir224, mir589 y mir133a en dos sueros controles y en 3 sueros de pacientes con CM por medio de la técnica de RTqPCR para establecer un perfil de expresión diferencial entre los dos grupos.

## VI. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1. Esquema de trabajo



### 6.2. Líneas celulares.

En este estudio se utilizaron tres líneas celulares de CM.

- MCF7. Línea celular humana derivada de adenocarcinoma de glándula mamaria.
- MDA-MB-468. Línea celular humana derivada de adenocarcinoma de glándula mamaria.
- T-47D. Línea celular humana derivada de carcinoma ductal de glándula mamaria.

### 6.3. Cultivo celular.

Se cultivaron todas las líneas celulares con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron a 37°C con atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%.

### 6.4. Extracción de RNA de líneas celulares.

Se utilizó un mililitro de Trizol para lisar el pellet celular y posteriormente con cloroformo y centrifugación se obtuvo una fase acuosa en la que se precipitó el RNA total con isopropanol para después resuspenderlo en 40uL de Agua/DEPC. La cuantificación del material genético se realizó por espectrometría con el equipo NanoDrop y se revisó la integridad del RNA utilizando SYBR safe en gel de agarosa 2% (agarosa diluida con Agua/DEPC) y la electroforesis se llevó a cabo a 100v por 25 minutos.

### 6.5. Obtención de suero.

Se realizó venopunción con jeringa de 5ml en el brazo de una voluntaria y después se transfirió la sangre a un tubo para dejarla coagular entre 15 y 20 minutos, posteriormente se centrifugó 3000 RPM por 15 minutos para obtener el suero. Por último, se hicieron alícuotas del suero y se conservaron a una temperatura de -70°C.

**Tabla No. 6.1. Características de los sueros congelados de pacientes con CM.**

Muestra	Cantidad (ml)	Color
Control 2 (paciente sano)	1.25	amarillo
Suero 1	1.25	anaranjado
Suero 2	0.75	amarillo
Suero 3	1.5	amarillo



## 6.6. Sueros de pacientes con CM congelados.

Se utilizaron cuatro sueros congelados de los cuales uno pertenece a un paciente sano y los tres restantes son de pacientes con CM diagnosticado. Estos fueron proporcionados por el Centro Médico Nacional **"20 de noviembre"** del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) (tabla 6.1).

## 6.7. Extracción de RNA a partir de suero.

### 6.7.1. QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma kit.

Se mezclaron 200 uL de suero con 1 ml de QIAzol y 200 uL de cloroformo y se centrifugaron para separar una fase acuosa, la cual se mezcló con etanol y se transfirió a una columna proporcionada por el kit, se siguieron los pasos indicados para lavar la columna con los buffers proporcionados y por último se eluyó el RNA con agua libre de RNAsa.

### 6.7.2. Trizol/Glycoblue.

Se mezclaron 150 uL de suero con 450 uL de Trizol y 90 uL de cloroformo y se centrifugaron para separar una fase acuosa y de ella se precipito el RNA con isopropanol y Glycoblue, por último se resuspendió con agua libre de RNAsa.

### 6.7.3. ZYMO Direct-zol RNA mini Prep kit.

Se mezclaron 100 uL de suero con 300 uL de Trizol y centrifugaron, después se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y se le agrego 400 uL de Etanol 100%. La mezcla se transfirió a la columna proporcionada, la cual se centrifugó y lavó con los buffers proporcionados, por último el RNA se eluyó con agua libre de RNAsa.

En todos los métodos de extracción la cuantificación de RNA se realizó mediante espectrometría con el equipo NanoDrop.

#### 6.8. Reacción de retrotranscripción de miRNA (RT Taqman).

Fueron utilizados 6 ensayos TaqMan correspondientes a 5 miRNAs y al snoRNA RNU6B como gen endógeno o de referencia (tabla 6.2).

Por cada reacción de RT se realizó una mezcla con 15 uL de Buffer, 0.15 uL de dNTPs, 0.19 uL de Inhibidor de RNAsa y 1 uL Retrotranscriptasa proporcionados por el kit "Taqman miRNA Reverse Transcription", después se agregó lo equivalente a 10ng de RNA, 1 uL de agua libre de RNAsa y 1.5 uL primer específico a un miRNA (RT). El programa de termociclado fue 16°C 30 minutos, 42°C 30 minutos, 85°C 5 minutos y 4°C como temperatura final. El cDNA se guardó a -20°C.

#### 6.9. Reacción de PCR cuantitativa (qPCR con sondas TaqMan).

Por cada reacción de qPCR se mezcló 10 uL de TaqMan master mix universal, 0.75 uL de sonda taqman específica al miRNA, 7.92 uL de agua libre de RNAsa y 1.33 uL de cDNA correspondiente a la sonda utilizada. Las mezclas se cargaron en una placa de 96 pozos y se utilizó el programa de termociclado, 95°C 10 minutos y 40 ciclos de 95°C 15 segundos, 60°C 60 segundos en el equipo de PCR tiempo real Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System.

