



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Evaluación de la funcionalidad un microRNA
biotinilado”**

T E S I S

QUE PRESENTA

STEFANIA ANDREA MARTÍNEZ ALARCÓN

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FELIPE VACA PANIAGUA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017



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.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser mi ejemplo día a día.

Por haber despertado en mi la curiosidad científica, por brindarme sustento incondicional y ayudarme a creer que sí se puede sin importar quién diga lo contrario, gracias a ustedes he aprendido que los límites existen hasta dónde yo quiera, pero sobre todo ustedes me enseñaron lo que realmente importa en la vida: la felicidad y el amor y me demuestran diario que éstos dos mueven al mundo.

A mis hermanas por ser la alegría de mis días, por cuidarme siempre, por los buenos y malos consejos en momentos difíciles que me han ayudado a crecer y poder vencer incluso los miedos más absurdos. Las amo.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Felipe Vaca, gracias por haberme confiado las pipetas de su laboratorio cuando era una pequeña de segundo semestre. Agradezco mucho el tiempo, esmero y paciencia que me ha tenido, sus palabras de aliento en momentos difíciles, y por enseñarme que con una sonrisa se puede lograr todo; también por todo su trabajo encaminado a darnos las mejores herramientas para superarnos profesionalmente.

Dra. Clara, por enseñarme el valor de la organización y responsabilidad, porque a pesar de todo el gran trabajo que realiza, siempre tiene un buen comentario para mejorar.

A los doctores Luis Arias, José Bustos y Yolanda Chirino por tomarse el tiempo de revisar mi tesis y por sus atinados comentarios para mejorarla.

A mis compañeros del laboratorio, Karla, Fer, Ernesto, Marco, Toño, Héctor, Carlos y Jossi que a lo largo de estos años se han convertido en mi segunda familia y con gusto pasamos más tiempo juntos de lo que nos aguantamos, gracias por estar. Especialmente a Osvaldo sin ti seguiría hundida, gracias por todo.

A mis todos amigos de la carrera, Cara, Gaby, Sergio, Omar, Itzel, Noemí, Juan, Beto, Marisol, Mich, Freda y Karina por los momentos memorables y experiencias juntos, cada uno me ha enseñado algo invaluable, sin ustedes todo habría sido gris.

A Carlos Avalos por ser mi mano derecha, mi mejor amigo, la bondad más pura y por darme una razón para ser mejor día con día.

A Arianna por siempre tomar mi mano, y demostrarme que no importa el tiempo ni la distancia, la amistad verdadera siempre perdura.

“La inestabilidad genética, como una locura perfecta [...] da impulso a la generación de clones mutantes. De tal modo, el cáncer explota la lógica fundamental de la evolución como ninguna otra enfermedad”

Siddhartha Mukherjee.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
I. RESUMEN	8
II. INTRODUCCIÓN	9
1. Cáncer	9
1.1 Epidemiología y etiología	10
2. Cáncer de mama	11
2.1 Etiología y factores de riesgo del cáncer de mama	13
2.2 Clasificaciones del cáncer de mama	16
2.2.1 Clasificación histológica	16
2.2.2 Clasificación TNM	17
2.2.2 Clasificación molecular	19
2.2.3 Clasificación inmunohistoquímica	22
3. Cáncer de mama triple negativo	23
3.1 Tratamientos para el cáncer de mama triple negativo	24
4. MicroRNAs	25
4.1 Biogénesis de los miRNAs	25
4.2 MicroRNAs en el cáncer	29
4.3 miR-302c	30
5. Algoritmos bioinformáticos de predicción de interacciones miRNA:mRNA	32
6. Interacciones no-canónicas	33
7. Experimentos de captura por afinidad directa	34
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	36
V. OBJETIVOS	36
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Análisis bioinformático y de enriquecimiento de microRNAs y sus blancos	38
2. Diseño de oligonucleótidos	38

3. Cultivo celular	38
4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA	39
5. Amplificación de la secuencia de la región 3'UTR del gen <i>AKT1</i>	39
6. Clonación del fragmento 3' UTR de <i>AKT1</i> al vector pJET1.2/blunt	39
7. Transformación de bacterias químicamente competentes	40
8. Tamizaje de clonas	40
9. Purificación de los plásmidos recombinantes	40
10. Digestión del vector recombinante pJET- <i>AKT1</i> y vector pmiRGLO	40
11. Subclonación del fragmento 3' UTR de <i>AKT1</i> al vector pmiRGLO	41
12. Secuenciación tipo Sanger	41
13. Transfección	41
13.1 Estandarización de la transfección para la línea celular MDA-MB-231	41
13.2 Cotransfección del vector pmiR-AKT1 y miR-302c-B	42
14. Ensayo del gen reportero de la luciferasa	42
VII. RESULTADOS	43
1. Análisis bioinformático de microRNAs	43
2. Diseño de oligonucleótidos	44
3. Extracción de RNA	45
4. Amplificación de la secuencia de la región 3'UTR del gen <i>AKT1</i>	46
5. Clonación de la región 3'UTR en el vector pJET1.2/blunt	47
6. Análisis de la secuencia obtenida de la secuenciación tipo Sanger	48
7. Subclonación de la región 3'UTR en el vector pmiRGLO	49
8. Análisis de la secuencia obtenida de la secuenciación tipo Sanger	50
9. Estandarización de la transfección	51
10. Ensayo de la luciferasa	52
VIII. DISCUSIÓN	53
IX. CONCLUSIONES	58
X. LITERATURA CITADA	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Epidemiología global del cáncer.
- Figura 2.** Anatomía de la glándula mamaria femenina.
- Figura 3.** Cambio del porcentaje anual (APC) de cáncer de mama en el periodo de 2001-2011 en México.
- Figura 4.** Clasificación histológica del cáncer de mama según la OMS (2010).
- Figura 5.** Frecuencias de los subtipos moleculares de cáncer de mama y su asociación con el grado histológico.
- Figura 6.** Dinámicas torsionales de la proteína Argonauta 2 de *Homo sapiens*
- Figura 7.** Biogénesis de los microRNAs.
- Figura 8.** Secuencias de los microRNAs maduros de la familia miR-302-367.
- Figura 9.** Interacciones canónicas y no-canónicas miRNA:mRNA.
- Figura 10.** Anatomía molecular de la maduración los miRNAs.
- Figura 11.** Estrategia experimental.
- Figura 12.** Genes blanco de miR-302c identificados con tres herramientas bioinformáticas diferentes: TargetScan, miRANDA, miRTarBase.
- Figura 13.** Sitios de unión de miR-302c en la región 3'UTR de *AKT1*.
- Figura 14.** Extracción de RNA a partir de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Figura 15.** Amplificación de la región 3'UTR de *AKT1*.
- Figura 16.** Mapa de la construcción del vector recombinante pJET-*AKT1*.
- Figura 17.** PCR de colonia del vector recombinante pJET-*AKT1*.
- Figura 18.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica de referencia (NCBI) contra secuencia obtenida de la secuenciación Sanger (pJET-*AKT1*).
- Figura 19.** Mapa de la construcción del vector recombinante pmiR-*AKT1*.
- Figura 20.** PCR de colonia del vector recombinante pmiR-*AKT1*.
- Figura 21.** Análisis de la orientación correcta de la construcción pmiRGLO-*AKT1*.
- Figura 22.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica de referencia (NCBI) contra la secuencia obtenida de la secuenciación Sanger (pmiR-*AKT1*).
- Figura 23.** Transfección del plásmido pEGFP-N1 en células de CMTN.
- Figura 24.** Análisis de la actividad funcional de miR-302c-B.
- Figura 25.** Modelo de la estructura del complejo miRISC de *Homo sapiens*.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Etapas del cáncer de mama con base en la clasificación TNM, según la guía del American Cancer Society (2017).
- Tabla 2.** Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama según la clasificación de Guedj (2012).
- Tabla 3.** Características de los subtipos inmunohistoquímicos de cáncer de mama según la clasificación de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, 2010).
- Tabla 4.** Subtipos de CMTN basados en análisis de la expresión de perfiles genéticos.
- Tabla 5.** Análisis de enriquecimiento de los genes blanco encontrados para miR-302c.
- Tabla 6.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar la región 3'UTR de *AKT1* y para secuenciar el vector pmiRGLO.

ABREVIATURAS

3'UTR	3' no-codificante (3' untranslated region)
AGO2	Argonauta 2
AKT1	Cinasa serina/treonina 1 de AKT
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AOX	Aldehído oxidasa
APC	Cambio de porcentaje anual
AR	Receptor de andrógenos
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATCC	American Type Cell Culture
BL1	Tipo basal 1
BL2	Tipo basal 2
cDNA	DNA copia
CLL	Leucemia linfocítica crónica
CM	Cáncer de mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER	Receptor de estrógenos
EXP5	Exportina 5
SFB	Suero Fetal Bovino
GTP	Guanosín-trifosfato
h	Horas
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
IDC	Carcinoma ductal infiltrante
IHC	Inmunohistoquímica
IM	Inmunomodulatorio
Kb	Kilobase
LAR	Luminal positivo a receptores de andrógenos
LCIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>

LumA	Luminal A
LumB	Luminal B
LumC	Luminal C
M	Mesenquimal
mApo	Molecular apócrino
MEK	MAP-ERK cinasa
min	Minutos
miR-B	microRNA biotinilado
miR-302c-B	miR-302c-biotinilado
miR-146-B	miR-146-biotinilado
miR-39-B	miR-39-biotinilado
miRISC	Complejo de silenciamiento inducido por miRNAs
miRNA	microRNA
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensajero
MSL	Mesenquimal de tipo troncal
NHS	National Health Service
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NormL	Tipo normal
°C	Grados Celsius
PACT	Proteína activadora de PKR
PARP	Polimerasa Poli-ADP-ribosa
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de sales de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 cinasa
Pol	Polimerasa
PR	Receptor de progesterona

RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retro-transcripción
s	Segundos
Tm	Temperatura media de desnaturalización
TRBP	Proteína Tar de unión a RNA de doble cadena
U	Unidades enzimáticas
UFC	Unidades formadoras de colonia
XOR	Xantina oxido-reductasa
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μg	Microgramo
μL	Microlitro

I. RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA pequeños no-codificantes que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional mediante la unión por apareamiento de bases con sus RNA mensajeros (mRNA) blanco. Los perfiles de expresión aberrante de los miRNAs tienen un papel importante en el desarrollo de patologías como el cáncer. Los blancos de miRNAs son predichos con herramientas bioinformáticas, las cuales tienen altas tasas de falsos negativos y falsos positivos, debido a que sólo consideran las interacciones canónicas para realizar las predicciones. En el presente trabajo se evaluó la funcionalidad miR-302c biotinilado en su extremo 3' por medio de un ensayo del gen reportero de la luciferasa, para posteriormente utilizar este microRNA en la implementación de estrategias experimentales de captura por afinidad directa de sus mRNA blancos particulares. Para evaluar la funcionalidad de miR-302c biotinilado se realizó la clonación de la región 3'UTR de *AKT1*, la cual contiene un sitio de unión con miR-302c probado experimentalmente, en el vector pmiRGLO, que contiene el gen de la proteína reportera Luciferasa. Se encontró que la presencia de biotina en el extremo 3' de miR-302c no interfiere con su funcionalidad, ya que inhibió exitosamente la traducción de la enzima Luciferasa. Por lo tanto, miR-302c-biotinilado puede ser utilizado para la captura de interacciones específicas miRNA:mRNA.

II. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen genético, causadas por la acumulación de alteraciones en genes que controlan el crecimiento, división y muerte celular (National Cancer Institute, 2015). Éste grupo de enfermedades se caracterizan por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales a través de su transformación progresiva a células malignas (Hanahan y Weinberg, 2000). La propagación no controlada y el desarrollo de metástasis es la principal causa de muerte del paciente (American Cancer Society, 2015). La mayoría de los tipos de cáncer son causados por la acumulación de por lo menos tres alteraciones sucesivas, a lo largo de 20 a 30 años, en genes clave conocidos como genes conductores (Driver genes), categorizados en tres grupos i) proto-oncogenes, ii) genes supresores de tumor y iii) genes de reparación al daño a DNA (Vogelstein y Kinzler, 2015; Parsa, 2016).

Se pueden presentar alteraciones genéticas que se encuentran en genes conductores (Mut-Driver gene) o en genes que regulan procesos epigenéticos (Epi-Driver gene; Vogelstein, 2013). Las alteraciones genéticas que ocurren con mayor frecuencia en el genoma del cáncer son aberraciones cromosómicas, por ejemplo aneuploidias, deleciones, inversiones, translocaciones y mutaciones puntuales, mientras que las principales alteraciones epigenéticas son metilación de islas CpG, remodelación de la cromatina y alteración en los patrones de expresión de los microRNAs (Vogelstein y Kinzler, 2015). Cada uno de estos cambios causa directa o indirectamente un aumento en la ventaja selectiva de la célula que las contiene en comparación con las células del tejido circundante (Hanahan y Weinberg, 2011). La ventaja de las aptitudes biológicas que adquirió la célula lleva a la proliferación acelerada de su progenie o subclonas. Esta expansión subclonal dirigida por mutaciones o alteraciones en oncogenes eleva la probabilidad de que éstas mismas subclonas presenten nuevas mutaciones subsecuentes, y se acumulen en el fondo genético premaligno (Rozhok y DeGregory, 2015), hecho que da origen a la generación de nuevas subclonas. Lo anterior contribuye a la presencia de múltiples subclonas tumorales sincrónicas, dentro de la masa tumoral, lo cual se conoce como heterogeneidad intra-tumoral (McGranahan y Swanton, 2015).

1.1. Epidemiología y etiología

El cáncer es la cuarta causa de muerte a nivel mundial; en 2012 se estimaron un total de 8.2 millones de muertes, y 14.1 millones de casos nuevos (WHO, 2012; Figura 1). Los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en hombres y mujeres son: cáncer de pulmón (1.8 millones de casos, 16.8% del total), cáncer de mama (1.7 millones, 11.9%), cáncer colorrectal (1.4 millones, 9.7%) y cáncer de próstata (1.0 millones, 7.8%; WHO, 2012). Se prevé que la incidencia de cáncer aumente en el futuro tanto en países desarrollados como en países no-desarrollados, debido al envejecimiento de la población, así como a la adopción de estilos de vida que aumentan el riesgo de contraer cáncer como la inactividad física y cambios en el comportamiento reproductivo asociados a la urbanización y al desarrollo económico (Torre, 2015). El desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer está asociado a factores de riesgo como la edad, consumo de alcohol o tabaco, exposición a radiación, a sustancias carcinógenas o agentes infecciosos; la dieta, obesidad, hormonas, inflamación crónica, inmunosupresión y factores hereditarios (NCI, 2015).

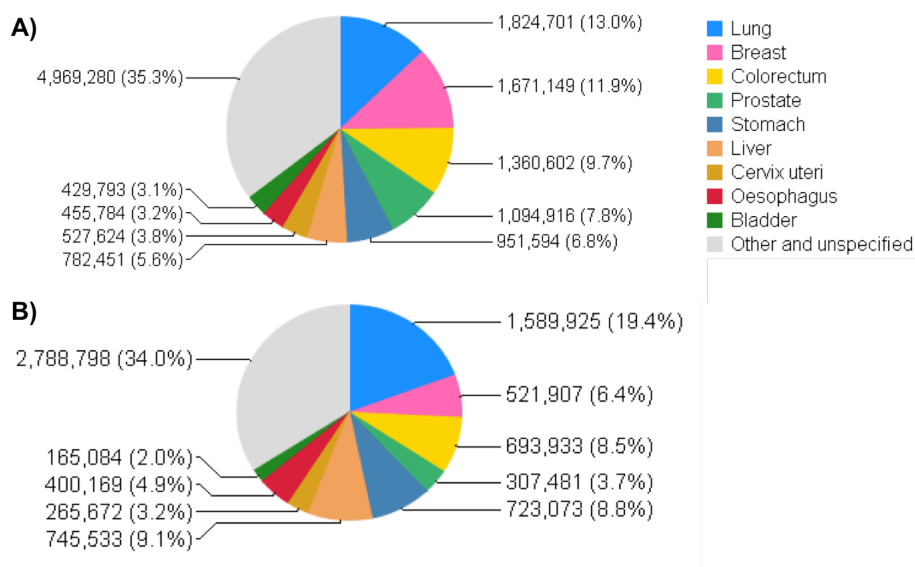


Figura 1. Epidemiología global del cáncer. A) Incidencia de cáncer para sexo masculino y femenino. B) Mortalidad de cáncer para sexo masculino y femenino. Obtenida de WHO, 2012.

2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento descontrolado de células del tejido mamario. El 90% de los subtipos de cáncer de mama son carcinomas, es decir, se originan de células epiteliales. Debido a la naturaleza glandular del tejido mamario, se denomina adenocarcinoma al cáncer que surge de las células lobulares y de las células ductales (Figura 2). También se puede originar a partir de las células del estroma que incluyen adipocitos y tejido conectivo fibroso (Breast Cancer Organization, 2016).

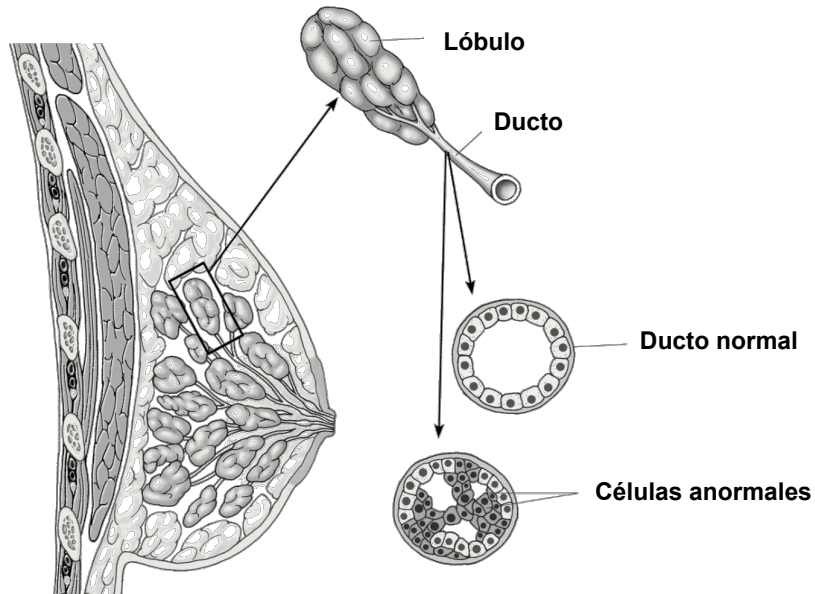


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria femenina. Modificado de breastcancer.org, 2014.

A nivel mundial, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad entre mujeres con 1.7 millones de nuevos casos y 521,907 muertes en 2012 (WHO, 2012). El cáncer de mama *per se* representa el 25% de todos los casos de cáncer, y el 15% de todas las muertes por cáncer entre mujeres. Los países más desarrollados presentan aproximadamente el 50% de todos los casos y el 38% de muertes por cáncer de mama. La variación internacional de las tasas de incidencia de cáncer de mama, refleja diferencias en la disponibilidad de servicios para la detección temprana, así como la exposición a factores de riesgo variables (Stewart y Wild, 2014).

En México desde el año 2006 el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad entre mujeres. En el periodo de 2001 a 2011 se registraron 69,651 nuevos casos y 48,817 muertes; se presentó un incremento en el cambio de porcentaje anual de 5.9% y 0.39% en las tasas de incidencia y mortalidad respectivamente (Figura 3). El pico de incidencia más alto reportado, se presenta en mujeres de entre 60-65 años, mientras que la tasa más alta de mortalidad se presentó en mujeres mayores de 85 años (Soto-Perez-de-Celis y Chavarri-Guerra, 2016). La incidencia del cáncer de mama aumenta progresivamente con la edad, con un incremento máximo en mujeres post-menopáusicas (Stewart y Wild, 2014).

