



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización del miRNA-137 en las células
de cáncer de mama MDA-MB-231**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Andrea Viridiana Cervantes Ayala



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Cervantes
Ayala
Andrea Viridiana
75 73 83 19
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
No. Cuenta: 312547637

2. Datos del Tutor

Dr.
Miguel Ángel
Velázquez
Flores

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Ruth
Ruiz
Esparza Garrido

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Araceli Rubí
Viedma
Rodríguez

5. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Cesar Antonio
Ortiz
Martínez

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.
María Teresa
Ortiz
Melo

7. Datos del Trabajo escrito

Caracterización del miRNA-137 en las células de cáncer de mama MDA-MB-231
88 pp
2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ruth Ruiz Esparza Garrido y al Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores por haberme ayudado en este proceso, por enseñarme todo lo necesario para realizar este trabajo, por darme la oportunidad de desarrollar mis habilidades experimentales en este laboratorio, por la motivación para seguir aprendiendo y preguntando, por la confianza depositada en mí, por la amistad, así como por el tiempo dedicado a este proyecto. Por todos los pasteles, el café y las charlas en el laboratorio.

A mis sinodales, por el tiempo que dedicaron para leer mi trabajo y por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Rocío Salceda y a todos los chicos del Laboratorio de Fisiología Celular, gracias por haberme incluido en su equipo de trabajo, por brindarme el tiempo, el espacio y los materiales necesarios para realizar mis cultivos. Así como por todo lo que aprendí en mi paso por su laboratorio.

A Elizabeth Morales, la mejor amiga y compañera de laboratorio, por todos los momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera del lab. Por escucharme, aguantarme con todo y mis cambios repentinos de humor, por nuestras eternas pláticas tratando de entender la vida y por siempre darme ánimos para seguir con todos nuestros proyectos. Estoy segura de que seguiremos compartiendo éxitos, fracasos, alegrías y tristezas.

A mis compañeros y amigos de la Facultad, por todo lo que compartimos durante la carrera. A Luis Vázquez, por todos estos años, por tantas risas y momentos felices, y por que continúe nuestra amistad.

Por último, agradezco a todas aquellas personas que me han apoyado, aconsejado, escuchado y brindado su cariño en estos 22 años de vida. A todos los que continuaron creyendo en mí, incluso cuando yo no lo hacía. Gracias por haber contribuido a todo lo que soy ahora.

DEDICATORIA

A mis padres

Maricela Ayala Ponce y Roberto Cervantes Servín

A mi hermano

Roberto Cervantes Ayala.

A ustedes les pertenece este trabajo.

Gracias por darme la oportunidad de hacer lo que me gusta.

*“You need to let the little things that would ordinarily bore you
suddenly thrill you”*

Andy Warhol

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	III
II. LISTA DE FIGURAS	V
III. LISTA DE TABLAS	VI
IV. RESUMEN	VII
V. ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer	2
1.2 Cáncer de mama	3
1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama	3
1.2.2 Cáncer de mama hereditario	6
1.2.3 Biología molecular del cáncer de mama	8
1.2.4 Línea celular MDA-MB-231	10
1.3 Proteína de muerte que interacciona con BCL2 (BIK)	11
1.3.1 Proteínas de la familia BCL2	11
1.3.2 Proteínas de tipo “ <i>BH3-only</i> ”	12
1.3.3 BIK	14
1.3.4 Participación de BIK en cáncer	15
1.3.5 Nuevas funciones de BIK	16
1.4 MicroRNA-137	18
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	30
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	33

5.1 Objetivo general	33
5.1.2 Objetivos particulares	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Cultivo de células MDA-MB-231	34
6.2 Cuerva de crecimiento	34
6.3 Extracción de RNA	34
6.4 Síntesis de cDNA	35
6.5 qPCR	35
6.6 Predicción de las vías biológicas reguladas por el miR-137	37
6.7 Análisis estadístico	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1 Condiciones de crecimiento de la línea M231	38
7.2 Caracterización molecular de la línea M231	40
7.3 Expresión del miR-137	43
7.4 Expresión de BIK	45
7.5 Predicción de las vías biológicas reguladas por el miR-137	47
8. CONCLUSIONES	54
9. PERSPECTIVAS	55
10. LITERATURA CITADA	56
11. ANEXOS	63
ANEXO 1. Lista de los genes blanco validados para el miR-137 (Tarbase)	63
ANEXO 2. Vías biológicas potencialmente reguladas por el miR-137	65

I. ABREVIATURAS

ATCC	Colección de cultivos de tipo americano
ATG5	Proteína relacionada con autofagia 5
BAK	Proteína antagonista 1 de BCL2
BAX	Proteína BCL-2 asociada al cromosoma X
BCL2	Proteína reguladora de la apoptosis BCL2
BH	Dominio de homología BCL2
BIK	Proteína de muerte que interacciona con BCL2
BRCA1	BRCA1, asociado a reparación de DNA
BRCA2	BRCA2, asociado a reparación de DNA
CaM	Cáncer de mama
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCND2	Ciclina D2
CDH1	Caderina 1 (caderina E)
CDH2	Caderina 2 (caderina N)
CDKN1A	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A
cDNA	DNA complementario
CKII	Cinasa similar a caseína II
CLDN3	Claudina 3
CLDN4	Claudina 4
CLDN7	Claudina 7
COOH	Dominio carboxilo terminal
CSC	Células trocales cancerosas
CYC	Citocromo C
DBLOH	Proteína mitocondrial DIABLO de unión a IAP
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
ER	Receptor de estrógenos
ErbB	Receptor tirosina-cinasa Erb-B
GBM	Glioblastoma multiforme
HBOC	Cáncer de ovario y de mama hereditario
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano

hESC	Células troncales embrionarias humanas
HMEC	Células epiteliales mamarias humanas
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1
Ki67	Marcador de proliferación Ki-67
Klf4	Factor similar a Kruppel 4
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MBR	Región de unión a la membrana
miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensajero
M231	Línea celular MDA-MB-231 (M.D Anderson-Metastatic Breast-231)
Nanog	Caja homeótica Nanog
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
NH ₂	Dominio amino terminal
NOXA	Proteína Inducida por forbol-12-miristato-13-acetato
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	RNA pequeño de interferencia
Ser35	Serina 35
SFB	Suero fetal bovino
SNAI1	Represor transcripcional de la familia Snail 1
SNAI2	Represor transcripcional de la familia Snail 2
Sox2	Caja SYR 2
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
Thr33	Treonina 33
TM	Dominio transmembranal
TM ^o	Temperatura Melt
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
VIM	Vimentina
Wnt7B	Miembro 7b de la familia Wnt

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hallmarks esenciales para la carcinogénesis	2
Figura 2. Principales causas de mortalidad asociadas a cáncer en mujeres ...	4
Figura 3. Tasa de incidencia en México de CaM por estados, por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años	5
Figura 4. Tasa de mortalidad en México de CaM por estados, por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años	6
Figura 5. Herencia autosómica dominante de los genes BRCA1/2	7
Figura 6. Clasificación de los miembros de la familia BCL-2, de acuerdo con la presencia de los dominios BH	12
Figura 7. Miembros de la familia “ <i>BH3-only</i> ” en humanos	13
Figura 8. Mecanismo de acción de las proteínas “ <i>BH3-only</i> ”	14
Figura 9. Estructura de la proteína BIK	15
Figura 10. Proceso de extracción de RNA utilizando el método TRizol	35
Figura 11. Curva de crecimiento de las células MDA-MB-231	39
Figura 12. Validación de la línea celular mediante la expresión de ciertos marcadores epiteliales y mesenquimales	41
Figura 13. Expresión relativa del miR-137 en las células HMEC y M231	44
Figura 14. Expresión relativa de BIK en las células HMEC y M231	46
Figura 15. Vía de señalización MAPK.....	52
Figura 16. Vías que regulan pluripotencia en células troncales.....	53

III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación molecular del CaM	1
Tabla 2. Sitios genómicos de microRNAs en donde se une BIK	30
Tabla 3. Secuencias de los primers para los marcadores moleculares	36
Tabla 4. Número de genes predichos y validados para el miR-137	47
Tabla 5. Análisis de las vías reguladas por el miR-137 con Tarbase	47
Tabla 6. Análisis de las vías reguladas por el miR-137 utilizando las 3 herramientas (TarBase, micro-TDS y TargetScan)	48

IV. RESUMEN

El cáncer de mama (**CaM**) representa una de las principales causas de mortalidad en México y en el mundo. Es una enfermedad heterogénea tanto en su presentación clínica como molecular. En la actualidad, se han realizado esfuerzos para identificar posibles biomarcadores que permitan mejorar el diagnóstico y pronóstico del **CaM**. **BIK** es una proteína que participa en la regulación de la apoptosis, ha sido identificada en el núcleo de la línea celular MDA-MB-231 (**M231**) y se ha determinado que interacciona con el DNA, incluyendo la región genómica del microRNA-137. De acuerdo con esto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión del **miR-137** y comenzar a identificar la función de **BIK** en la línea celular **M231**. La expresión de los mRNAs de ciertos marcadores moleculares de la línea **M231** (para validar el modelo de estudio) y la expresión del **miR-137** y de **BIK** se determinó por qPCR; las vías de señalización potencialmente reguladas por el **miR-137** se predijeron con la base de datos DIANA miRPath. Los marcadores epiteliales **CDH1** y **EPCAM** mostraron, respectivamente, una disminución de -6 ± 0.3 veces y -5.7 ± 1.4 veces en su expresión en las células **M231** en comparación con las células **HMEC**. En contraste, los marcadores de la TEM, **VIM** y **SNAI1**, estuvieron más expresados (14 ± 5.4 y 9 ± 4.8 veces) en **M231** que en **HMEC**. La expresión del **miRNA-137** fue 3 ± 0.02 veces menor en la línea **M231** que en la línea **HMEC** y por el contrario, la expresión de **BIK** fue mayor (0.66 ± 0.13) en contraste con **HMEC**. Las predicciones bioinformáticas mostraron que los genes blanco (predichos y validados) del **miR-137** participan principalmente en la vía de las **MAPK** y en vías

que regulan la pluripotencia de células troncales. En conclusión, las células M231 - usadas en este estudio- tienen los rasgos moleculares reportados previamente para esta línea por Cahall (2015) y Prat (2010). Además, se encontró que la disminución del miR-137 podría estar relacionada con la malignidad de la línea celular M231, al regular vías de señalización (MAPK y pluripotencia) relacionadas con el control del ciclo celular. Por último, la posible función de BIK como factor de transcripción que regula al miR-137 tiene que ser posteriormente estudiada.

Palabras clave: Cáncer, MDA-MB-231, microRNAs, miR-137, BIK, ciclo celular.

V. ABSTRACT

Breast cancer (BC) is one of the greatest causes of mortality among women. This cancer is a highly heterogeneous group of diseases that show diverse clinical and molecular characteristics. Currently, many efforts have been made to identify possible biomarkers that improve the BC diagnosis and prognosis. BIK (BCL2-Interacting Killer (Apoptosis-Inducing)), a protein that has a role in the apoptosis induction, has been identified inside the nucleus of MDA-MB-231 (M231) cells and it interact with DNA, including the microRNA-137 genomic region. Based on this, we characterized the miR-137 expression and started the identification of BIK function in the cell line M231. The mRNA expression of certain molecular markers for M231 and for both miR-137 and BIK, was evaluated by qPCR. Also, prediction of the biological pathways where this miRNA could be involved were identify with the DIANA-miRPath application. The Epithelial markers CDH1 (Cadherin 1) and EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) showed, respectively, a -6 ± 0.3 and -5.7 ± 1.4 fold decrease in their expression in the M231 cells compared to HMEC cells. In contrast, EMT (Epithelial-mesenchymal transition) markers, VIM (Vimentin) and SNAI1 (Snail Family Transcriptional Repressor 1), were overexpressed (14 ± 5.4 and 9 ± 4.8 fold increase) in the M231 cells relative to HMEC. The miR-137 expression was 3 ± 0.02 fold decreased in the M231 cells compared to HMEC. On the other hand, the BIK expression was 0.66 ± 0.13 fold increase in the cells M231 in comparison to HMEC. Predictions showed that validated and predictable targets participated mainly in the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling pathway and in signaling pathways regulating pluripotency of stem cells. In

conclusion, our data indicated that the M231 cells –used in this study- have the molecular features previously reported for this cell line. In addition, the decrease in the miR-137 expression could be related to the malignancy of the cells M231 by regulating signaling pathways (MAPK and pluripotency) associated with cell cycle regulation. Finally, the involvement of BIK as transcription factor by regulating the miR-137 expression remains to be demonstrated

Key words: Breast cancer, MDA-MB-231, microRNAs, miR-137, BIK, cell cycle.

1. INTRODUCCIÓN

El **CaM** representa uno de los principales desafíos en salud pública, al ser una de las principales causas de mortalidad en mujeres tanto en México como en el mundo. Uno de los principales retos clínicos es la detección temprana y la clasificación molecular adecuada del tipo de cáncer para la aplicación del tratamiento correcto.

La línea celular de **CaM** MDA-MB-231 (**M231**) presenta una alta capacidad invasiva y metastásica. Recientemente, se identificó que la proteína proapoptótica BIK se localiza en el núcleo e interacciona físicamente con regiones codificantes y no codificantes del genoma de las células M231, específicamente en regiones donde se localizan varios genes de microRNAs (1,2).

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes que actúan como reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Recientemente, se han identificado cambios aberrantes en los patrones de expresión de los microRNAs que ayudan a clasificar molecularmente los tumores mamarios (3,4).

El miRNA 137 se ha descrito como un supresor de tumores en varios tipos de cáncer, como por ejemplo en melanoma, osteosarcoma, gliomas pediátricos, cáncer de lengua, pulmón, ovario, tiroides y gástrico (5–10) El estudio del miRNA 137 podría generar información relevante para dilucidar algunos de los mecanismos moleculares involucrados en la invasión y metástasis de la línea celular de **CaM** MDA-MB-231 y podría utilizarse como un posible biomarcador

para el diagnóstico y/o pronóstico de pacientes y para el desarrollo de tratamientos específicos para cada subtipo molecular de **CaM**.

1.1 Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que, a nivel clínico, se clasifican de acuerdo con los tipos celulares que las originan, a la edad en la que aparecen, a la tasa de crecimiento, la capacidad de invasión, la prognosis y la respuesta al tratamiento (11). Molecularmente, todas estas enfermedades se caracterizan por una alteración en múltiples procesos biológicos que se denominan 'hallmarks' o capacidades esenciales que las células deben adquirir para que se lleve a cabo la transformación maligna (Figura 1) (12).

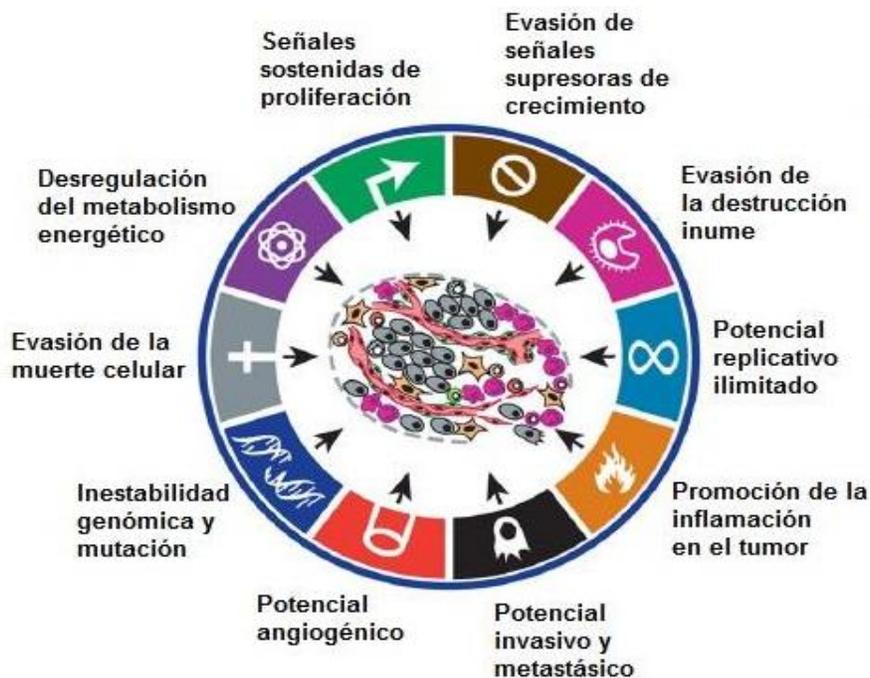


Figura 1. Hallmarks esenciales para la carcinogénesis. Tomado y modificado de Hanahan y Weinberg (2011).

El cáncer puede ser causado por factores externos tales como la exposición a la luz UV, el tabaco, organismos infecciosos (bacterias o virus), una dieta poco saludable (11), así como por factores internos como son las mutaciones genéticas heredadas, hormonas, condiciones inmunes y cambios epigenéticos (alteración de los patrones de metilación del DNA) (11). El riesgo de desarrollar cualquier tipo de cáncer aumenta con la edad, ya que se tiene un tiempo de exposición más largo a los distintos factores de riesgo, además de que los mecanismos de reparación celular van perdiendo su eficacia con la edad (13).

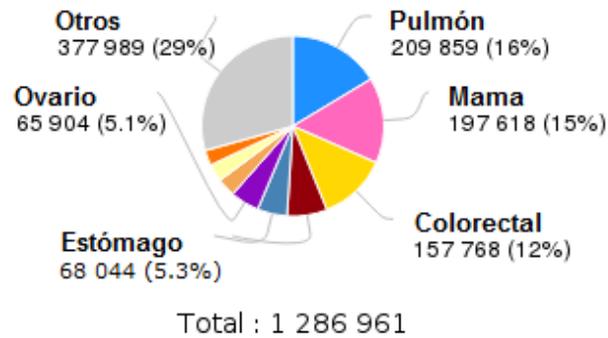
1.2 Cáncer de mama

1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama

El **CaM** es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y en particular, es el cáncer más frecuente entre las mujeres, con un aproximado de 2 millones de casos nuevos diagnosticados en el 2018 (24.2% de todos los tipos de cáncer) siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (626,679 muertes) (14).

En regiones desarrolladas es la segunda causa de muerte (198.000 muertes, 15%, Figura 2A), por cáncer, y la primera causa de muerte en mujeres de regiones menos desarrolladas (324.000 muertes, 14%, Figura 2B) (14).

A. Número estimado de muertes (mujeres) en regiones desarrolladas



B. Número estimado de muertes (mujeres) en regiones menos desarrolladas

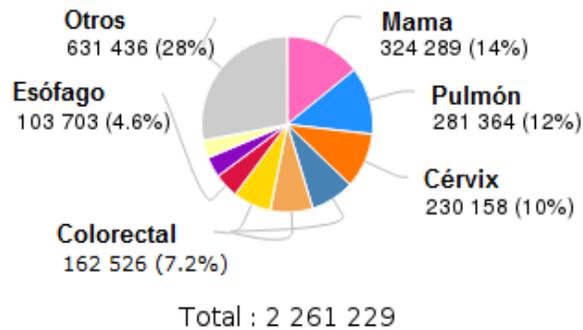


Figura 2. Principales causas de mortalidad asociadas a cáncer en mujeres. A: Regiones desarrolladas. **B:** Regiones menos desarrolladas. [Tomado y modificado de Globocan, 2018 (globocan.iarc.fr)]

En los países desarrollados, la mayoría de los casos de **CaM** son detectados tempranamente, por lo que el pronóstico de los pacientes frecuentemente es favorable. Por el contrario, en los países menos desarrollados los casos se diagnostican en estadios patológicos más avanzados y, por ende, la tasa de supervivencia es menor (13).

De acuerdo al INEGI (2014) en México el **CaM** ocupa el tercer lugar en causas de mortalidad después de enfermedades del corazón y de diabetes mellitus, y el primer lugar en mortalidad por cáncer (15).