Se obtuvieron triplicados de unidades de Ct para cada reacción de qPCR, con estos datos se calculó el  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}$ ) tomando como gen de referencia al snoRNA RNU6B. Para poder comparar el comportamiento del grupo control con el grupo de CM dentro de una gráfica, se calculó el valor de  $2^{-(\Delta Ct)}$  (anexo) y como análisis estadístico se realizó una prueba t de student para datos no pareados con la finalidad de determinar la diferencia entre el grupo control y el grupo de CM para cada miRNA analizado. Se empleó el software GraphPad PRISM 6.01 y se consideró como valor de significancia estadística  $P < 0.05$ .

**Tabla No. 6.2. Ensayos TaqMan de miRNAs utilizados**

miRNA	Secuencia	miRBase	Ensayo TacMan
snRNA U6	CGCAAGGATGACACG CAAATTCGTGAAGCGT TCCATATTTTT		RNU6B
133a	UUUGGUCCCCUCAA CCAGCUG	MI0000450	hsa-miR-133a
135b	UAUGGCUUUUCAUUC CUAUGUGA	MI0000810	hsa-miR-135b
189	GUGCCUACUGAGCUG AUAUCAGU	MI0000231	hsa-miR-189
224	CAAGUCACUAGUGGU UCCGUUUA	MI0009783	hsa-miR-224
589	UGAGAACCACGUCUG CUCUGAG	MI0003599	hsa-miR.589

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

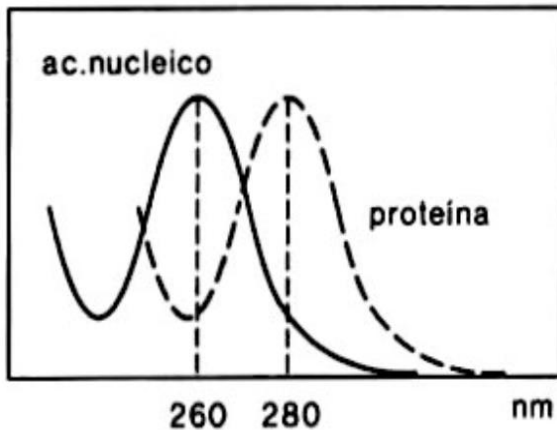
### 7.1. Extracción y análisis de calidad de RNA de líneas celulares de CM

En este estudio se utilizaron las líneas celulares de cáncer MCF7, T-47D y MDA-468 que son derivadas de carcinomas de glándula mamaria (ATTC, 2017). Este grupo se utilizó para comparar su patrón de expresión de miRNAs con el estudio realizado previamente por el grupo de trabajo en muestras tejido de mama embebido en parafina (figura 7.3.c). Con este objetivo, se extrajo RNA al grupo de líneas celulares y se utilizó el equipo espectrofotométrico NanoDrop para cuantificar la concentración de RNA por microlitro, además de la relación 260/280 (tabla 7.1.).

**Tabla No. 7.1. Concentración de RNA total de líneas celulares de CM.**

Línea celular	[ng/uL]	ug RNA	260/280
MCF7	2304	92.160	1.98
T47D	820.7	32.828	2.00
MDA468	3056.9	122.276	1.93

Estos resultados muestran una extracción de RNA exitosa, ya que además de lograr obtener una buena cantidad del ácido nucleico de cada línea celular, la relación 260/280 nos indica un nivel de pureza alto ya que son valores que entran en el rango de 1.8 y 2.0. Este rango está dado por la relación entre la absorbancia de las longitudes de onda de máxima absorción de los ácidos nucleicos y las proteínas, 260 y 280 respectivamente, donde un valor entre 1.8 y 2.0 indica un nivel de pureza alto (Puerta, C. 2015; González, A. 2010) (figura 7.1).



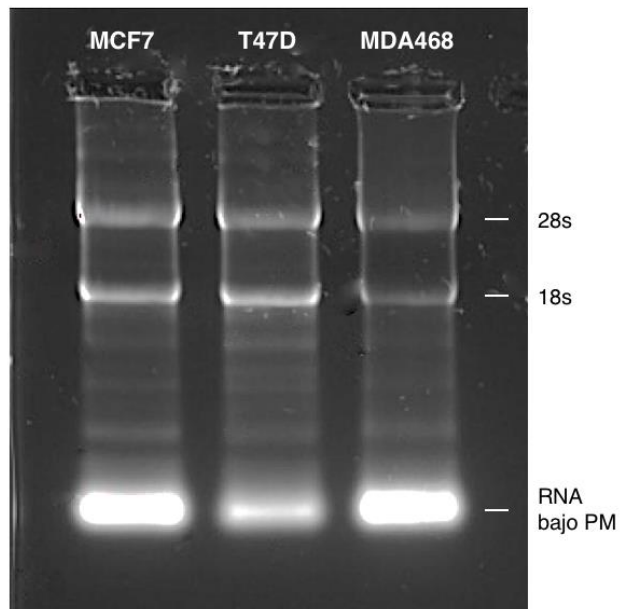
**Figura No. 7.1. Longitudes de onda de máxima absorción de los ácidos nucleicos y las proteínas.** cuando la absorción aumenta en la longitud de onda de 280nm por contaminación de proteínas la relación 260/280 tendrá valores menores a 1.8. Un aumento en la relación 260/280 indicaría contaminación con otro tipo de ácido nucleico.