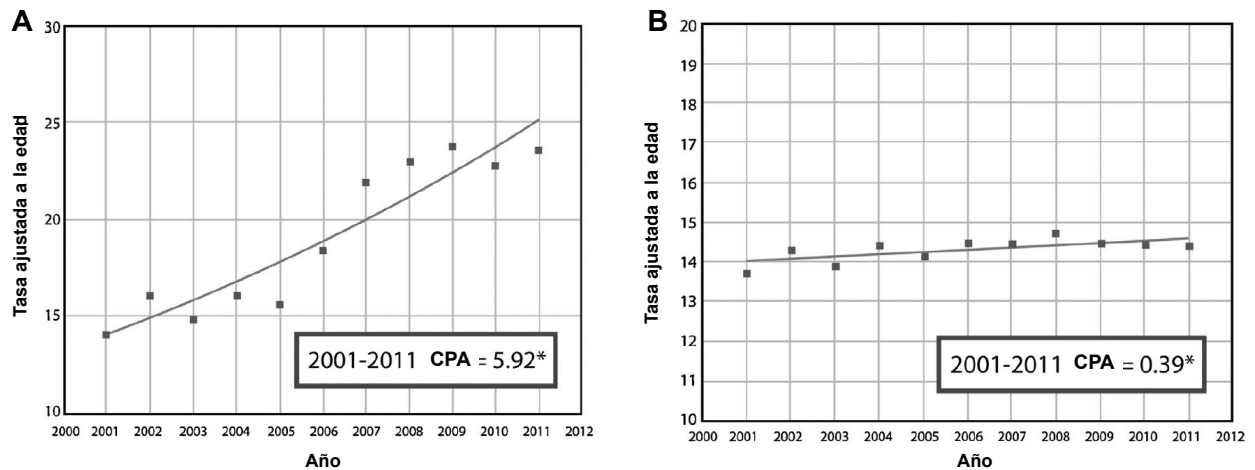


Figura 3. Cambio del porcentaje anual (CPA) de cáncer de mama en el periodo de 2001-2011 en México. A) Incidencia. B) Mortalidad. Modificado de Soto-Perez-de-Celis y Chavarri-Guerra (2016).

2.1 Etiología y factores de riesgo del cáncer de mama

El origen del cáncer de mama es multifactorial e incluye factores endócrinos y reproductivos como nuliparidad, primer parto después de los 30 años e historia hormonal. También factores ambientales como exposición a radiación ionizante y factores de estilo de vida como dieta alta en calorías, consumo de alcohol y falta de ejercicio.

Factores biológicos:

- Factores genéticos: se estima que 5-10% de los casos de cáncer de mama son debidos a una predisposición genética hereditaria. La mayoría de los genes de susceptibilidad a cáncer de mama hereditario son genes supresores de tumor que participan en vías de reparación de daños al DNA, del control del ciclo celular o de respuesta a daño genotóxico. Por ejemplo los genes *BRCA1* (65% de riesgo) y *BRCA2* (55%), *PTEN* (85%), *ATM* (60%), *TP53* (25%) y *CDH1* (42%). La identificación de variantes genéticas patogénicas hereditarias ha ofrecido posibilidades a los pacientes de prevención y terapia dirigida (Nielsen, *et al.*, 2016).
- Origen étnico: las diferencias en la biología del cáncer de mama entre varios grupos étnicos se puede atribuir a dos razones: 1) diferencias socio-económicas como acceso a servicios de salud o calidad de los servicios y 2) diferencias personales entre las que se incluyen historia familiar, genética, reproductiva, edad, dieta, ejercicio o fuentes de estrés. El cáncer de mama ocurre en edades más tempranas en mujeres de origen africano-americano que en mujeres de origen europeo-americano. Además se asocia grados de alta diferenciación celular y receptores de estrógenos y progesterona negativos en mujeres de raza negra (Parsa, 2016). Se ha descrito también que existe una delección fundadora de los exones 9-12 del gen *BRCA1* con origen mestizo o amerindio en la población mexicana, esta delección aumenta el riesgo de cáncer de mama en mujeres jóvenes hispanas (Weitzel, *et al.*, 2007).

- Factores hormonales: la edad temprana de menarquía y menopausia tardía, están asociadas con riesgo bajo, debido a los perfiles hormonales y el efecto que éstos tienen sobre la involución de los lóbulos de las mamas (Stewart y Wild, 2014).
- Obesidad: está inversamente relacionada con el riesgo de presentar cáncer de mama pre-menopáusico y directamente relacionada con el riesgo de cáncer post-menopáusico y de subtipos positivos a receptores de estrógenos en la neoplasia. La conversión de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo influencia el riesgo bajo (Lauby-Secretan, *et al.*, 2016).

Ambientales:

- Terapias hormonales: durante la menopausia la terapia de reemplazamiento de estrógenos y progesterona aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama, así como la agresividad del subtipo. Se propone una asociación de la influencia mitógena de las progestinas sobre los tejidos mamarios. Por otro lado, el uso de anticonceptivos de estrógeno y progesterona durante la juventud (< 20 años) se asocian con un aumento en el riesgo de presentar cáncer de mama antes de los 35 años (Stewart y Wild, 2014; Beral, 2003).
- Radiación ionizante: La exposición a rayos X, rayos γ o en la forma de partículas subatómicas α y β inducen daño molecular, específicamente daño al DNA. La células que contienen estos daños pueden adquirir ventajas de crecimiento, proliferación e inestabilidad genómica. La susceptibilidad de desarrollar cáncer depende del contexto biológico como la edad, estado del sistema inmune y variación genéticas en otros genes conductores de susceptibilidad (Ausrele, *et al.*, 2014).

Estilo de vida:

- Consumo de alcohol: se ha demostrado que es un factor de riesgo moderado, ya que el 4% de los casos de cáncer de mama son atribuibles a este factor en países desarrollados con una media de consumo de alcohol de 0.4 g/día (Hamajima, *et al.*, 2002). El consumo de alcohol aumenta los niveles de estrógeno, androsterona y del factor de crecimiento parecido a la insulina (producido en el hígado), que aumentan la susceptibilidad de las glándulas mamarias a desarrollar cáncer, alterando su desarrollo estructural y la proliferación celular. Otro mecanismo se deriva del metabolismo del etanol, en donde intervienen el acetaldehído y acetato. El acetaldehído induce modificaciones al DNA causando deleciones, aberraciones cromosómicas o aductos, además interfiere con los mecanismos de reparación del material genético. La aldehído deshidrogenasa (ALDH), la xantina oxidorreductasa (XOR), y la aldehído oxidasa (AOX), convierten el acetaldehído a acetato, durante este proceso se generan radicales libres asociados con la carcinogénesis (Coronado, *et al.*, 2011).

2.2 Clasificaciones del cáncer de mama

Los casos de cáncer de mama son heterogéneos y variables morfológica y clínicamente. Se han propuesto diferentes clasificaciones de los subtipos del cáncer de mama con base en el avance tecnológico y las herramientas disponibles.

2.2.1 Clasificación histológica:

- Carcinomas *in situ*: con base en los patrones de crecimiento y las características citológicas se subdividen en carcinoma lobular *in situ* (LCIS) y carcinoma ductal *in situ* (DCIS). EL DCIS es el más común y se sub-clasifica con base en las características de la arquitectura del tumor en: comedón, cribiforme, micropapilar, papilar y sólido (Leonard y Swain, 2004; Malhotra, 2010).
- Carcinomas invasivos: constituyen un grupo heterogéneo, que se diferencian histológicamente como: papilares, medulares, tubulares, mucinosos o coloides, invasivos lobulares, ductal/lobular y ductales infiltrantes (IDC). Los IDC representan el 70-80% de los tumores, es el subtipo más común. Con base en los niveles de pleiomorfismo nuclear, formación de glándulas y túbulos e índice mitótico, éste grupo se subclasifica en grado 1 (bien diferenciados), grado 2 (moderadamente diferenciados) y grado 3 (pobrementemente diferenciados; Lakhani, et al., 2012; Malhotra, 2010; Figura 4).

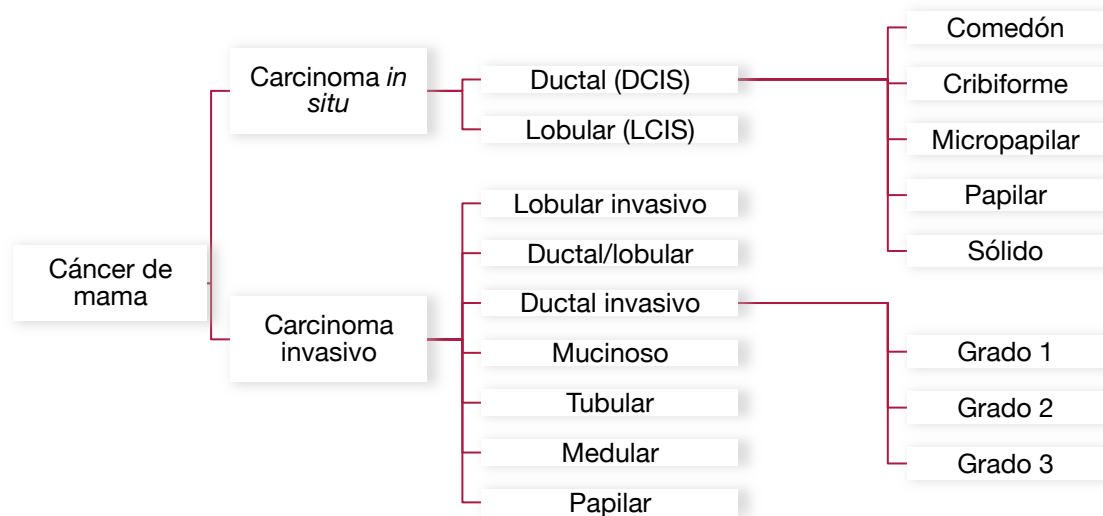


Figura 4. Clasificación histológica del cáncer de mama según la OMS (2010).

2.2.2 Clasificación TNM

La clasificación por etapas o estadios proporciona información sobre el grado de propagación del cáncer al momento del diagnóstico. Se basa en tres características: tamaño del tumor (**T**), invasión a ganglios linfáticos (**N**), y metástasis (**M**). Posterior a las letras T, N, o M se asignan un número y una letra, que proporcionan información más detallada de la categoría. Los números bajos (0, I, II) indican que el cáncer se ha propagado menos, mientras que los número altos (III y IV) indican que el estadio del cáncer es más avanzado. Las letras dividen a los estadios en sub-etapas A, B o C (American Cancer Society, 2017; Tabla 1).

Tabla 1. Etapas del cáncer de mama con base en la clasificación TNM.

Etapa 0	T	is	Carcinoma <i>in situ</i> (DCIS). Es la forma más temprana del cáncer de mama. Las células cancerosas continúan localizadas en el interior de un conducto.
	N	0	
	M	0	
Etapa IA	T	1	El tamaño del tumor es <2 cm de ancho (T1), no hay invasión a ganglios linfáticos (N0), ni a áreas distantes (M0).
	N	0	
	M	0	
Etapa IB	T	0-1	El tamaño del tumor es <2 cm de ancho o no se detecta (T0 o T1), hay micrometástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares (N1mi), y no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	1mi	
	M	0	
Etapa IIA	T	0-1	El tamaño del tumor es <2 cm de ancho o no se detecta (T0 o T1), hay invasión a ganglios linfáticos cercanos al esternón, y en 1-3 ganglios axilares (N1), no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	1	
	M	0	
	T	2	El tamaño del tumor es >2, <5 cm de ancho (T2), no hay invasión a ganglios linfáticos (N0), y no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	0	
	M	0	
Etapa IIB	T	2	El tamaño del tumor es >2 cm, <5 cm de ancho (T2), hay invasión en 1-3 ganglios linfáticos axilares y/o en ganglios linfáticos mamarios internos (N1), no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	1	
	M	0	
	T	3	El tamaño del tumor es >5 cm de ancho, no hay invasión a la pared torácica ni a la piel (T3), no hay invasión a ganglios linfáticos (N0), y no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	0	
	M	0	
Etapa IIIA	T	0-2	El tamaño del tumor es >5 cm de ancho (T0-2), hay invasión de 1-4 ganglios linfáticos axilares, o a ganglios linfáticos mamarios internos (N2), no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	2	
	M	0	

Tabla 1. Continuación

	T	3	El tamaño del tumor es >5 cm de ancho, no hay invasión a la pared torácica ni a la piel (T3), hay invasión a 1-9 ganglios linfáticos axilares, o a ganglios mamaros internos (N1-2), no hay invasión a áreas distantes (M0).
	N	1-2	
	M	0	
Etapa IIIB	T	4	El tumor invadió la pared torácica o la piel (T4), no hay invasión a áreas distantes (M0), además cumple con una de las siguientes características: · No hay invasión a los ganglios linfáticos (N0). · Hay invasión a 1-3 ganglios linfáticos axilares, y/o hay pequeñas cantidades de cáncer en ganglios linfáticos mamaros internos (N1). · Hay invasión a 4-9 ganglios linfáticos axilares, y/o hay inflamación de ganglios linfáticos mamaros internos (N2).
	N	0-2	
	M	0	
Etapa IIIC	T	-	El tumor puede ser de cualquier tamaño, no hay invasión a áreas distantes (M0), además cumple con una de las siguientes características: · Propagación del cáncer a 10 o más ganglios linfáticos axilares (N3). · Propagación del cáncer a los ganglios infraclaviculares (N3). · Propagación del cáncer a los ganglios supraclaviculares (N3). · El cáncer afecta a los ganglios linfáticos axilares y ha agrandado los ganglios linfáticos mamaros internos (N3). · El cáncer se ha propagado a cuatro o más ganglios linfáticos axilares, y se encuentran diminutas cantidades de cáncer en los ganglios linfáticos mamaros internos (N3).
	N	3	
	M	0	
Etapa IV	T	-	El tumor puede ser de cualquier tamaño, presenta o no invasión a ganglios linfáticos adyacentes, hay invasión a órganos distantes o a ganglios linfáticos distantes al seno (M1).
	N	-	
	M	1	

·Modificado de American Cancer Society (2017).

2.2.3 Clasificación molecular

Dentro de las glándulas mamarias existen dos tipos de células epiteliales a partir de las cuales se puede desarrollar cáncer: células basales (o mioepiteliales), y células lumbinales. Con base en la expresión y alteraciones genéticas específicas para cada uno de los linajes celulares se han realizado clasificaciones de los subtipos de cáncer de mama, con la finalidad de tratar a cada subtipo con una terapia adecuada (Perou, 2000; Figura 5).

- Tipo normal (NormL): Representan 5-10% del total de los casos de cáncer de mama. Son tumores pobremente caracterizados y han sido agrupados en fibroadenomas y muestras normales de mama. Se caracterizan por la expresión positiva del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor de andrógenos (AR), mientras que la expresión del factor de crecimiento epidémico 2 (HER2 o ErbB2) es negativa (Figura 5; Tabla 2; Reis-Filho, 2011; Guedj, 2012; Yersal, 2014).
- Luminal A (LumA): Representan 30-60% del total de los casos de cáncer de mama. Son tumores con origen en las células próximas al lumen de los conductos mamarios. Éstos tumores son de lento crecimiento y poco agresivos, presentan pronóstico favorable debido a la expresión de receptores hormonales y a la buena respuesta a terapia hormonal dirigida. Se caracterizan por la expresión de ER, PR, AR y la no expresión de HER2. Los genes más frecuentemente mutados en este subtipo son *PIK3CA* (45% de los tumores), *MAP3K1*, *GATA3*, *TP53*, *CDH1* y *MAP2K4*. Estos tumores presentan metástasis principalmente a hueso (Figura 5; Tabla 2; Guedj, 2012; TCGA, 2012; Reis-Filho, 2011; Zorka, 2014).
- Luminal B (LumB): Representan 10-20% del total de los casos de cáncer de mama. Son tumores con origen en las células próximas al lumen de los conductos mamarios. Son tumores más grandes que los del subtipo LumA, y presentan pronóstico pobre. Se caracterizan además, por la expresión positiva

de ER, PR, AR y la expresión negativa de HER2. El gen más frecuentemente mutado es *PIK3CA*. Invaden ganglios linfáticos y la metástasis es principalmente a hueso (Figura 5; Tabla 2; Guedj, 2012; Zorka, 2014).

- Luminal C (LumC): Representan 10-15% del total de los casos de cáncer de mama. Son tumores con origen en las células próximas al lumen de los conductos mamarios. De los tres subtipos luminales, el subtipo C presenta la peor respuesta de supervivencia. Se caracterizan por la expresión positiva de AR mientras que la expresión de ER, PR y HER2 puede ser positiva o negativa. Son la frontera entre los tumores ER positivos o negativos, conservan los patrones de expresión de algunos genes de los tumores ER negativos, y se atribuye a esto la respuesta pobre a los tratamientos (Figura 5; Tabla 2; Sorlie, 2001; Guedj, 2012).
- Apócrino molecular (mApo): Representan 8-14% del total de casos de cáncer de mama. Son tumores con fenotipo apócrino histológico. Caracterizados por la expresión positiva de AR y HER2 amplificado, mientras que la expresión de ER y PR es negativa. La señalización por andrógenos es la más activa en este subtipo. Tiene un patrón de expresión híbrido entre *TP53* y *PIK3CA*. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres mayores a 35 años (Figura 5; Tabla 2; Farmer, 2005; Guedj, 2012, Reis-Filho, 2011; Jun, 2012; TCGA, 2012).
- Tipo basal (BasL): Representan 10-20% del total de los tumores de cáncer de mama. Son tumores con alto grado histológico, presentan pronóstico desfavorable y alta tasa de proliferación. Tienen origen histológico en las células próximas a la membrana basal de los conductos mamarios. Están caracterizados por la ausencia de la expresión de ER, PR, y HER2. También expresan altamente el gen *CDKN2A*, *FGFR2* amplificado y baja expresión de *RB1* y *BRCA1* (Figura 5; Tabla 2; Guedj, 2012; Reis-Filho, 2011).

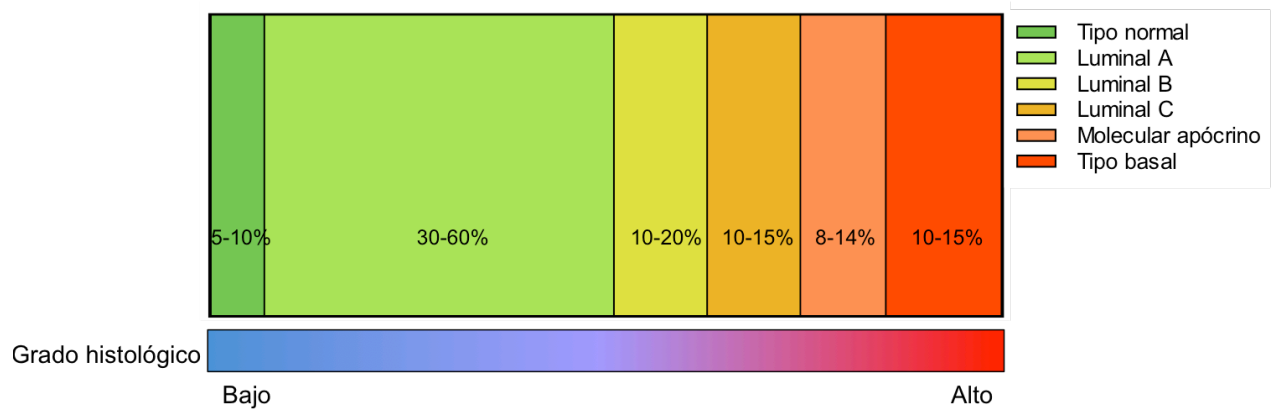


Figura 5. Frecuencias de los subtipos moleculares de cáncer de mama y su asociación con el grado histológico. Esquema elaborado con base en el trabajo de Guedj (2012) .

Tabla 2. Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama según la clasificación de Guedj (2012).