La mayor incidencia de **CaM** ocurre en mujeres mayores de 45 años, siendo en el grupo de 60 a 64 años donde se concentra el mayor número de casos nuevos (68 por cada 100,000 mujeres en ese grupo de edad). Los estados de Campeche (117.15), Colima (94.24), Aguascalientes (63.33) y Veracruz (62.36) son los estados con el mayor número de casos nuevos de **CaM** (Figura 3) (16).

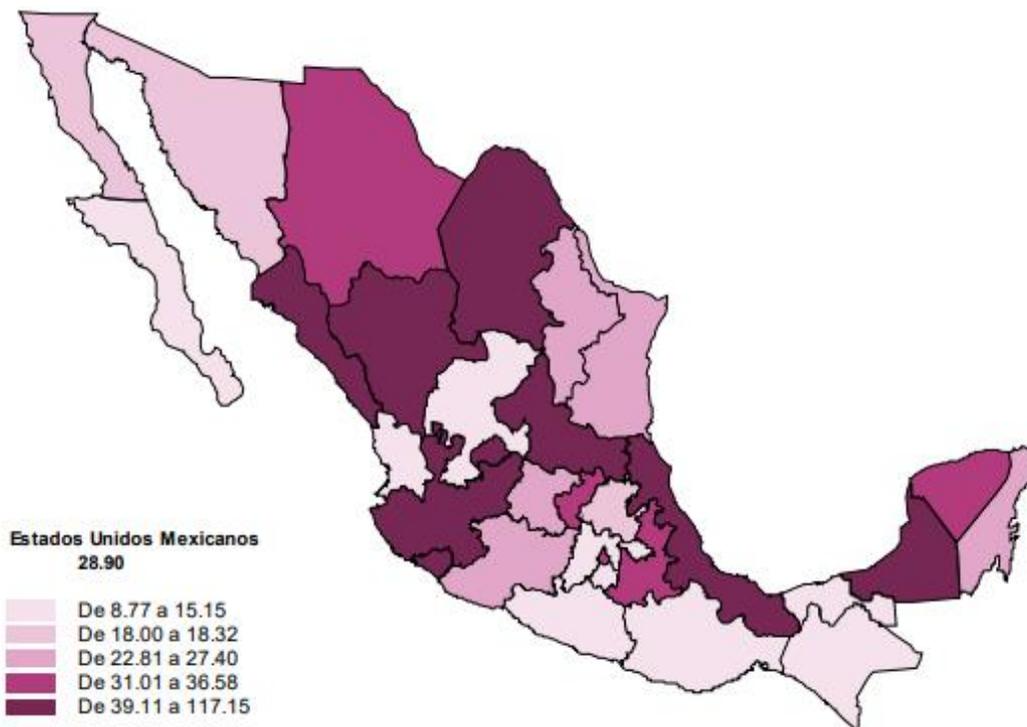


Figura 3. Tasa de incidencia en México de CaM, por estados, por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años. [Tomado y modificado del INEGI

(<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>)]

Por su parte, las tasas de mortalidad por CaM se incrementan conforme aumenta la edad: la tasa de mortalidad más alta se ubica en las mujeres mayores de 80

años, en donde 63 de cada 100,000 mujeres fallecen cada año (16). Los estados con mayor mortalidad por **CaM** son Coahuila (24.2), Sonora (22.6) y Nuevo León (22.4) (Figura 4) (17).

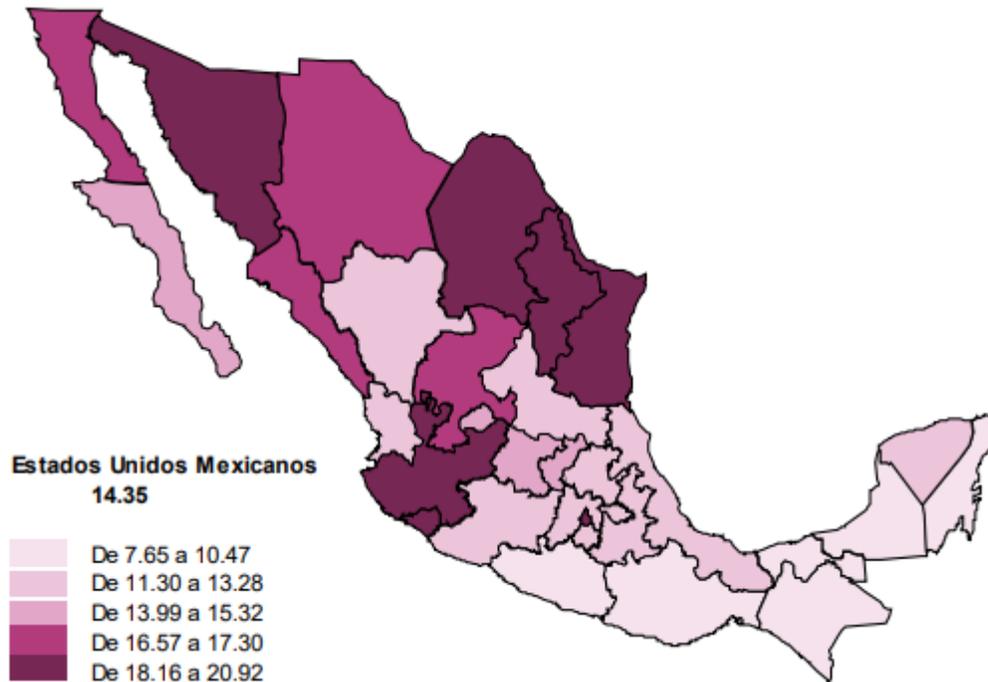


Figura 3. Tasa de mortalidad en México de CaM, por estados, por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años. [Tomado y modificado del INEGI (<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>)]

1.2.2 Cáncer de mama hereditario

Alrededor del 5-10% de los casos de **CaM** son de origen hereditario (el 90% restantes son esporádicos), y se definen por la aparición de casos de **CaM** y de ovario en una edad inferior a los casos de cáncer esporádicos (<30 años), así como casos de tumores bilaterales (en ambas mamas) entre familiares cercanos (18).

Los dos genes más comúnmente mutados (1 de cada 300-500 personas) en el **CaM** y ovario hereditario (HBOC) son los genes supresores de tumores BRCA1 (BRCA1, asociado a reparación de DNA) y BRCA2 (BRCA2, asociado a reparación de DNA) (19). Estos genes están localizados en el las regiones cromosómicas 17q21 y 13q12, respectivamente. Ambos genes se heredan de forma autosómica dominante (Figura 5) y codifican para fosfoproteínas nucleares que tienen una función importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica, al participar en la vía de reparación homóloga de la ruptura de doble cadena del DNA (20).

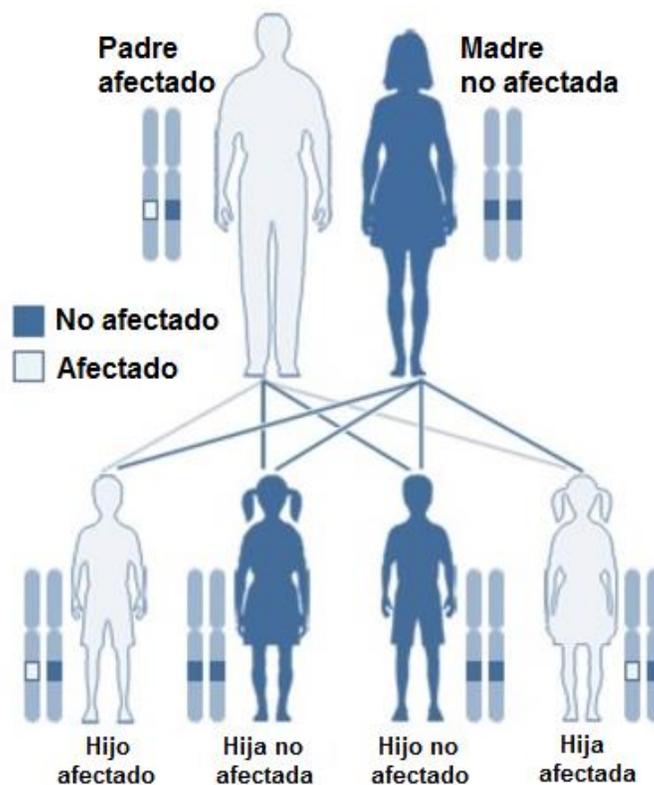


Figura 5. Herencia autosómica dominante de los genes BRCA 1/2. [Tomado y modificado de la Biblioteca Nacional de Medicina US (<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/breast-cancer#inheritance>)]

Para ambos genes se han descrito una gran cantidad de variantes transcripcionales que están asociadas con los casos de HBOC (20): las mujeres que portan mutaciones en el gen BRCA1 ó BRCA2 tienen un 65-80% de riesgo de desarrollar **CaM** y un 20-45% de desarrollar cáncer de ovario (19).

Además de las mutaciones en BRCA 1 y 2, existen otras alteraciones moleculares que pueden conducir al desarrollo de **CaM**. Por ejemplo, en el síndrome de Li-Fraumeni se encuentra mutado el gen supresor de tumores p53 localizado en el cromosoma 17p, esta alteración se hereda de forma autosómica dominante con alta penetrancia y supone un riesgo para el desarrollo de múltiples neoplasias, como osteosarcomas, tumores cerebrales y cáncer de mama (18). Otro ejemplo es la enfermedad de Cowden, también de herencia autosómica dominante pero con baja penetrancia, en donde el gen mutado es un PTEN (Fosfatasa y homólogo de tensina) localizado en la región genómica 10q23, lo cual lleva a un riesgo elevado de desarrollo de cáncer de mama y tiroides (18).

1.2.3 Biología molecular del cáncer de mama

Actualmente, el **CaM** se clasifica molecularmente en cinco subtipos (Tabla 1); esto es con base en la expresión génica de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y del factor del crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (21).

Tabla 1. Clasificación molecular del CaM.

Clasificación	Inmunoperfil	Otras características
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	Ki67 bajo, a menudo sensible a la quimioterapia
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	Ki67 alto, variable a la quimioterapia.

Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	EGFR ⁺ y/o citoqueratina 5/6 ⁺ , Ki67 alto, a menudo sensible a la quimioterapia
Claudin-low	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Ki67 bajo, E-cadherina, claudinas 3,4 y 7 a la baja; respuesta intermedia a la quimioterapia
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	Ki67 alto, reactivo a la quimioterapia.

Recientemente, se describió el subtipo 'claudin-low', que inicialmente estaba incluido en el subtipo basal o "triple negativo" (**TNBC**), el cual no expresa ninguno de los receptores mencionados anteriormente (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) y que posee una baja expresión de las claudinas 3, 4 y 7 (CLDN3, CLDN4, CLDN7) (22,23). Asimismo, este subtipo tiene una baja expresión de Ki67 (marcador de proliferación Ki-67) y un enriquecimiento de marcadores asociados con la transición epitelio-mesenquima (**TEM**): Caderina 2 (CDH2), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1), vimentina (VIM) y el represor transcripcional de la familia Snail 1 (SNAI1) (24,25).

Las claudinas son proteínas que están involucradas en las uniones estrechas de las células epiteliales (23). CDH2 es una proteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio y es indicativa de invasión y metástasis (24). ICAM1 es otra molécula de adhesión que está involucrada en la metástasis, debido a que controla el movimiento de las células a través de la matriz extracelular (24).

Lo anterior indica que este subtipo molecular se caracteriza por ser altamente invasivo y metastásico, ya que presenta modificaciones importantes en la expresión de moléculas involucradas en la adhesión celular. Las líneas

celulares MDA-MB-231, BT549, Hs578T y SUM1315 se clasifican dentro de este grupo y son un excelente modelo para estudiar este subtipo de **CaM** (21).

1.2.4 Línea celular MDA-MB-231

La línea celular de **MDA-MB-231 (M231)** se derivó de un tejido metastásico de tipo **TNBC** y se encuentra agrupada en el subtipo de **CaM** 'claudin-low'. Esta línea se estableció en 1973, a partir de células aisladas de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con adenocarcinoma (26). Las células de esta línea derivan de células epiteliales, crecen adheridas a un sustrato y presentan un fenotipo fusiforme; además, presentan mutaciones en p53 y KRas (27), poseen una alta capacidad migratoria e invasiva (28) y expresan los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y de crecimiento transformante alfa (TGF- α), así como al miembro 7b de la familia Wnt (Wnt7B) (29). Las proteínas de la familia Wnt están implicadas en un gran conjunto de procesos celulares, entre ellos la proliferación, la migración celular y la apoptosis (30). En particular, se ha identificado que Wnt7B tiene una función relevante en la progresión maligna del **CaM** al influir en la invasión, angiogénesis y metástasis de las células tumorales (30).

Como se mencionó anteriormente, las células **M231** expresan tanto marcadores de tejidos epiteliales como marcadores mesenquimales, lo cual favorece la migración celular y esto a su vez, se relaciona con un fenotipo invasivo y metastásico (24).

1.3 Proteína de muerte que interacciona con BCL2 (BIK)

1.3.1 Proteínas de la familia BCL2

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fundamental para mantener la homeostasis tisular y esto depende de la constante recepción de señales tanto del entorno extracelular como del intracelular (31). La evasión de la apoptosis puede causar cáncer o enfermedades autoinmunes, mientras que una apoptosis excesiva puede conducir a enfermedades degenerativas, particularmente del sistema nervioso y del corazón (32).

La apoptosis puede inducirse mediante dos vías: la intrínseca; mediada por las mitocondrias, y la extrínseca; que involucra receptores membranales de muerte (32). Las proteínas de la familia BCL2 (proteína reguladora de la apoptosis BCL2) regulan la vía intrínseca o mitocondrial, mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (32,33). Esta familia está conformada por 25 miembros, algunos de los cuales tienen la capacidad de inhibir la apoptosis (anti-apoptóticos), mientras que otros la inducen (pro-apoptóticos) (33). Los miembros de esta familia poseen regiones estructurales conservadas de tipo 'BCL2', también conocidas como dominios de homología BCL2 (BH); al día de hoy, se han identificado cuatro de estas regiones (BH1-BH4) y cada miembro de esta familia comparte al menos una de ellas. Basado en estos dominios BH, los miembros pueden clasificarse en tres subfamilias diferentes: proteínas anti-apoptóticas multidominios (protectores de muerte), proteínas pro-apoptóticas multidominios ('killers') o proteínas pro-apoptóticas de tipo *BH3-only* (reguladores de la apoptosis) (Figura 6) (33,34). El dominio transmembranal (TM), también conocido

como región de unión a la membrana (MBR), permite a los integrantes de esta familia anclarse al retículo endoplásmico o a la mitocondria y por medio de los dominios BH1-BH4, estas proteínas establecen interacciones con otros miembros de la familia. El dominio BH3, promueve la apoptosis, mientras que el BH4 la inhibe (35).

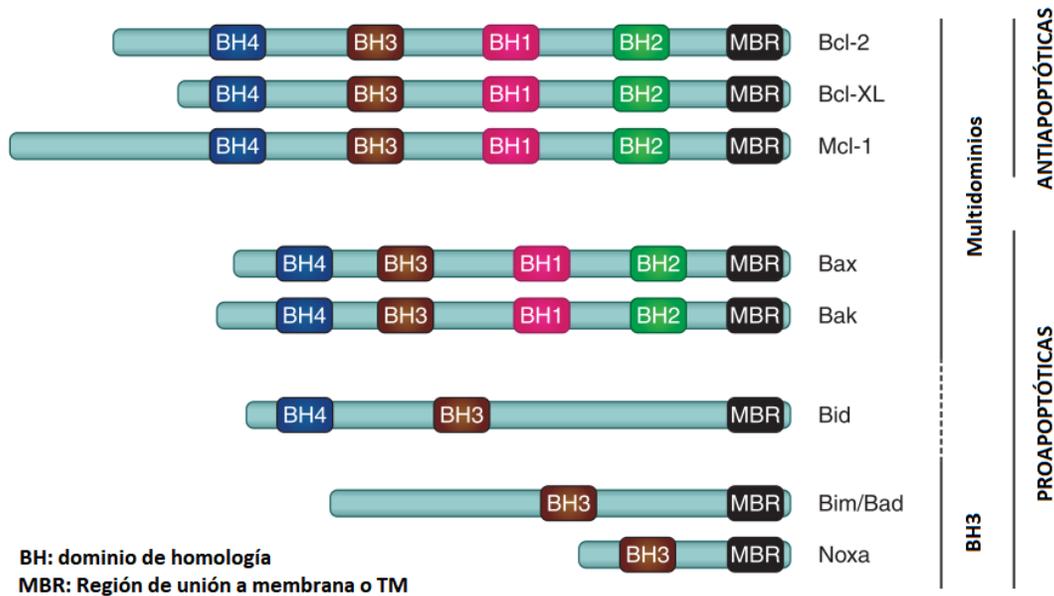


Figura 6. Clasificación de los miembros de la familia BCL-2, de acuerdo con la presencia de los dominios BH. MBR es el dominio de unión a la membrana; BH1 y BH2 son de unión a otras proteínas de la familia; BH3 induce apoptosis, mientras que BH4 la inhibe [Tomado y modificado de Shamas-din, et al , 2013].

1.3.2 Proteínas de tipo “BH3-only”

En los humanos, la subfamilia de proteínas pro-apoptóticas de tipo “BH3-only” está formada por 8 proteínas (Figura 7) (35).



Figura 7. Miembros de la familia “BH3-only” en humanos. [Tomado y modificado de Lomonosova & Chinnadurai, 2008.]

Por sí mismas, estas proteínas no son capaces de inducir la apoptosis, sino que interfirieren con la actividad de las proteínas anti-apoptóticas o activan a los inductores de muerte “killers” (36). Cuando hay condiciones de estrés o señales de daño, algunos miembros de tipo “BH3-only”, principalmente NOXA (proteína Inducida por Forbol-12-miristat-13-acetato), se activa e inhibe la acción de proteínas anti-apoptóticas como BCL2. Esto resulta en la homo-oligomerización de BAX (proteína BCL-2 asociada al cromosoma X) o BAK1 (proteína antagonista 1 de BCL2) (32) lo cual induce la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria, a través de los cuales se liberan otras moléculas pro-apoptóticas como DBLOH (proteína mitocondrial DIABLO de unión a IAP) y el CYC (citocromo C). Este último conduce a la activación de las caspasas, las cuales son las efectoras del proceso de la apoptosis (Figura 8) (32).

Vía mitocondrial

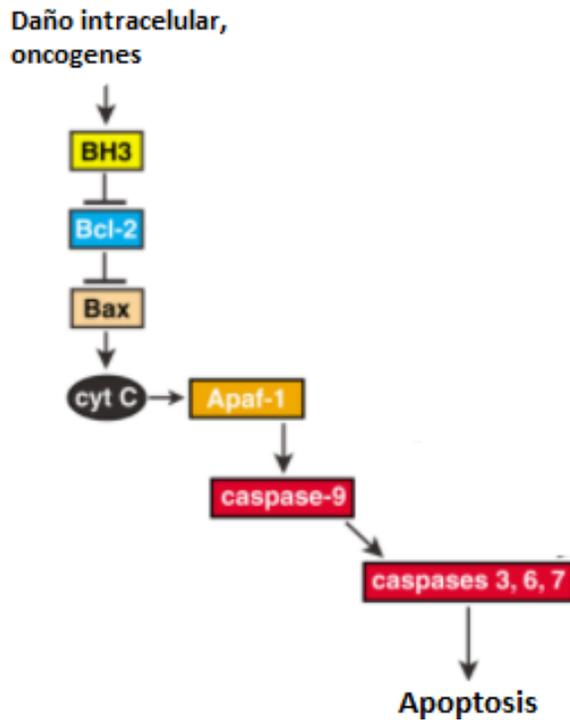


Figura 8. Mecanismo de acción de las proteínas “BH3-only”: inhiben la acción de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) permitiendo la oligomerización de proteínas pro-apoptóticas (Bax o Bak) causando un cambio en la permeabilidad de la membrana, lo cual provoca la liberación de citocromo C que activa a las caspasas para llevar a cabo la apoptosis [Tomado y modificado Adams, *et al* 2007].