*Modificado de Cultek 2017.*

Estas muestras de RNA también fueron analizadas en electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la calidad e integridad del material genético, ya que esta técnica nos permite observar el RNA ribosomal (rRNAs) 28s y 18s en una relación equimolar para muestras con RNA intacto, entendiendo que el rRNA 28s posee una mayor masa que el rRNA 18s, en el gel teñido con SYBR safe será visible una relación 2:1

respectivamente entre los rRNAs. En el gel también es posible observar contaminación con DNA genómico el cual aparece por encima de las bandas de rRNA; por debajo de estas bandas también son reconocibles los RNA de bajo peso molecular (bajo PM) entre los que se encuentran la subunidad 5s rRNA, algunos RNA pequeños y el RNA degradado (Grody, W. 2009; Krieg, P. 1996).

Como resultado se observó que se tienen muestras de RNA de calidad ya que no posee contaminación con DNA genómico, pero se encuentra degradado ya que no es muy clara la relación 2:1 entre las subunidades 28s y 18s, además se observa un barrido por debajo de los rRNAs y bandas de RNA de bajo PM muy intensas lo que indicaría que además de los RNA pequeños contiene RNA degradado (figura 7.2). Aun así las **muestras son útiles ya que como menciona Stanta “no está claro como la degradación de rRNA realmente refleja la calidad de las poblaciones subyacentes, ya que en determinadas condiciones el rRNA puede degradarse más rápidamente” (Stanta, G. 2011).**

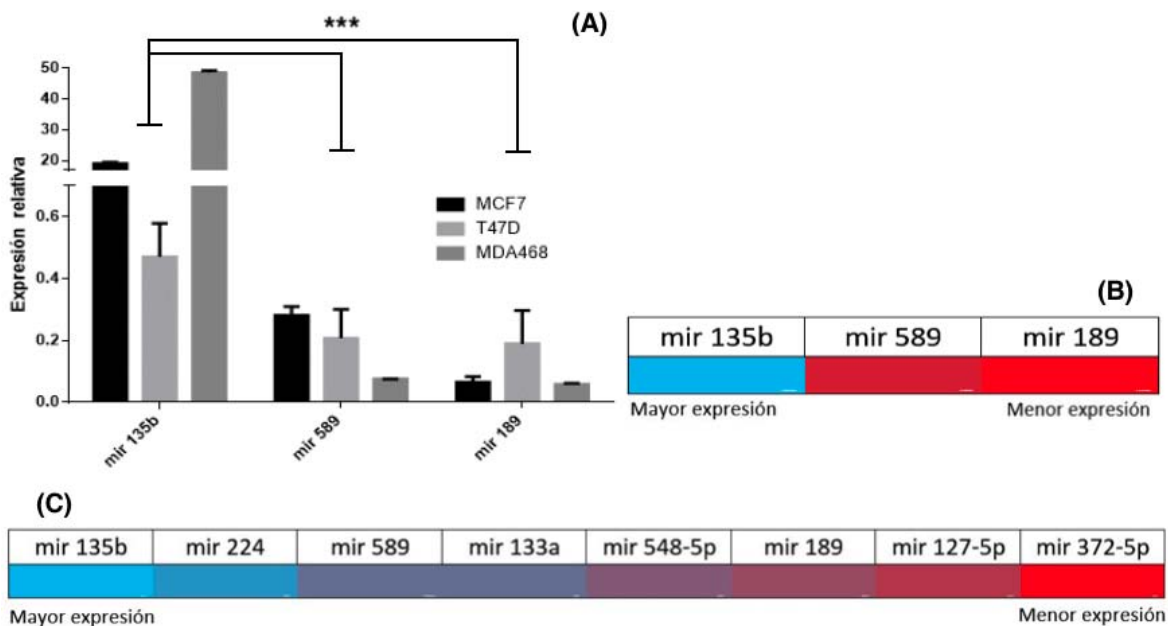


**Figura No. 7.2. Análisis de calidad de preparaciones de RNA por electroforesis en gel.** Se realizó un gel de agarosa al 2% y se tiñó con SYBR safe. Se observan claramente las subunidades de rRNA 28s y 18s, por debajo de estas es visible un barrido además de bandas intensas de RNA de bajo peso molecular lo que indicaría la degradación de rRNA.