	Receptores				Origen histológico		Pronóstico	Sitio principal de metástasis	Perfil genético	
	ER	PR	HER 2	AR	Ductal	Lobular			Sobre-expresión	Subexpresión
NormL	+	+	-	+	+	+	Favorable	Hueso	-	-
LumA	+	+	-	+	+	-	Favorable	Hueso	<i>PIK3CA</i>	<i>MAP3K1</i> <i>GATA3</i> <i>TP53</i> <i>CDH1</i> <i>MAP2K4</i>
LumB	+	+	-	+	+	-	Desfavorable	Hueso	<i>PIK3CA</i>	-
LumC	+/-	+/-	+/-	+	+	-	Desfavorable	Hueso, Hígado	-	-
mApo	-	-	+	+	+	-	Desfavorable	Hueso	<i>PI3KCA</i>	<i>TP53</i>
BasL	-	-	-	-	+	-	Desfavorable	Cerebro	<i>CDKN2A</i> <i>FGFR2</i>	<i>RB1</i> <i>BRCA1</i>

2.2.4 Clasificación inmunohistoquímica

En la práctica clínica se utiliza la técnica de análisis inmunohistoquímico (IHC) para conocer el estado de expresión de los receptores ER, PR y HER2, además de la tasa proliferativa y etapa del tumor para determinar la terapia más adecuada para cada paciente. Con base en estas características se definen tres subtipos (Tang, *et al.*, 2015; Rakha *et al.*, 2010; Tabla 3):

- ER positivos
 - Luminal A: presentan expresión positiva de ER, baja expresión del marcador de proliferación Ki-67 (<14%), alta expresión de PR (>20%), y no expresan HER2.
 - Luminal B: presentan expresión positiva de ER, alta expresión de Ki-67 (>14%), baja expresión de PR (<20%), y no expresan HER2.
- HER2 positivos
 - Luminal HER2: presentan expresión positiva de ER y HER2, la expresión de PR puede ser positiva o negativa.
 - HER2 enriquecido: la expresión de ER y PR es baja o nula, mientras que la expresión de HER2 está enriquecida.
- Triple negativos
 - Tipo basal: no presentan expresión de ER, PR y HER2, mientras que la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y de las citoqueratinas 5/6 (CK5/6) es positivo.
 - Triple negativo no clasificado: no presenta expresión de ER, PR, HER2, EGFR y CK5/6. Estos tumores no están asociados con mutaciones en *BRCA1*.

Tabla 3. Características de los subtipos inmunohistoquímicos de cáncer de mama.(+) Expresión positiva. (-) No hay expresión. (ID) Indistinto, se refiere a que su expresión no determina el subtipo molecular.

Marcadores	ER positivos		HER2 positivos		Triple negativos	
	Luminal A	Luminal B	Luminal HER2	HER2 enriquecido	Tipo Basal	TN no clasificado
ER	+	+	+	-	-	-
PR	> 20%	< 20%	+/-	-	-	-
HER2	-	-	+	++	-	-
Ki-67	< 14%	> 14%	ID	ID	ID	-
CK5/6	ID	ID	ID	ID	+	-
EGFR	ID	ID	ID	ID	+	-

·Según la clasificación de la Sociedad Americana de Oncología Clínica, (2010).

3. Cáncer de mama triple negativo

Los tumores de mama triple negativos representan el 15% de todos los tumores de mama invasivos (Foulkes *et al.*, 2010). El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es definido por la falta de expresión de los receptores ER, PR y HER2 (Carey *et al.*, 2010). Están caracterizados clínicamente, por ser tumores grandes, de alto grado histológico, edad temprana de las pacientes al momento de su diagnóstico, y por tiempos cortos de supervivencia libre de enfermedad (de tres a cinco años), además tienen alta tasa de recurrencia en órganos distantes y un pronóstico pobre comparado con otros subtipos de cáncer de mama (Lehmann, *et al.*, 2011).

Molecularmente las mutaciones más comunes en el CMTN son en *TP53*, *PIK3CA*, *USH2A*, deleciones en genes como *PTEN*, *INPP4B* y amplificaciones en *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *FGFR1*, *FGFR2*. También presentan alta inestabilidad genómica intrínseca debido la presencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2* (Shah, 2012). Debido a estas características moleculares, dentro del CMTN existe heterogeneidad interpaciente, que confiere diferencias en la respuesta a diferentes terapias. Existen subclasificaciones del CMTN basadas en los perfiles de expresión genético las cuales se presentan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Subtipos de CMTN basados en análisis de la expresión de perfiles genéticos.

Auto y año	Abreviatura	Nombre
Lehmann <i>et al.</i> (2011).	BL1	Tipo basal 1
	BL2	Tipo basal 2
	M	Mesenquimal
	MSL	Mesenquimal tipo troncal
	IM	Inmuno-modulatorio
	LAR	Luminal positivo a receptor de andrógenos
Burstein <i>et al.</i> (2014)	LAR	Luminal positivo a receptor de andrógenos
	MES	Mesenquimal
	BLIS	Tipo basal inmuno-suprimido
	BLIA	Tipo basal inmuno-activado
Jezequel <i>et al.</i> (2015)	C1	Tipo no basal
	C2	Tipo basal
	C3	Basal enriquecido

3.1 Tratamientos para el cáncer de mama triple negativo

La quimioterapia citotóxica es el tratamiento para CMTN más usado desde hace 20 años (Cortazar *et al.*, 2012). Los tratamientos basados en antraciclinas y taxanos son efectivos, ya que aproximadamente 35% de los pacientes con CMTN en estadios tempranos, que son tratados con terapias basadas en antraciclinas o taxanos alcanzan una respuesta patológica completa de cáncer invasivo o *in situ*, y en los ganglios linfáticos (Bonotto, *et al.*, 2014).

Otros compuestos utilizados como quimioterapia citotóxica son las sales de platino, las cuales incluyen al carboplatino y cisplatino. Estos agentes son inductores de daño al DNA e inducen a apoptosis. Éstos agentes han demostrado tener grandes beneficios como terapia neoadyuvante y adyuvante. Además la respuesta es mejor en pacientes con CMTN, en comparación con aquellos que presentan otros subtipos de cáncer de mama (Kennedy, *et al.*, 2004). Sin embargo son agentes altamente tóxicos para todos los linajes celulares de paciente, y cuando son utilizados en estadios avanzados o metastásicos, menos del 30% de las mujeres tiene una sobrevida mayor a 5 años (von Minckwitz, *et al.*, 2012).

Para el 65% de los pacientes que no responden completamente a la quimioterapia citotóxica se han propuesto terapias personalizadas dirigidas a alteraciones específicas de los tumores de CMTN. Por ejemplo, los inhibidores de la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP; Calabrese, *et al.*, 2004), terapia anti-andrógenos (Gulcap, *et al.*, 2013), inhibidores de PI3K (Ibrahim, *et al.*, 2012), inhibidores de MEK (Hoeflich, *et al.*, 2009), inmunoterapia (Nanda, *et al.*, 2015), entre otras. Las características moleculares de los tumores de CMTN determinan la selección de la terapia dirigida, por ejemplo, los pacientes con tumores que tienen mutaciones en los genes *BRCA1/2*, así como en genes implicados en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga son buenos candidatos para la terapia con inhibidores de PARP, o para la quimioterapia citotóxica con sales platinadas. Por otro lado, los pacientes con alteraciones en genes que participan en las vías de proliferación como PI3K/mTOR o Ras/Raf/Mek pueden ser tratados con inhibidores de PI3K y MEK (Bianchini, 2016).

4. MicroRNAs

Los patrones de expresión de muchos genes codificantes y de microRNAs (miRNAs) están aberrantemente expresados en CMTN (Yang, *et al.*, 2014). Se ha demostrado que uno de los mecanismos de regulación de la expresión genética a nivel epigenético en cáncer es mediado por los miRNAs (Bartel, 2004). Los miRNAs son moléculas de RNA pequeños no-codificantes de ~22-28 nt que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional, mediante la represión o activación de la traducción e induciendo el corte y degradación de sus RNA mensajeros (mRNA) blanco, a los cuales se unen por complementariedad de bases (Friedman, 2009).

Los miRNAs fueron descubiertos por el Lee y Ambros en 1993, quienes describieron que *lin-4* controla la sincronización del desarrollo embrionario del nemátodo *C. elegans*, sin codificar para alguna proteína pero sí producía dos hebras de RNA (Lee *et al.*, 1993). Desde entonces el número de pequeños RNAs descritos ha crecido substancialmente. En mamíferos se predice que los miRNAs controlan la actividad de ~60% del total de los genes que codifican para proteínas y participan en la regulación de prácticamente todos los procesos celulares (Kim, 2009).

4.1 Biogénesis de miRNAs

Los miRNAs son transcritos por la RNA Polimerasa II, produciendo una horquilla de ~1 kb (pri-miRNA), la cual es cortada por el complejo Microprocesador heterotrimérico constituido por la subunidad de ribonucleasa III de doble cadena Drosha, y dos del cofactor de unión a RNA de doble cadena DGCR8 (Grimson, *et al.*, 2007). Este complejo Microprocesador libera una horquilla de ~60-70 pb denominada precursora (pre-miRNA), la cual es transportada al citoplasma de manera dependiente de Ran-GTP por la carioferina Exportina 5 (EXP5; Bartel, 2004).

En el citoplasma el pre-miRNA, es procesado por la proteína Tar de unión a RNA de doble cadena (TRBP), la proteína activadora de PKR (PACT), y la ribonucleasa Dicer (Winter, 2009). Dicer corta el bucle terminal de cadena simple, reconociendo el motivo

-UGU- (Bartel, 2015) y liberando un dúplex de ~18-22 nt que es desenrollado por su dominio de helicasa DExD/H-box de manera independiente de ATP (Kawamata, 2009). Posteriormente el dúplex es incorporado al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), conformado por la proteína Argonauta 2 (Ago2), y la proteína rica en repeticiones de glicina-triptófano (GW182), Una vez que el miRNA es incorporado a este complejo se le llama miRISC (Grimson, *et al.*, 2007; Figura 6).

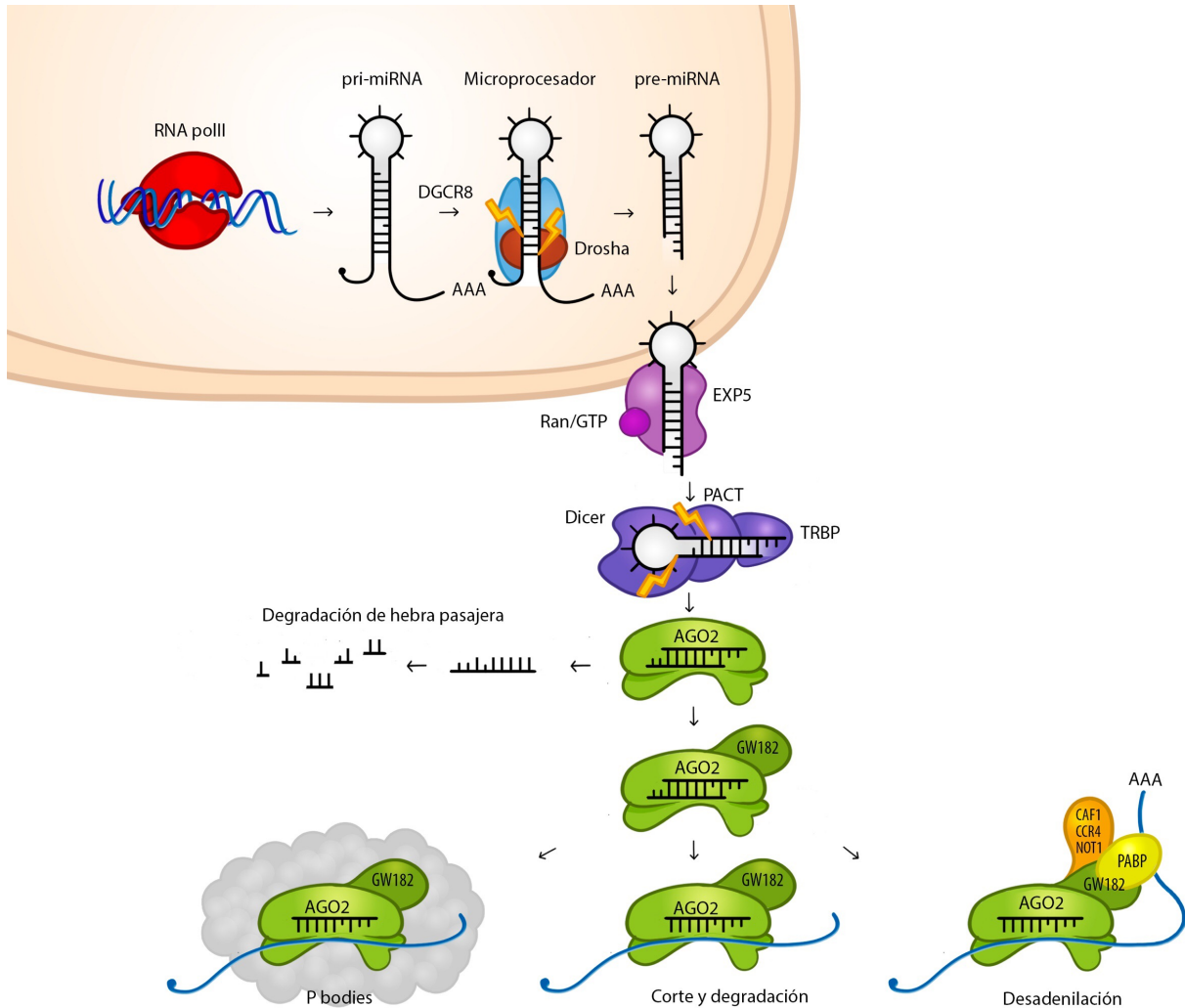


Figura 6. Biogénesis de los microRNAs. Esquema elaborado con base en Bartel, (2004), Gregory *et al.*, (2005) y Winter *et al.*, (2009).

4.2 Estructura y función del miRISC

La estructura de Ago2 está conformada por los dominios PAZ, Linker 2 (que contiene una estructura alfa-hélice 7), MID y PIWI. El nucleótido 5' terminal del miRNA en forma monofosforilada, es anclado en un bolsillo profundo en la unión de los dominios MID y PIWI, con el fosfato terminal de la última base que interactúa con los aminoácidos de Ago2 por medio de un ion Mg^{++} (Gan, *et al.*, 2015). Los nucleótidos del miRNA interactúan con Ago2 a través del esqueleto de fosfato-ribosa, y se acomodan en una forma semi-helicoidal, con las bases disponibles para el mRNA blanco (Fabian y Sonenberg, 2012).

El miRISC es el responsable de ejecutar la función de los miRNAs de la siguiente forma: el miRNA actúa como el núcleo del miRISC, interactuando directamente con Ago2, de esta manera determina con cuáles mRNAs se unirá potencialmente, y posteriormente las proteínas Ago2 y GW182 ejecutarán el silenciamiento o mejoramiento de la expresión del mRNA blanco (Fabian y Sonenberg, 2012)

Estudios biofísicos y estructurales han mostrado que el miRISC tiene tres funciones básicas ejecutadas por Ago2 (Gan, *et al.*, 2015).

- (i) Selecciona la hebra guía (con actividad) con base en la estabilidad termodinámica, bajo el siguiente criterio: la hebra que tiene mayor número de apareamientos imperfectos en el extremo 5'. La hebra no seleccionada (pasajera) se libera del miRISC y es posteriormente degradada por las ribonucleasas Xrn1/2 (Meijer *et al.*, 2014).
- (ii) Proporciona estabilidad a la hebra guía del miRNA por medio de la interacción del alfa-hélice 7.
- (iii) Coordina el apareamiento guiado por el miRNA, mediante una hibridación de tipo Watson y Crick de la región del nucleótido 2-7 (región semilla o "seed") del miRNA y la región 3' no-codificante (3'UTR) del mRNA (Bartel, 2015).

Las funciones del miRISC son determinadas por las conformaciones de Ago2 y la flexibilidad de su estructura (Tama *et al.*, 2002), presenta tres movimientos esenciales que permiten la transición de su estado abierto a cerrado:

- (i) Movimiento de bisagra abierta-cerrada: entre MID/PIWI y PAZ, este movimiento permite el acomodamiento de una hélice de RNA en forma A (Sheng, *et al.*, 2014; Figura 7).
- (ii) Movimiento de torsión o giro conformacional: entre MID/PIWI y PAZ, esta torsión permite que la región alfa-hélice 7 de Ago2 se acomode en la ranura menor del dúplex de miRNA:mRNA, dentro o cerca de la región semilla (Sheng, *et al.*, 2014; Figura 7).
- (iii) Movimiento de rotación del dominio PAZ junto con la alfa-hélice 7 de Ago2, esta rotación bloquea o fija la interacción del alfa-hélice 7 con la ranura menor del dúplex, una vez que se fija la interacción de Ago2 con el dúplex miRNA:mRNA, se considera un estado cerrado (Sheng, *et al.*, 2014; Figura 7).

Una vez fijada la interacción de Ago2 con el dúplex miRNA:mRNA, existen tres vías de acción del miRNA: i) corte y degradación del mRNA; ii) represión traduccional; y iii) aumento de la traducción bajo condiciones de estrés celular (Winter *et al.*, 2009; Iorio, 2005; Gregory *et al.*, 2005; Orom *et al.*, 2008).

Además de su funcionamiento en procesos fisiológicos normales como reguladores de la expresión genética en el crecimiento, proliferación, diferenciación celular, apoptosis, defensa antiviral y mantenimiento de fenotipos específicos, los cambios en la expresión regular de los miRNAs están asociados a muchas patologías humanas, como insuficiencia cardíaca, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebro-vascular y cáncer (Vegter *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; DiStefano, 2016; McManus, 2003).

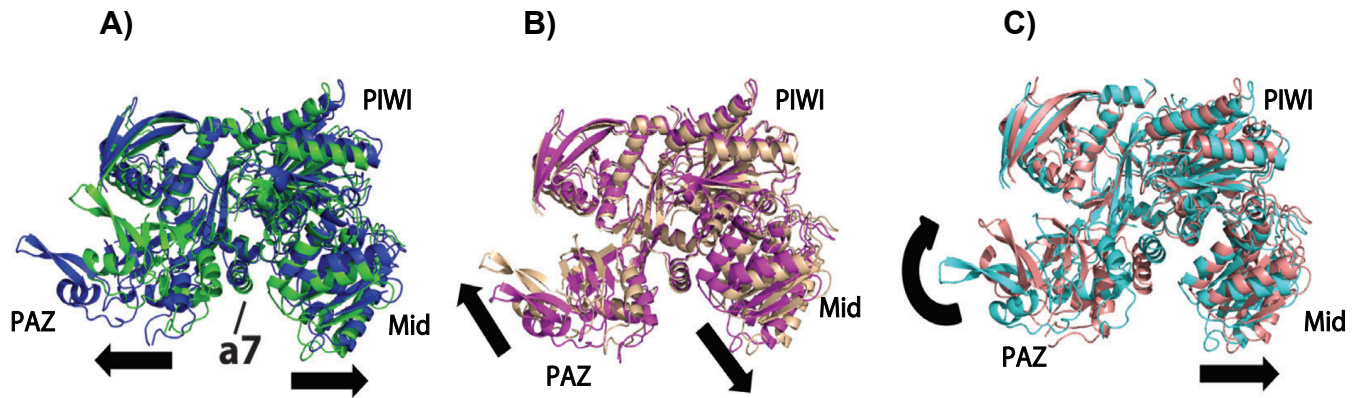


Figura 7. Dinámicas torsionales de la proteína Argonauta 2 de *Homo sapiens*. Las flechas negras muestran las direcciones principales de los movimientos de los dominios (PAZ, PIWI y Mid). A) Movimiento de bisagra abierta-cerrada entre MID/PIWI y PAZ. B) Movimiento de torsión o giro conformacional entre MID/PIWI y PAZ. C) Movimiento de rotación del dominio PAZ. Obtenido y modificado de Gan *et al.* (2015)

4.3 MicroRNAs en cáncer

El primer estudio que demostró que los genes de miRNAs estaban implicados en el desarrollo de carcinomas humanos fue publicado en 2002. En este estudio se analizó el *locus* 13q14 en células B de leucemia linfocítica crónica (CLL), cuya delección está asociada con el 70% de los casos de CLL. En éste *locus* se encuentran los genes de miR-15a y miR-16-1, cuya expresión está disminuida en el 68% de los casos de CLL. De esta manera relacionaron causalmente la expresión aberrante de miR-15a y miR-16-1 con el desarrollo de CLL (Calin, *et al.*, 2002).