1.3.3 BIK

La proteína **BIK** (proteína de muerte que interacciona con BCL2) es conocida como el miembro fundador de la familia “BH3-only”, ya que fue la primera proteína en la que se relacionó el dominio BH3 con la actividad de muerte celular (37). En humanos, el gen **BIK** se localiza en el cromosoma 22q13.3 y codifica para una fosfoproteína localizada principalmente en el retículo endoplasmático (37). Posee un dominio amino terminal (NH₂), uno BH3, un dominio transmembranal (TM) y uno carboxilo terminal (COOH), así como un una cremallera de leucina (región rica en leucina), la cual es característica de los factores de transcripción) (Figura 9) (37).

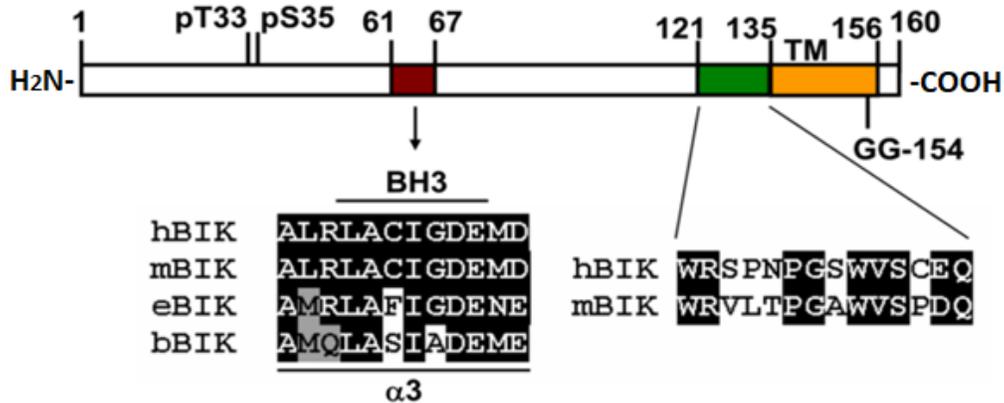


Figura 9. Estructura de la proteína BIK: se observa el dominio amino terminal, el BH3, el TM y el carboxilo terminal [Tomado y modificado de Chinnadurai *et al* 2008].

De acuerdo con predicciones informáticas, se ha sugerido que **BIK** tiene una estructura secundaria bien definida, forma 6 hélices alfa (α) con el dominio BH3 expuesto (37). Por el contrario, los otros miembros de “*BH3-only*” están desestructurados.

BIK requiere ser fosforilada (Thr-33 y/o Ser-35) por la cinasa CKII (cinasa similar a caseína II) para llevar a cabo, de forma correcta, su actividad (31,37). Se ha demostrado que ciertas mutaciones que impiden la fosforilación de **BIK**, reducen su actividad pro-apoptótica al disminuir su interacción con las proteínas anti-apoptóticas. Por el contrario, las mutaciones que no alteran la fosforilación de **BIK** (Ser \rightarrow Asp) potencian su actividad pro-apoptótica y su interacción con BCL2 (37).

1.3.4 Participación de BIK en cáncer

Varios estudios sugieren que **BIK** puede actuar como un supresor tumoral en determinados tejidos (37). Se ha demostrado que en el epitelio renal no

neoplásico, **BIK** se expresa en altos niveles, mientras que en el carcinoma renal, su expresión se reduce por la pérdida de heterocigosidad y por la metilación de su promotor (38). En gliomas y cáncer colorrectal, se han identificado deleciones en el cromosoma 22q, que abarcan el *locus* de **BIK** (37). En linfoma de células B, se han identificado mutaciones tanto en intrones como en exones del gen **BIK** que afectan la funcionalidad de la proteína (39). En líneas celulares de **CaM** - dependientes de estrógeno- la expresión de **BIK** se encuentra a la baja (37); sin embargo, un estudio realizado en mujeres mexicanas encontró que la expresión de **BIK** era alta en la mayoría de los tumores de mama esporádicos estudiados (40), lo cual sugiere que esta proteína tiene otras funciones, además de la inducción de la apoptosis, en ciertos subtipos de **CaM**.

1.3.5 Nuevas funciones de BIK

En el año 2016, en un estudio se determinó que la interferencia de **BIK** -por un siRNA específico- cambió la expresión de varios miRNAs, asociados con la tumorigénesis y malignidad de las células de **M231**, y los niveles basales de la autofagia, lo que indica la participación de **BIK** en la regulación de esta vía en esta línea celular de **CaM** (41). Además, otro estudio encontró que los niveles elevados de **BIK** (a nivel mRNA y proteína) y ATG5 (proteína relacionada con autofagia 5) se asociaron con un pobre pronóstico de pacientes con **CaM** (42). Esto indica que a pesar de la gran cantidad de evidencia de su actividad como supresor de tumores, **BIK** tiene una actividad oncogénica.

Lo anterior muestra la participación de **BIK** en el control de la expresión de ciertos miRNAs y del proceso de autofagia en el **CAM**; sin embargo, más estudios son necesarios para saber cómo BIK regula la autofagia.

Participación del miR-137 en el cáncer

Cervantes-Ayala AV,¹ Ruiz Esparza-Garrido R,² Velázquez-Flores MÁ^{*1}

Recibido: 23 de febrero del 2018, versión corregida: 27 de abril del 2018, aceptado 27 de abril del 2018

RESUMEN

Los microRNAs son RNAs pequeños (18-100 nucleótidos) que regulan la expresión de sus genes blanco a nivel postranscripcional; sin embargo, hay evidencia de su expresión a nivel nuclear. El microRNA hsa-miR-137 se localiza dentro del gen hospedero MIR137, en la región cromosómica 1p21.3 y regula genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular. Este microRNA participa en la neurogénesis al suprimir la proliferación de las células troncales neurales y promover su diferenciación; debido a esta importante función, se ha estudiado su participación en diferentes enfermedades neurológicas y en el cáncer. En este último se ha determinado su función como supresor de tumores en neoplasias del sistema nervioso, en melanoma, en cáncer gástrico y de pulmón, carcinoma bucal, osteosarcoma, cáncer de ovario y de mama. Por el contrario, en el cáncer de vejiga se ha identificado como un oncogén. Con base en lo anterior, este RNA pequeño no codificante puede tener un posible potencial como biomarcador y blanco terapéutico en varios tipos de cáncer, aunque aún se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares que regula.

Palabras clave: microRNAs, miR-137, neurogénesis, cáncer.

-
1. Laboratorio de Genómica Funcional de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría "Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).
 2. Catedrática Conacyt, Laboratorio de Genómica Funcional de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría "Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).
Naturaleza del trabajo: síntesis de información (Revisión).
- * Autor para correspondencia: Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores. Tel: (+52 55) 56276900 ext. 22409.
Correo electrónico: dr.velazquez.imss@gmail.com.

ABSTRACT

MicroRNAs are small RNAs (18-100 nucleotides), which regulate the expression of their target genes at the post-transcriptional level; however, miRNAs have been detected at the nuclear level. MicroRNA hsa-miR-137 is located within its host gene MIR-137HG, in the locus 1p21.3, and regulates genes involved in cell proliferation and cell differentiation. This microRNA participates on the neurogenesis by suppressing the proliferation of neural stem cells and by promoting their differentiation. Because of these crucial functions, its participation has been focussed on the study of different neurological diseases and in cancer, where it functions as tumoral suppressor (nervous system tumors, melanoma, gastric and lung cancer, oral carcinoma, osteosarcoma, ovarian and breast cancer) or oncogene (bladder and breast cancer). According to these studies, miR-137 could function as a biomarker for diagnosis and prognosis, and as therapeutic target in many types of cancer; however, more studies are needed to establish these.

Key words: microRNAs, miR-137, neurogenesis, cancer.

INTRODUCCIÓN

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes que comprenden aproximadamente el 0.02% del contenido total de RNA de las células (Daugaard & Hansen, 2017) y que se encuentran involucrados en la regulación de múltiples procesos celulares, al regular la expresión génica a nivel postranscripcional. Debido a su importancia en el control de la expresión génica de muchos mRNAs, cambios en su transcripción, procesamiento, actividad y/o en los niveles de expresión de la forma madura del miRNA, pueden derivar en enfermedades como el cáncer (Rana, 2007).

El miR-137 se localiza en la región cromosómica 1p21.3, dentro del gen hospedero MIR137HG, que codifica para un RNA largo no codificante (lncRNA) (Mahmoudi & Cairns, 2017). El gen de este miRNA presenta un promotor interno y está regulado por una isla CpG, lo cual sugiere que la expresión del miR-137 puede regularse por la metilación de su promotor (Warburton *et al.*, 2015). El ciclo celular es la principal vía biológica regulada por este miRNA, así como la diferenciación celular.

Cambios en los niveles de expresión del miR-137 se han asociado con diversos tipos de cáncer y se ha propuesto que este miRNA actúa como un supresor de tumores u oncogén, dependiendo del tejido en el que se exprese aberrantemente. Debido a la importancia de este miRNA en la oncogénesis, en esta revisión se describirán los hallazgos más importantes acerca de las principales vías celulares que regula y su participación como supresor tumoral u oncogén en algunos tipos de cáncer.

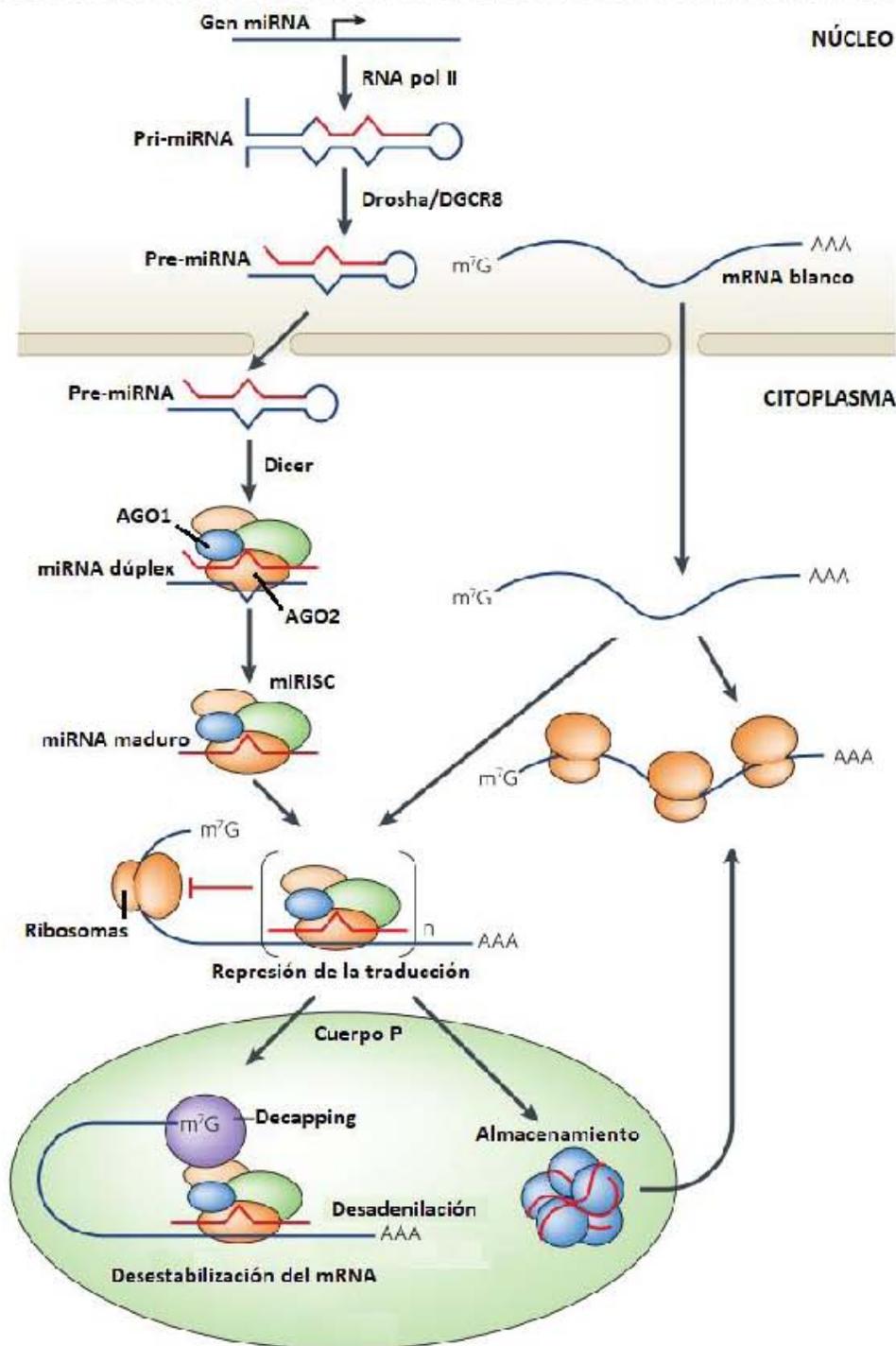
HSA-miR-137

Los miRNAs son un grupo de RNAs pequeños no codificantes de 18-100 nucleótidos de longitud (Hansen *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2014), que tienen una función importante en la regulación postranscripcional, al desestabilizar a su mRNA blanco, al inhibir su traducción o al almacenarlos en cuerpos de procesamiento (Cuerpos P) (Rana, 2007). Los miRNAs se consideran moléculas clave en la regulación de diversos procesos biológicos, como por ejemplo la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, el metabolismo de ácidos grasos, la neurogénesis, la diferenciación hematopoyética, la respuesta inmune, la transducción de señales, la angiogénesis y la metástasis (Mahmoudi & Cairns, 2017; Takahashi *et al.*, 2015; Vincent *et al.*, 2014; Wahid *et al.*, 2010).

Los genes que codifican para los miRNAs se encuentran orientados en sentido (5' a 3') y anti-sentido (3' a 5'), y se localizan principalmente en regiones intergénicas (Rana, 2007); sin embargo, aproximadamente el 30% de los miRNAs derivan de intrones o exones (Daugaard & Hansen, 2017). Si bien la mayoría son transcritos por la RNA polimerasa II, un pequeño grupo de miRNAs, asociados a secuencias repetidas ALU, son transcritos por la RNA polimerasa III (Rana, 2007; Wahid *et al.*, 2010). A la fecha se conocen cinco vías de biogénesis: la canónica (Figura 1); aquella que da origen a los mirtrones o simtrones; la que transcribe miRNAs delimitados por secuencias ALU; y la de los agotrones (Hansen *et al.*, 2016; Ruiz Esparza-Garrido *et al.*, 2016), lo cual denota la gran complejidad que tiene la regulación génica que es mediada por miRNAs.

Los miRNAs regulan la expresión génica al unirse a su mRNA blanco; esta unión puede ocurrir en cualquier región del mRNA, pero las uniones son más propensas a presentarse en la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA (Kwak *et al.*,

Figura 1. Vía canónica de la biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs se transcriben en el núcleo por la RNA pol II. El pri-miRNA es procesado por Drosha-DGCR8, originando un pre-miRNA que se exporta hacia el citoplasma por la Exportina 5. En el citoplasma, el complejo Dicer/TRBP corta el asa al del pre-miRNA y origina un miRNA de doble cadena que se une a las proteínas Ago y forma el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual determina la hebra del miRNA maduro que regulará expresión de su mRNA blanco [Tomado y modificado de Rana, et al, 2007].



2010; Valencia-Sánchez *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2009). La capacidad que tiene el miRNA para reprimir la expresión de los mRNAs, depende de la complementariedad de bases entre una secuencia de 6-8 nucleótidos –en el extremo 5' del miRNA denominada “secuencia semilla” (Mahmoudi & Cairns, 2017) y el extremo 3'UTR del mRNA (Valencia-Sánchez *et al.*, 2006), así como de la energía libre y la termodinámica que se genera entre la unión de la secuencia semilla y el mRNA (Rana, 2007; Valencia-Sánchez *et al.*, 2006). Dado que los miRNAs tienen muchos mRNAs blanco, un miRNA puede regular múltiples vías de señalización celular y cambios en su expresión pueden alterar los niveles de sus mRNAs blanco (Ruiz Esparza-Garrido *et al.*, 2016).

LOCALIZACIÓN GENÓMICA DEL miR-137

El miR-137 es un miRNA intragénico antisentido transcrito por la RNA polimerasa II cuya secuencia se encuentra dentro del gen de un lncRNA, el MIR-137HG (Mahmoudi & Cairns, 2017; Warburton *et al.*, 2015). Esta unidad transcripcional (UT) tiene más de 60 kb de longitud y se ubica en el brazo

corto del cromosoma 1, en una región con múltiples repeticiones en tándem de 15 nucleótidos (VNTR: 5'-TAGCAGCGGCAGCGG-3'), las cuales pueden actuar como reguladores de la transcripción (Warburton *et al.*, 2015). Según predicciones informáticas, esta UT produce cuatro transcritos, de los cuales solo 3 contienen al pre-miRNA (codificado en el exón 3 y con una longitud de 102 pb) a partir del cual se procesa el miR-137 maduro de 23 pb (Figura 2) (Mahmoudi & Cairns, 2017; Sato, *et al.*, 2011).

Datos obtenidos en ENCODE (Enciclopedia de elementos de DNA) mostraron la presencia de marcas de histonas asociadas con promotores activos (H3K4me3 y H3K27Ac), lo que sugiere la existencia de un promotor interno en la secuencia del miR-137 (Warburton *et al.*, 2015). El gen de este miRNA se encuentra regulado por una isla CpG, ubicada río arriba de su secuencia, lo que sugiere que su expresión podría verse regulada por la hipermetilación de su promotor (Mahmoudi & Cairns, 2017; Sato *et al.*, 2011). Además, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante ChIP-Seq, se identificó que REST (Factor de transcripción si-

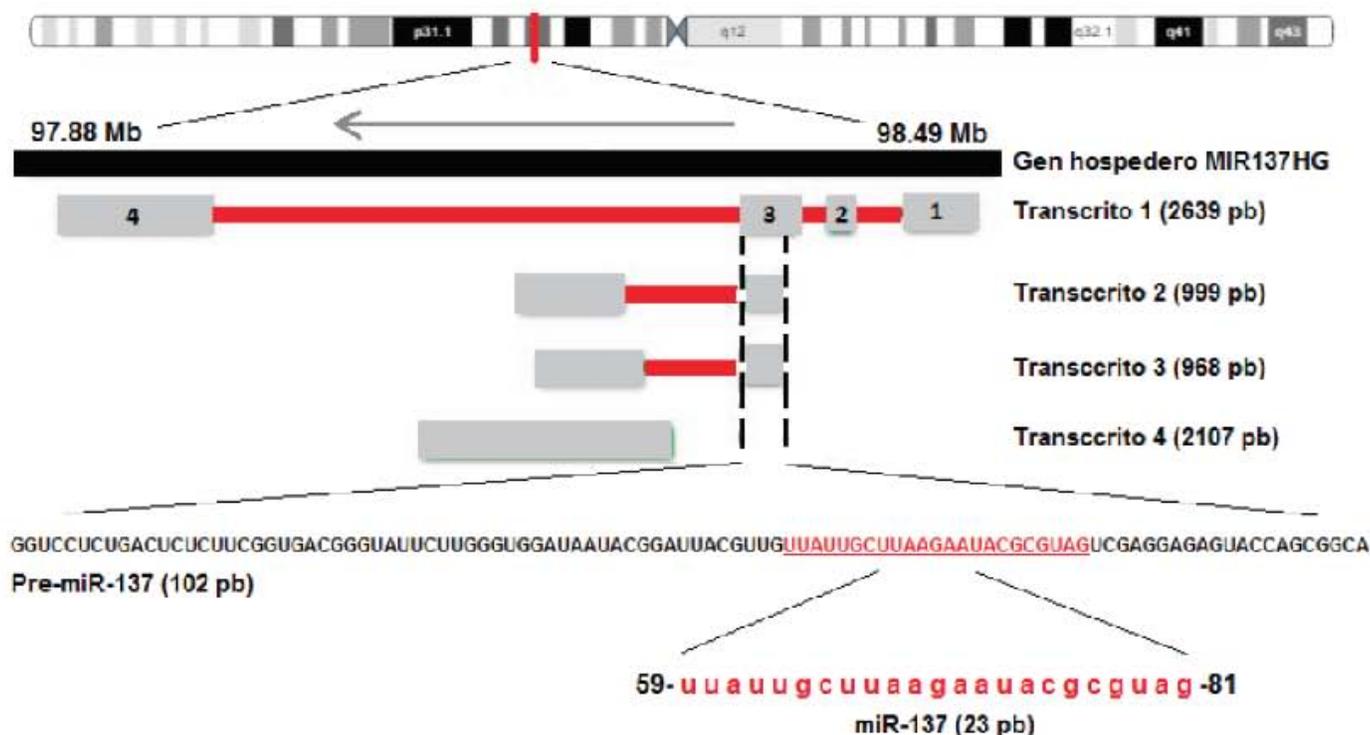


Figura 2. Localización genómica del miR-137. Este miRNA está inmerso en el cromosoma 1p21.3, en el exón 3 del gen MIR137HG el cual codifica para un RNA largo no codificante. La forma madura del miR-137 tiene 23 pb [Tomado y modificado de Mahmoudi *et al.*, 2017].