## 7.2. Expresión relativa de miRNAs en líneas celulares de CM.

Una vez que se comprobó la calidad de las muestras de RNA de las tres líneas celulares de CM, se prosiguió con la metodología para realizar las RTqPCR para la identificación del nivel de expresión relativa de un grupo de miRNAs. Como se sabe para la identificación de miRNAs maduros no es posible utilizar sistemas convencionales de qPCR, esto es debido a la dificultad para crear primers específicos, ya que estos son del mismo tamaño o más grandes que los miRNAs y además poseen una alta variabilidad en el contenido de GC. Es por estos motivos que se eligió utilizar ensayos TaqMan para miRNAs que poseen una mayor sensibilidad que otros métodos como lo es la detección de cDNA de doble cadena utilizando SYBR Green (Nolan, T. 2013). El grupo de miRNAs a identificar se eligió con respecto al estudio realizado previamente en tejido embebido

en parafina (figura 7.3.c); por lo que se utilizó el miRNA con mayor expresión relativa (mir135b) y dos por debajo de este (mir589 y mir189), evitando utilizar los de menor expresión, intentado con esto asegurar la detección de los miRNAs elegidos.



**Figura No. 7.3. Nivel de expresión de miRNAs en líneas celulares de CM.** A. cuantificación relativa de los miRNAs mir135b, mir589 y mir189 en las muestras de RNA de las líneas de CM MCF7, T47D y MDA468; existe una diferencia muy significativa en el grupo mir135b con respecto a los otros dos grupos. B. Heat map de la media de expresión de miRNAs en líneas celulares de CM, utilizando una escala de color donde el azul representa el miRNA con mayor expresión y el color rojo el de menor expresión. C. Heat map de expresión de miRNAs en tejido tumoral de CM embebido en parafina como base de comparación para el estudio, se utilizó la misma escala de color.

Terminadas las RTqPCR de cada ensayo TaqMan para cada muestra de RNA y realizando los cálculos para obtener el valor de  $2^{-(\Delta Ct)}$  para observar el nivel de expresión relativa de los miRNAs mir135b, mir589 y mir189 (figura 7.3.); se observó que en el grupo mir135b se encontró la expresión más alta de los tres grupos y mediante el análisis estadístico ANOVA de comparación múltiple entre grupos de miRNAs (realizado con el software GraphPad PRISM 6.01) se encontró que la diferencia con

respecto a los otros dos grupos es significativa ( $P < 0.0001$ ); por otro lado la media de la expresión relativa en el grupo mir589 posee un valor mayor al del grupo mir189 pero mediante el estudio estadístico se comprobó que la diferencia entre ellos no es significativa (figura 7.3.a). Con estos resultados se consideró que existe una cierta correspondencia entre el estudio realizado con muestras embebidas en parafina y el estudio actual (figura 7.3.b-c), por lo tanto se tomó como referencia para la elección de ensayos TaqMan que se utilizaron para la identificación de miRNAs en suero. En este caso se eligieron los cuatro miRNAs con mayor expresión, que corresponden a mir135b, mir224, mir589 y mir133a (figura 7.3.c).

### 7.3. Selección de método de extracción de RNA en suero.

El siguiente paso en el estudio fue la elección de un método adecuado para la purificación y análisis de RNA circulante, este es un paso crítico cuando se utilizan muestras de sangre periférica (plasma y suero) ya que conllevan varios problemas metodológicos, entre ellos la baja concentración de RNA circulante y la facilidad de contaminación por hemólisis o material genético celular (linfocitos) (Moret, I. 2013). Por lo tanto se realizó una comparación entre tres metodologías que utilizan el tiocianato de guanidina como desnaturizante de proteínas y un potente inhibidor de RNAsas; y fenol/cloroformo para separar los ácidos nucleicos por solubilidad diferencial (NIDDK, 1987). Los kits comerciales miRNeasy Serum/Plasma y Direct-zol RNA mini Prep utilizan columnas de sílice que al pH y concentración de sales adecuada atrapan al RNA aislado que posteriormente se eluye con agua libre de RNAsas (Marko, M. 1982). La tercer metodología utiliza el reactivo Glycoblue que es un carbohidrato ramificado (glucógeno) unido covalentemente a un colorante azul, este es utilizado como coprecipitante de RNA, aumentando el rendimiento y ayudando a la visibilidad del precipitado (Ambion, 2017).



Como materia prima se utilizó un suero extraído de sangre periférica de un donador sano y desde ese momento se consideró como suero control uno. Como se puede ver en los resultados (tabla 7.2), en todas las extracciones la cantidad de RNA aislado no es muy grande además de que la calidad de las muestras estuvo por debajo de lo recomendado ya que la relación 260/280 estuvo por debajo de 1.8; siendo la extracción con el kit miRNeasy serum/plasma la de mayor calidad por su relación 260/280 y con Trizol/Glycoblue se obtuvo mayor cantidad de RNA. Se revisaron trabajos similares en donde se comparan métodos de extracción de RNA en suero, y como en este caso, se reportan bajas cantidades de RNA aislado y relación 260/280 por debajo de lo recomendado; Moret menciona que la baja concentración de RNA en las muestras puede ser la causa de este fenómeno (Moret, I. 2013; Sergueeva, Z. 2012). Para este estudio se decidió utilizar Trizol/Glycoblue como método de extracción, dándole preferencia a la obtención de un mejor rendimiento del ácido nucleico.