A partir de éste trabajo se ha demostrado que los miRNAs participan en la patogénesis molecular del cáncer, en procesos como la proliferación, apoptosis, invasión tisular, metástasis y angiogénesis, actuando como oncomiRs cuando se encuentran sobreexpresados, y como supresores de tumor cuando se encuentran subexpresados (DiLeva, *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de miRNAs supresores de tumor, son el grupo de miR-34a-b que interactúan con el mensajero de *BCL2* reprimiendo su expresión (Wan, *et al.*, 2013); la familia de miR-200 como supresora de la transición epitelio-mesenquima (EMT), un proceso que precede a la invasión metastásica (Mongroo y Rustgi, 2010). Algunos de los oncomiRNAs son miR-21, que regula la vía de PTEN promoviendo el fenotipo metastásico y el grupo de miR-221/222, que al ser sobreexpresados reducen la expresión de E-cadherinas promoviendo también el fenotipo metastásico (D'Ippolito *et al.*, 2013). Los miRNAs también pueden tener un papel dual, es decir, un mismo miRNA puede actuar como oncomiR y como miRNA supresor de tumor, esto dependiendo de condiciones celulares específicas, por ejemplo, miR-204 actúa como oncomiR uniéndose al mensajero de PDEF en células de carcinoma indiferenciado neuroendócrino de próstata, pero en células de adenocarcinoma prostático actúa como supresor de tumor uniéndose a blancos como AKT1, Ciclina D1 y p21 (Tianqi *et al.*, 2016; KEGG, 2016; Zhang, *et al.*, 2015;).

4.4 miR-302c

En este trabajo seleccionamos a miR-302c debido a su posible función dual como oncogen y supresor tumoral en células de cáncer de mama triple negativo y en células de carcinoma embrionarias (Volinia, 2014; Barroso-delJesus, 2008; Liang, 2014; Li, 2017; Vaca-Paniagua, 2015; Zhang, 2015), ya que algunos de sus blancos validados experimentalmente incluyen oncogenes como *ESR1* y *AKT1*, genes supresores de tumor como *ATM* (miRTarBase), y otros blancos no validados experimentalmente, pero predichos con herramientas bioinformáticas incluyen *TET2* y *APC* (TargetScan) y *BRCA1* (miRANDA). Por lo tanto, en conjunto, miR-302c podría regular al menos seis genes clave en la progresión del cáncer.

MiR-302c pertenece al grupo policistrónico miR-302-367, localizado en el intrón 8 del gen *LARP7* que codifica para la Ribonucleoproteína 7, presente en el complejo snRNP, el cual es un regulador positivo del factor B de elongación transcripcional, requerido para activar a la RNA polimerasa II (NCBI, 2016). El grupo miR-302-367 cuenta con un promotor autónomo (Barroso-delJesus *et al.*, 2008; Figura 8).

Respecto a su función biológica, miR-302-367 es el grupo más abundante en células troncales de embrión humano y puede promover la reprogramación somática (Zhan, 2015). También se expresa altamente en células troncales de carcinoma humano, a las que les confiere propiedades importantes para la tumorigénesis, como la auto-regeneración y generación de progenie diferenciada por división asimétrica. Su localización es predominantemente citoplasmática, y su expresión es dependiente de la ontogenia celular (Barroso-delJesus *et al.*, 2008). En tejido mamario normal no hay expresión de *MIR302*, por esta razón, este miRNA está relacionado con la patogénesis del cáncer de mama; además su expresión está correlacionada con marcadores de células troncales como *CD44* y *BMI1* (Volinia *et al.*, 2014). La represión de miR-302 confiere radioresistencia, y contribuye a la metástasis del cáncer de mama (Liang *et al.*, 2014). Mientras que la sobreexpresión de éste miRNA inhibe la invasión y metástasis de células de cáncer de mama, disminuye la expresión de *AKT1* y *Rad51*, y sensibiliza a células de cáncer de mama a la radioterapia (Liang *et al.*, 2013). En células troncales

humanas normales, miR-302 demostró inhibir la tumorigénesis y proliferación, coordinando la supresión de Cdk2 y la vía celular de CDK4/6 (Lin *et al.*, 2010). En células de carcinoma cervical el grupo de miR-302-367 inhibe la proliferación, uniéndose directamente al transcrito de *AKT1* y reduciendo los niveles de proteína (Cai *et al.*, 2013).

Todos éstos estudios sugieren que miR-302 tiene un papel como supresor tumoral, sin embargo, también se ha demostrado que puede funcionar como oncomiRNA, dependiendo de la concentración intracelular. Por ejemplo, cuando está en sobre-expresado se une a la Ciclina D2, promoviendo la transición de G1/G0 a S, mientras que cuando está sub-expresado se une a *BNIP3L*, promoviendo la apoptosis. Mediante éstos mecanismos, miR-302 regula el ciclo celular y la apoptosis a través de la regulación de distintos genes blanco (Zhang *et al.*, 2015). También está asociado con subtipos de cáncer de mama agresivos como el CMTN, ya que reprime la expresión de ER α (Leivonen *et al.*, 2009). En un estudio del perfil de expresión de los miRNAs en tejidos de CMTN de pacientes mexicanas, se reportó que miR-302a y miR-302c están sobreexpresados (Vaca-Paniagua *et al.*, 2015). Esta evidencia experimental sugiere que el grupo de miR-302-367 tiene una función dual, es decir, puede actuar como supresor de tumor o como oncomiRNA.

Nombre	Secuencia
hsa-miR-302a-5p	<u>ACUU</u> AAAC <u>GUGGA</u> UGUACUUGCU
hsa-miR-302b-5p	<u>ACUUUAACA</u> UGGA AGUG CUUUC
hsa-miR-302c-5p	<u>UUUAACA</u> UGG GGUAC CUGCUG
hsa-miR-302d-5p	<u>ACUUUAACA</u> UGG AGG CACUUGC
hsa-miR-367-5p	<u>ACU</u> GUUGC <u>UAAUAUG</u> CAACUCU

Figura 8. Secuencias de los miRNAs maduros de la familia de miR-302-367. En rojo se marcan las alteraciones nucleotídicas que presentan cada uno de los miRNAs, los nucleótidos subrayados indican la región semilla. Obtenido de miRbase.org, 2017.

5. Algoritmos bioinformáticos

El conocimiento de los genes regulados por miRNAs es fundamental para el entendimiento del cáncer a nivel molecular. Actualmente se utilizan predicciones bioinformáticas para encontrar blancos potenciales para miRNAs. Las predicciones bioinformáticas de los blancos de miRNAs trabajan bajo la hipótesis de que hay una interacción canónica, es decir, los nucleótidos 2-7 del miRNA están apareados con la región 3'UTR de su mRNA blanco. Estos algoritmos también incorporan información termodinámica de la estabilidad de la interacción por medio de la energía libre liberada por la unión miRNA:mRNA, así como la conservación filogenética de los sitios de unión presentes en el mRNA (Agarwal, 2015).

A pesar de que éstas herramientas son muy útiles y han demostrado predecir correctamente blancos de miRNAs, producen también altas tasas de falsos positivos debido a que no se toma en cuenta la estructura secundaria del RNA, y al uso de la región semilla como medida, lo cual genera una predicción poco precisa (Reczko, 2012), y falsos negativos, ya que solo toman en cuenta la región 3'UTR del mRNA (Grimson, *et al.*, 2007; Krek, 2005). También se han descrito limitaciones matemáticas en los algoritmos para describir las interacciones miRNA-mRNA en sistemas biológicos (Salviato, 2013). Otra limitación de los algoritmos bioinformáticos es su incapacidad para predecir interacciones no-canónicas miRNA:mRNA, en las que no interviene la región semilla del miRNA o la región 3'UTR del mRNA (Agarwal, 2015).

6. Interacciones no-canónicas

En estudios recientes se ha demostrado que los miRNAs también regulan la expresión genética por medio de interacciones no-canónicas. Se definen como interacciones no-canónicas aquellos apareamientos miRNA:mRNA que no incluyan la región semilla y/o la región 3'UTR del mRNA (Chi, *et al.*, 2012), se han descrito al menos nueve diferentes modelos de unión miRNA:mRNA (Cloonan, 2015; Figura 9).

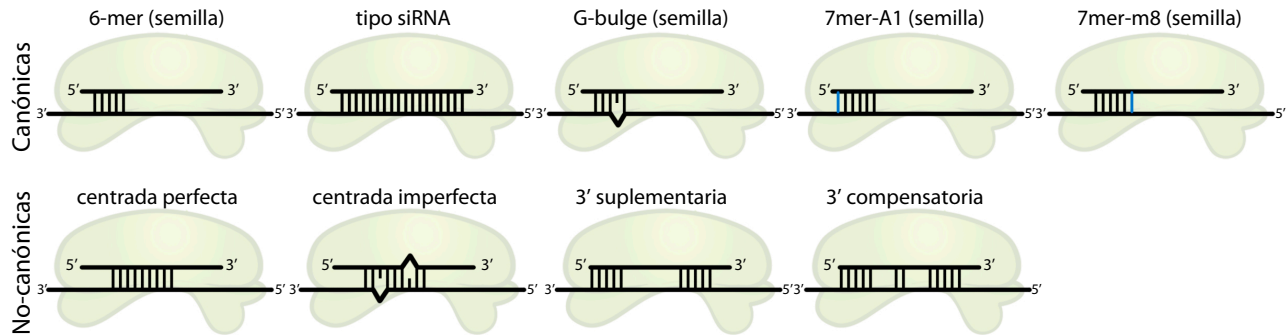


Figura 9. Interacciones canónicas y no-canónicas miRNA:mRNA. Elaborado con base en el trabajo de Cloonan (2015) y Grimson *et al.*, 2007. Las interacciones que no emplean a la región semilla del miRNA no son predichas por los algoritmos bioinformáticos.

El porcentaje de interacciones no-canónicas es predominante sobre las interacciones canónicas, ya que del 40-70% de los sitios de reconocimiento de miRNAs son mediados por éste tipo de interacciones (Martin *et al.* 2014; Helwak *et al.* 2013). Las interacciones no-canónicas no han sido ampliamente descritas ya que no son identificables empleando únicamente los métodos bioinformáticos, solo pueden identificarse y caracterizarse experimentalmente (Tan *et al.* 2014).

7. Experimentos de captura por afinidad directa

Con la finalidad de detectar las interacciones globales de miRNAs, Orom *et al.* (2009) desarrollaron un método para identificar mRNAs asociados a un miRNA específico usando un análogo de miRNA biotinilado en su extremo 3' (miRNA-B; Figura 10). Los miRNAs-B son transfectados a células en cultivo, posteriormente son incorporados a los complejos miRISC, y median la asociación con los blancos endógenos. La funcionalidad del miRNA-B sintético debe ser evaluada para tener la certeza de que la modificación de la biotina no interfiere en la selección correcta de la hebra guía y en la funcionalidad del miRNA (Orom *et al.*, 2009). Para validar de manera funcional lo anterior, se emplea un plásmido con un gen reportero que contenga sitios de interacción ya probados para un microRNA en particular, en este trabajo se seleccionó la interacción de miR-302c con la región 3'UTR de *AKT1* (Cai, *et al.*, 2013).

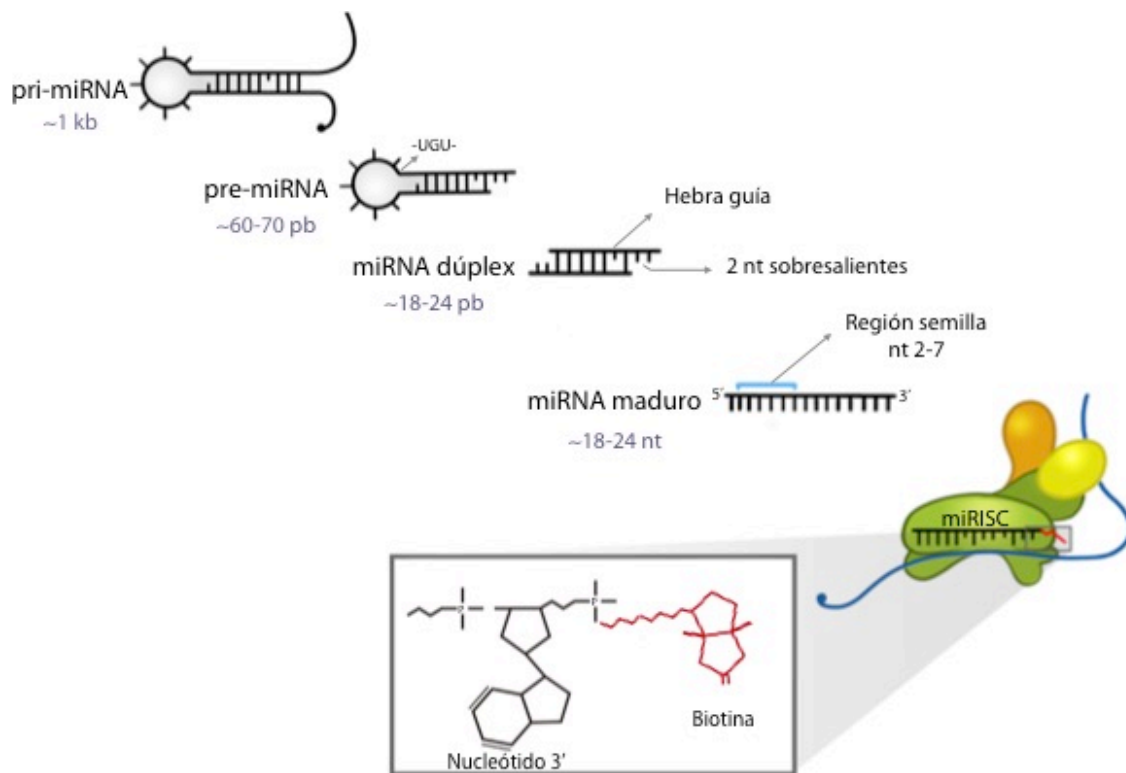


Figura 10. Anatomía molecular de la maduración los miRNAs. Se muestran los motivos reconocidos por la maquinaria de maduración, los tamaños de cada molécula y los nucleótidos sobresalientes. También se muestra un modelo del complejo miRISC a escala con un microRNA biotinilado; la molécula de biotina (color rojo) se extiende hacia afuera del canal de la proteína Ago2.

III. JUSTIFICACIÓN

Dada la relevancia de los miRNAs como reguladores epigenéticos en procesos patológicos como el cáncer, la identificación de interacciones canónicas y no-canónicas, es prioritaria para conocer y entender las redes globales de interacción de los miRNAs, así como sus funciones y los mecanismos moleculares en los que participan dentro de una célula tumoral. Las herramientas bioinformáticas actualmente utilizadas tienen limitaciones para detectar las interacciones no-canónicas, y éstas interacciones pueden incluir mRNAs blanco clave en la progresión del cáncer. El presente trabajo propone la evaluar la funcionalidad de un miRNA biotinilado en su extremo 3', por medio de la verificación de una interacción ya probada en la región 3'UTR de *AKT1*, para posteriormente utilizarlo en la implementación de estrategias experimentales para identificar nuevas interacciones canónicas y no-canónicas de miR-302c, lo que ampliaría el conocimiento de procesos básicos de los miRNAs, así como de las vías de señalización alteradas en las células tumorales.

IV. HIPÓTESIS

El miRNA biotinilado (miR-302c-B) inhibirá la expresión del gen reportero de la luciferasa, por medio de la interacción con sus sitios blanco canónicos en la región 3'UTR de *AKT1* en un modelo de cáncer de mama triple negativo.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la funcionalidad de miR-302c-B sobre la región 3'UTR de *AKT1* en un modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo.

Objetivos particulares

- Clonar la región 3'UTR de *AKT1* en el vector pmiRGLO.
- Cotransfectar la construcción pmiR-*AKT1* y miR-302c-B en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Realizar un ensayo de silenciamiento del gen reportero de la Luciferasa, empleando miR-302c-B y la región 3'UTR de *AKT1*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estrategia experimental

Para validar la funcionalidad de miR-302c-B sobre la región 3'UTR de *AKT1* en un modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo, se realizó una construcción con el vector pmirGLO (Promega) para el ensayo de gen reportero de la Luciferasa. Se insertó en el sitio múltiple de clonación la región 3'UTR del gen *AKT1*, la cual contiene sitios demostrados experimentalmente de unión a miR-302c (Cai *et al.*, 2013). El miRNA apareado deberá reducir la actividad de la proteína Luciferasa, evaluada con el ensayo del sistema Dual-Luciferase Reporter (Orom, 2007). Para lo anterior, brevemente, se realizó una cotransfección de miR-302c-B y controles de microRNAs biotinilados (Exiqon), y del plásmido recombinante pmiR-*AKT1* en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y se midió la actividad de la enzima Luciferasa (Orom *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2014; Figura 11).

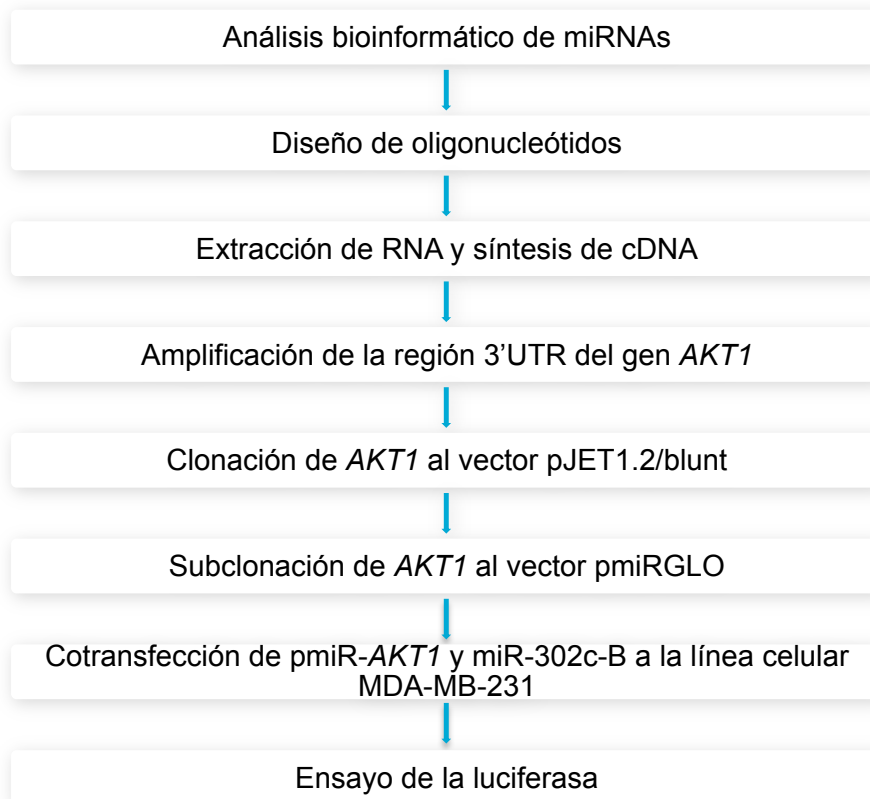


Figura 11. Estrategia experimental. Conjunto y orden de los métodos empleados en este trabajo.

1. Análisis bioinformático y de enriquecimiento de microRNAs y sus blancos

Para la selección de un miRNA, se analizó una lista de microRNAs sobreexpresados en CMTN (Vaca-Paniagua, *et al.*, 2014), por medio de herramientas bioinformáticas. Se utilizaron los software TargetScan 7.0 (Agarwal, *et al.*, 2015), miRTarBase 6.0 (Institute of Bioinformatics and Systems Biology), y miRanda (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center). A los blancos predichos se les realizó un análisis de enriquecimiento con el software de GSEA/MSigDB v2.2.0 (Broad Institute) y DAVID 6.7 (Huang, *et al.*, 2009), los agrupamientos arrojados se agregaron a una base de datos.

2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para la amplificación de la región 3'UTR de *AKT1* se diseñaron con base en la secuencia de referencia obtenida de la base de datos GeneBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el ID: NM_005163.2. Se ingresó la secuencia de la región 3'UTR en el software Primer 3 (University of Michigan Medical School) y se realizaron los análisis *in silico* con el software OligoCalc (Northern University) y FastPCR para corroborar que los productos de la amplificación fueran específicos y para obtener las temperaturas de dimerización inter e intra oligonucleótidos. A los oligonucleótidos obtenidos se les agregó en sus extremos 5' los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI* respectivamente.

3. Cultivo celular

La línea celular MDA-MB-231 fue obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC). La células fueron mantenidas en medio DMEM-F12 1:1 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning), a 37°C con en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio DMEM-F12+10% SFB fue reemplazado cada tres días por medio fresco. Se utilizaron placas de 24 pozos, y se sembraron 160,000 células por pozo con la finalidad de tener 70% de confluencia al momento de transfección.