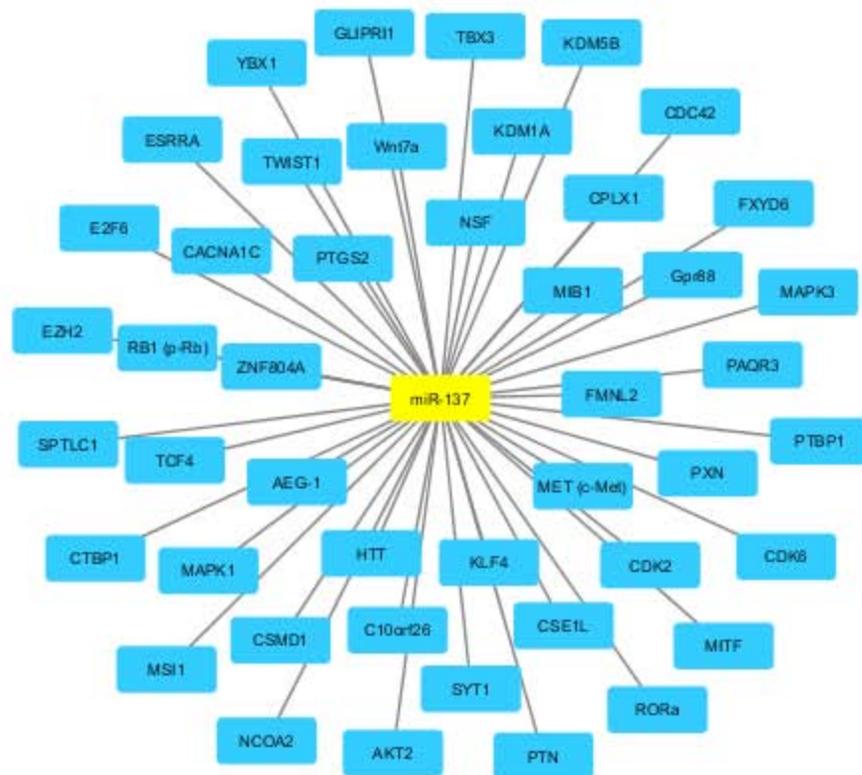


Figura 3. Genes blanco del miR-137 (aproximadamente 60) validados experimentalmente [Elaboración propia].

enciador de RE1) se une al promotor interno del miRNA y actúa como un represor transcripcional (Warburton *et al.*, 2015).

FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL miR-137

Mediante análisis informáticos se han descrito alrededor de 1000 posibles genes blanco del miR-137, de los cuales solo el 5% se han validado experimentalmente (Figura 3) (Mahmoudi & Cairns, 2017). Se ha demostrado que los genes blanco de este miRNA están implicados en diversas vías biológicas, principalmente en el control del ciclo celular y la diferenciación celular (Tabla 1) (Mahmoudi & Cairns, 2017).

El principal mecanismo por el cual el miR-137 inhibe la proliferación, es mediante la regulación negativa de uno de sus genes blanco, la CDK6 (Cinasa dependiente de ciclina 6). La represión de la CDK6 bloquea la transición de la fase G1 a la fase S y detiene el ciclo celular de las células troncales neurales (eNSC), y promueve su transición hacia la etapa de diferenciación (Figura 4) (Yin *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que el miR-137 participa de manera importante en el neurodesarrollo, al regular negativamente a Mib1 (Ubiquitina ligasa

E2 Bomba mental 1), lo cual contribuye a controlar la maduración neuronal (Smrt *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2014). Mib1 es una ubiquitina ligasa localizada en las membranas postsinápticas que inhibe la ruta de señalización Notch, la cual bloquea la expresión de genes necesarios para la diferenciación celular (Figura 4) (Smrt *et al.*, 2011).

Se ha observado que el miR-137 se encuentra expresado en el cerebro (durante la etapa embrionaria y en el adulto) (Smrt *et al.*, 2011) tanto de ratones como de humanos y que presenta su mayor expresión en el hipocampo, en la amígdala y en las regiones corticales con neurogénesis activa (Yin *et al.*, 2014). Por el contrario, este miRNA tiene una baja expresión en el cerebelo y en el tallo cerebral (Mahmoudi & Cairns, 2017). Debido a lo anterior, se ha sugerido una función reguladora crítica del miR-137 durante el desarrollo neuronal de regiones cerebrales específicas, al regular genes asociados tanto con la proliferación como con la diferenciación de las NSC (Mahmoudi & Cairns, 2017). Por ejemplo, en las NSC embrionarias (eNSC) la expresión del miR-137 se encuentra regulada por el receptor nuclear TLX (Receptor nuclear huérfano humano), el cual a su vez regula la progre-

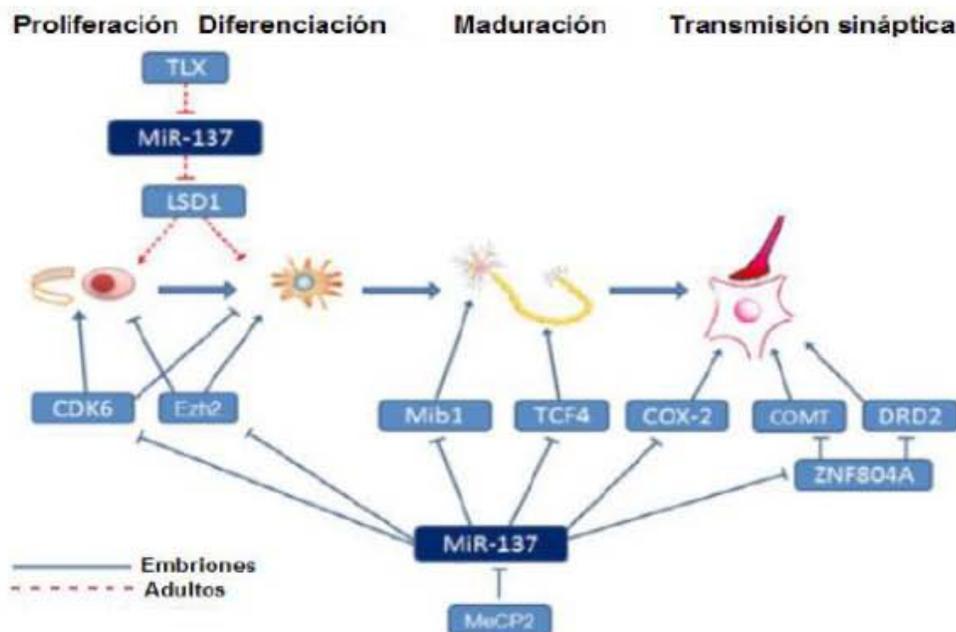


Figura 4. Red de regulación del miR-137 y sus genes blanco durante la neurogénesis y la maduración neuronal, tanto en embriones como en adultos [Tomado y modificado de Yin et al, 2014].

sión del ciclo celular de las eNSC. TLX recluta a su co-represor LSD1 (Histona desmetilasa específica de lisina 1) y forma un complejo que se une a la región genómica del gen miR-137 e inhibe su transcripción (Yin *et al.*, 2014). TLX y LSD1 están altamente expresados en las eNSC durante la etapa de proliferación y en consecuencia, los niveles del miR-137 se encuentran relativamente bajos (Figura 5). Posteriormente, los niveles de TLX y LSD1 disminuyen durante el proceso de diferenciación y los niveles del miR-137 aumentan (Figura 5) (Smrt *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). Al incrementar sus niveles, el miR-137 actúa sobre el mRNA de LSD1 y reprime su expresión; de esta forma, la interacción de LSD1 con la región promotora del miR-137 disminuye y este miRNA promueve la diferenciación neuronal (Yin *et al.*, 2014).

En las NCS adultas (aNSCs), la expresión del miR-137 está regulada por MeCp2 (Proteína 2 de unión a CpG), Sox2 (SRY-Box 2) y EZH2 (Potenciador de histona metiltransferasa homólogo de Zeste) (Yin et al, 2014). MeCp2 es un represor transcripcional que interactúa con el factor de transcripción Sox2 y forma un complejo que se une a la región promotora del miR-137, siendo así como inhibe su expresión y permite la proliferación celular. Después, durante la diferenciación disminuyen los niveles de MeCp2 y Sox2, y au-

menta la expresión del miR-137 (Figura 5). EZH2 es una metiltransferasa blanco del miR-137, por lo tanto la represión de EZH2 reduce a su vez la metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27), lo que induce la expresión de genes que inhiben la proliferación y favorecen la diferenciación celular (Figura 5) (Szulwach *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2014).

PARTICIPACIÓN DEL miR-137 EN EL CÁNCER

Las vías biológicas reguladas por el miR-137 pueden dar una idea relativamente clara de la función de este miRNA tanto en el desarrollo como en la progresión del cáncer, en donde cambios en la regulación del ciclo celular son frecuentes (Mahmoudi & Cairns, 2017; Tamim et al, 2014). Se ha identificado al ciclo celular como la principal vía biológica regulada por el miR-137 tanto en células cancerosas como no cancerosas, al tener como mRNAs blanco a Akt2 (Cinasa de tipo Serina/Treonina AKT2), CDC42 (Ciclo de división celular 42), CDK2 (Cinasa 2 dependiente de ciclina), YBX1 (Proteína 1 de unión a caja-Y), E2F6 (Factor de transcripción E2F 6), MAPK1 (Proteína cinasa 1 activada por mitógenos), MAPK3 (Proteína cinasa 3 activada por mitógenos) y RB1 (Co-represor transcripcional 1 RB) (Mahmoudi & Cairns, 2017; Tamim et al, 2014). Sumado a éstos, otro blanco importante del miR-137 es TCF3 (Factor de trans-

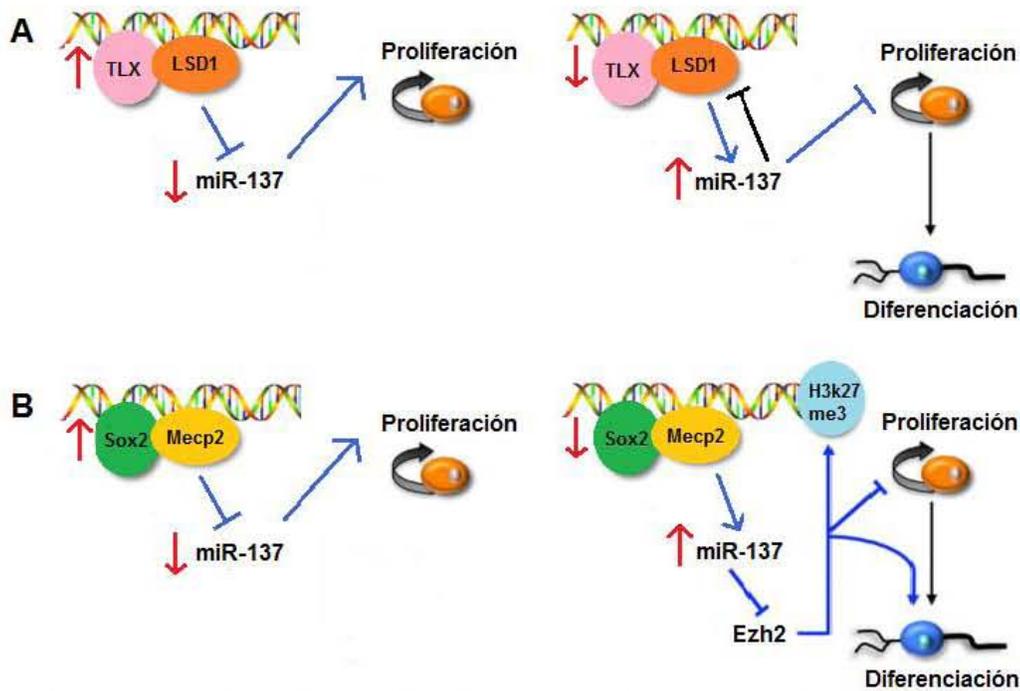


Figura 5. Regulación de la expresión del miR-137 en NSC embrionarias y adultas. A) Regulación en las eNSC. Los bajos niveles de TLX y LSD1 permiten el aumento en la expresión del miR-137, el cual reprime a su vez a LSD1 y así se mantienen elevados los niveles del miRNA, esto permite el paso de la etapa de proliferación a la de diferenciación. B) Regulación en las aNSC. Al disminuir los niveles de Sox2 y Mecp2 aumentan los niveles del miR-137, lo cual reprime a EZH2 y disminuye la metilación de la H3K27, y esto induce la expresión de genes que favorecen la diferenciación [Tomado y modificado de Szulwach et al, 2010].

cripción 3), un miembro de la familia de factores de transcripción de proteínas -E-, que funciona como regulador de la pluripotencia y diferenciación de células troncales por la vía de señalización Wnt (Tamim et al., 2014).

FUNCIÓN DEL miR-137 COMO SUPRESOR TUMORAL

En la mayoría de los tipos de cáncer en donde se ha estudiado al miR-137, éste funciona como un supresor tumoral (Chang et al, 2016; Chen et al, 2017; Du et al, 2016; Feng et al, 2017; Li et al, 2017; Sun et al, 2016; Tamim et al, 2014). La expresión relativamente baja de este miRNA se ha atribuido principalmente a la metilación de su promotor, lo cual se asocia con una menor supervivencia (Du et al, 2016; Li et al, 2016; Zhao et al, 2012). Importante, el restablecimiento de su expresión inhibe la proliferación celular (mediante el bloqueo en la fase G0/G1), la migración, invasión y angiogénesis (Chen et al, 2017; Du et al, 2016; Luo et al, 2013; Tamim et al, 2014).

Tumores cerebrales

En cuanto a los tumores del sistema nervioso, también se ha observado que el miR-17 se encuentra expresado a la baja tanto en los oligodendrogliomas como en el GBM (glioblastoma multiforme), en comparación con tejidos no neoplásicos (Tamim et al, 2014). En el plasma de pacientes con GBM, se observó una expresión a la baja del miR-137 en relación a pacientes sin cáncer, lo cual se correlacionó con una menor supervivencia (Li et al, 2016). Además, se observó una menor expresión de este miRNA entre pacientes con GBM en estadios más avanzados, que en pacientes en estadios tempranos (Li et al, 2016; Tamim et al, 2014). Estos datos sugieren que el miR-137 podría ser utilizado como un biomarcador no invasivo tanto para el diagnóstico (estadio) como para el pronóstico del GBM (tiempo de supervivencia).

Melanoma

En el melanoma, uno de los tumores cutáneos más agresivos y con mayor incidencia en el mundo, un gen clave es AURKA (Aurora cinasa A), una cinasa de tipo serina/treonina que participa en la formación del huso mitótico, la proliferación y la división celular (Chang et al, 2016). Esta proteína se ha descrito como un oncogén que está asociado con la progresión e invasión del melanoma y otros tipos de cáncer (Nikonova et al, 2008). AURKA se encuentra generalmente a la alta en el melanoma, en relación con tejidos cutáneos no neoplásicos (Chang et al, 2016). Un estudio realizado en el año 2016, comprobó que AURKA se regula directamente por el miR-137 y que existe una correlación negativa entre la expresión de este miRNA y AURKA en tejidos de melanoma; es decir, el miR-137 está expresado a la baja y AURKA a la alta (Chang et al, 2016). Por otro lado, el miR-137 también regula negativamente a MITF (Factor de transcripción asociado con la melanogénesis) –un regulador clave en el desarrollo de los melanocitos-, el cual se encuentra desregulado en el melanoma. Se ha observado que la expresión a la alta del miR-137 inhibe la proliferación y supervivencia de células de melanoma al disminuir los niveles de MITF (Luo et al, 2013). Debido a lo anterior, en este tipo de cáncer el miR-137 podría representar un posible blanco terapéutico para reprimir la expresión de AURKA y MITF, y de esta forma reducir la agresividad del melanoma.

Cáncer gástrico y de pulmón

Al igual que en los otros tipos de cáncer, la expresión del miR-137 se encuentra disminuida y esto se asocia con un tiempo de supervivencia menor de los pacientes con cáncer gástrico (Du et al, 2016). Este miRNA regula negativamente la expresión de KLF12 (Factor parecido a Kruppel 12) y TWIST (Factor de transcripción de la familia TWIST BHLH), lo cual podría asociarse con cambio en la proliferación, diferenciación, migración y pluripotencia, así como con la transición epitelio mesénquima (EMT) (Du et al, 2016). Por lo tanto, el restablecimiento de los niveles del miR-137 podría controlar los procesos celulares antes mencionados; sin embargo, aún deben realizarse estudios que comprueben esta hipótesis.

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en el mundo (Chen et al, 2017). La expresión de este miRNA está disminuida en el NSCLC (Cáncer de pulmón de células no

pequeñas), en relación con tejido adyacente no neoplásico. En este tipo de cáncer se ha demostrado que el miR-137 disminuye la expresión de NCOA3 (Coactivador 3 del receptor nuclear), un oncogén que está altamente expresado en este cáncer y se asocia con el desarrollo y progresión tumoral (Chen et al, 2017). Lo anterior indica una clara función del miR-137 como supresor de tumores, por lo que su estudio podría proporcionar una opción terapéutica para pacientes con NSCLC.

Carcinoma de células bucales escamosas

Un estudio demostró que los niveles de expresión del miR-137 están disminuidos en este tipo de cáncer, en relación con los tejidos controles, y que SP1 (Factor de transcripción Sp1) es un blanco directo de este miRNA (Sun et al, 2016). Como era de esperarse, la expresión ectópica de este miRNA disminuyó los niveles de SP1 y promovió la expresión del marcador epitelial CDH1 (E-cadherina) e inhibió la expresión de los marcadores mesenquimales CDH2 (N-cadherina), VIM (Vimentina) y SNAI1 (Receptor Transcripcional 1 de la familia Snail) (Sun et al, 2016). Esto sugiere que el miR-137 suprime la EMT, lo que a su vez inhibe la migración e invasión celular. Por lo tanto, el restablecimiento de los niveles de este miRNA podría disminuir la malignidad de los carcinomas de células escamosas.

Osteosarcoma

En el osteosarcoma, se han reportado niveles de expresión del miR-137 más bajos que en tejidos adyacentes no tumorales, lo cual se asocia negativamente con la progresión tumoral (Feng et al, 2017). En este tipo de cáncer, el mRNA blanco principal del miR-137 es el EZH2; sin embargo, su función en este tipo de cáncer no se ha estudiado (Feng et al, 2017). En otros tipos de cáncer (GBM, neuroblastoma y melanoma), la elevada expresión del EZH2 –dada por los niveles bajos del miR-137– tiene una función oncogénica, al disminuir la expresión de genes supresores de tumores que están relacionados con la proliferación celular. Además, el EZH2 se asocia con un comportamiento tumoral más agresivo y con un mal pronóstico (Chang et al, 2016; Tamim et al, 2014). Con base en lo anterior, podría ser que el EZH2 presente las mismas funciones en el osteosarcoma y que el miR-137 sea un blanco terapéutico útil para inhibir la agresividad

de estos tumores y esto aumente la supervivencia de los pacientes con osteosarcoma.