**Tabla No. 7.2. Cuantificación de RNA después de su extracción por diferentes métodos, de una muestra de suero control.**

Metodo	[ng/uL]	ug RNA	260/280
Zymo Direct-zol	0.4	0.02	1.62
Trizol/Glycoblue	48	1.440	1.60
miRNeasy serum/plasma	15.5	0.217	1.77

#### 7.4. Expresión relativa de miRNAs en suero de pacientes con CM.

Al tener seleccionados los miRNAs que se estudiarían y el método de extracción de RNA en suero, se prosiguió al análisis de los sueros congelados de pacientes con CM. Se tomaron las cantidades necesarias de suero para la extracción de RNA; y como se esperaba, la cantidad y la relación 260/280 fueron bajas en todos los casos (tabla 7.3).

**Tabla No. 7.3. Cuantificación de RNA después de su extracción con Trizol/ Glycoblue, de muestras de suero.**

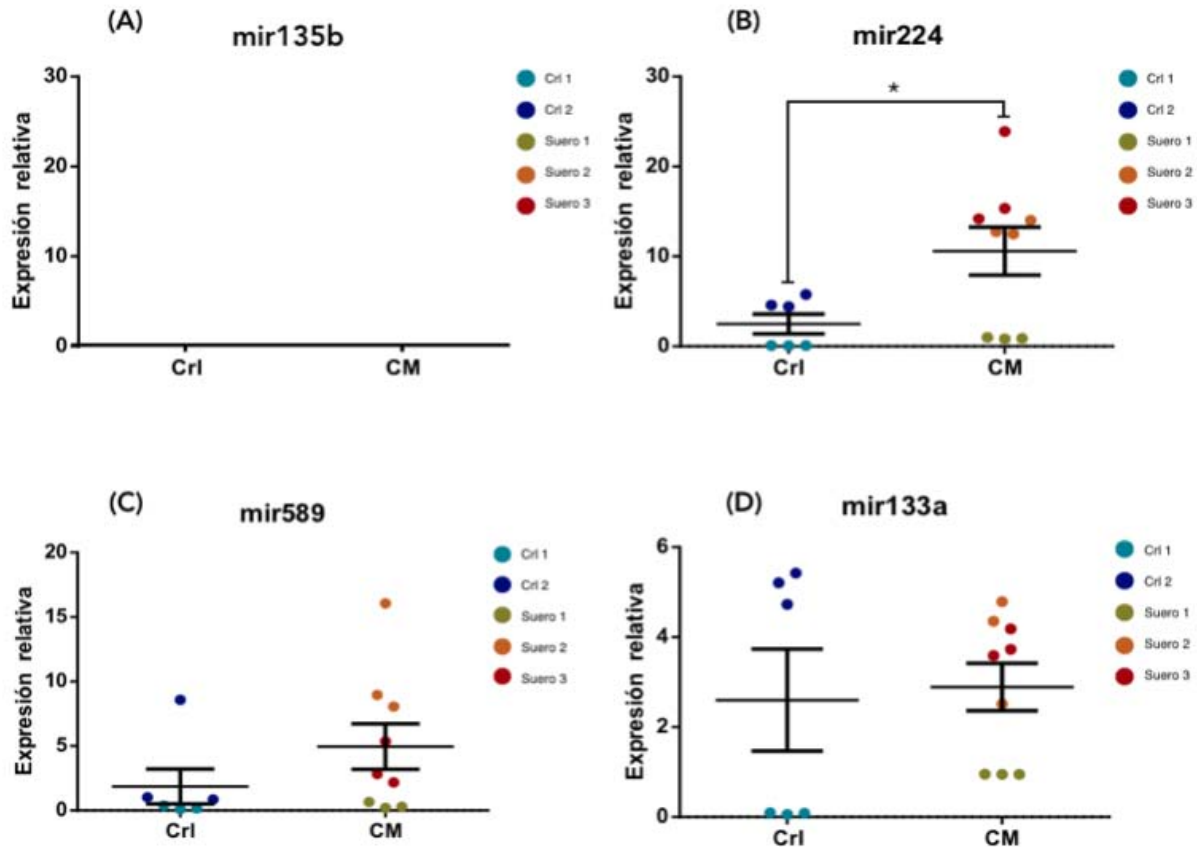
Muestra	[ng/uL]	ug RNA	260/280
Control 1	48	1.440	1.60
Control 2	17.9	0.537	1.57
Suero 1	26.0	0.780	1.49
Suero 2	36.7	1.101	1.57
Suero 3	23.7	0.711	1.44

Por último se realizaron las RTqPCR de los ensayos TaqMan elegidos en todas las muestras de RNA obtenidas. Se calculó el valor de  $2^{-(\Delta Ct)}$  y se comparó la expresión relativa de los miRNAs entre el grupo control sano y el grupo de pacientes con CM; realizando pruebas t de student para datos no pareados para confirmar que la diferencia entre los grupos fuera significativa. El primer resultado evidente es la ausencia de la expresión de mir135b en los sueros de los dos grupos, siendo este el de mayor expresión en tejido y líneas celulares de CM (figura 7.4.a). En la literatura se encontró un estudio en donde se realizó la medición de algunos miRNAs como biomarcadores de cáncer colorectal; entre ellos estaba mir135b el cual se encontraba en niveles demasiado bajos para ser cuantificado tanto en los controles como en los sueros problema que utilizaron (Faltejskova,

P. 2012; Dakubo, G. 2016). Esto podría revelar que mir135b no es un miRNA circulante o se encuentra en niveles demasiado bajos en la sangre como para ser considerado un buen biomarcador en este tipo de muestras.