4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Se aisló el RNA total de la línea celular MDA-MB-231 empleando el método de aislamiento con tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987), con reactivo TRIzol (Life Technologies). Las células fueron cultivadas en frascos T-25, cuando alcanzaron una confluencia del 85-90% se removió cuidadosamente el medio y se lavaron con 7 mL de PBS 1X, luego se les agregó 1 mL de TRIzol, y se llevó a cabo la extracción de acuerdo con el protocolo del fabricante. El RNA total se cuantificó a 260/280 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek). A partir de 500 ng de RNA total extraído de la línea celular MDA-MB-231, se realizó la síntesis de cDNA por medio de una transcripción reversa con el kit First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific), y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

5. Amplificación de la secuencia de la región 3'UTR del gen *AKT1*

La amplificación de la secuencia 3'UTR del mensajero *AKT1* se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa con el kit KAPA Taq PCR (KAPA Biosystems), a partir del cDNA obtenido en el paso anterior, utilizando los oligonucleótidos específicos para la región de interés, y una reacción sin cDNA utilizada como control negativo. El programa de termociclador usado fue: 95°C, 3 min; 94°C, 30 s; 63°C, 30 s; 72°C, 1 min; 35 ciclos. Una vez obtenido el producto único, se purificó por columna con el kit FastGene PCR/Gel Extraction (Nippon Genetics).

6. Clonación del fragmento 3' UTR de *AKT1* al vector pJET1.2/blunt

Se clonó el fragmento 3'UTR de *AKT1* purificado en el vector para productos de PCR pJET1.2/blunt (ThermoFisher Scientific), el alineamiento se realizó con el kit CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific), el cual cuenta con un paso de relleno de extremos protuyentes para generar extremos romos. Para la ligación del producto de PCR con extremos romos al vector pJET1.2/blunt se utilizó Ligasa T4 (ThermoFisher Scientific) y se incubó a 22°C por 1 h. La construcción (pJET-*AKT1*) se mantuvo a -20°C hasta su posterior uso.

7. Transformación de bacterias químicamente competentes

Se agregaron 50 ng del plásmido pJET-AKT1 a 50 µL de bacterias químicamente competentes de *E. coli* DH5α, la mezcla fue incubada por 15 min en hielo. Posteriormente se realizó un choque térmico de 42°C por 60 s y se transfirieron a hielo por 2 min. Se les agregó 200 µL de medio LB para la recuperación y se mantuvieron en agitación a 150 rpm, a 37°C por 1 h. Posteriormente se sembraron por gota en cajas de Petri con medio LB (Luria-Bertani) sólido con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C por 14 h.

8. Tamizaje de clonas

Se contó el número de colonias aisladas (clonas) que crecieron en la placa y se seleccionaron ocho clonas aisladas diferentes, que fueron empleadas directamente para realizar una PCR de colonia, realizando la técnica de siembra en espejo. Para realizar lo anterior, se inocularon tubos de 0.2 mL con cada colonia y se resembraron en cajas Petri con medio LB (Luria-Bertani) sólido con 100 µg/mL de ampicilina y con cuadrantes numerados.

9. Purificación de los plásmidos recombinantes

Para las purificaciones de los plásmidos construidos (recombinantes) se empleó el método de mini-preparación por lisis alcalina GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific). Se seleccionaron 4 clonas y se sembraron en 5 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, se incubaron a 37°C por 14 h, con agitación constante. Se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm por 15 min, y se llevó a cabo la purificación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las alícuotas fueron cuantificadas con por espectrofotometría y almacenadas a -20°C hasta su posterior uso.

10. Digestión del vector recombinante pJET-AKT1 y vector pmiRGLO

La construcción pJET-AKT1 y el vector pmiRGLO fueron digeridos con las enzimas *SacI* y *XbaI* (New England Biolabs), para generar extremos cohesivos y facilitar la subclonación del fragmento en el vector pmiRGLO (Promega). Se agregaron 20 U de enzima por cada microgramo de DNA y la mezcla se incubó a 37°C toda la noche. El inserto (AKT1) y el vector (pmiRGLO) digeridos se mantuvieron a -20°C hasta su posterior uso.

11. Subclonación del fragmento 3' UTR de *AKT1* al vector pmiRGLO

El fragmento 3'UTR de *AKT1* digerido se ligó con el vector pmiRGLO digerido. Ambos fragmentos contenían extremos cohesivos, de esta manera se realizó una subclonación direccionada. Se utilizó la DNA Ligasa T4 (ThermoFisher Scientific), y las proporciones molares de 1:3 y 1:5. Se incubó a 22°C por 2 h y se usaron para transformar bacterias químicamente competentes como se describió en el paso 7.

12. Secuenciación tipo Sanger

Los plásmidos recombinantes pJET-*AKT1* y pmiR-*AKT1* se secuenciaron en Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología UNAM, mediante secuenciación tipo Sanger usando los oligonucleótidos diseñados para secuenciación “pJET1.2 Forward Sequencing Primer” y “pJET1.2 Reverse Sequencing Primer”, y “pmiRGLO Forward Sequencing Primer” y “pmiRGLO Reverse Sequencing Primer” para las construcciones pJET-*AKT1* y pmiR-*AKT1* respectivamente.

13. Transfección

13.1 Estandarización de la transfección

Las condiciones de transfección para la línea celular MDA-MB-231, fueron estandarizadas en placas de 24 pozos (15 mm de diámetro) con tres concentraciones de Lipofectamina 2000 (1, 1.2 y 2 μ L/pozo), y tres concentraciones de vector EGFP-N1 (250, 400 y 600 ng/pozo). Las células fueron expuestas por 6 h a los complejos DNA:lipofectamina; posteriormente se lavaron con PBS 1X y se les agregó 1 mL de medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB. Las células transfectadas se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia con el filtro para la longitud de onda 500-550 nm a las 24 y 48 h después de retirar los complejos DNA:lipofectamina.

13.2 Cotransfección del vector pmiR-AKT1 y miR-302c-B

Para evaluar la interacción de miR-302c-B con la región 3'-UTR del gen *AKT1* se realizó una cotransfección de pmiR-AKT1 con miR-302c-B. Se utilizaron 600 ng totales de los plásmidos pmiR-AKT1, pmiRGLO y EGFP-N1, y 30 nM de miR-302c-B por pozo (miRNA problema), miR-146-B y cel-miR-39-B (controles negativos sin sitios de unión a *AKT1*).

14. Ensayo del gen reportero de la luciferasa

Después de 24 h de la cotransfección, se realizó el ensayo del gen reportero de la Luciferasa. El vector pmiRGLO contiene el marco abierto de lectura de *Luc* que codifica para la enzima luciferasa de luciérnaga. Las luciferasas catalizan la oxidación del sustrato Luciferina, de manera dependiente de ATP, Mg²⁺ y O₂. La oxidación ocurre a través de una molécula intermediaria de AMP-Luciferina que se transforma en Oxyluciferina lentamente, produciendo un destello de luz medible a una longitud de onda de 560 nm. Los fotones liberados se midieron de acuerdo con las especificaciones del kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) y el luminómetro GloMax 20/20 (Promega). Las células de cada pozo fueron lisadas con 100 µL de PLB 1X (Passive Lysis Buffer) en agitación constante y se transfirieron 20 µL de cada lisado en una placa de 96 pozos color negro con fondo plano transparente. Posteriormente se agregó el reactivo LARII (Luciferase Assay Reagent II) y se midió la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga durante 10 s. Luego se agregó el reactivo Stop&Glo y se midió la luminiscencia de luciferasa de *Renilla* durante 10 s. Los datos de luciferasa de luciérnaga fueron normalizados contra los valores de luciferasa de *Renilla* usando la fórmula: [(Fluc/Rluc)*1000].

15. Análisis estadístico

La evaluación de las diferencias significativas se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism, Prism6.

VII. RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de microRNAs

Se analizó una lista de 142 microRNAs sobreexpresados en CMTN con las herramientas TargetScan 7.0, miRTarBase 6.0, miRanda, GSEA/MSigDB v2.2.0 y DAVID-BioinformaticDB. Se seleccionó a miR-302c como un miRNA con relevancia en CMTN, ya que además de estar sobreexpresado, se identificaron blancos potenciales a oncogenes como *AKT1*, *EGFR*, *ABL2*, *CCND1*, *CCND2* y *FOXO2*, y en genes supresores de tumor como a *TET2*, *BRCA1*, *APC* entre otros.

Entre sus blancos también se encontraron otros genes en las categorías de citosinas, quimiocinas y factores de crecimiento como *CXCL1*, *FGF10*, *VEGFA*, factores de transcripción como *FOXL2*, *FOXO3*, *MYCN*, y proteínas cinasas como *WEE1*, *TP53RK*, *EGFR*, *MAP3K1*, *PAK2* entre otras (Figura 12, Tabla 5).

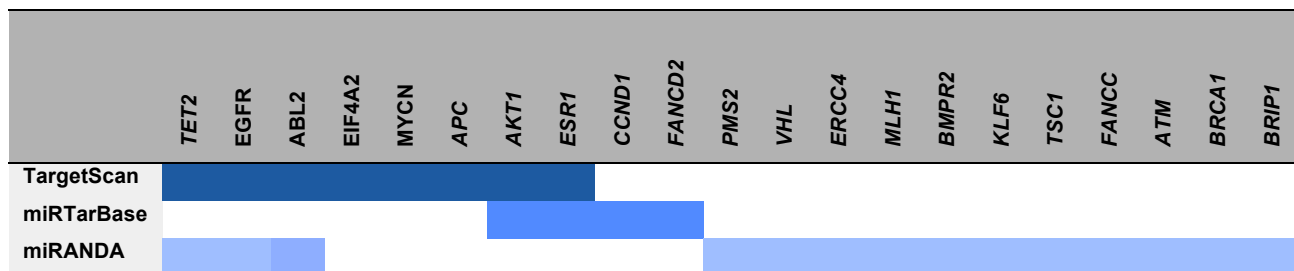


Figura 12. Genes blanco de miR-302c identificados con tres herramientas bioinformáticas diferentes: TargetScan, miRanda, miRTarBase.

Tabla 5. Análisis de enriquecimiento de los genes blanco encontrados para miR-302c.

Genes	Citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento	Factores de trans-cripción	Cinasas	Oncogenes	Supresores de tumor
	<i>CXCL1</i> <i>EPGN</i> <i>FGF10</i> <i>FGF19</i> <i>GDF11</i> <i>IL8</i> <i>INHBB</i> <i>LIF</i> <i>RABEP1</i> <i>TXLNA</i> <i>VEGFA</i>	<i>BCL11B</i> <i>FOXO3</i> <i>HLF</i> <i>NR4A3</i>	<i>BMPR2</i> <i>MAP3K1</i> <i>MAP3K11</i> <i>NEK9</i> <i>NR4A3</i> <i>PAK2</i> <i>PAK7</i> <i>PKN2</i> <i>STK40</i> <i>TNIK</i> <i>TP53RK</i> <i>ULK1</i> <i>WEE1</i>	<i>AKT1</i> <i>ESR1</i> <i>BCL11B</i> <i>CCND1</i> <i>CCND2</i> <i>EGFR</i> <i>EIF4A2</i> <i>FOXL2</i> <i>FOXO2</i> <i>HIP1</i> <i>MYCN</i> <i>PLAG1</i> <i>RUNX1</i> <i>TAL1</i> <i>TRIP11</i> <i>ABL2</i>	<i>BRCA1</i> <i>TET2</i> <i>APC</i> <i>ATM</i> <i>ERCC4</i> <i>BRIP1</i> <i>VHL</i> <i>PMS2</i> <i>FANCD2</i> <i>FANCC1</i> <i>MLH1</i> <i>KLF6</i> <i>TSC1</i>

Los sitios de unión de miR-302c a la región 3'UTR del gen *AKT1* presentan evidencia de unión canónica (miRTarBase), ya que fueron demostrados experimentalmente por medio de un ensayo de Luciferasa (Cai, *et al.*, 2013). Se puede observar que el sitio predicho por TargetScan y el sitio demostrado experimentalmente no coinciden, esta interacción es un ejemplo de un falso positivo, ya que a pesar de encontrarse la secuencia complementaria para miR-302c, los sitios predichos con herramientas bioinformáticas se encuentran río arriba de la interacción probada experimentalmente (Figura 13).

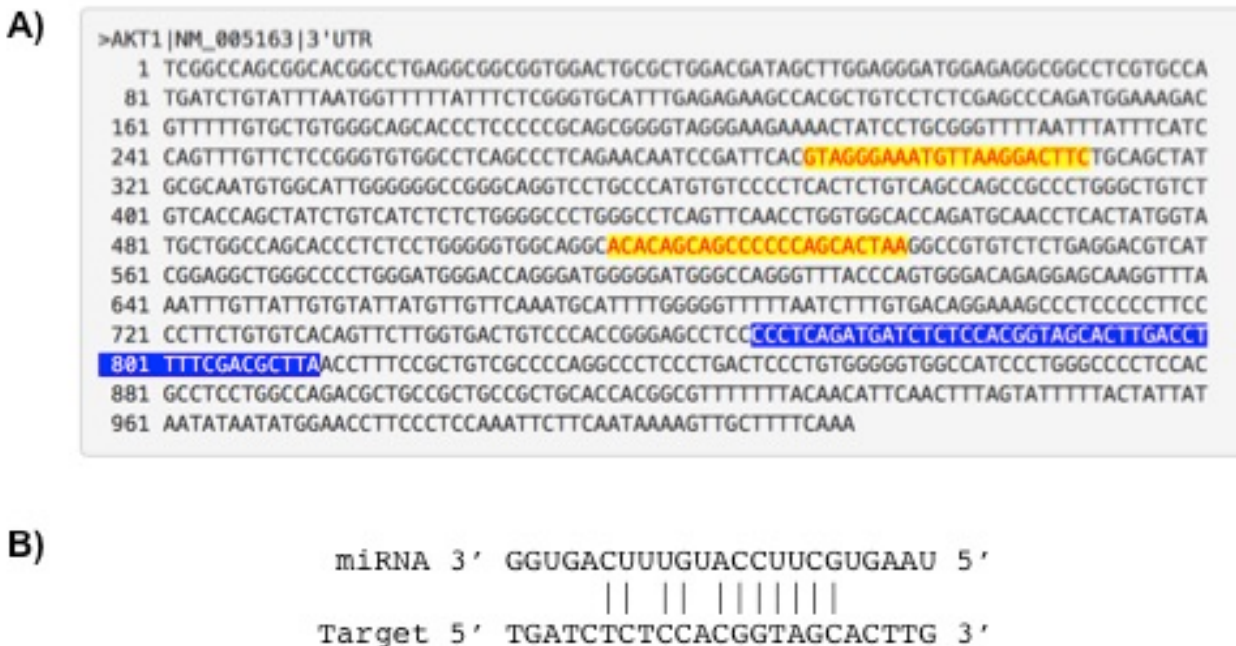


Figura 13. Sitios de unión de miR-302c en la región 3'UTR de *AKT1*. A) Región 3'UTR de *AKT1*. La anotación amarilla corresponde a los sitios predichos con TargetScan. La anotación azul corresponde al sitio experimental descrito por Cai, *et al.*, (2013). Obtenido de miRTarBase, (2015). B) Interacción de miR-302c con *AKT1* Obtenido de Cai, *et al.*, (2013).

2. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos que flanquearan la región 3'UTR de *AKT1*, se utilizó el software Primer 3, y se tomó en cuenta que la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido fuera cercana a 60°C, y no difiriera más de 3°C entre sí, para conferir mayor estabilidad en la unión al DNA molde. También se consideró que tuvieran un porcentaje de guanina y citosina no mayor a 60%. Para conocer la especificidad de los oligonucleótidos, se realizó un análisis con el algoritmo de Primer BLAST (NCBI).

Una vez conseguidas éstas características, se les agregaron sitios de restricción para las enzimas *SacI* y *XbaI*, añadiendo tres nucleótidos de anclaje en el extremo 5' para *SacI* y un nucleótido de anclaje en el extremo 5' para *XbaI*. Con el análisis Primer BLAST se obtuvo 100% de identidad para el RNA mensajero del gen *AKT1* en sus variantes 1) NM_005163.2, 2) NM_001014432.1, y 3) NM_001014443.1, antes de la adición de los sitios de restricción. El tamaño de amplicón predicho fue de **817 pb**. Los oligonucleótidos de secuenciación del vector pmiRGLO (Promega) se diseñaron flanqueando el sitio múltiple de clonación. El tamaño de amplicón predicho fue de **863 pb**. La lista de los oligonucleótidos se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para amplificar la región 3'UTR de *AKT1* y para secuenciar el vector pmiRGLO. Verde: Sitio de reconocimiento de *SacI*, Amarillo: Sitio de reconocimiento de *XbaI*.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Longitud	GC %	Tm
3'UTR-AKT1-Forward+ <i>SacI</i>	ACT GAGCTC GACGATAGCTTGGAGGGA	27	51.8	67.2
3'UTR-AKT1-Reverse+ <i>XbaI</i>	GTCTAGA ACCCCCACAGGGAGTCA	24	58.3	64.99
pmiRGLOsequencing Forward	GCAAGATCGCCGTGTAATTC	20	50.0	54.5
pmiRGLOsequencing Reverse	GTTAGCAGCCGGATCAGCTT	20	55.0	57.0

3. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó por duplicado, los productos se resolvieron en un gel de agarosa al 2%, en el cual se observó la integridad del RNA y las bandas correspondientes a las subunidades del RNA ribosomal 28S y 18S, 5.8S y RNAs de transferencia (Figura 14).

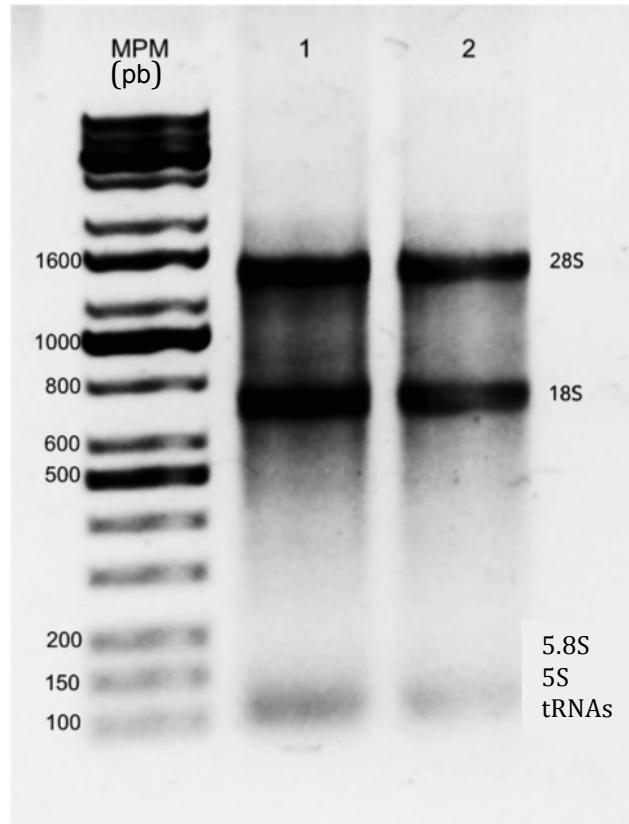


Figura 14. Extracción de RNA a partir de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Gel de agarosa 2.0%. En los carriles 1 y 2 se observan las bandas de rRNA 28S, 18S, 5S y tRNAs.

4. Amplificación de la secuencia de la región 3'UTR del gen *AKT1*

Se utilizaron los oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar la región 3'UTR del gen *AKT1* usando cDNA como sustrato molde. El producto obtenido no fue único ya que observaron varios amplicones más pequeños (Figura 15 A), por lo tanto se realizó una purificación por columna del producto de PCR cortando la banda, recuperando un total de 57.5 ng y un producto único de 800-900 pb (Figura 15 B).