Cáncer de ovario y mama

XIAP (Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X) es una proteína que tiene una función importante tanto en el surgimiento como en el desarrollo del cáncer de ovario (Li et al, 2017). XIAP es un regulador apoptótico capaz de inhibir la actividad de las caspasas y está altamente expresado en el cáncer de ovario; esto se asocia con una alta tasa de supervivencia celular y resistencia a fármacos. En líneas celulares y tumores de cáncer de ovario, se estableció una correlación negativa entre la expresión de XIAP y la expresión del miR-137 (Li et al, 2017). Con base en esto, el miR-137 podría funcionar como un blanco terapéutico que disminuya la expresión de XIAP, reactive la vía de la apoptosis en las células transformadas y así se elimine la resistencia a los fármacos empleados en el tratamiento de este cáncer.

Por otra parte, un estudio realizado por Zhao y sus cols. (2012) encontró que los niveles de expresión del miR-137 están disminuidos en varias líneas celulares de cáncer de mama (CaM) (MCF-7, T-47D, SK-BR-3, BT-474 y MDA-MB-231) y que el ESRRA (Receptor alfa relacionado con estrógenos) es blanco de regulación de este miRNA. El ESRRA es un receptor nuclear que facilita la progresión del CaM al regular una amplia gama de procesos biológicos tales como el metabolismo, el ciclo celular, la apoptosis, la metástasis y la transcripción (Zhao et al, 2012). La participación del miR-137 –al regular al ESRRA- tiene que definirse en cada una de las líneas celulares de CaM.

FUNCIÓN DEL miR-137 COMO ONCOGÉN

La evidencia anterior sugiere firmemente que el miR-137 funciona como supresor tumoral; no obstante, en el cáncer de vejiga y ciertas líneas celulares de CaM se ha observado que este miRNA actúa como oncogén (Xiu et al, 2014; Ying et al, 2017). En tejidos de cáncer de vejiga, la expresión del miR-137 está incrementada y esto aumenta la prolifera-

ción, migración e invasión celular (Xiu et al, 2014). En este estudio se identificó al supresor tumoral PAQR3 (Miembro 3 de la familia de receptores de progenina y AdipoQ) como blanco del miR-137, lo cual se asocia con la baja expresión de PAQR3 en tejidos neoplásicos. Este supresor tumoral es una proteína transmembranal -localizada en el aparato de Golgi- que inhibe la señalización de las cinasas activadas por mitógenos Raf/Mek/Erk, al secuestrar a Raf en el aparato de Golgi (Xiu et al, 2014). Como resultado de la disminución en su expresión, se esperaría la activación constitutiva de esta vía y una mayor malignidad tumoral.

En las líneas celulares de CaM MCF-7 y BT474, se demostró que la alta expresión del miR-137 puede potenciar la invasión celular al suprimir la expresión de BMP7 (Proteína morfogenética de ósea-7) (Ying et al, 2017). BMP7 es una proteinasa de la matriz extracelular que degrada el colágeno tipo IV, lo que afecta la regulación de la EMT al regular la vía PI3K/AKT: vía clave en la transformación de las células (Ying et al, 2017). Estos datos, junto con la evidencia de su función como supresor tumoral, indican que la función del miR-137 depende de los rasgos moleculares de cada subtipo tumoral de CaM.

CONCLUSIONES

La presente revisión brinda un panorama general de la biología del miR-137, sus redes de interacción con sus genes blanco, así como sus funciones celulares. La información presentada indica una función clave del miR-137 en diferentes procesos biológicos, principalmente en el control del ciclo celular. Este miRNA resulta de particular interés por sus funciones durante el neurodesarrollo, así como por su asociación con el cáncer, en donde actúa como supresor de tumores u oncogén.

De acuerdo con esto último, el miR-137 puede tener un gran potencial como biomarcador pronóstico y diagnóstico, así como un posible blanco terapéutico en varios tipos de cáncer. Sin embargo, aún son necesarios más estudios para dilucidar todos los mecanismos moleculares involucrados en

los trastornos causados por este RNA pequeño no codificante.

REFERENCIAS

- Chang, X., Zhang, H., Lian, S., & Zhu, W. (2016). miR-137 suppresses tumor growth of malignant melanoma by targeting aurora kinase A. *Biochem Biophys Res Commun*, 475(3), 251–256.
- Chen, R., Zhang, Y., Zhang, C., Wu, H., & Yang, S. (2017). miR-137 inhibits the proliferation of human non-small cell lung cancer cells by targeting SRC3. *Oncol Lett*, 13(5), 3905–3911.
- Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017). Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends Genet*, 33(3), 208–219.
- Du, Y., Chen, Y., Wang, F., & Gu, L. (2016). miR-137 plays tumor suppressor roles in gastric cancer cell lines by targeting KLF12 and MYO1C. *Tumour Biol*, 37(10), 13557–13569.
- Feng, Q., Wu, Q., Liu, X., Xiong, Y., & Li, H. (2017). MicroRNA-137 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med*, 13(6), 3167–3174.
- Hansen, T. B., Venø, M. T., Jensen, T. I., Schaefer, A., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2016). Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun*, 7(May), 1–10.
- Kwak, P. B., Iwasaki, S., & Tomari, Y. (2010). The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, 101(11), 2309–2315.
- Li, H., Li, Y., Li, Y., Shi, X., & Chen, H. (2016). Circulating microRNA-137 is a potential biomarker for human glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20, 3599–3604.
- Li, X., Chen, W., Zeng, W., Wan, C., Duan, S., & Jiang, S. (2017). microRNA-137 promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the regulation of XIAP. *Br J Cancer*, 116(1), 66–76.
- Luo, C., Tetteh, P. W., Merz, P. R., Dickes, E., Abukiwan, A., Hotz-Wagenblatt, A., Eichmüller, S. B. (2013). miR-137 Inhibits the Invasion of Melanoma Cells through Downregulation of Multiple Oncogenic Target Genes. *J Invest Dermatol*, 133(3), 768–775.
- Mahmoudi, E., & Cairns, M. J. (2017). MiR-137: an important player in neural development and neoplastic transformation. *Mol Psychiatry*, 22(1), 44–55.
- Nikonova, A., Astsaturov, I., Serebriiskii, I., Dunbrack, R., & Golemis, E. (2008). Aurora-A kinase (AURKA) in normal and pathological cell growth. *Cell Mol Life Sci*, 70(4), 661–687.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 23–36.
- Ruiz Esparza-Garrido, R. & Velázquez-Flores, M.Á. (2016). Nuevos e inesperados mecanismos de biogénesis y acción de los microRNAs. *Revista de Educación Bioquímica*, 35(3), 55–70.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J., & Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics. *FEBS Journal*, 278(10), 1598–1609.
- Smrt, R. D., Szulwach, K. E., Pfeiffer, R. L., Li, X., Guo, W., Pathania, M., Bordey, A. (2011). MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase Mind Bomb-1. *Mind*, 28(6), 1060–1070.
- Sun, G., Ye, P., Murai, K., Lang, M.-F., & Li, S. (2011). miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:259(1).
- Sun, L., Liang, J., Wang, Q., Li, Z., Du, Y., & Xu, X. (2016). MicroRNA-137 suppresses tongue squamous carcinoma cell proliferation, migration and invasion. *Cell Prolif*, 49(5), 628–635.
- Szulwach, K. E., Li, X., Smrt, R. D., Li, Y., Luo, Y., Lin, L., Jin, P. (2010). Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol*, 189(1), 127–141.
- Takahashi, R. U., Miyazaki, H., & Ochiya, T. (2015). The roles of microRNAs in breast cancer. *Cancers*, 7(2), 598–616.
- Tamim, S., Vo, D. T., Uren, P. J., Qiao, M., Bindewald, E., Kasprzak, W. K., Penalva, L. O. F. (2014). Genomic analyses reveal broad impact of miR-137 on genes associated with malignant transformation and neuronal differentiation in glioblastoma cells. *PLoS ONE*, 9(1).
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, 20(5), 515–524.
- Vincent, K., Pichler, M., Lee, G. W., & Ling, H. (2014). MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int. J. Mol. Sci*, 15(8), 14475–14491.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Mol Cell Res*, 1803(11), 1231–1243.
- Warburton, A., Breen, G., Rujescu, D., Bubb, V. J., & Quinn, J. P. (2015). Characterization of a REST-

regulated internal promoter in the schizophrenia genome-wide associated gene MIR137. *Schizophr Bull*, 41(3), 698–707.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11(3), 228–234.

Xiu, Y., Liu, Z., Xia, S., Jin, C., Yin, H., Zhao, W., & Wu, Q. (2014). MicroRNA-137 upregulation increases bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting PAQR3. *PLoS ONE*, 9(10), 1–7.

Yin, J., Lin, J., Luo, X., Chen, Y., Li, Z., Ma, G., & Li, K. (2014). MiR-137: A new player in schizophrenia. *Int J Mol Sci*, 15(2), 3262–3271.

Ying, X., Sun, Y., & He, P. (2017). MicroRNA-137 inhibits BMP7 to enhance the mesenchymal transition of breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(11), 18348–18358.

Zhao, Y., Li, Y., Lou, G., Zhao, L., Xu, Z., Zhang, Y., & He, F. (2012). MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells. *PLoS ONE*, 7(6).

Tabla 1. mRNAs blanco del miR-137 (validados experimentalmente)
Tomado y modificado de Mahmoudi & Cairns, 2017.

Gen blanco	Nombre completo	Método de validación	Rol biológico
AEG-1	Metaderina	Western blot, ensayo luciferasa	Papel en RISC, funciones miARN, ontogenia
AKT2	Cinasa de tipo Serina/Treonina AKT2	Western blot, ensayo luciferasa	Proteína quinasa, desarrollo del cáncer
C10orf26	Proteína de unión a dominio WW similar a 1	Ensayo luciferasa	Supresor tumoral potencial
CACNA1C	Cadena de calcio, dependiente de voltaje, tipo I, subunidad alfa 1C	Ensayo luciferasa	Regulación de la contracción, secreción, expresión génica de neurotransmisores
CDC42	Ciclo de división celular 42	Western blot, ensayo luciferasa	Ciclo celular
CDK2	Cinasa 2 dependiente de ciclinas	Western blot	Regulación del ciclo celular
CDK6	Cinasa 6 dependiente de ciclina	Western blot, ensayo luciferasa	Ciclo celular
CPLX1	Complexina 1	Western blot, ensayo luciferasa	Exocitosis de vesículas sinápticas
CSE1L	Segregación cromosómica similar a 1	Western blot, ensayo luciferasa	Migración celular, secreción
CSMD1	CUB y Sushi dominios múltiples 1	Ensayo luciferasa	Supresor tumoral potencial
CTBP1	Proteína de unión C-terminal 1	Ensayo luciferasa	Desarrollo, proliferación
E2F8	Factor de transcripción E2F 8	Western blot	Ciclo celular
ESRRA	Receptor relacionado con el estrógeno alfa	Ensayo luciferasa	Regulador del metabolismo energético
EZH2	Potenciador de histona metiltransferasa homólogo de Zeste	Ensayo luciferasa	Represión de la metilación del ADN, desarrollo embrionario
FMNL2	Proteína tipo formina 2	Western blot, ensayo luciferasa	Morfogénesis, citocinesis, polaridad celular, adhesión
FXYD6	Dominio FXDY que contiene un regulador de transporte de iones 6	Western blot, ensayo luciferasa	Regulación Na ⁺ /K ⁺ ATPasa
GLIPR1 (RTVP-1)	GLI relacionados con la patogénesis 1	Western blot, ensayo luciferasa	Diferenciación, cáncer
Gpr88	Receptor 88 acoplado a proteína G	Western blot	Desarrollo neuronal, adhesión celular

HTT	Huntingtin	Western blot, ensayo luciferasa	Vinculado a la enfermedad de Huntington
KDM1A (LSD1)	Desmetilasa específica de lisina (K) 1A	Western blot, ensayo luciferasa	Proliferación celular, diferenciación y crecimiento
KDM5B (Jarid1b)	Desmetilasa específica de Lisina (K) 5B	Western blot, ensayo luciferasa	Histona desmetilasa, desarrollo del cáncer
KLF4	Factor 4 similar a Kruppel (intestino)	Western blot, ensayo luciferasa	Desarrollo, diferenciación
MAPK1	Proteína cinasa activada por mitógenos 1	Western blot	Proliferación, diferenciación, desarrollo
MAPK3	Proteína cinasa activada por mitógenos 3	Western blot	Proliferación, diferenciación, ciclo celular
MET	Proto-oncogen met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)	Western blot, ensayo luciferasa	Desarrollo embrionario, curación de heridas
MIB1	Ubiquitina ligasa E2 Bomba mental 1	Ensayo luciferasa	Apoptosis, ciclo celular
MITF	Factor de transcripción asociado a microftalmia	Ensayo luciferasa, reportero GFP	Diferenciación celular, proliferación, supervivencia
MSI1	Homologo de Musashi 1 (Drosophila)	Western blot, ensayo luciferasa	Regulación de células troncales
NCOA2	Coactivador del receptor nuclear 2	Western blot	Crecimiento celular, desarrollo, homeostasis
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida	Western blot, ensayo luciferasa	Fusión de vesículas de transporte
PAQR3	Miembro de la familia de receptores de progesterona y AdipoQ III	Western blot, ensayo luciferasa	Regulación de Raf cinasa
PTBP1	Proteína de unión al tracto de polipirimidina 1	Ensayo luciferasa	Procesamiento de mRNAs, metabolismo, transporte
PTGS2 (Cox-2)	Sintasa 2 prostaglandina-endoperoxido	Western blot, ensayo luciferasa	Dioxigenasa y peroxidasa
PTN	Pleiotropina	Western blot	Apoptosis, proliferación celular
PXN	Paxillina	Western blot, ensayo luciferasa	Motilidad y migración celular
RB1 (p-Rb)	Co-represor transcripcional 1 RB	Western blot	Ciclo celular, supresor tumoral
RORa	Gen alfa del receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico	Western blot	Ritmo circadiano, organogénesis y diferenciación
SPTLC1	Serina palmitoiltransferasa, subunidad de base de cadena larga 1	Ensayo luciferasa	Biosíntesis de esfingolípidos
SYT1	Synaptotagmina 1	Western blot, ensayo luciferasa	Exocitosis de vesículas sinápticas
TBX3	Caja T 3	Western blot, ensayo luciferasa	Desarrollo
TCF4	Factor de transcripción 4	Ensayo luciferasa	Desarrollo neuronal, adhesión celular
TWIST1	Factor de transcripción de la familia TWIST BHLH	Western blot	Determinación/diferenciación del linaje celular
Wnt7a	Miembro de la familia Wnt 7A	Western blot	Oncogénesis y desarrollo
YBX1	Proteína 1 de unión a caja-Y	Western blot, ensayo luciferasa	Regulación de la traducción, transcripción, migración celular, proliferación
ZNF804A	Proteína de dedo de zinc 804A	Ensayo luciferasa	Desarrollo neuronal, adhesión celular

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Un estudio realizado en el laboratorio, demostró la presencia de **BIK** en el citoplasma y núcleo de las células **M231**, mediante microscopía confocal (1). Otro trabajo demostró que **BIK** tiene la capacidad de cambiar su localización subcelular en respuesta a estrés oxidativo; se observó que BIK se localiza en el núcleo de las células M231 y transloca hacia el citosol después de ser sometidas a estrés oxidativo mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o cis-Diamino-Dicloro-Platino-II (cisplatino, CP) un agente quimioterapéutico; sin embargo, el significado biológico de la expresión nuclear de BIK no se determinó (43).

Posteriormente, mediante ChIP-chip se demostró que **BIK** interacciona físicamente con el genoma de las células **M231**, tanto en regiones codificantes como no codificantes (2). En particular, se observó que BIK se une a varios *loci* en donde se localizan diversos microRNAs, entre ellos el **miR-137** (Tabla 2). Esto sugiere que **BIK** puede funcionar como factor de transcripción y participar en la regulación transcripcional del **miR-137**, para regular así la migración e invasión las células **M231** (2).

Tabla 2. Sitios genómicos de microRNAs en donde se une BIK.

MicroRNA	Chromosome	MicroRNA	Chromosome
miR-200a-3p/5p		miR-202-3p/5p	10
miR-34a-3p/5p	1	miR-100-3p/5p	11
miR-200b-3p/5p	1	miR-708-3p/5p	11
miR-137	1	miR-1261	11
miR-1302	1	miR-203a-3p/5p	12

MicroRNA	Chromosome	MicroRNA	Chromosome
miR-1471	2	miR-1269 ^a	14
miR-570-3p/5p	2	miR-495-3p/5p	14
miR-563	3	miR-656-3p/5p	14
miR-135a-3p/5p	3	miR-1247-3p/5p	14
miR-1224-3p/5p	3	miR-9-3p	15
miR-572	3	miR-1275	15
miR-1251-3p/5p	4	miR-10a-3p/5p	17
miR-143-3p/5p	4	miR-187-3p/5p	18
miR-583	5	miR-516b-3p/5p	19
miR-1302	5	miR-155-3p/5p	21
miR-146a-3p/5p	5	miR-130b-3p/5p	22
miR-30a-3p/5p	6	miR-let-7b-3p/5p	22
miR-1268a	6	miR-106a-3p/5p	22
miR-183-3p/5p	7	miR-301b-3p/5p	X
miR-548f-3p	7	miR-325	X
miR-29a-3p/5p	7	miR-503-3p/5p	X
miR-124-3p/5p	8	mir-718	X
miR-548h-3p/5p	8	miR-424-3p/5p	X
miR-873-3p/5p	9		

Tomada de Ruiz Esparza-Garrido R, et al, 2018.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es uno de los problemas de salud de mayor relevancia en México y a nivel mundial, y en particular, el **CaM** representa la principal causa de mortalidad en las mujeres de nuestro país.

En los últimos años, el avance en el conocimiento molecular del **CaM** ha permitido establecer una mejor clasificación y generar nuevos tratamientos subtipo específico. A pesar de lo anterior, aún existen subtipos tumorales que no responden a los tratamientos actuales.

Recientemente, se identificó que BIK regula la autofagia y que esto se asocia con un mal pronóstico de ciertos tumores de **CaM** (41). Asimismo, se sabe que BIK interacciona físicamente con regiones codificantes y no codificantes del genoma de las células **M231**, incluyendo la región en la que se localiza el miR-137 (2). Con base en lo anterior, el estudio del miR-137 permitirá identificar nuevos mecanismos que funcionan de manera aberrante en el **CaM** y con ello, postular nuevas herramientas moleculares para su uso diagnóstico, pronóstico y para la generación de un tratamiento.

4. HIPÓTESIS

La disminución de la expresión del **miR-137** influirá en la desregulación de vías de señalización involucradas en la tumorigénesis de la línea celular **M231**.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Caracterizar al miR-137 en las células de cáncer de mama **M231**.

5.1.2 Objetivos particulares

1. Determinar las condiciones de crecimiento de la línea **M231**
2. Caracterizar molecularmente a la línea celular **M231**
3. Determinar la expresión del **miR-137** en las células **M231**
4. Predecir las vías biológicas reguladas por el **miR-137**

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de células MDA-MB-231

La línea celular **M231** (ATCC® HTB-26™) se cultivó en medio DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino (SFB; v/v) y en presencia de 100 U/mL de penicilina. Las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

6.2 Cuerva de crecimiento

El conteo celular se llevó a cabo mediante el método Neubauer (Celeromics) (1) para determinar la cinética de crecimiento celular. Se inició el cultivo con 5×10^4 células. Para esto, las células se despegaron con tripsina-EDTA al 0.5% y el conteo celular se hizo cada 24 horas, durante 6 días. Se calculó el porcentaje (%) del crecimiento celular a partir de tres experimentos independientes.