En la expresión relativa de mir224 se encontró un aumento en el grupo de CM con una diferencia significativa ( $P= 0.0179$ ) con respecto al grupo control sano, este resultado lo posicionó como un buen biomarcador de CM en suero (figura 7.4.b), aunque tendría que ser corroborado con una población mayor. Este resultado es apoyado por el estudio en donde Zhu también identifica un aumento de expresión en suero de pacientes con CM (Zhu, J. 2014) y Liu lo identifica como un inhibidor de la proliferación y migración de células de CM, encontrando también que los niveles de expresión de miR-224 se asocian inversamente con la agresividad del cáncer (Liu, F. 2016).

Los mir589 y mir133a presentaron un fenómeno parecido, ya que las medias en los grupos de CM son mayores a las medias de los grupos controles sanos pero no poseen una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) (figura 7.4.c-d). Si en un estudio futuro se aumentara la población, es probable que estos miRNAs podrían establecerse como buenos biomarcadores de CM ya que en dos diferentes estudios con el propósito de medir su propio panel en sueros, los miRNAs antes mencionados han sido identificados con un aumento de expresión en suero de pacientes con CM con respecto a los controles sanos, identificando Cortez a mir589 y Shen a mir133a (Cortez, M. 2012; Shen, J. 2014).



**Figura No. 7.4. Expresión relativa de mir135, mir224, mir589 y mir133a en muestras de suero.** En las gráficas se representan dos grupos, el de controles sanos en tonos de azul (Crl) y el grupo de sueros de pacientes con CM (CM). Se representan los valores individuales de  $2^{-\Delta Ct}$ , las medias de los grupos y el error estándar. (A) La expresión de mir135b no fue cuantificable en las muestras utilizada; (B) en la expresión de mir224 se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los dos grupos y (C y D) en la expresión de mir589 y mir133a se encontró que la media en el grupo CM es mayor a la media del grupo Crl pero no hay una diferencia significativa entre ellas.

Por otro lado, si se analiza la expresión de las muestras individualmente, se puede observar una alta variación de la expresión relativa de los miRNA entre las muestras de los pacientes y también entre algunas mediciones de una misma muestra. El primer caso puede explicarse por la expresión diferencial de los miRNAs en los diferentes tipos de CM o estar dada por alguna condición clínica específica del paciente, por lo que sería necesario analizar y comparar sus historias clínicas para poder llegar a una conclusión que relacione el estado clínico con las diferencias de expresión de los miRNAs (Liu, F. 2016). Por último, la variación entre las mediciones

de una misma muestra puede estar relacionada tanto por errores aleatorios como por errores sistemáticos en la experimentación. El principal error aleatorio sería la baja precisión en las mediciones de los componentes de las reacciones de qPCR; situación que podrá remediarse con el aumento del número de mediciones y la capacitación del experimentador. Los errores sistemáticos podrían deberse a la detección en los últimos ciclos de amplificación de los miRNAs en las qPCR (anexo, tabla 10.1) debido a su baja concentración en las muestras. Este problema podría ser solucionado modificando y estandarizando el procedimiento de detección, un ejemplo sería la realización de una amplificación previa del cDNA de los miRNAs para que fueran detectados por el equipo más fácilmente y obteniendo así un resultado más confiable (Peña, C. 2015).

## VIII. CONCLUSIONES

---

- Se encontró correspondencia en las medias de expresión de los miRNAs mir135b, mir189 y mir589 entre el estudio previo, realizado con muestras embebidas en parafina de tejido tumoral de CM, y el estudio actual en líneas celulares de CM.
- El método de extracción de RNA en suero con mayor rendimiento fue el de Trizol/Glycoblue, mientras que la utilización del kit miRNeasy serum/plasma proporcionó una muestra de RNA de mayor calidad, en base a su relación 260/280. Por necesidades de este estudio se prefirió la obtención de un mejor rendimiento del ácido nucleico.
- El mir135b no fue detectado en las muestras de suero, por lo que se piensa que este miRNA se encuentra en niveles muy bajos en sangre y por lo tanto no sería un buen biomarcador.
- Fue posible observar un aumento en la media de expresión del mir224 en el grupo con CM, presentando una diferencia significativa con respecto al grupo control, con un valor de P de 0.0179. Los mir589 y mir133a también presentaron un aumento en la media de expresión con respecto al grupo control pero sin una diferencia significativa.
- En este estudio se encontraron diferencias en la expresión de mir224, mir589 y mir133a entre sueros de pacientes con CM y sueros de pacientes sanos (control), pero estos resultados no son concluyentes debido a la población tan pequeña que se utilizó. Como un estudio piloto, se da la pauta para aumentar la población y las mediciones necesarias para establecer a estos y otros miRNAs como biomarcadores de CM.