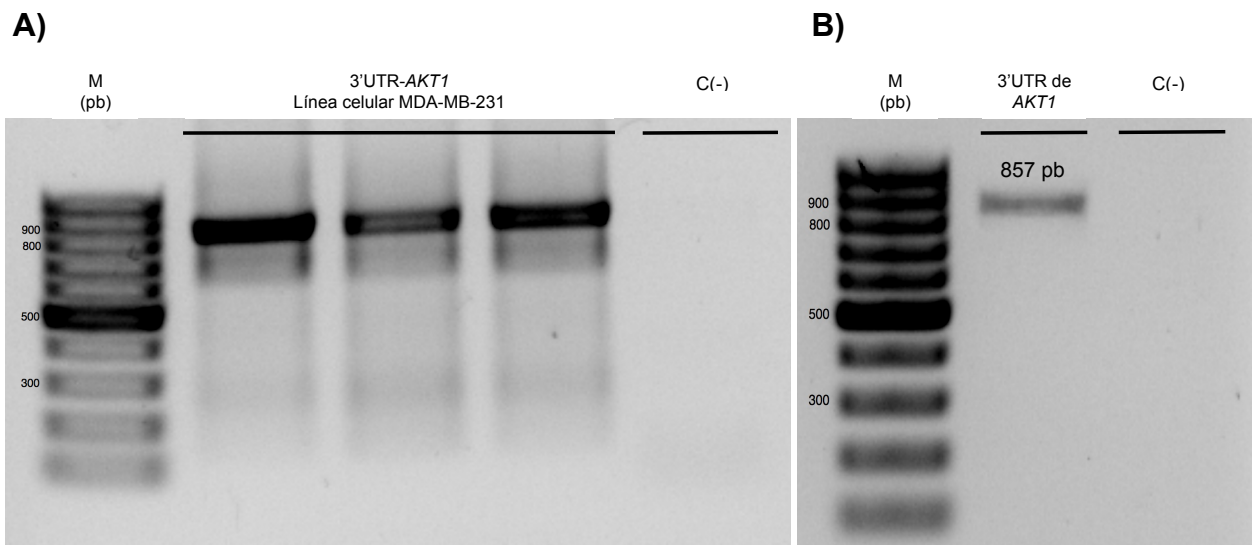


Figura 15. Gel de agarosa 1%. A) Amplificación de la región 3'UTR de *AKT1*, carril 1-3: productos obtenidos a partir de cDNA de MDA-MB-231, carril 4: control negativo de la reacción agua libre de nucleasas. B) Purificación de la región 3'UTR del gen *AKT1*, carril 1: producto específico purificado, carril 2: control negativo agua libre de nucleasas.

5. Clonación de la región 3'UTR en el vector pJET1.2/blunt.

El amplicón purificado se ligó en el vector de clonación para productos de PCR pJET1.2/blunt, el cual contiene un gen de resistencia para ampicilina (Figura 16). Con las ligaciones (pJET-AKT1) se transformaron bacterias calcio-competentes *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron 18 clones aislados en un medio con 100 μ g/mL de ampicilina, las cuales se tamizaron con una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos de secuenciación de pJET forward y pJET reverse, que flanquean el sitio múltiple de clonación. Las clonas 11, 13, 15, 16 y 18 se consideraron positivas, ya que el tamaño del producto de amplificación coincide con el producto esperado de **937 pb** (Figura 17).

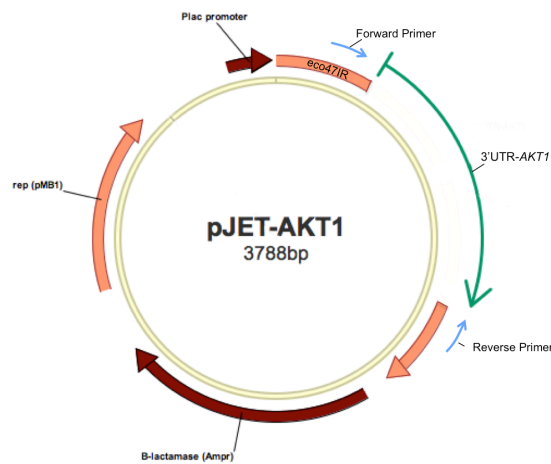


Figura 16. Mapa de la construcción del vector recombinante pJET-AKT1.

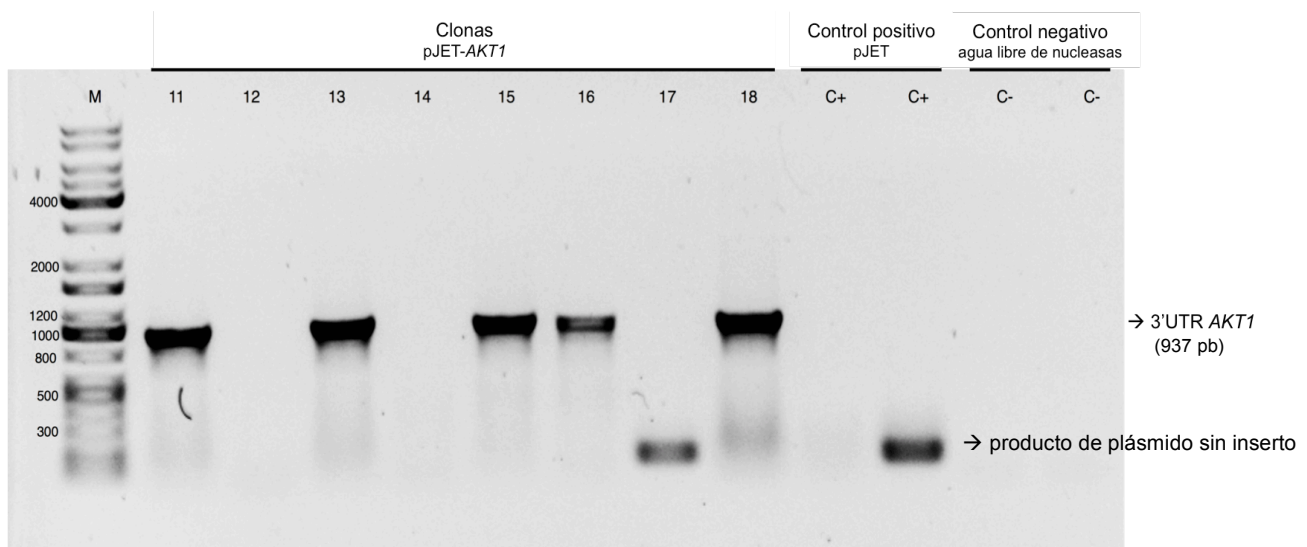


Figura 17. PCR de colonia del vector recombinante pJET-AKT1. Gel de agarosa 1%. Clonas 11-18. Control positivo pJET1.2/blunt no-recombinante. Control negativo agua libre de nucleasas.

6. Análisis de la secuencia obtenida de la secuenciación tipo Sanger

Para confirmar la identidad del fragmento clonado, se seleccionó la clona 13 de la construcción pJET-AKT1. La secuencia de la clona 13 tiene una identidad del 99.75% comparada contra la secuencia de referencia (NCBI). A pesar de presentar una mutación puntual de tipo transversión del nucleótido T>A, ésta transversión no afecta el marco de lectura ya que se encuentra en la región 3'UTR aunque podría afectar la estructura secundaria del RNA. El sitio de unión de miR-302c presentó 100% de identidad (Figura 18).

pJET-AKT1	TACTGAGCTCGACGATAGCTTGGAGGGA	TGGAGAGGCGGCCCTCGTGCCATGAACTGTATTTAATGGTTTTT
NCBI	GACTGCGCTGGACGATAGCTTGGAGGGATGGAGAGGCGGCCCTCGTGCCATGATCTGTATTTAATGGTTTTT	*****
pJET-AKT1	ATTTCTCGGGTGCATTTGAGAGAAGCCACGCTGTCCCTCGAGCCCAGATGGAAAGACGTTTTTGTGCTGT	ATTTCTCGGGTGCATTTGAGAGAAGCCACGCTGTCCCTCGAGCCCAGATGGAAAGACGTTTTTGTGCTGT
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	GGGCAGCACCTCCCCGAGCGGGGTAGGGAAGAAAATATCCTGCGGGTTTAAATTTATTCATCCAGT	GGGCAGCACCTCCCCGAGCGGGGTAGGGAAGAAAATATCCTGCGGGTTTAAATTTATTCATCCAGT
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	TTGTTCTCCGGGTGTGGCCTCAGCCCTCAGAACAATCCGATTACAGTAGGAAATGTTAAGGACTTCTGCA	TTGTTCTCCGGGTGTGGCCTCAGCCCTCAGAACAATCCGATTACAGTAGGAAATGTTAAGGACTTCTGCA
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	GCTATGCGCAATGTGGCATTGGGGGGCCGGCAGGTCCTGCCATGTGTCCCTCACTCTGTGAGCCAGCC	GCTATGCGCAATGTGGCATTGGGGGGCCGGCAGGTCCTGCCATGTGTCCCTCACTCTGTGAGCCAGCC
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	GCCCTGGGCTGTCTGTACAGCTATCTGTATCTCTCTGGGGCCCTGGGCCTCAGTTCAACCTGGTGGCA	GCCCTGGGCTGTCTGTACAGCTATCTGTATCTCTCTGGGGCCCTGGGCCTCAGTTCAACCTGGTGGCA
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	CCAGATGCAACCTCACTATGGTATGCTGGCCAGCACCTCTCCTGGGGGTGGCAGGCACACAGCAGCCCC	CCAGATGCAACCTCACTATGGTATGCTGGCCAGCACCTCTCCTGGGGGTGGCAGGCACACAGCAGCCCC
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	CAGCACTAAGGCCGTGTCTCTGAGGACGTATCGGAGGCTGGGCCCTGGGATGGGACCAGGGATGGGGGA	CAGCACTAAGGCCGTGTCTCTGAGGACGTATCGGAGGCTGGGCCCTGGGATGGGACCAGGGATGGGGGA
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	TGGGCCAGGGTTTACCCAGTGGGACAGAGGCAAGGTTAAATTTGTTATTGTGTATTATGTTGTTCAAA	TGGGCCAGGGTTTACCCAGTGGGACAGAGGCAAGGTTAAATTTGTTATTGTGTATTATGTTGTTCAAA
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	TGCATTTTGGGGTTTTTAATCTTTGTGACAGGAAAGCCCTCCCCCTCCCCTTCTGTGTACAGTTCTTG	TGCATTTTGGGGTTTTTAATCTTTGTGACAGGAAAGCCCTCCCCCTCCCCTTCTGTGTACAGTTCTTG
NCBI	*****	*****
pJET-AKT1	GTGACTGTCCCACGGGAGCCTCC	CCCTCAGATGATCTCTCCACGGTAGCACTTGACCTTTTCGACGCTTA
NCBI	GTGACTGTCCCACGGGAGCCTCCCCCTCAGATGATCTCTCCACGGTAGCACTTGACCTTTTCGACGCTTA	*****
pJET-AKT1	ACCTTTCGCTGTGCCCCAGCCCTCC	TGACTCCCTGGTGGGGGGTCTAGAC
NCBI	ACCTTTCGCTGTGCCCCAGCCCTCCCTGACTCCCTGTGGGGGTGGCCATCCCTGGGCCCTCCAGCC	*****

Figura 18. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de referencia (NCBI) contra secuencia obtenida de la secuenciación Sanger (pJET-AKT1). Celeste: oligonucleótidos de amplificación. Verde: Sitio de restricción de *SacI*. Amarillo: sitio de restricción de *XbaI*. Azul: sitio de unión de miR-302c 3'UTR de *AKT1*.

7. Subclonación de la región 3'UTR en el vector pmiRGLO

El fragmento 3'UTR de *AKT1* digerido se ligó con el vector pmiRGLO digerido con las enzimas *SacI* y *XbaI*. El vector de expresión pmiRGLO (Promega) contiene un gen de resistencia para ampicilina (Figura 19). Con la ligación (pmiR-*AKT1*) se transformaron bacterias calcio-competentes de *E. coli* DH5 α ; se obtuvieron 6 clonas aisladas en un medio con 100 μ g/mL de ampicilina, las cuales se tamizaron con una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos de secuenciación pmiRGLO forward y pmiRGLO reverse que flanquean el sitio múltiple de clonación. Las clonas 1-6 se consideraron positivas, ya que su producto de amplificación coincide con el producto esperado de **863 pb** (Figura 20).

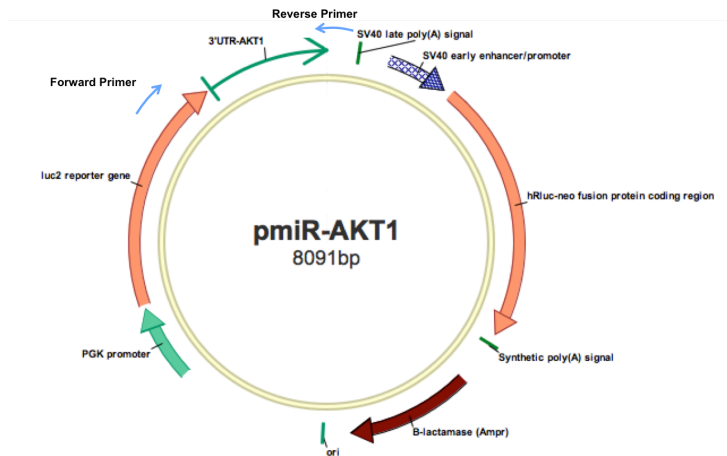


Figura 19. Mapa de la construcción del vector recombinante pmiR-*AKT1*

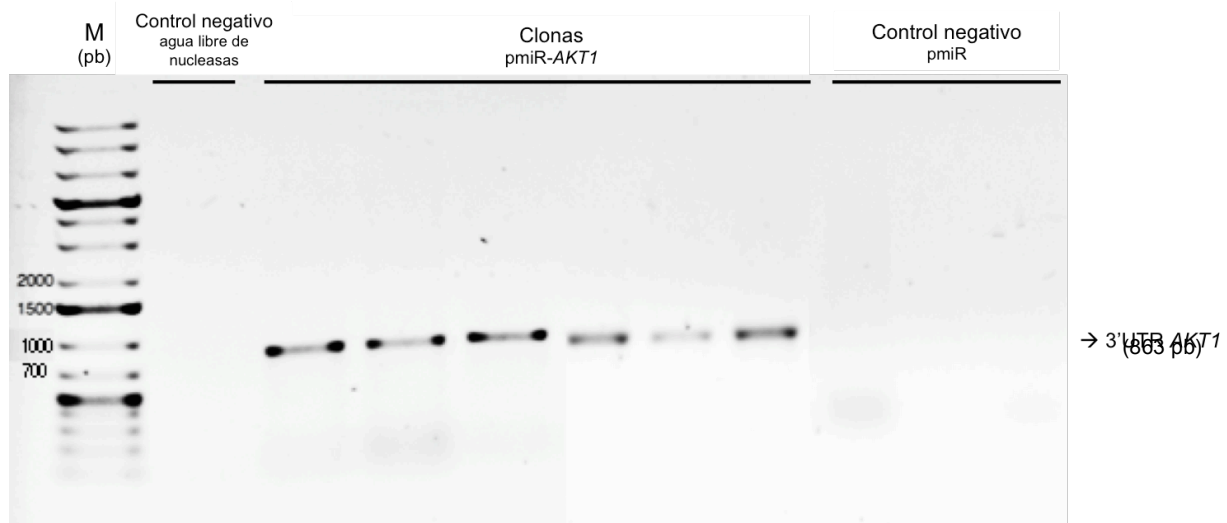
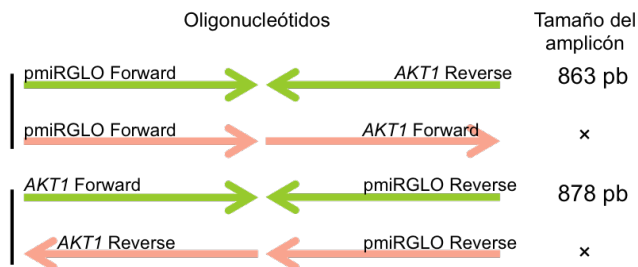


Figura 20. PCR de colonia del vector recombinante pmiR-*AKT1*. Gel de agarosa 1%. Clonas 1-3 y 10-12. Control negativo pmiRGLO no-recombinante. Control negativo agua libre de nucleasas.

Para verificar la orientación del inserto 3'UTR-AKT1 se realizó una PCR usando como molde el DNA plasmídico de la clona 3. Se utilizaron los oligonucleótidos pmiRGLO Forward y 3'UTR-AKT1-Forward que permiten la síntesis *in vitro* de DNA de la cadena sentido del vector y del inserto respectivamente, y los oligonucleótidos pmiRGLO Reverse y 3'UTR-AKT1-Reverse que permiten la síntesis *in vitro* de la cadena antisentido del vector y del inserto respectivamente (Figura 21 A).

Mediante este ensayo se confirmó que la clona 3 estaba en orientación correcta, ya que únicamente con las combinaciones de oligonucleótidos pmiRGLO Forward + 3'UTR-AKT1 Reverse y 3'UTR-AKT1 Forward + pmiRGLO Reverse hubo una amplificación. Se observan las bandas de ~870 pb que corresponden al tamaño esperado para ambas amplificaciones, mientras que para las combinaciones pmiRGLO Forward + 3'UTR-AKT1 Forward y 3'UTR-AKT1 Reverse + pmiRGLO Reverse no hubo una amplificación. De ésta forma podemos afirmar que la clona 3 se encuentra en orientación apropiada (Figura 21 B).

A)



B)

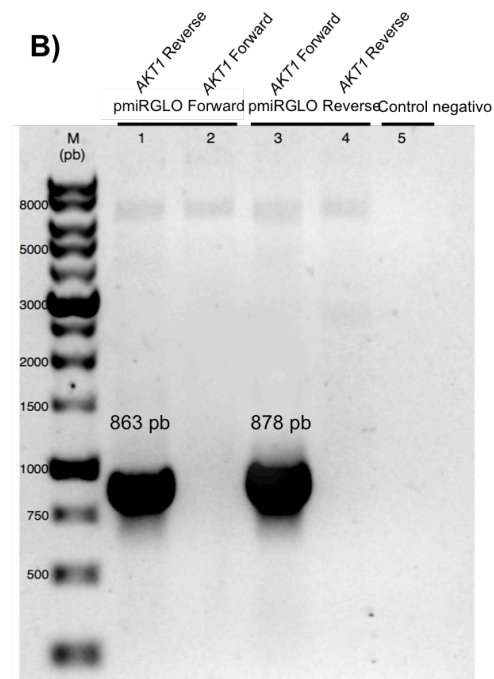


Figura 21. Análisis de la orientación correcta de la construcción pmiRGLO-AKT. A) Esquema del modelo teórico de amplificación de los productos de la PCR de colonia. B) PCR punto final de la clona 3 del vector recombinante pmiR-AKT1. Gel de agarosa 1%. Carril 1) pmiRGLO Forward + 3'UTR-AKT1 Reverse, carril 2) pmiRGLO Forward + 3'UTR-AKT1 Forward, carril 3) 3'UTR-AKT1 Forward + pmiRGLO Reverse, carril 4) 3'UTR-AKT1 Reverse + pmiRGLO Reverse. Carril 5) Control negativo agua libre de nucleasas.