6.3 Extracción de RNA

Las células **M231** (65% de confluencia) fueron separadas de las placas de cultivo con tripsina-EDTA al 0.5% e incubadas a 37°C por 10 minutos; la reacción fue detenida con 1mL de medio de cultivo fresco. Después, las células fueron lavadas con PBS 1X (solución salina tamponada con fosfatos: [138 mM] NaCl; [3 mM] KCl; [8.1 mM] Na₂HPO₄; y [1.5 mM] KH₂PO₄), transferidas a tubos de 1.5 ml y centrifugadas a 800xg por 10 minutos, a temperatura ambiente (~25°C). El sobrenadante se descartó y se procedió con la extracción de RNA utilizando TRIzol™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante y ciertas modificaciones (tiempos de incubación) hechas por Drago-García D. (2015) (Figura 10). Una vez

purificado, el RNA se almacenó a -20°C hasta su uso. Posteriormente, la concentración y calidad del material se determinó por espectrofotometría en el NanoDrop 1000 (ThermoScientific, EUA).

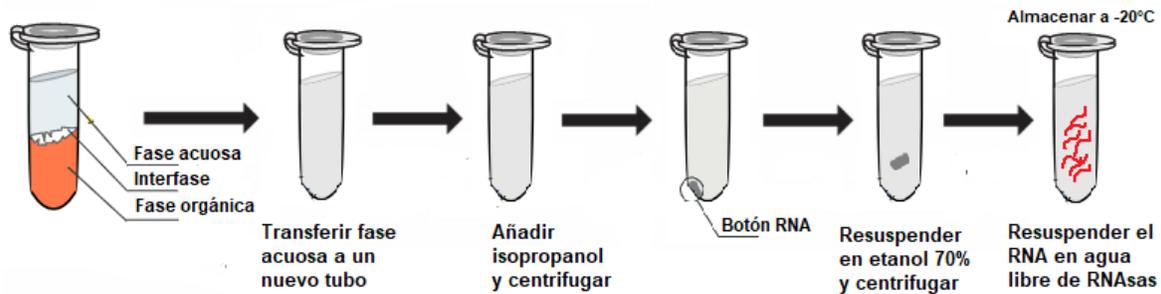


Figura 10. Proceso de extracción de RNA utilizando el método de TRIzol.

6.4 Síntesis de cDNA

Se sintetizó cDNA para detectar a los miRNAs maduros y mRNAs, por medio del kit miScript II RT (Qiagen). Los componentes de las reacciones fueron: $4\ \mu\text{L}$ del 5x miScript HiSpec Buffer (síntesis de cDNA para miRNAs) 5x miScript HiFlex Buffer (síntesis de cDNA para mRNAs); $2\ \mu\text{L}$ del 10x Buffer miScript Nucleics Mix; $2\ \mu\text{L}$ del Buffer miScript Nucleics Mix; $2\ \mu\text{L}$ del miScript Reverse Transcriptase Mix; y $12\ \mu\text{L}$ del RNA purificado (235ng). La reacción se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante: 37°C (60 min); 95°C (5 min). Por último, el cDNA se almacenó a -20°C hasta la realización de la PCR.

6.5 qPCR

La expresión de los marcadores moleculares específicos de la línea celular M231 se determinó mediante el kit RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon). Los

primers se diseñaron utilizando el programa Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 3) y fueron sintetizados por T4Oligo (Guanajuato, México). Los reactivos utilizados para la reacción fueron: 10µL del RealQ Plus 2x Master Mix; 1 µL del primer forward; 1 µL del primer reverse; 300 ng del templado de cDNA; y 6µL de agua libre de RNAsas, para un volumen final de reacción de 25 µL. La reacción se realizó en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoScientific, EUA) bajo las siguientes condiciones: activación inicial (95°C; 15 min); 40 ciclos: 95°C (15 seg); TM° de los primers (1 min). La expresión de estos marcadores se normalizó con el gen GADPH.

Tabla 3. Secuencias de los primers para los marcadores moleculares

Gen	Secuencias y TM°
E-cadherina	Forward 5'-AGCAGAACTAACACACGGGG-3' 64.4°C; Reverse 3'-TGCAACGTCGTTACGAGTCA-5' 66°C
EpCAM	Forward 5'-AGATTCTTGGCAGCGTTCT-3' 67.1°C; Reverse 3'-GTTCTGTACTCACCAGCACAA-5' 67.6°C
Vimentina	Forward 5'-AAATGGCTCGTCACCTTCGT-3' 66.1°C; Reverse 3'-TTGCGCTCCTGAAAACTGC-5' 67.8°C
Snail	Forward 5'-AAGATGCACATCCGAAGCC-3' 68.2°C; Reverse 3'-TCATCAAAGTCCTGTGGGGC-5' 67.7°C

Para la detección del miR-137 maduro se utilizó el kit miScript SYBR® Green PCR (Qiagen). Los reactivos utilizados para la reacción fueron: 2 µL del 2x SYBR Green PCR Master Mix; 2.5 µL del 10x miScript Universal Primer; 2.5µL del primer para el miR-137; 150 ng del templado de cDNA; y 5µL de agua libre de RNAsas, para un volumen final de reacción de 25 µL. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: activación inicial (95°C;15 min); 40 ciclos: 94°C (15 seg); 55°C (30 seg); 70°C (30 seg). La expresión se normalizó con el gen miR-16.

Los valores relativos de expresión se obtuvieron por medio del modelo matemático descrito por Livak ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) (44). Posteriormente, se realizaron geles de agarosa para comprobar el tamaño esperado de los amplicones y confirmar que las reacciones eran específicas.

6.6 Predicción de las vías biológicas reguladas por el miR-137

Se llevo a cabo una predicción de los genes blanco del miR-137 así como de las posibles vías celulares reguladas por este miRNA con el software DIANA-miRPath v.3, utilizando las herramientas TaRBase v7.0 (genes validados), micro-TDS v5.0 (genes predichos) y TargetScan (genes predichos). Se tomaron en cuenta las vías en las cuales el valor de $p < 0.05$.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. A todos los resultados se les aplicó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y una t de Student para muestras independientes. Se tomaron como diferencias significativas los valores de $p < 0.05$. Este análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism V.6.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Condiciones de crecimiento de la línea M231

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio la línea celular de CaM M231, la cual es altamente invasiva y metastásica (27,29). En nuestras condiciones de cultivo, las células **M231** incrementaron su número en un $25 \pm 1.4 \%$ y $100 \pm 19 \%$ a las 24 y 48hrs (0.7 veces más *versus* 24 hrs), respectivamente. El crecimiento celular se estabilizó a las 144 hrs ($280 \pm 2 \%$; 0.8 veces más *versus* las 48 hrs) (Figura 11A). En la Figura 11B-C (4 días de cultivo) se distingue claramente el fenotipo fusiforme de las células **M231**. Estos resultados son similares al tiempo de crecimiento reportado por la American Type Culture Collection (ATCC®), la cual reporta la duplicación de estas células a las 38 horas y la estabilización de su crecimiento (fase estacionaria) aproximadamente a las 144 horas (29). Sin embargo, en el 2012 se demostró que la duplicación de estas células ocurría aproximadamente a las 56 horas de cultivo (45). Asimismo, en otro trabajo se observó que esta línea se duplicó a las 26 horas (1), lo que difiere tanto de lo reportado por la ATCC, como de los resultados obtenidos por Hao y sus cols. (2012), y de nuestros resultados. Ya que en todos los estudios se utilizaron las mismas condiciones de cultivo, las diferencias observadas podrían deberse a otros factores tales como el número inicial de células cultivadas, el pH, la humedad, la superficie disponible para el crecimiento así como las propiedades fisicoquímicas del sustrato (46).

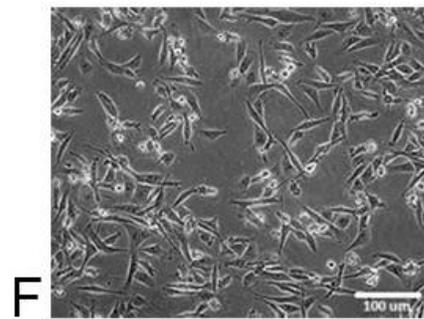
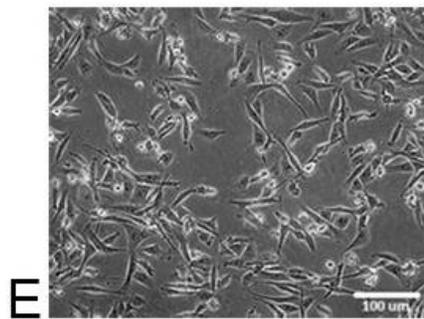
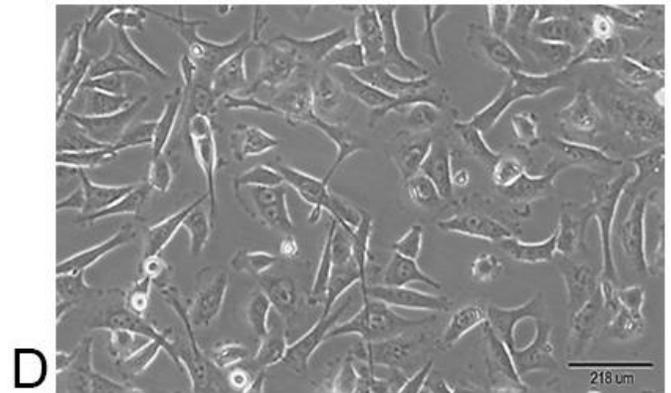
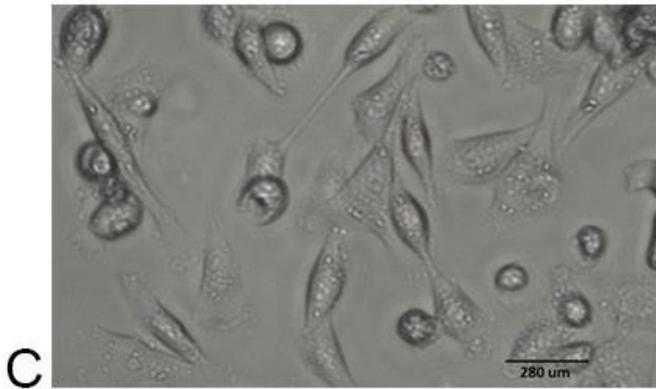
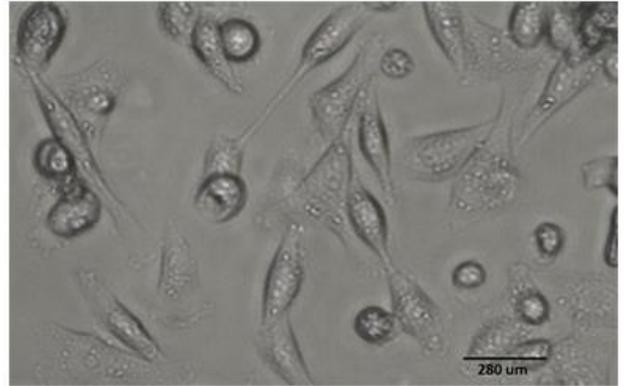
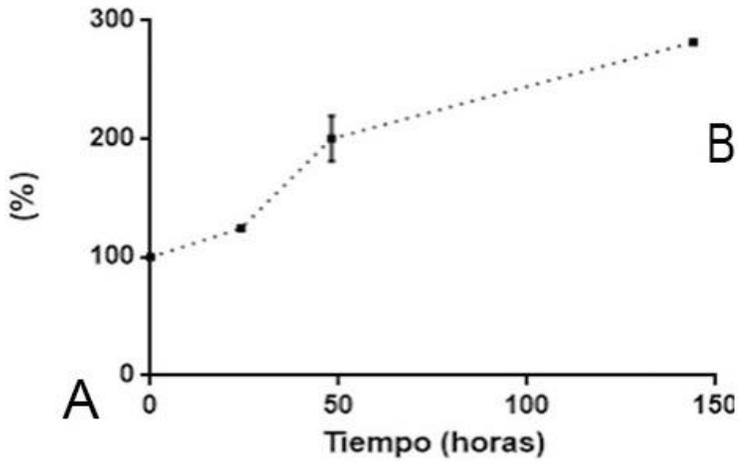


Figura 11. Curva de crecimiento de las células MDA-MB-231. **A)** Se muestra el crecimiento de las células a las 24, 48 y 144 horas después de ser sembradas. La gráfica muestra el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. **B)** Se observa una imagen del cultivo, 20X (2 días de cultivo) **C)** En la imagen se distingue el fenotipo fusiforme de las células M231, 4X (3 días de cultivo). **D)** Se muestra el cultivo de las células M231 con una confluencia del 80%, 10X (5 días de cultivo). **E)** Imagen tomada de la ATCC y **F)** Imagen tomada de Cahall (2015).

Por su parte, las imágenes de las células (Figura 11B-D) permiten observar la morfología característica de la línea **M231**; las células son muy alargadas, en forma de huso, lo que refleja su fenotipo altamente invasivo. Esto es consistente con lo descrito y observado (Figura 11E y F) para esta línea celular (24,47).

7.2 Caracterización molecular de la línea **M231**

Para corroborar que la línea celular **M231** cuenta con las características moleculares previamente descritas en la literatura (24), se determinó la expresión relativa de algunos marcadores moleculares epiteliales y mesenquimales. De acuerdo con lo reportado, los marcadores epiteliales CDH1 (Caderina 1) y EPCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales) mostraron una expresión relativa menor (-6 ± 0.3 veces (CDH1) y -5.7 ± 1.4 veces (EPCAM)) en las células **M231** en relación con la línea no neoplásica HMEC (Figura 12B). Por su parte, VIM y SNAI1 mostraron respectivamente un aumento en su expresión de 14 ± 5.4 y 9 ± 4.8 veces en las células **M231** en relación con HMEC (Figura 12B).

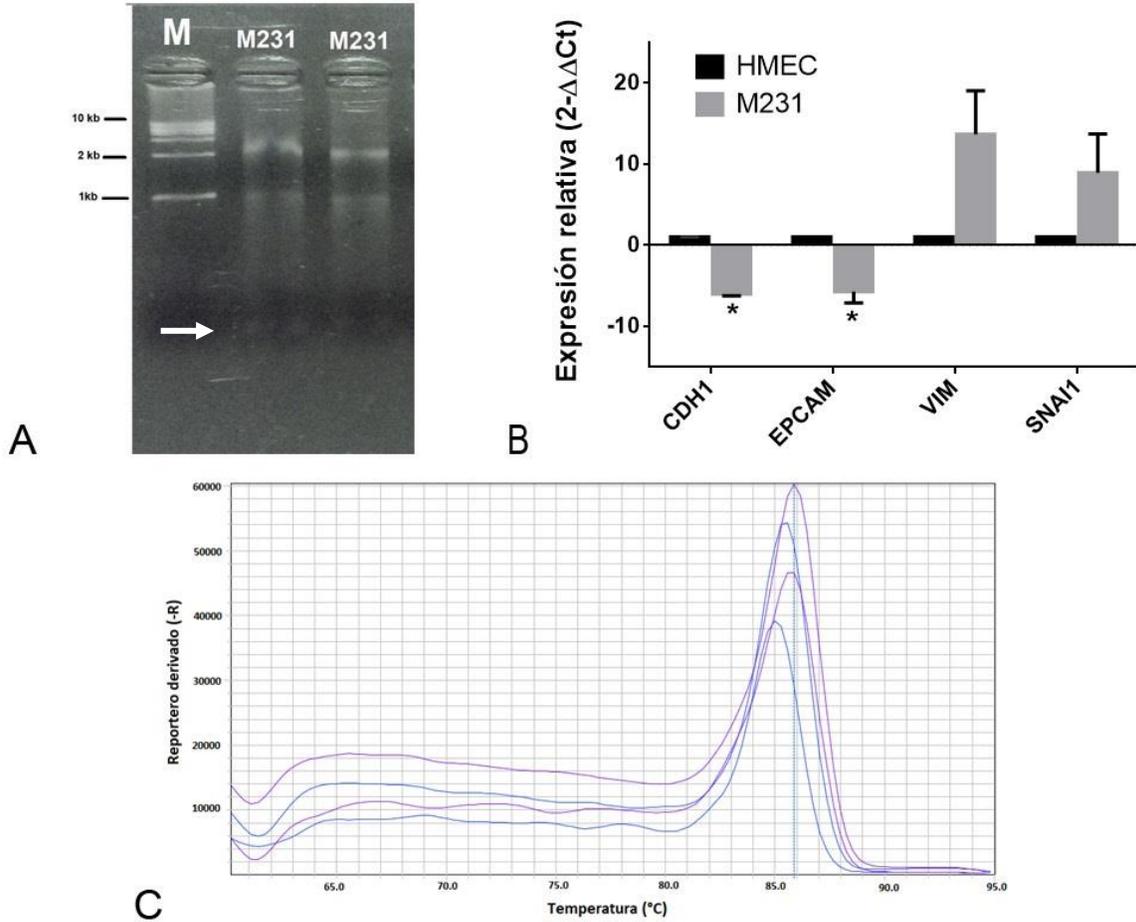
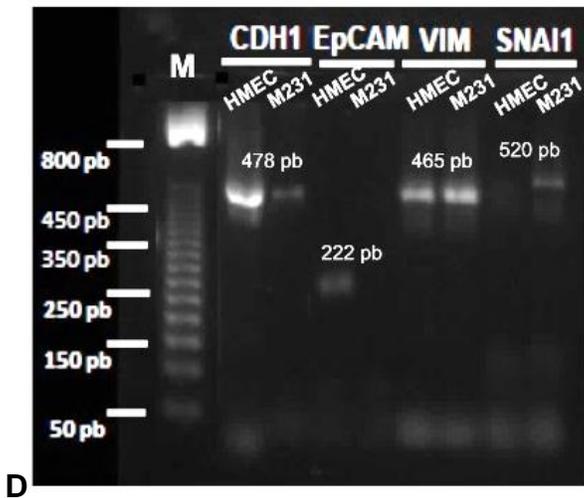


Figura 12. Validación de la línea celular.

A) RNA total: gel de agarosa (1%) en donde se observan íntegras las bandas ribosomales: 18S (~1.5 kb) y 28S (~2.5 kb) y la banda correspondiente a las especies de RNA pequeños (→). (M = Marcador peso molecular 1-10 Kb). **B) qPCR.** Expresión relativa de los marcadores epiteliales (CDH1 y EPCAM) y mesenquimales (VIM Y SNAI1). Se usó el gen GAPDH para normalizar la expresión. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante una *t* de Student (**P* < 0.05). La gráfica se generó con el programa computacional GraphPad Prism V.6. **C) Curva Melt:** cinética de disociación de los fragmentos amplificados. **D) Especificidad de la reacción:** se ge de agarosa (2%) en el que se observa la presencia de un solo amplicón para los marcadores moleculares (M = Marcador peso molecular 50-800 pb).



La expresión de los marcadores epiteliales y mesenquimales coincide con lo reportado en la literatura (21,24,25,48). Esta línea celular se clasifica dentro del subtipo molecular '*claudin-low*', cuyas características principales son la baja expresión de genes involucrados en la adhesión celular, tales como CDH1 y EPCAM; y una alta expresión de marcadores mesenquimales como VIM SNAI1, TWIST1, ZEB2 y CDH2 (21,24,25,48). La expresión de estos marcadores se relaciona con el proceso de la TEM, la cual implica la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales que inducen cambios morfológicos (por ejemplo, la remodelación del citoesqueleto) y la pérdida tanto de la polaridad apical-basal como de la adhesión célula-célula que permite la migración e invasión celular (25,48,49).

La CDH1 es una proteína transmembranal dependiente de calcio que participa en la adhesión célula- célula; la disminución en la expresión de esta proteína es uno de los primeros pasos en la invasión celular, al permitir el desprendimiento de las células del sitio primario y es una marca distintiva de la TEM (24). EPCAM es una glicoproteína transmembranal de tipo I que también participa en la adhesión celular, por lo que la pérdida de su expresión se asocia con una mayor capacidad migratoria de las células (50) su parte, SNAI1 es un factor de transcripción que reprime la expresión de la CDH1 al unirse a su región promotora, por lo que su alta expresión aumenta la motilidad y la invasión celular. Además, SNAI1 se ha implicado en la regulación del ciclo celular, al reprimir la expresión de la ciclina D2 (CCND2) específica de la fase G1/S e inducir al Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A) (48,51). VIM es una

proteína de filamentos intermedios de tipo III y su expresión a la alta se correlaciona con una mayor migración e invasión celular, al regular la migración celular inducida por el represor transcripcional de la familia Snail 2 (SNAI2) y por la GTPasa KRas (Kras) (52). Lo anterior demuestra por qué la línea M231 se considera como altamente invasiva y metastásica.