## IX. PERSPECTIVAS

---

- Aumentar la población tanto en el grupo control de pacientes sanos como el grupo problema de pacientes con CM.
- Obtener y utilizar muestras de suero con sus respectivas historias clínicas, para poder relacionar la diferencia de expresión entre los distintos tipos de CM y el estado clínico del paciente.
- Mejorar y estandarizar la metodología de RTqPCR para la detección de miRNAs presentes en muestras de suero, se sugiere realizar una amplificación previa en un termociclador común.

## X. REFERENCIAS

---

1. Adair, T., Montani, J. (2010). Angiogenesis. Morgan & Claypool Life Sciences. pag. 1-4
2. Ambion., Applied Biosystems. (31 de marzo de 2017). GlycoBlue™ Coprecipitant. thermofisher.com. obtenido de [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/sp\\_9515.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/sp_9515.pdf).
3. American Cancer Society. (14 de enero de 2016). Detección temprana y diagnóstico del cáncer de seno. *cancer.org*. Obtenido de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003164-pdf.pdf>.
4. American Cancer Society. (5 de mayo de 2017). Comprensión de un diagnóstico de cáncer de seno. *cancer.org*. Obtenido de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno.html>
5. Appasani, K. (2005). RNA Interference Technology. Cambridge: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. pag. 69-80
6. Arce, C. (14 de enero de 2016). Oncoguía. *incan.org*. Obtenido de <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1327324685.pdf>.
7. Arroyo, J. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. PNAS, 108, 5003-5008.
8. ATCC. (22 de marzo de 2017). MCF7 (ATCC® HTB-22™). atcc.org. obtenido de <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>
9. ATCC. (22 de marzo de 2017). MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) atcc.org. obtenido de <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-132.aspx>
10. ATCC. (22 de marzo de 2017). T-47D (ATCC® HTB-133™) atcc.org. obtenido de <https://www.atcc.org/products/all/HTB-133.aspx>



11. ATSDR. (14 de Enero de 2016). *atsdr.cdc.gov*. Obtenido de [http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/es\\_cancer\\_fs.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/es_cancer_fs.pdf).
12. Cairns, R. H. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *NATURE REVIEWS*, 11, 85-95.
13. Cancer.Net Editorial Board. (5 de mayo de 2017). Cáncer de mama: Diagnóstico. cancer.Net. obtenido de <http://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-de-mama/diagnóstico>
14. Cárdenas, J. B. (2015). *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario*. Colima: ELSEVIER.
15. Carmichael, G. (2010). RNA Silencing, Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press. pag. 18-20; 310-315
16. Cortez, M., et.al. (2012). Circulating MicroRNAs as Noninvasive Biomarkers in Breast Cancer. *Recent Results Cancer Res*, 195, 10.
17. Cultek. (31 de marzo de 2017). Manejo de muestras: Cuantificación de ácidos nucleicos. *cultek.com*. obtenido de [http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_Almacenamiento&opc=tecnicas&idap=59](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Almacenamiento&opc=tecnicas&idap=59).
18. Dakubo, G. (2016). Cancer Biomarkers in Body Fluids: Biomarkers in Circulation. Ontario: Springer. pag. 230-232.
19. De Alba, D., Rueda, A. (2013). Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *REB*, 32(1), 36-39.
20. Faltejskova, P., et.al. (2012). Circulating miR-17-3p, miR-29a, miR-92a and miR-135b in serum: Evidence against their usage as biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*, 12(4), 199-204.
21. Frixia, T. (2015). Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers*, 7, 2466-2485.

22. GLOBOCAN. (19 de enero de 2016). GLOBOCAN 2012: *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Obtenido de [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
23. Gonzalez, A. (2010). Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Madrid: Elsevier. pag. 35.
24. Grody, W., et.al. (2009). *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. San Diego: Academic Press. pag. 40-42.
25. Hanahan, D., Weinberg, A. (2000). *The Hallmarks of cancer*. Elsevier, Cell 100, 57-70.
26. Hanahan, D., Weinberg, A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Elsevier, Cell 144, 646-674.
27. Issler, O., Chen, A. (2015). Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 201–212
28. Krieg, P. (1996). *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis*. Texas: John Wiley & Sons. pag. 45-47.
29. Lin, S., Gregory, R. (2015). MicroRNA biogenesis in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(6), 321-333.
30. Liu, F., et.al. (2016). MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating fizzled 5 expression. *Oncotarget*, 7(31), 49130–49142.
31. López, C. F. (2014). Los microRNA: nuevos biomarcadores en cáncer de mama. *Revista Mexicana de Mastología*, 4, 100-107.
32. Lugo, A. T. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria*, 11(44), 187-192.
33. Marko, M., et.al. (1982). A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Analytical Biochemistry*, 121(2), 382-387