8. Análisis de la secuencia obtenida de la secuenciación tipo Sanger

Para confirmar la identidad del fragmento clonado, se seleccionó la clona 3 de la construcción pmiR-AKT1. La secuencia de la clona 3 tiene una identidad del 100% comparada contra la secuencia de la referencia de la clona parental (NCBI). El sitio de unión de miR-302c de la clona 3 presenta 100% de identidad (Figura 22).

pmiR-AKT1 NCBI	AGATGCTTGGAGGGATGGAGAGGCGGCCTCGTGCCATGATCTGTATTTAATGGTTTTTATTTCTCGGGTGCATTATTT GATAGCTTGGAGGGATGGAGAGGCGGCCTCGTGCCATGAACTGTATTTAATGGTTTTTATTTCTCGGGTGCATTATTT *****
pmiR-AKT1 NCBI	GAGAGAAGCCACGCTGTCTCTCGAGCCAGATGGAAGACGTTTTTGTGCTGTGGGCAGCACCTCCCCGCAGCGGG GAGAGAAGCCACGCTGTCTCTCGAGCCAGATGGAAGACGTTTTTGTGCTGTGGGCAGCACCTCCCCGCAGCGGG *****
pmiR-AKT1 NCBI	GTAGGAAGAAAACCTATCCTGCGGGTTTTAATTTATTTTCATCCAGTTTGTCTCCGGGTGTGGCCTCAGCCCTCAGAAC GTAGGAAGAAAACCTATCCTGCGGGTTTTAATTTATTTTCATCCAGTTTGTCTCCGGGTGTGGCCTCAGCCCTCAGAAC *****
pmiR-AKT1 NCBI	AATCCGATTACGTAGGGAATGTTAAGGACTTCTGCAGCTATGCGCAATGTGGCATTGGGGGGCCGGGCAGGTCTCTGC AATCCGATTACGTAGGGAATGTTAAGGACTTCTGCAGCTATGCGCAATGTGGCATTGGGGGGCCGGGCAGGTCTCTGC *****
pmiR-AKT1 NCBI	CCATGTGTCCCCTCACTCTGTTCAGCCAGCCGCTGGGTGTCTGTTCACCAGCTATCTGTTCATCTCTCTGGGGCCCTGG CCATGTGTCCCCTCACTCTGTTCAGCCAGCCGCTGGGTGTCTGTTCACCAGCTATCTGTTCATCTCTCTGGGGCCCTGG *****
pmiR-AKT1 NCBI	GCCTCAGTTCAACCTGGTGGCACCAGATGCAACCTCACTATGGTATGCTGGCCAGCACCTCTCTCGGGGTGGCAGGC GCCTCAGTTCAACCTGGTGGCACCAGATGCAACCTCACTATGGTATGCTGGCCAGCACCTCTCTCGGGGTGGCAGGC *****
pmiR-AKT1 NCBI	ACACAGCAGCCCCCAGCACTAAGGCCGTGTCTCTGAGGACGTATCGGAGGCTGGGCCCTGGGATGGGACCAGGGAT ACACAGCAGCCCCCAGCACTAAGGCCGTGTCTCTGAGGACGTATCGGAGGCTGGGCCCTGGGATGGGACCAGGGAT *****
pmiR-AKT1 NCBI	GGGGGATGGGCCAGGGTTTACCCAGTGGGACAGAGGAGCAAGGTTTAAATTTGTTATTTGTGTATTATGTTGTTCAAATG GGGGGATGGGCCAGGGTTTACCCAGTGGGACAGAGGAGCAAGGTTTAAATTTGTTATTTGTGTATTATGTTGTTCAAATG *****
pmiR-AKT1 NCBI	CATTTTGGGGTTTTTAAATCTTTGTGACAGGAAAGCCCTCCCCCTCCCTTCTGTGTACAGTTCTTGGTGACTGTCC CATTTTGGGGTTTTTAAATCTTTGTGACAGGAAAGCCCTCCCCCTCCCTTCTGTGTACAGTTCTTGGTGACTGTCC *****
pmiR-AKT1 NCBI	CACCGGAGCCTCC CCCTCAGATGATCTCTCCACGGTAGCACTTGACCTTTTCGACGCTTA ACCTTTCGGTGTGCGCC CACCGGAGCCTCCCCCTCAGATGATCTCTCCACGGTAGCACTTGACCTTTTCGACGCTTAACCTTTCGGTGTGCGCC *****
pmiR-AKT1 NCBI	CAGTCTCCCTGACTCCCTGTGGGGCTCTAGAGTCGACTGCAGGCATGCA AGCTGATCCGGGCTGCC CAGTCTCCCTGACTCCCTGTGGGGCTCTAGAGTCGACTGCAGGCATGCAAGCTGATCCGGGCTGC- *****

Figura 22. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de referencia (NCBI) contra la secuencia obtenida de la secuenciación Sanger (pmiR-AKT1). Verde: oligonucleótidos de secuenciación pmiRGLO. Azul: sitio de unión de miR-302c:3'UTR de AKT1.

9. Estandarización de la transfección

Las condiciones para la transfección fueron estandarizadas para la línea celular MDA-MB-231, usando el vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech), el cual tiene un gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Se determinó que las condiciones óptimas para una eficiencia de transfección de ~40% son: 1.2 μL de lipofectamina, 600 ng de plásmido y 24 h de incubación post-transfección para 160,000 células en una superficie de 1 cm^2 . Éstas condiciones se seleccionaron bajo los criterios: i) que la cantidad de Lipofectamina no afectara la viabilidad en comparación al control de células, ii) que la cantidad de plásmido transfectado resultara en un eficiencia comparable a mayores cantidades, y iii) el tiempo de incubación post-transfección resultara en la mayor expresión de GFP. En la figura 21 se muestra un experimento representativo usando 1.2 μL de Lipofectamina y 600 ng de plásmido, condición que resultó en la más alta eficiencia de transfección y menor daño celular (Figura 23).

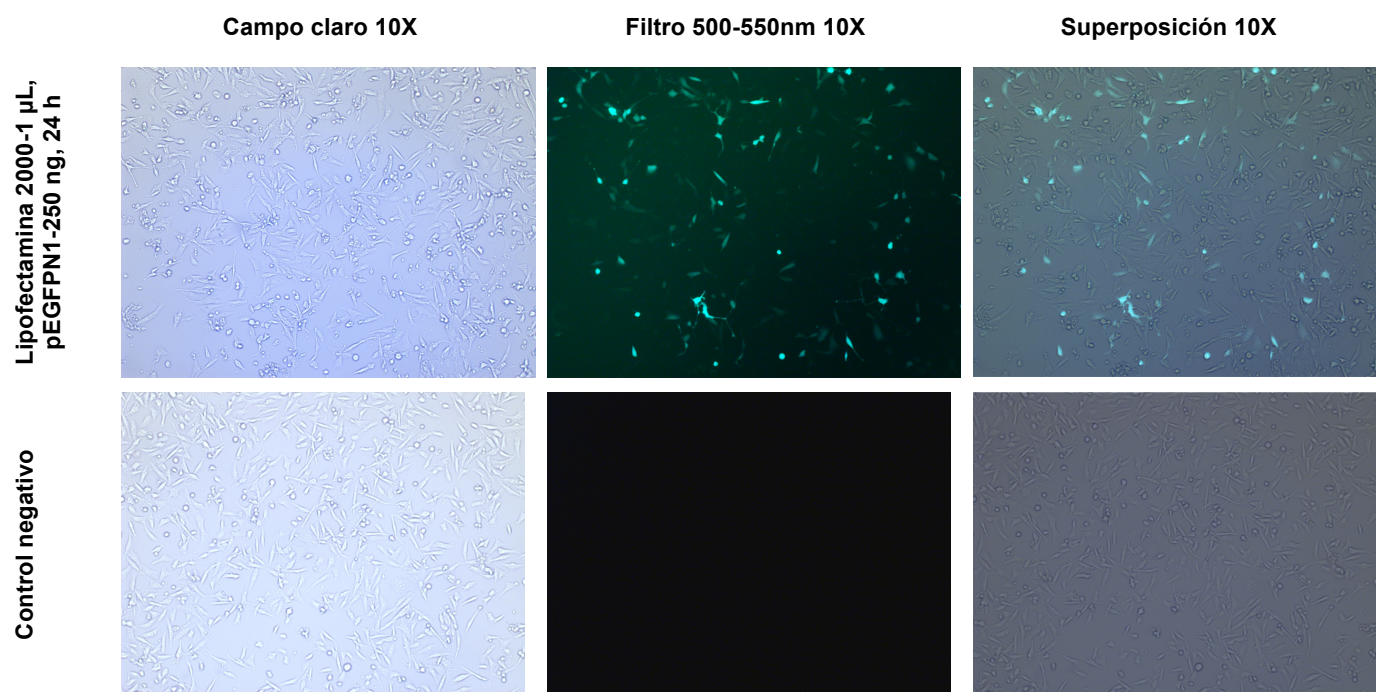


Figura 23. Transfección del plásmido pEGFP-N1 en células MDA-MB-231 bajo un microscopio de fluorescencia. Control negativo: células solo expuestas a Lipofectamina 2000. Aumento: 10X.

10. Ensayo de la luciferasa

Para evaluar la regulación post-transcripcional ejercida por miR-302c-B insertamos la región 3'UTR de *AKT1* río abajo del gen *Luc*. Se midió el efecto de miR-302c-B sobre la traducción y actividad enzimática de la proteína reportera luciferasa. Se usaron como controles negativos cel-miR-39-B y miR-146-B los cuales no tienen sitios complementarios dentro de la 3'UTR de *AKT1* y la actividad luciferasa de cada tratamiento fue normalizada contra el vector pmiRGLO vacío respectivo. Se observó que miR-302c-B causó una reducción significativa ($p < 0.01$), del 42%, sobre la expresión de enzima luciferasa en el vector que contenía sitios blanco para este microRNA. Los vectores que no contenían sitios de unión para miR-302c-B (pmiRGLO) no tuvieron represión significativa. De igual manera, miR-146-B y miR-39-B no ejercieron regulación negativa sobre luciferasa (Figura 24). De esta manera se confirmó que la inclusión de la biotina en el extremo 3' de miR-302c no afecta su actividad.

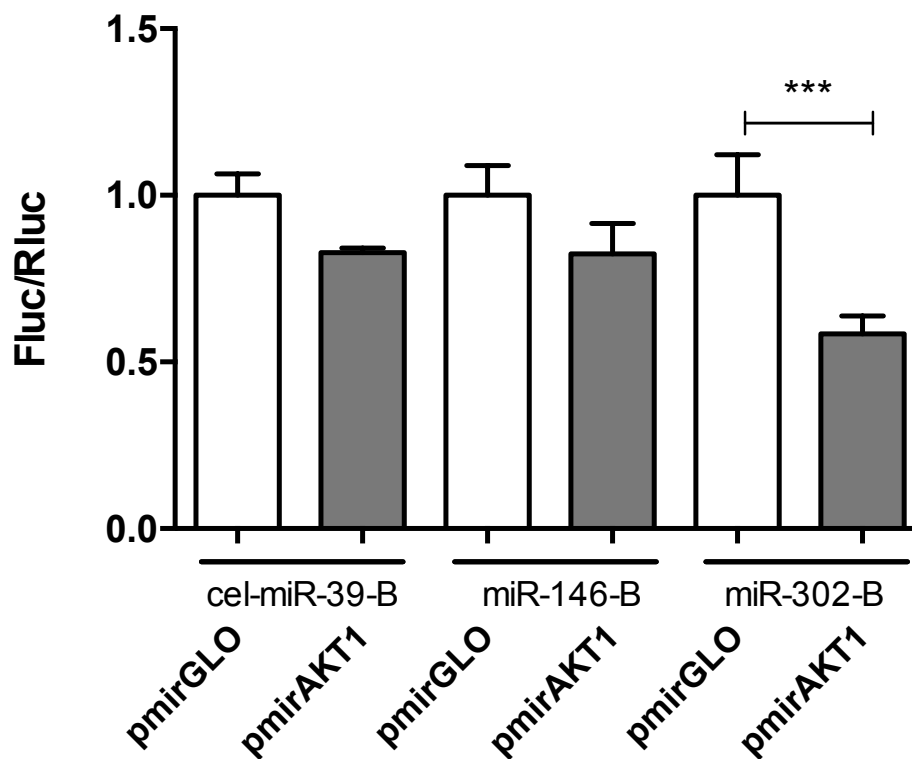


Figura 24. Análisis de la actividad funcional de miR-302c-B. Las barras color verde corresponden a miR-302c. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados biológicos. Eje X: tratamientos. Eje Y: [unidades relativas de luminiscencia de luciérnaga / unidades relativas de luminiscencia de *Renilla*]*1000. Los datos son presentados como la media \pm SD y analizados por ANOVA de una vía. *** $p < 0.001$.

VIII. DISCUSIÓN

Los miRNAs son importantes reguladores de la expresión genética, actúan reprimiendo o mejorando la traducción del mRNA al que se unen por medio de hibridación tipo Watson y Crick. Para entender las funciones de un miRNA en particular es esencial conocer sus blancos. Las herramientas de predicción bioinformáticas de los mRNA blanco regulados por miRNAs usan algoritmos que únicamente consideran a la región semilla y la región 3'UTR del mRNA para realizar la predicción (Grimson, 2007; Agarwal, 2015; Krek, 2005), y por esta razón son incapaces de predecir interacciones no-canónicas. Las herramientas experimentales de detección de interacciones miRNA:mRNA han demostrado generar un panorama más completo de las redes de interacción de los miRNAs (Tan, *et al.*, 2014).

En este trabajo realizamos (i) la clonación del fragmento 3'UTR del transcrito *AKT1* en el vector pJET1.2/blunt para amplificar dicho producto; (ii) la subclonación del fragmento 3'UTR del gen *AKT1* en el vector de expresión del gen reportero de la luciferasa pmiRGLO para evaluar posteriormente con un ensayo de luciferasa la unión de miR-302c-B; (iii) la estandarización de las condiciones de transfección óptimas para la línea celular MDA-MB-231 con el vector pEGFP-N1, el cual contiene un gen que codifica para la proteína verde fluorescente y que permite evaluar la eficiencia de transfección; y (iv) el ensayo del gen reportero de la luciferasa.

La aproximación experimental utilizada en el presente trabajo para clonar el fragmento de interés (3'UTR de *AKT1*) fue por medio del uso de plásmidos. Los plásmidos son moléculas circulares de DNA que son escindidas en sitios específicos por enzimas de restricción para linealizarlas, y posteriormente ligarlas a un fragmento a estudiar que contenga extremos compatibles con el plásmido digerido. Los productos de ligación o vectores recombinantes son usados después para transformar bacterias de *E. coli* y replicar la molécula de interés. El proceso de transformación bacteriana permite introducir material genético exógeno a una bacteria y aprovechar la maquinaria de replicación de ésta para generar millones de copias del plásmido. Para poder seleccionar las bacterias que han incorporado plásmidos, éste debe contener un gen que codifique para la resistencia a algún antibiótico y así la célula hospedera adquiera la capacidad de sobrevivir y proliferar en un ambiente con antibiótico. El

plásmido utilizado en este trabajo contiene el gen de resistencia para ampicilina que codifica para la proteína β -lactamasa; cuando ésta se expresa, la bacteria es capaz de inactivar ampicilina y crecer (Griffiths et al., 1999). Para realizar la subclonación es necesario obtener al menos una clona con el inserto deseado en dirección correcta, en el presente trabajo se obtuvieron clonas suficientes con el inserto en dirección correcta, y con un 99.75% y 99.76% de identidad para pJET-AKT1 y pmiR-AKT1 respectivamente. Ninguna de las construcciones presentaron mutaciones en los sitios de unión a miR-302c, la razón por la que pueden presentarse mutaciones es debido a errores de la polimerasa mientras ocurre la amplificación. Además el inserto del vector recombinante pmiR-AKT1 se encuentra en orientación correcta 5'-3', esto es fundamental, ya que de haberse clonado en dirección inversa, el sitio de reconocimiento del miRNA estaría en sentido 3'-5' y por lo tanto el reconocimiento del miRNA sería incorrecto (Bartel, 2009).

Para introducir el plásmido recombinante pmiR-AKT1 a células adherentes en cultivo de CMTN se utilizó el método de transfección transitoria mediada por lípidos catiónicos con el reactivo Lipofectamina 2000. El principio de la técnica es la interacción de las cargas negativas del DNA o RNA (grupos fosfato) con la superficie cargada positivamente de los liposomas. Éstas cargas positivas median la interacción con la membrana de las células blanco, permitiendo la fusión del liposoma con la membrana celular e insertando el complejo por endocitosis (Thermo Scientific, 2017). Ésta técnica requiere que se determine la cantidad óptima de DNA en combinación con la concentración del lípido catiónico (lipofectamina), además se debe tener en cuenta que las concentraciones elevadas de lipofectamina aumentan la toxicidad del medio. En éste trabajo se obtuvo una eficiencia de transfección aceptable (~40%), con respecto a la eficiencia reportada para el reactivo Lipofectamina 2000 (48-54%), atribuimos este resultado a las condiciones de cultivo celular, y a los tiempos de incubación de los complejos Lipofectamina:DNA. Se ha reportado que las condiciones óptimas de confluencia para trabajar son 60-80%, si las células llegan a confluencias mayores, puede existir inhibición de crecimiento por contacto celular. (Dalby et al., 2004). En cuanto a las eficiencias de transfección, es difícil obtener un 100% de células transfectadas, y esto depende de el reactivo de transfección utilizado, el cual debe tener la característica de ser altamente eficiente en el transporte del ácido nucleico a la ubicación

celular apropiada para su expresión (al núcleo para DNA, y citoplasma para RNA), en donde podrá utilizar la maquinaria endógena de duplicación, transcripción y en el citoplasma de traducción (Iglesias-Artola, *et al.*, 2015).

Elegimos el ensayo de actividad relativa de la luciferasa para evaluar la interacción de miR-302c-B con un mensajero blanco ya probado anteriormente (Cai, *et al.*, 2013), éste ensayo es considerado actualmente el estándar para validar interacciones miRNA:mRNA (Martin *et al.*, 2014). Las luciferasas son enzimas catalizadoras de la reacción con productos oxiluciferina, AMP, CO₂ y luz. Éstas enzimas son ejemplo de la evolución paralela, ya que tienen una función similar, pero tienen estructuras proteicas diferentes y por lo tanto requerimientos de sustrato diferentes. Éstas diferencias hacen posible discriminar selectivamente entre sus reacciones de bioluminiscencia (Sherf, *et al.*, 1996). En ingeniería genética el gen *Luc*, fue propuesto como un reportero muy versátil porque la actividad de la luciferasa puede reportar modificaciones en los niveles de la proteína, así como el efecto de moléculas que afecten la estructura de la enzima o la actividad transcripcional y post-transcripcional de su gen. La sensibilidad de ésta tecnología es de mínimo 2000 moléculas por reacción (Wood, 1991).

La actividad represora de miR-302c puede ser afectada por la adición de la biotina en su extremo 3'. La biotilación de miRNAs fue propuesta para capturar las interacciones miRNA:mRNA experimentalmente por medio de perlas de estreptavidina, haciendo uso de la unión fuerte que existe entre éstas dos moléculas (Orom *et al.*, 2007). Además la biotina tiene la característica de ser una molécula pequeña de tamaño similar a una base nitrogenada, como las presentes en el DNA y RNA, por lo que es poco probable que genere choques estéricos con el complejo miRISC; lo cual sugiere que su incorporación en el miRNA no afecta la funcionalidad anteriormente probada (Orom *et al.*, 2008).

Por esta razón se evaluó la regulación a nivel post-transcripcional ejercida por miR-302c-B sobre un transcrito quimérico de *Luc-3'UTR AKT1* utilizamos el vector de expresión pmiRGLO (Promega) el cual ésta diseñado para insertar en el sitio múltiple de clonación fragmentos susceptibles a regulación por miRNAs. El sitio múltiple de clonación de pmiRGLO se encuentra río abajo del gen *Luc* y río arriba de la señal de poliadenilación.

De esta manera se transcribe la estructura de un gen completo, sin embargo en caso de presentar unión del miRNA, éste transcrito puede ser degradado o llevado a los cuerpos de procesamiento dependiente del tipo de interacción con el miRNA (Pasquinelli, 2012). En el caso de la unión de miR-302c:3'UTR-*AKT1* la unión que se presenta es canónica, con interacción perfecta de los nucleótidos de la región semilla compensada con cuatro apareamientos de los nucleótidos 10, 11, 13 y 14. Se trata de una unión muy estable y se ha reportado que éste tipo de interacciones son responsables de la represión de la traducción (Grimson *et al.*, 2007).

Como era esperado, se confirmó de manera funcional que la biotina no interfiere con la unión de miR-302c-B a la región 3'UTR de *AKT1*. Los resultados mostraron que miR-302c-B a pesar de su modificación en el extremo 3', se une a su mRNA blanco correctamente. Dentro del miRISC, las flexiones estructurales tanto de Ago2 como del dúplex miRNA:mRNA, permiten interacciones canónicas y no-canónicas además de la posibilidad de albergar dúplex largos. Se consideran largos cuando son superiores a 16 pb, como es el caso de la interacción evaluada en el presente trabajo (Fabian y Sonenberg, 2012), las bases que no interactúan con alguno de los dominios PAZ, PIWI o Mid de Ago2 se extienden o protruyen hacia afuera del canal de unión de RNA, a regiones expuestas para evitar choques estéricos (Gan *et al.*, 2015).

Lo anterior es consistente con que la modificación química del microRNA biotinilado no obstruye la interacción miR-302c-B con su mensajero blanco (Figura 25). Además se trata de una interacción tipo semilla perfecta, para lo que se ha reportado que es menos probable las distorsiones estructurales en las regiones semilla y del extremo 3' del mRNA causen impedimentos estéricos con la estructura de Ago2 en comparación con aquellas, en la región central del dúplex (nt 10-14; Gan, *et al.*, 2015).