7.3 Expresión del miR-137

Una vez caracterizada la línea celular y con la finalidad de analizar la expresión del **miR-137**, se realizó una RT-qPCR. Los resultados mostraron que la expresión de este miRNA se encuentra disminuida 3 ± 0.02 veces en las células **M231** en contraste con HMEC (1 ± 0.01) (Figura 13A). El perfil de expresión del **miR-137** es similar a los niveles relativamente bajos observados en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo en el melanoma (53), cáncer de ovario (54) y NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) (7) se observa la mayor disminución de este miRNA (~2.5 veces menos); en el GBM (glioblastoma multiforme) (55) y carcinoma oral de células escamosas (10) la expresión de este miRNA se ha encontrado disminuida ~1.6 veces menos; mientras que la menor reducción en los niveles de expresión del **miR-137** se ha observado en osteosarcoma (9) y cáncer de tiroides (56) (~0.5 veces menos).

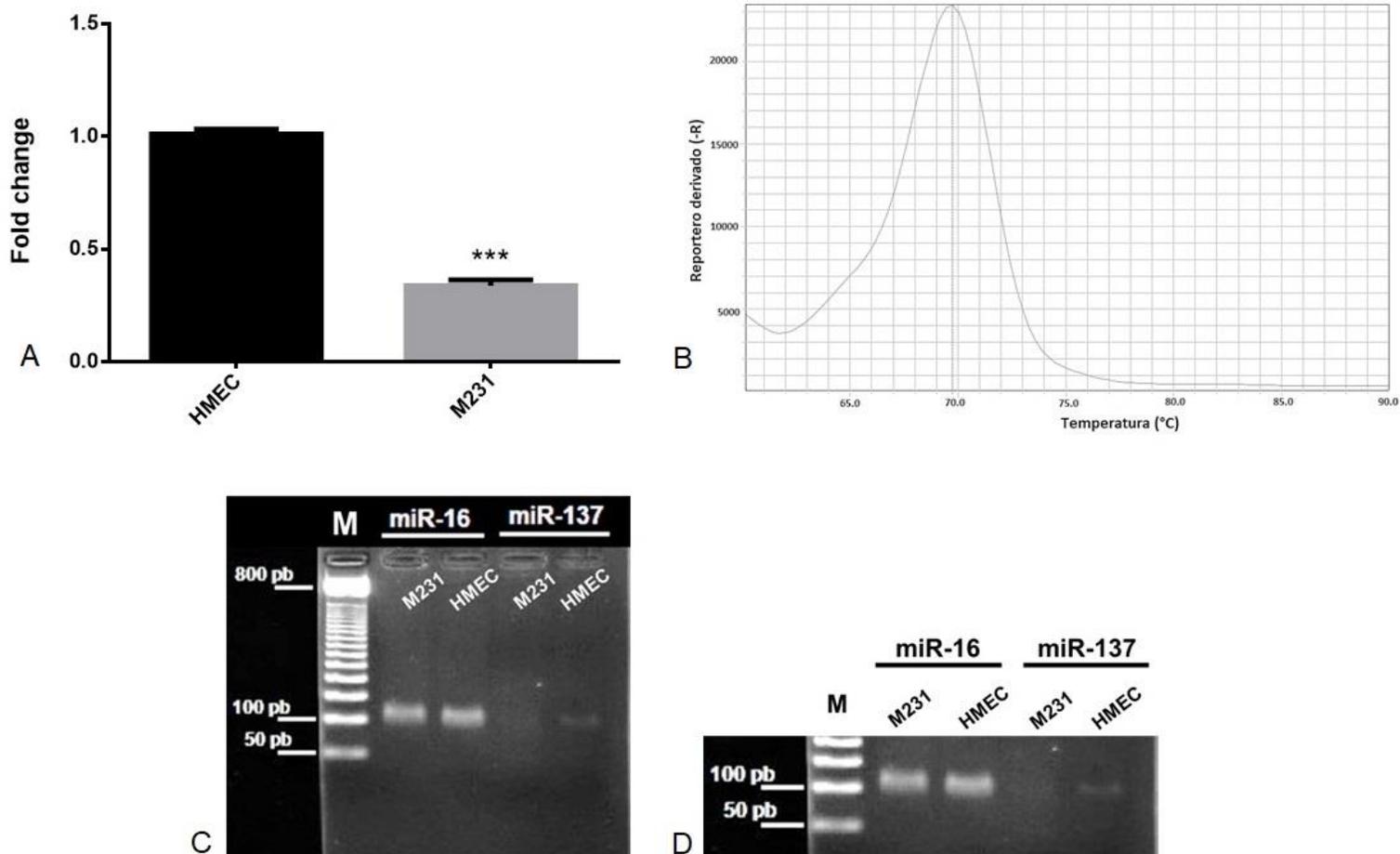


Figura 13. Expresión relativa del miR-137 en las células HMEC y M231. A) qPCR: expresión del **miR-137** en las células **M231**. Se utilizó el **miR-16** para normalizar la expresión. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante una *t* de Student (* $P < 0.05$). La gráfica se generó con el programa computacional GraphPad Prism V.6. **B) Curva Melt. C) Gel de agarosa (2%):** muestra los amplicones obtenidos en las qPCRs de los miRNAs (M= Marcador de peso molecular de 50-800 pb) para ambos miRNAs se observan amplicones de 100 pb de acuerdo con las especificaciones del kit miScript SYBR® Green PCR.

En particular, en el **CaM** se ha observado que la expresión del miR-137 varía de acuerdo con el subtipo molecular en el que se estudie de -3 a -40 veces aproximadamente. Nuestros datos se correlacionaron con los reportados por Zhao *et al* (2012), quienes observaron una baja expresión del miR-137 en varias líneas

celulares de **CaM**, entre ellas la **M231** (~45 veces menos) en comparación con la línea epitelial de glándula mamaria no neoplásica MCF10A (28). Similarmente, otro estudio también encontró una disminución (~25 veces menos) en la expresión de este miRNA en células **M231** (57). En contraste, niveles relativamente altos del **miR-137** (~3 veces más) se detectaron en muestras de tumores mamarios (grado IV) y en las líneas celulares de **CaM** MCF7 (Lumial A) y BT474 (Lumial B) (58), lo cual podría deberse a que en este estudio se usaron los tejidos adyacentes como tejidos control para hacer la comparación del nivel de expresión del miRNA. En conjunto, estos datos indican que los niveles de expresión del **miR-137** varían de acuerdo con el subtipo molecular de **CaM** en estudio, y en particular, en el subtipo '*claudin-low*' este miRNA se encuentra disminuido.

7.4 Expresión de BIK

Debido a que se demostró que **BIK** se une al **miR-137**, a nivel de su secuencia genómica (2), se esperaría que un cambio en la expresión de BIK indujera cambios en la expresión de este miRNA. Los resultados de la qPCR mostraron que en comparación con HMEC, la expresión relativa de **BIK** se encuentra ligeramente aumentada en las células **M231** (0.66 ± 0.13 veces) (Figura 14A). De acuerdo con la literatura, la expresión de **BIK** está a la alta en muestras de adenocarcinomas ductales de **CaM** (40) y en diferentes líneas celulares, como M231 y MCF7 (1). En el 2016, un trabajo encontró que el incremento en la expresión de BIK, en muestras de pacientes, se asoció con un mal pronóstico de la enfermedad, lo que sugiere una probable actividad de BIK como promotor de

tumores al inducir la autofagia (42). La localización nuclear de **BIK** y su interacción física con el genoma de las células **M231** sugiere fuertemente que **BIK** tiene otras funciones además de actuar como regulador de la apoptosis. Particularmente, su interacción con la región promotora del **miR-137** sugiere que **BIK** regula la expresión de este miRNA, al actuar como un factor de transcripción y a su vez, esto podría asociarse con la malignidad de las células **M231**. Esto indica que **BIK** podría tener funciones oncogénicas en el **CaM**, a pesar de ser descrito como supresor de tumores en otros tipos de cáncer (38,39).

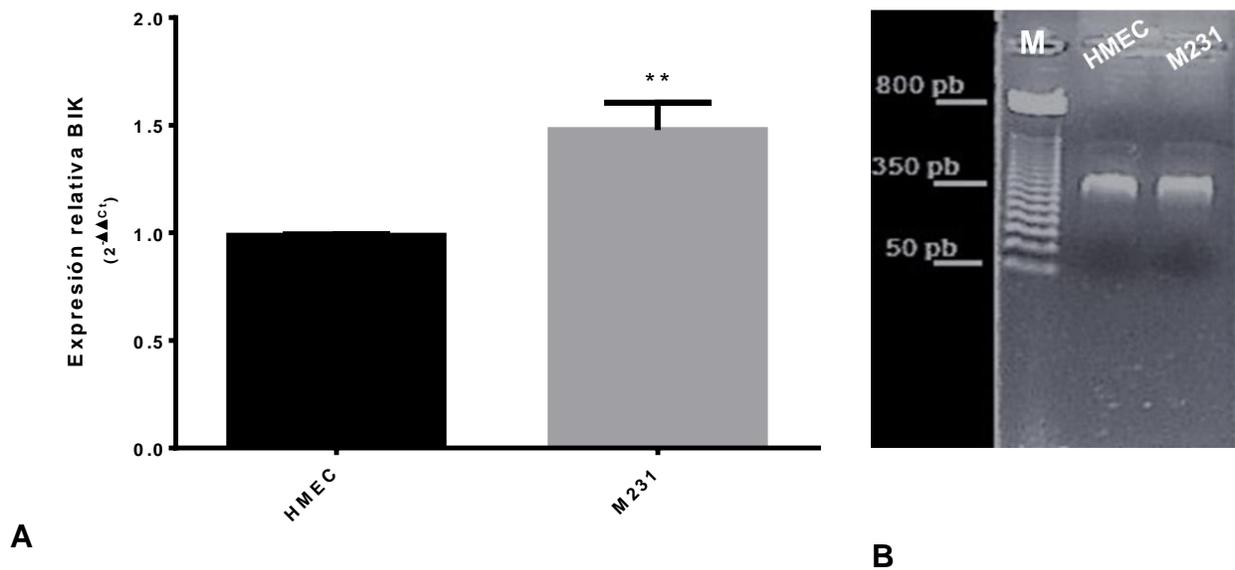


Figura 14. Expresión relativa de BIK en las células HMEC y M231. A) Se utilizó el gen GAPDH para normalizar la expresión de BIK. Se muestra la media \pm SEM de 6 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante una *t* de Student (**P* < 0.05). La gráfica se generó con el programa computacional GraphPad Prism V.6. **B)** Gel de agarosa (2%) que muestra los amplicones obtenidos en las qPCRs de los miRNAs (M= Marcador de peso molecular de 50-800 pb): se observa un solo amplicón lo que indica que la reacción fue específica.

7.5 Predicción de las vías biológicas reguladas por el miR-137

Con la finalidad de analizar las vías biológicas potencialmente reguladas por el miR-137, se utilizó el software DIANA-miRPath v.3, el cual utiliza las herramientas TarBase v7.0 (analiza los genes validados), micro-TDS v5.0 (genes predichos) y TargetScan (genes predichos) para identificar los genes blanco y KEGG (Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas) para conocer las vías en las que están involucrados los genes regulados por el miRNA. Las Tablas 4 y 5, muestran respectivamente el número de genes identificados con cada una de las herramientas y las vías biológicas enriquecidas con los genes blanco que están validados para el miR-137. Todos los genes blanco validados se describen en el ANEXO 1.

Tabla 4. Número de genes predichos y validados para el miR-137

Herramienta	# genes
TarBase (validados)	336
Micro-TDS (predichos)	1530
TargetScan (predichos)	908

Tabla 5. Vías en las que participan los blancos validados del miR-137

KEGG pathway	Valor p	# de genes
Vía de señalización Hippo	0.0001535201220	9
Interacción de los receptores de la Matriz Extracelular (ECM)	0.0004011268832	5

**Datos obtenidos con el programa TarBase*

Con el objetivo de tener un poder de predicción más alto, se identificaron las vías potencialmente reguladas por este miRNA, a partir de los genes validados y predichos, utilizando las herramientas Tarbase, micro-TDS y TargetScan (Tabla 6; Figuras 15 y 16). Para ver todas las vías, ir al ANEXO 2.

Tabla 6. Análisis de las posibles vías reguladas por el miR-137,

KEGG pathway	Valor p	# de genes
Vía de señalización MAPK	0.00978078453869	46
Vías que regulan pluripotencia en células troncales	0.00978078453869	25
Vía de señalización ErbB	0.0100563980343	20
Vía de señalización de la hormona tiroidea	0.0100563980343	23
Vía de señalización Hippo	0.0142207521344	26
Vía de señalización de la oxitocina	0.0142207521344	29
Vía de señalización del calcio	0.0160605828591	33
Uniones adherentes	0.0160605828591	16
Vía de señalización cAMP	0.0436427752089	36
Adhesión focal	0.0436427752089	37

**Datos obtenidos utilizando las herramientas Tarbase, micro-TDS y TargetScan*

De acuerdo con lo obtenido con el software DIANA-miRPath (Tablas 5 y 6; Figuras 15 y 16), se puede observar que los genes potencialmente regulados por el miR-137 participan en vías de señalización tales como de las MAPK (Proteínas Cinasas dependientes de mitógenos), ErbB (Receptor tirosina-cinasa Erb-B), Hippo, (proteína cinasa Hippo) y cAMP (adenosín monofosfato cíclico), así como vías relacionadas con pluripotencia. Modificaciones en cualquiera de estas vías podrían alterar procesos celulares tales como el ciclo celular, la supervivencia, la adhesión celular, la pluripotencia, la proliferación y la apoptosis.

La vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) regula importantes procesos celulares, tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, supervivencia, inflamación, autofagia e inmunidad (59–61).

Esta cascada de señalización puede ser activada por citocinas, factores de crecimiento y/o moléculas de la matriz extracelular. Está compuesta por proteínas cinasas serina-treonina que al ser activadas fosforilan diferentes proteínas (incluyendo factores de transcripción) que determinan la respuesta celular (61).

La activación aberrante de esta vía representa un evento oncogénico de gran importancia en el desarrollo y progresión de múltiples tipos de cáncer (59). Mutaciones o cambios en la expresión de los reguladores río arriba y río abajo son frecuentes. Por ejemplo, la ruta RAS-MAPK se encuentra alterada en el 67% de los casos de leucemia linfoblástica aguda de precursores de células T(T-ALL); además en diferentes tipos de cáncer de mama se ha observado la activación aberrante de la ruta RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK (62).

Múltiples estudios han demostrado que algunos miRNAs tienen como blanco miembros de la vía de señalización MAPK (59), por lo tanto, la desregulación de dichos miRNAs en el cáncer podría conducir a la activación aberrante de la señalización MAPK contribuyendo así al proceso de tumorigénesis. En este trabajo se identificaron posibles genes blanco del **miR-137**, involucrados en esta vía de señalización (Figura 15). Por lo tanto, estudiar más a fondo la participación del **miR-137** en la regulación de la vía de las MAPK, en la línea **M231**, resulta importante para determinar si este miRNA está involucrado en la malignidad de estas células.

Las células trocales cancerosas (CSC) son un pequeño grupo de células con la capacidad de autorrenovarse y producir células cancerosas diferenciadas (63,64). Lo que diferencia a las CSC de las células troncales embrionarias (ESC), es que las primeras pierden el control de la replicación y la diferenciación lo que lleva a la tumorigénesis (64). Las CSC son las encargadas de iniciar y sostener el crecimiento tumoral así como de llevar a cabo el proceso de metástasis (65).

Los factores de transcripción y las vías de señalización que regulan la troncalidad de las ESC desempeñan también papeles importantes en el mantenimiento de las CSC (66). Entre los factores de transcripción más importantes se encuentran Sox2 (Caja SYR 2) cuya expresión desregulada ha sido observada en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, en tumores cerebrales, cáncer de pulmón, colón y mama (63); Klf4 (Factor similar a Kruppel 4) cuyos genes blanco están implicados en el control del ciclo celular y que dependiendo del tipo de cáncer actúa como supresor tumoral (cáncer gástrico y de colón) o como oncogen (cáncer de mama y de piel) (63); y Nanog (Caja homeótica Nanog) relacionado con los procesos de renovación, proliferación y pluripotencia. Mientras que las vías principales de pluripotencia son JAK/STAT, Wnt/ β -catenina y la vía Sonic Hedgehog (Shh).

En CSC hepáticas se ha observado que la baja expresión del miR-137 se relaciona con la mayor formación de esferas y el aumento de la expresión de marcadores relacionados con las células troncales cancerosas (CD133, CD44 y EpCAM) (66). En este estudio se encontró que algunos de los genes que participan en vías relacionadas con la pluripotencia, fueron predichos como blancos potenciales del **miR-137** (Figura 16). Tomando en cuenta el estudio en

CSC hepáticas y los resultados del análisis bioinformático aquí realizado, la determinación del papel del **miR-137** en el mantenimiento de la pluripotencia en células de cáncer de mama podría ayudar a tener mejor información acerca del origen y progresión tumoral.

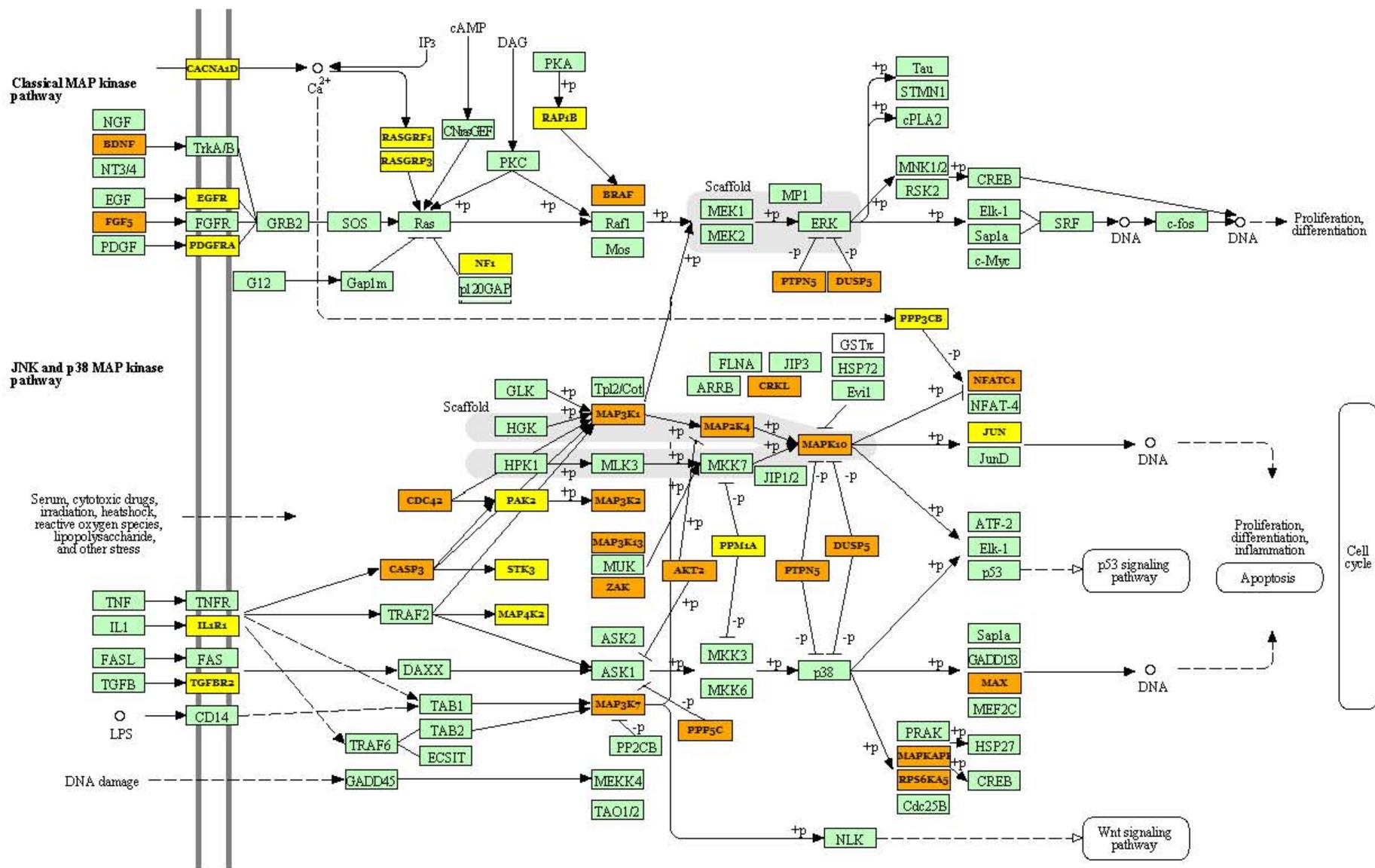


Figura 15. Vía de señalización MAPK (PATHWAY: hsa04010, DIANA-miRPath v.3)

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que las células **M231**, usadas en la realización del presente estudio, expresan los marcadores moleculares distintivos de esta línea celular.