34. Moret, I., et.al. (2013). Assessing an Improved Protocol for Plasma microRNA Extraction. PLOS ONE, 8(12), e82753.
35. Navarro, A. (2008). ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL COLON, EL CÁNCER COLORECTAL Y EL LINFOMA DE HODGKIN. Barcelona: Universidad de Barcelona.
36. NIDDK, Laboratory of Biochemistry and Metabolism. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry, 162, 156- 159.
37. Nolan, T., et.al. (2013). PCR Technology: CRC press Taylor & Francis Group. pag. 307-319
38. Patrinos, G., Ansorge, w. (2005). Molecular Diagnostics. Burlington. Academic Press. pag. 111-115
39. Peña, C. (2015). Expresión diferencial de microRNAs en tumores de mujeres jóvenes con cáncer de mama: Cribado de dianas moleculares (tesis doctoral). Universidad de Valencia.
40. Puerta, C., Urueña, C. (2005). Prácticas de biología molecular. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana. pag. 22.
41. Repetto, M., Repetto, G. (2009). Toxicología fundamental. Sevilla: Diaz DE Santos. pag. 164-166.
42. Sergueeva, Z., et.al. (2012). Optimization of miRNA Extraction from Serum: Molecular Med, Tri-Con 2012, 19–23.
43. Shen, J., et.al. (2014). Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. Oncotarget, 5(14), 5284–5294.
44. Stanta, G. (2011). Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues. Trieste. Springer Science & Business Media. pag. 81-83.
45. Zhu, J., et.al. (2014). Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. Front Genet, 5, 149

## XI. ANEXO

Datos crudos de las reacciones de RTqPCR de los miRNAs en suero y resultados de los cálculos realizados para su análisis.

**Tabla No.11.1. Valores de CT obtenidos para cada reacción de RTqPCR.**

miRNA	S. CrI G	S. CrI	Suero 1	Suero 2	Suero 3
RNU6B	31.88371	34.53411	36.00795	35.983555	35.86052
RNU6B	32.33375	34.522774	34.364647	36.667297	35.94528
RNU6B	31.370178	34.896328	33.721165	35.817383	35.59713
mir135b	x	x	x	x	x
mir135b	x	x	x	x	x
mir135b	x	x	x	x	x
mir224	35.452152	32.127453	34.939144	32.347145	31.861286
mir224	35.809887	32.513092	34.881172	32.512764	31.223524
mir224	35.37876	32.451622	34.73394	32.48561	31.973362
mir589	34.465836	34.604607	35.286674	33.144203	34.6796
mir589	34.970818	31.55154	36.464825	32.9918	34.30395
mir589	33.19237	34.8581	36.931305	32.15017	33.379707
mir133a	35.3304	32.40994	34.77773	34.8273	33.901886
mir133a	35.421524	32.269833	34.775105	33.89642	33.736164
mir133a	35.94233	32.211575	34.76614	34.033726	33.9583

**Tabla No.11.2. Media de los valores de CT del gen de referencia RNU6B.**

snoRNA	S. CrI G	S. CrI	Suero 1	Suero 2	Suero 3
RNU6B	31.862	34.651	34.698	36.156	35.801

**Tabla No.11.3. Normalización de los valores de CT de los miRNAs analizados. ( $\Delta Ct$ )**

miRNA	S. CrI G	S. CrI	Suero 1	Suero 2	Suero 3
mir224	3.590	-2.524	0.241	-3.809	-3.940
mir224	3.947	-2.138	0.183	-3.643	-4.577
mir224	3.516	-2.199	0.036	-3.670	-3.828
mir589	2.603	-0.046	0.589	-3.012	-1.121
mir589	3.108	-3.099	1.767	-3.164	-1.497
mir589	1.330	0.207	2.233	-4.006	-2.421
mir133a	3.468	-2.241	0.080	-1.329	-1.899
mir133a	3.559	-2.381	0.077	-2.260	-2.065
mir133a	4.080	-2.439	0.068	-2.122	-1.843

**Tabla No.11.4. Valores de  $2^{\Delta Ct}$  de los miRNAs analizados.**

miRNA	S. CrI G	S. CrI	Suero 1	Suero 2	Suero 3
mir224	0.083	5.750	0.846	14.015	15.345
mir224	0.065	4.401	0.881	12.495	23.875
mir224	0.087	4.593	0.975	12.733	14.198
mir589	0.165	1.033	0.665	8.066	2.175
mir589	0.116	8.571	0.294	8.965	2.823
mir589	0.398	0.866	0.213	16.067	5.356
mir133a	0.090	4.728	0.946	2.512	3.730
mir133a	0.085	5.210	0.948	4.789	4.184
mir133a	0.059	5.424	0.954	4.354	3.587