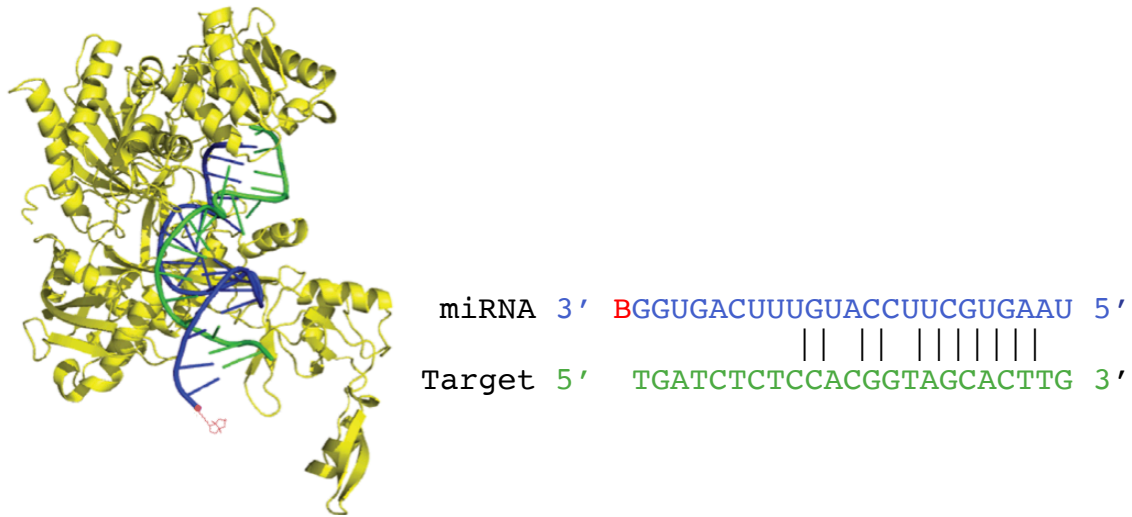


Figura 25. Modelo de la estructura del complejo miRISC de *Homo sapiens*. Modificado de Gan *et al.*, 2015. La estructura no presenta choques estéricos ya que la biotina sobresale del canal de interacción de Ago2. Se muestran las interacciones con los dúplex miRNA:mRNA. Color azul: miR-302c-B. Color verde: 3'UTR de *AKT1*. Color rojo: biotina.

La captura por afinidad directa de interacciones miRNA:mRNA por medio de biotina-estreptavidina permite la validación funcional de miRNAs predichos con herramientas bioinformáticas, o bien el reconocimiento e identificación de nuevos blancos no identificados con herramientas bioinformáticas. Una desventaja es que la técnica depende completamente de la transfección y su eficiencia, es decir, no es posible hasta ahora realizarlo en un modelo *in vivo*. Por otro lado, las ventajas de este método son escalables a cualquier línea celular en cultivo, ya sea de cualquier tipo de cáncer, como de otro tipo de linaje celular. Esto permitiría conocer las redes de interacción de miRNAs particulares en cualquier patología a nivel molecular y relacionarlos causalmente a ésta. Este trabajo generó las bases para la realización de experimentos de captura por afinidad directa en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama.

IX. CONCLUSIONES

- Se clonó exitosamente la región 3'UTR de AKT1 en el vector pmiRGLO en orientación correcta a partir de RNA extraído de la línea celular MDA-MB-231.
- Se estandarizaron las condiciones óptimas de transfección para la línea celular MDA-MB-231 y con base en estas condiciones se cotransfectaron el vector recombinante pmiR-*AKT1* y el miR-302c-B.
- El ensayo del gen reportero de Luciferasa demostró que la funcionalidad del microRNA biotinilado no fue afectada por la modificación química en su extremo 3' en el modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, ya que como había sido reportado, se observó una represión de la expresión de la proteína Luciferasa del 42% regulada por la interacción de miR-302c con la región 3'UTR de *AKT1*.

X. LITERATURA CITADA

- Agarwal V, Bell GW, Nam J, Bartel DP. 2015. *Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs*. [<http://www.targetscan.org>] eLife. Consultado 5 febrero 2016.
- American Cancer Society. 2015. *Cancer Basics*. [<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/index>]. Consultado 24 enero 2016.
- Barroso-delJesus, A., Cristina R., Gema L., Gustavo J., Laura S., Gertrudis L., Alfredo B., Pablo M. 2008. *Embryonic Stem Cell-Specific miR302-367 Cluster: Human Gene Structure and Functional Characterization of Its Core Promoter*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6609-6619.
- Bartel, D. 2004. *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function*. *Cell Press*. 116, 281-297.
- Bartel, D. P., Wenwen F. 2015. The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Molecular Cell*. 60, 131-145.
- Beral, V. 2003. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet*. 362: 419-427.
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I., Sanders, M., Gianni, L. 2016. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature*. 13:674-690.
- Bonotto, M. *et al.* Measures of outcome in metastatic breast cancer: insights from a real-world scenario. *Oncologist* 19, 608–615 (2014).
- BreastCancerOrganization. 2014. What Is Breast Cancer. [http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc] Consultado 27 enero 2016.
- Cai N. A., Yi-Dong W., Peng-Sheng Z. 2013. *The microRNA-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1*. *RNA*. 19, 85-95.
- Calabrese, C. R., Almasy, R., Barton, S., Batey, M.A., Calvert, A.H., Canan-Koch, S., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., Kumpf, R.A., Kyle, S., Li, J., Maegley, K., Newell, D.R., Notarianni, E., Stratford, I.J., Skalizky, D., Thomas, H.D., Wang, L.Z., Webber, S.E., Williams, K.J., Curtin, N.J. 2004. *Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361*. *J. Natl Cancer Inst.* 96, 56–67.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Rai, K., Kipps, T., Bullrich, F., Croce, C. M. 2002. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *PNAS*. 99(24):15524-15529.
- Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., Gianni, L. 2010. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience. *Nature*. 7:683-692.
- Chi, S. W., Hannon, G., Darnell, R. 2012. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nature*. 19 (3):321-328.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1986. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.
- Coronado, G. D., Beasley, J. Livaudais, J. 2011. *Alcohol consumption and the risk of breast cancer*. *Salud Pública de México*. 53 (5), 440-447.
- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J., Wolmark, N., Bonnefoi, H., Cameron, D., a Gianni, L., Valagussa, P., Swain, S., Prowell, T., Loibl, S., Wickerham, L., Bogaerts, J., Baselga, J., Perou, C., Blumenthal, G., Blohmer, J., Mamounas, E., Bergh, J., Semiglazov, V., Justice, R., Eidtmann,

H., Paik, S., Piccart, M., Sridhara, R., Fasching, P., Slaets, L., Tang, S., von Minckwitz, G. 2014. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*. 384:164-172.

- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E., Tilkins, M., Price, P., Valentina, C. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 33: 95-103.
- DiStefano J.K. 2016. *Beyond the Protein-Coding Sequence: Noncoding RNAs in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes*. *Rev Diabet Stud*. 12(2).
- Fabian, M. R. y Sonenberg, N. 2012. *The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC*. *Nature*. 19(6):586-593.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Fiche, M., Delorenzi, M., Iggo, R. 2005. *Identification of molecular apocrine breast tumors by microarray analysis*. *Oncogene*. 24:4460-4671.
- Foulkes, W.D., Smith, I., Reis-Filho, J. 2010. Triple-negative Breast Cancer. *New Eng Jour Med*. 20: 1938- 1948.
- Friedman. R., Farh, K., Burge, C., Bartel. 2009. *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. *Genome Res*. 19(1):92-105.
- Gregory, R. I., Thimmalah P. C., Neil C., Ramin S. 2005. *Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing*. 123, 631-640.
- Griffiths-Jones S. 2004. *The microRNA registry*. *Nuc Acids Res*. 32, 109-111. [<http://www.mirbase.org>].
- Grimson, A., Kyle K., Wendy K., Philip G., Lee P., and David P. B. 2007. *MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing*. *Molecular Cell*. 27, 91-105.
- Guedj, M., Marisa, L., Reynies, A., Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., MacGrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., Bertheau, F., Bonnet, F., Martin, A.L., Feugeas, J. P., Bieche, I., Birnbaum, D., Bertucci, F., Thé, H., Theillet, C. 2012. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*. 31: 1196-1206.
- Gucalp, A., Tolaney, S., Isakoff, S.J., Ingle, J.N., Liu, M.C., Carey, L.A., Blackwell, K., Rugo, H., Nabell, L., Forero, A., Stearns, V., Doane, A.S., Danso, M., Moynahan, M.E., Momen, L.F., Gonzalez, J.M., Akhtar, A., Giri, D.D., Patil, S., Feigin, K.N., Hudis, C.A., Traina, T.A. 2013. *Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer*. *Clin. Cancer Res*. 19, 5505–5512.
- Ha, M., Narry K. 2014 *Regulation of microRNA biogenesis*. *Molecular Cell Biology*. 15, 509-524.
- Hamajima N, Hirose K, Tajima K *et al*. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2002. *Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. *Br J Cancer*, 87: 1234–1245.
- Hanahan, D., R. A. Weinberg. 2000. *The Hallmarks of Cancer*. *Cell Press*. 100, 57-70.
- Hanahan, D., R. A. Weinberg. 2011. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell Press*. 144, 646-674.
- Helwak, A., Grzegorz K., Tatiana D., David T. 2013. *Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH*

Reveals Frequent Noncanonical Binding. Cell Press. 153, 654-665.

- Hoeflich, K. P., O'Brien, C, Boyd, Z., Cavet, G., Guerrero, S., Jung, K., Januario, T., Savage, H., Punnoose, E., Truong, T., Zhou, W., Berry, L., Murray, L., Amler, L., Belvin, M., Friedman, L.S., Lackner, M.R. 2009. *In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal like breast cancer models. Clin. Cancer Res.* 15, 4649–4664.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. 2009. *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. Nature Protoc.* 4(1):44-57.
- Ibrahim, Y. H., García-García, C., Serra, V., He, L., Torres-Lockhart, K., Prat, A., Anton, P., Scaltri, M., Baselga, J. 2012. *PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA-proficient triplenegative breast cancer to PARP inhibition. Cancer Discov.* 2, 1036–1047 (2012).
- Iorio, M., V., Manuela, F., Chang-Gong L. Angelo V., Riccardo S., Silvia S., Eros M., Massimo P., Muller F., Manuela C., Sylvie M., Juan P. P., Anne R., Piero M., Stefano V., Italo N., George A. C., Patrizia Q., Massimo N., Carlo M. C. 2005. *MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. CancerRes.* 65, 7065-7070.
- Jin, C. Y., Jung, W., Koo, J. S. 2012. *The Clinicopathologic Features of Molecular Apocrine Breast Cancer. The Korean Journal of Pathology.* 46: 169-176.
- Kawamata, T., Hervé S. Yukihide T. 2009. *Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. Nature Structural and Molecular Biology.* 16(9) 953-960.
- Kennedy, R.D., Quinn, J., Mullan, P., Johnston, P.G., Harkin, D. 2004. The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 96, 1659-1668.
- Kim, N. V., Han, J., Siomi, M. C. 2009. *Biogenesis of small RNAs in animals. Nature.* 10:126-139.
- Krek, A., Grün D., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E. J., MacMenamin P. Da Piedade I., Gunsalus K. C. 2005. *Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet.* 37(5): 495-500.
- Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S.J., Tan, P. H., van de Vijver, M. 2012. *WHO Classification of Tumors of the Breast, Fourth Edition. IARC.*
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K. 2016. *Body Fatness and Cancer- Viewpoint of the IARC Working Group. The New England Journal of Medicine.* 375(8): 794-798.
- Leivonen, S-K., Makela R., Ostling P., Kohonen P., Haapa-Paananen P., Kleivi K., Enerly E., Aakula A., Hellstrom K., Sahlberg N., Kristensen V. N., Borresen-Dale A., Saviranta P., Perala M., Kallioniemi O. 2009. *Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. Oncogene.* 28, 3926-3936.
- Leonard, G. D., Swain, S. M. 2004. Ductal carcinoma *in situ*, complexities and challenges. *J Natl Cancer Inst.* 96 (12):906-920.
- Liang, Z., Bian X., Shim H. 2014. *Inhibition of breast cancer metastasis with microRNA-302a by downregulation of CXCR4 expression. Breast Cancer Res Treat.* 146, 535-542.
- Liang, Z., Jeffrey A., Donna G., John R., Hyunsuk S. 2013. *MicroRNA-302 Replacement Therapy Sensitizes Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation. Pharm Res.* 30, 1008-1016.
- Li, S., Donald C., Chun-Hung L., Shao-Yao Y., Davey L., David T. 2010. *Regulation of somatic cell*

reprogramming through inducible mir-302 expression. Nuc Acids Res. 1-12.

- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., Band, V. 2010. *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancer. Cancer Biology and Therapy.* 10(10).
- Martin, H., Shivangi W., Anita L. S., Keerthana, K., Katia N., Ehsan N., Alexander V., Sean M. G., Nicole C. 2014. *Imperfect centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. Genome Biology.* 15, 1-22.
- McGranahan, N., y Swanton, C. 2015. Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cnacer Evolution. *Cell Press.* 27: 15-26.
- McManus M. T. 2003. MicroRNAs and cancer. *Semin Cancer Biol.* 13(4).
- Millar, A. J., Short, S. R., Hiratsuka, K., Chua, N., Kay, Steve. 1992. Firefly Luciferase as a Reporter of Regulated Gene Expression in Higher Plants. *Plant Molecular Biology.* 10(4):324-337.
- Mongroo, P.S. y Rustgi, A.K. 2010. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 10:219-222.
- National Cancer Institute. 2015. *About cancer: cancer basics.* [<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>]. Consultado 27 de enero de 2015.
- National Institute of Biotechnology Information. 2016. *LARP7 Gene.* Consultado en [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51574>] el 19 de febrero de 2016.
- Nielsen, F. C., Hansen, T. O., Sorensen, C. S. 2016. *Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. Nature.* 16: 599-612
- Orom, U. A., Anders H. 2007. *Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs. Methods.*43 (162).
- Orom, U. A., Finn C. N., Anders H. 2008. *MicroRNA-10a Binds the 5' UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. Cell Press.* 30, 460-471.
- Parsa, Y., Mirmalek, S. A., Kani, F. E., Aidun, A., Salimi-Tatabaee, S. A., Yadollah-Damavandi, S., Jangholi, E., Parsa, T., Shahverdi, E. 2016. *A review of the clinical implications of breast cancer biology. Ephysician.* 8 (5).
- Pasquinelli, A. 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature.* 13: 271-282.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B. Van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A., Brown, P. O., Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 406:747-752
- Reczko, M., Maragkakis M., Alexiou P., Papadopoulos G. L., Hatzigeorgiou A. G. 2012.
- Reis- Filho, J. S., Pusztao, L. 2011. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *The Lancet.* 378:1812-1823.
- Rozhok, A., DeGregory, J. 2015. *Toward an evolutionary model of cancer: Considering the mechanisms tha govern the fate of somatic mutations. PNAS.*112(29):8914-8921.

- *Accurate microRNA Target Prediction Using Detailed Binding Site Accessibility and Machine Learning on Proteomics Data.* *Front Genet.* 2(103).
- Salviato, E. 2013. *Cancro all'Ovaio di stadio I: uno studio comparativo per l'identificazioni bioinformatica delle interazioni tra microRNA e mRNA.* Tesis para obtener el titulo de Maestra en ciencias estadísticas. 8-11.
- Shah, S. P. 2012. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486, 395–399.
- Sheng, G., Zhao, H., Wang, J., Tian, W., Swarts, D., van der Oost, J., Patel, D., Wang, Y. Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *PNAS.* 111(2): 652-657.
- Stewart, B. W. And Wild, C. P. 2014. *World Cancer Report.* WHO Press. pp. 16-54.
- Sorlie, T., Perou, C., Aas, T., Geisler, S., Eisen, M. B., Borresen-Dale, A. L. 2001. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* *PNAS.* 98 (19): 10869-10874.
- Soto-Pérez-de-Celis, E., Chavarri-Guerra, Y. National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001-2011: Analysis of a population-based database. 2016. *Cancer Epidemiology.* 41:24-33.
- Tama, F., Wriggers, W., Brooks, C. 2002. Exploring global distortions of biological macromolecules and assemblies from low-resolution structural information and elastic network theory. *J Mol Biol* 321: 297-305.
- Tan, S. M., Rory K., Jingming J., Oliver H., Larry M., Winston H., Judy L. 2014. *Sequencing of Captive Target Transcripts Identifies the Network of Regulated Genes and Functions of Primate-Specific miR-522.* *Cell Press.* 8, 1225-1239.
- Tang, P., Tse, G. M. 2015. Immunohistochemical surrogates for molecular classification of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 140: 806-814.
- The Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 490: 61-70.
- Tianqi, L., Pan, H., Li, R. 2016. The dual regulatory role of miR-204 in cáncer. *Tumor Biol.* 37(11):667-677.
- Vaca-Paniagua F., Rosa María A., Hector M., Carlos P., Veronica F., Federico L., Luis A. H., David C., Enrique B., Alejandro M., Geoffroy D., Nathalie F., Catherine V., Maxime V., Florence L. C., James M., Maude A., Stéphanie V., Jiri Z., Magali O. 2015. *Revealing the Molecular Portrait of Triple Negative Breast Tumors in an Understudied Population through Omics Analysis of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues.* *PlosOne.* 10, 1-18.
- Vegter, E., Peter V.D., Leon J. W., Yigal M. P., Adriaan A. V. 2016. *MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy.* *European Journal of Heart Failure.* 30. 1-12.
- Vogelstein, B., Nickolas P., Victor E., Shibin Z., Luis, A. D., Kenneth W. 2013. *Cancer Genome Landscapes.* *Science.* 339, 1546-1558.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. 2015. *The Path to Cancer: Three Strikes and You're Out.* *N Eng J Med.* 373:20.

- Volinia, S., Gerard N., Alessandra D., Stefan C., Ramzey A., Caroline D., Michela G., Raffaele B., Rami A., Kati M., Maria S., Garzon, Gianpiero D., Pierluigi G., Paola D., Jlenia M., Marco G., Marco M., Carlotta Z., Fabio C., Timothy W., Sylwia E., Maurizio P., Flavia P., Nicola Z., Hansjuerg A., Jeff P., Kay F., Charles L., Massimo N., Andrea V., Anne L., Carlo M. C., 2014. *Pluripotent Stem Cell miRNAs and Metastasis in Invasive Breast Cancer. J Natl Cancer Inst.* 106, 1-8.
- von Minckwitz, G., Untch, M., Blohmer, J.U., Costa, S.D., Eidtmann, H., Fasching, P.A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., Huober, J., Jackisch, C., Kaufmann, M., Konecny, G.E., Denkert, C., Nekljudova, V., Mehta, K., Loibl, S. 2012. *Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. J. Clin. Oncol.* 30, 1796–1804.
- Wang, L.G., Ni, Y., Su, B. H., Shen, H.C. 2013. *MicroRNA-34b functions as a tumor suppressor and acts as a nodal point in the feedback loop with Met. Int J Oncol.* 42:957-962.
- Weitzel, J. N., Lagos, V. I., Herzog, J. S., Judkins, T., Hendrickson, B., Ho, J. S., Ricker, C. N., Lowstuter, K. J., Blazer, K. R., Tomlinson, G., Scholl, T. 2007. Evidence for Common Ancestral Origin of a Recurring *BRCA1* Genomic Rearrangement Identified in High-Risk Hispanic Families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(8):1615-1620.
- WHO. 2012. *GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.* [<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>] consultado el 29 de agosto de 2017.
- Winter, J., Stephanie J. Sarina K., Richard I. G., Sven D. 2009. *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biology.* 11(3), 228-234.
- Yang, F., Zhang, W., Shen, Y., Guan, X. 2015. *Identification of dysregulated microRNAs in triple-negative breast cancer. Int Jour Oncology.* 46: 927-932.
- Yersal, O., Barutca, S. 2014. *Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. World Journal of Clinical Oncology.* 5(3): 412-424.
- Zhang, C., Jie L., Bing L., Qinghue C., Yun W. 2016. *Primate-specific miR-603 is implicated in the risk and pathogenesis of Alzheimer's disease. Aging.* 8.
- Zhang, Z., Hong, Y., Xiang, D., Zhu, P., Wu, E., Li, W., Mosenson, J., Wu, W. 2015. *MicroRNA-302/367 cluster governs hESC self-renewal by dually regulating cell cycle and apoptosis pathways. Stem Cell Reports.* 4, 645-657.
- Zorka, I., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuriscic, I., Jancic, S. 2014. *Differences between luminal A and luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. Clinical Medicine Insights: Oncology.* 8:107-111.