En cuanto a la expresión del **miR-137**, se determinó que esta se encuentra disminuida en la línea celular **M231** en comparación con la línea no neoplásica HMEC, y que la expresión de **BIK** se encuentra aumentada en **M231** en contraste con HMEC.

También, se encontró que el **miR-137** podría estar asociado con cambios en la vía de las MAPK y en vías relacionadas con el control de la pluripotencia, al potencialmente regular genes clave de ambas vías, lo cual parece indicar que la disminución del **miR-137** podría estar participando en la malignidad de la línea **M231**, al permitir la activación aberrante de las vías de señalización mencionadas, las cuales tienen un papel importante en el control del ciclo celular.

Por último, aún debe demostrarse la posible función de **BIK** como factor de transcripción que participa en la regulación del **miR-137**.

9. PERSPECTIVAS

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se espera en el futuro:

- Hacer un knock out de **BIK** mediante el sistema CRISPR/CAS9, para generar un cultivo de células **M231 BIK (-/-)**.
- Identificar si la eliminación de **BIK** altera los niveles del **miR-137**.
- Determinar los blancos directos del **miR-137** en la línea **M231** (en nuestras condiciones de cultivo).
- Realizar estudios funcionales para comprobar la participación del **miR-137** en las diferentes vías biológicas predichas.

10. LITERATURA CITADA

1. Martínez-Damas MG. Determinación de la expresión proteica de BIK en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7. No Title. Instituto Politécnico Nacional; 2012.
2. Ruiz Esparza-Garrido R, Ayala K, Rodríguez-Corona JM, Velázquez-Flores MÁ. Accurate Identification of BIK Binding Sites at the MDA-MB-231 Cell Genome by Human Tiling Arrays. *Cancer Biol Ther Oncol*. 2018;2(1):1–10.
3. Lu J, Getz G, Miska EA, Verez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834–8.
4. Iorio M V., Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065–70.
5. Chang X, Zhang H, Lian S, Zhu W. miR-137 suppresses tumor growth of malignant melanoma by targeting aurora kinase A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;475(3):251–6.
6. Li X, Chen W, Zeng W, Wan C, Duan S, Jiang S. microRNA-137 promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the regulation of XIAP. *Br J Cancer*. 2017;116(1):66–76.
7. Chen R, Zhang Y, Zhang C, Wu H, Yang S. miR-137 inhibits the proliferation of human non-small cell lung cancer cells by targeting SRC3. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3905–11.
8. Du Y, Chen Y, Wang F, Gu L. miR-137 plays tumor suppressor roles in gastric cancer cell lines by targeting KLF12 and MYO1C. *Tumour Biol*. 2016;37(10):13557–69.
9. Feng Q, Wu Q, Liu X, Xiong Y, Li H. MicroRNA-137 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):3167–74.

10. Sun L, Liang J, Wang Q, Li Z, Du Y, Xu X. MicroRNA-137 suppresses tongue squamous carcinoma cell proliferation, migration and invasion. *Cell Prolif.* 2016;49(5):628–35.
11. Klug WS, Cummings MR. *Conceptos de Genética*. 8°. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN; 2006. 502-521 p.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
13. Society AC. *Global Cancer Facts & Figures*. 3°. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
14. IARC. Globocan [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 20]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>
15. Sistema Nacional de Informacion en Salud. Principales causas de mortalidad en mujeres. INEGI [Internet]. 2014;2050. Available from: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
16. INEGI. Estadísticas a Propósito Del Día Mundial De La Lucha Contra El Cáncer De Mama. Inegi. 2015;1–14.
17. Salud S de. Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 20]. Available from: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
18. Torrades S. El origen genético del cáncer de mama. *Offarm.* 2003;22(6):108–12.
19. Daum H, Peretz T, Laufer N. BRCA mutations and reproduction. *Fertil Steril.* 2018;109(1):33–8.
20. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, Cantú D, et al. Full-Exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS One.* 2012;7(5).
21. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast*

- Cancer Res. 2011;215(13):1–7.
22. Santagata S, Thakkar A. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J Clin Invest*. 2014;124(2).
 23. Perou CM. Molecular stratification of Triple negative breast cancer. *The on*. 2010;15(suppl 5):39–48.
 24. Cahall CF, Lilly JL, Hirschowitz EA, Berron BJ. A Quantitative Perspective on Surface Marker Selection for the Isolation of Functional Tumor Cells. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9(Suppl 1):1–11.
 25. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5).
 26. Cailleau R, Young R, M O, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53:661–74.
 27. Kathryn JC, Sireesha V G, Stanley L. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*. 2012;32:35–48.
 28. Zhao Y, Li Y, Lou G, Zhao L, Xu Z, Zhang Y, et al. MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(6).
 29. American Type Culture Collection. MDA-MB-231 [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 27]. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#generalinformation>
 30. Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2006;15(3):701–7.
 31. Verma S, Zhao LJ, Chinnadurai G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: Mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4671–6.

32. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009;122(4):437–41.
33. Gutiérrez-santana JC, García-casillas G, Toscano-garibay JD. Participación de la proteína BIK en los procesos apoptóticos. *Rev Hosp Jua Mex.* 2014;81(4):239–44.
34. Viedma-Rodríguez R, Baiza-Gutman LA, García-Carranca A, Moreno-Fierros L, Salamanca-Gómez F, Arenas-Aranda D. Suppression of the death gene BIK is a critical factor for resistance to tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2013;43(6):1777–86.
35. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008;27(Suppl 1):1–31.
36. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Genetics.* 2007;26(9):1324–37.
37. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK-the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene.* 2008;27(Suppl 1(1):S20–S29.
38. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, et al. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ.* 2006;13(4):619–27.
39. Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosom Cancer.* 2003;38(1):91–6.
40. García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Peñaloza R, et al. A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer.* 2005;5(93):1–11.
41. Ruiz Esparza-Garrido R, Torres-Márquez ME, Viedma-Rodríguez R, Velázquez-Wong AC, Salamanca-Gómez F, Rosas-Vargas H, et al. Breast cancer cell line MDA-MB-231 miRNA profile expression after BIK interference: BIK involvement in autophagy. *Tumor Biol.* 2016;37(5):6749–59.

42. Pandya V, Glubrecht D, Vos L, Hanson J, Mackey J, Hugh J, et al. The pro-apoptotic paradox: the BH3-only protein Bcl-2 interacting killer (Bik) is prognostic for unfavorable outcomes in breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(22).
43. Trejo-Vargas A, Hernández-Mercado E, Ordóñez-Razo RM, Lazzarini R, Arenas-Aranda DJ, Gutiérrez-Ruiz MC, et al. Bik subcellular localization in response to oxidative stress induced by chemotherapy, in Two different breast cancer cell lines and a Non-tumorigenic epithelial cell line. *J Appl Toxicol*. 2015;35(11):1262–70.
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
45. Hao C, Wei S, Tong Z, Li S, Shi Y, Wang X, et al. The effects of RKIP gene expression on the biological characteristics of human triple-negative breast cancer cells in vitro. *Tumour Biol*. 2012;33(4):1159–67.
46. Birch JR, Cartwright T. Environmental Factors Influencing the Growth of Animal Cells in Culture. *J Chem Tech Biotechnol*. 1982;32:313–7.
47. Ivers LP, Cummings B, Owolabi F, Welzel K, Klinger R, Saitoh S, et al. Dynamic and influential interaction of cancer cells with normal epithelial cells in 3D culture. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):108.
48. Wei Z, Shan Z, Shaikh ZA. Epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells treated with cadmium and the role of Snail. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;344:46–55.
49. Mendez MG, Kojima S-I, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010 Jun;24(6):1838–51.
50. Herreros-Pomares A, Aguilar-Gallardo C, Calabuig-Fariñas S, Sirera R, Jantus-Lewintre E, Camps C. EpCAM duality becomes this molecule in a new Dr. Jekyll and Mr. Hyde tale. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;126(March):52–63.
51. Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, Fabra A, Portillo F, Cano A. SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma

- MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* 2007;67(24):11721–31.
52. Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(18):3033–46.
 53. Luo C, Tetteh PW, Merz PR, Dickes E, Abukiwan A, Hotz-Wagenblatt A, et al. miR-137 Inhibits the Invasion of Melanoma Cells through Downregulation of Multiple Oncogenic Target Genes. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):768–75.
 54. Dong P, Xiong Y, Watari H, Hanley SJB, Konno Y, Ihira K, et al. MiR-137 and miR-34a directly target Snail and inhibit EMT, invasion and sphere-forming ability of ovarian cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(132):1–9.
 55. Li H, Li Y, Li Y, Shi X, Chen H. Circulating microRNA-137 is a potential biomarker for human glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20:3599–604.
 56. Luo Y, Li X, Dong J, Sun W. microRNA-137 is downregulated in thyroid cancer and inhibits proliferation and invasion by targeting EGFR. *Tumor Biol.* 2016;37(6):7749–55.
 57. Denis H, Van Grembergen O, Delatte B, Dedeurwaerder S, Putmans P, Calonne E, et al. MicroRNAs regulate KDM5 histone demethylases in breast cancer cells. *Mol BioSyst.* 2016;12(2):404–13.
 58. Ying X, Sun Y, He P. MicroRNA-137 inhibits BMP7 to enhance the mesenchymal transition of breast cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(11):18348–58.
 59. Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget.* 2016;7(25):38892–907.
 60. Peluso I, Yarla NS, Ambra R, Pastore G, Perry G. MAPK signalling pathway in cancers: Olive products as cancer preventive and therapeutic agents. *Semin Cancer Biol.* 2017;
 61. Kim EK, Choi E-J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89(6):867–82.

62. Lei Y-Y, Wang W-J, Mei J-H, Wang C-L. Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(20):8539–48.
63. Vlashi E, Pajonk F. Cancer Stem Cells, Cancer Cell Plasticity and Radiation Therapy. *Semin Cancer Biol.* 2015;28–35.
64. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol.* 2018;71(2):110–6.
65. Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2007;3(1):7–17.
66. Zhao J, Fu Y, Wu J, Li J, Huang G, Qin L. The Diverse Mechanisms of miRNAs and lncRNAs in the Maintenance of Liver Cancer Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2018;1–9.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Lista de los genes blanco validados para el miR-137 (TarBase)

Genes

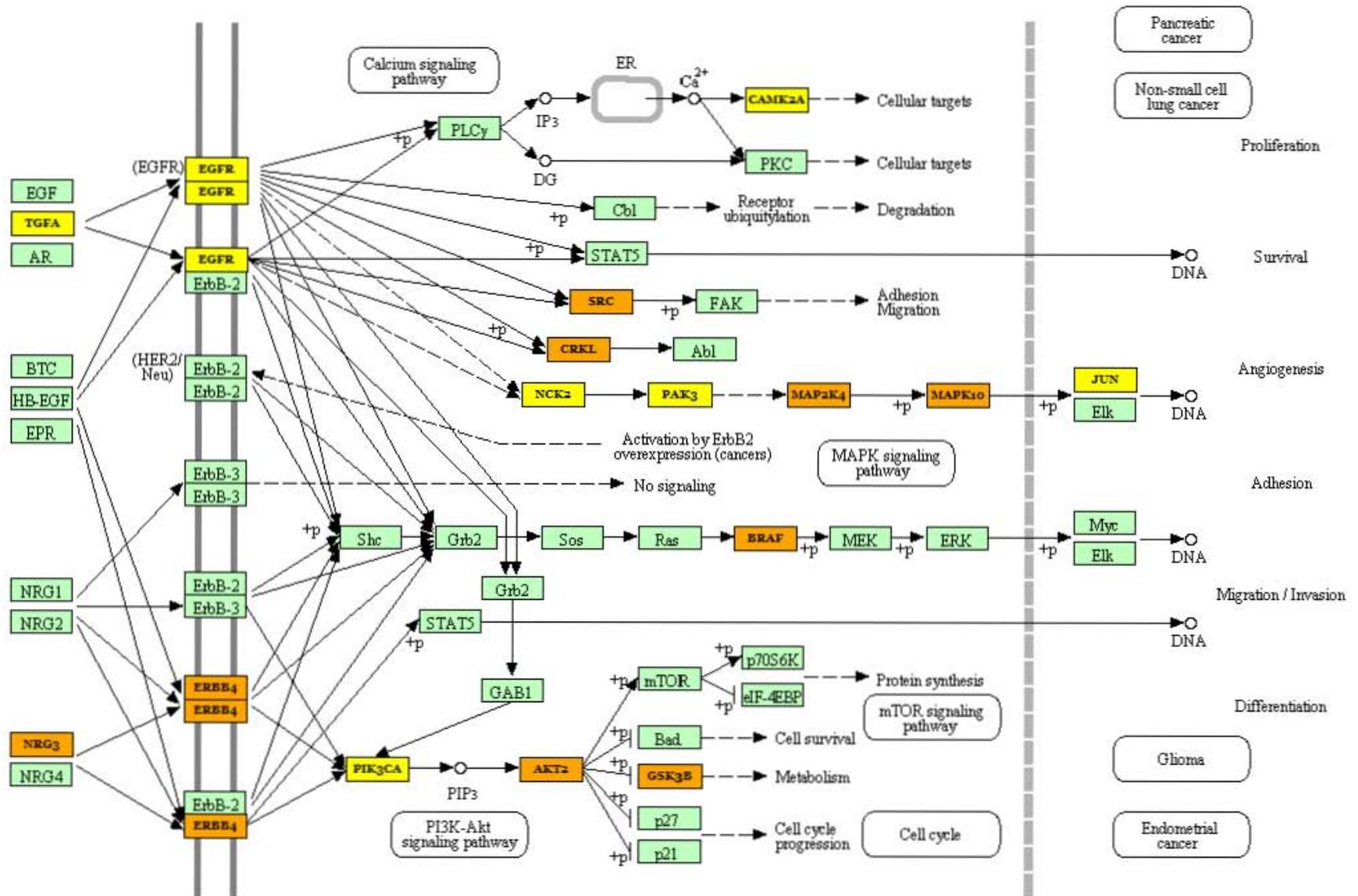
ARPC5	FBXO42	FSTL1	LRRC58	WNT11	SHH
PIK3C3	PDZD2	HERC1	ADM	RPS27L	CLSTN1
RPA1	SEC23A	PHF10	TCEAL4	ZNF700	IRAK1
IRS2	MCL1	ZNF770	SMCHD1	GAR1	NFIC
BRAF	DNAJB11	CANX	CSNK1A1	RANBP2	SOX2
PRLR	PNPLA6	PDS5A	CEBPA	SP1	BMP7
PAQR3	AKAP9	ABI3BP	SRPK1	SSR3	CTPS1
DARS2	MAP4	VPS13A	UQCRC2	FNIP1	RAD17
HIPK2	SNRK	CCT6A	UBE3C	SLC20A1	MAP3K7
ESYT1	HAND1	NAB1	SON	ZNF414	ITPR2
MFAP3	GOLGA8B	SOX21	MARCH8	FAM160B1	TET2
NFIX	STXBP5	CUL4A	PPM1A	AMOTL2	PCGF3
ATG7	MKRN2	TNRC6B	PALB2	PPARG	SLC40A1
UBE2Z	GPR180	PROX1	USP46	TMEM245	GOLGA3
G3BP1	PSPC1	STK39	PRKCSH	TP53BP1	PDHB
MASTL	RPL37	FAM20C	COL5A1	ATXN7L3B	GDPD1
FAM167A	ITGA5	GRN	MSH2	SELPLG	PFKFB4
ADAMTS5	ADO	AZIN1	CTSZ	PRPF4	MYL12A
EMP1	CCDC28A	LCAT	E2F6	MRPS6	CDC42EP2
EXT1	BCL11A	RYK	TFRC	UBE2G2	ENTPD7
LRP6	TNFRSF11A	RIOK2	SRPR	H3F3B	KPNB1
SMC1A	SELT	HECTD1	CEP350	ESRRA	PSMC1
UBP1	OSER1	FAM217B	ATRX	ZFR	SPOPL
RRAGD	DDX6	LAPTM4A	CSGALNACT1	HNRNPH1	SECISBP2L
UEVLD	MTIF2	ABCD3	TMEM131	CCNE1	TGFBR2
MED13L	RAB2A	AKT2	SNAPC4	NANOG	SLC1A5
UBE2Q2	IBTK	ARHGAP35	EIF4G1	CENPJ	EIF1
YAP1	NA	C9orf41	MIA3	GLIPR1	RAB14
GCLC	MARCH9	NPM1	TRIM33	PAPD7	ADRB1
FUS	MCFD2	PTGES2	TUBE1	PCMTD1	SGK1
FAM126B	MYO1C	ETNK1	PTGS2	LEPREL2	PSMB6

FABP4	MAN2A1	ITGAV	HECA	DNAJB12	MDM2
USP36	RNF217	ZNF385A	NCOA2	UPF2	SSR4
CBX2	USF2	ZFYVE16	CFL2	GOLGB1	RPL18
PPP1R9A	SETD5	TRAK2	BAZ2A	NSF	NT5DC1
MAST4	PPCS	CSE1L	MARCKSL1	TULP4	HOXC8
CENPT	FMR1	PMAIP1	NRP1	COG3	MYO1B
SIK3	PABPC4	OSBPL2	TMPO	UHMK1	PLS3
GRK5	TARDBP	KIAA1432	FXR1	TNRC6A	COQ7
MTHFD2	SMIM4	SMC4	DCUN1D3	BCMO1	ACO2
YWHAE	CLTC	SFXN1	JAZF1	OXR1	COL4A1
BTBD1	NOTCH2	SENP2	DDX5	RASAL2	DGKH
DENND4B	GLS	PIKFYVE	CUX1	ZBTB18	SNAP29
CALM3	LOX	RUNX1T1	XRN1	SNX6	PPP1CB
ZMYM4	TIMP2	AGO1	H3F3C	ALG13	FNIP2
COL12A1	ASPH	NECAP1	C6orf62	SLX4	ASAP2
THBS1	GRAMD3	PKP4	CDC42	PARD3	MEX3C
PTRF	CD2AP	BTG2	PMPCB	ATP2A2	ZCCHC3
ZNF267	RAB1A	CASP3	TMEM222	PAFAH1B2	NEFL
DBN1	SLC30A7	RNF4	IPO5	RPL35	OTUD7B
PRRC2B	HNRNPU	SSFA2	SCO1	ARHGEF7	GREM1
GAPDH	VLDLR	SBNO1	KCNC4	PLEKHA6	MOB1A
CTBP1	ZKSCAN8	GIGYF2	RPL28	ADK	ZC3H11A
KCNQ5	CDK6	NONO	CYSLTR1	AIMP2	AXL
YIPF6	KIF23	POU5F1	CCDC88A	CTDSPL2	PDIA6
VAC14	HEY2	SLC35C1	KCNK1	LEPROT	PITPNA

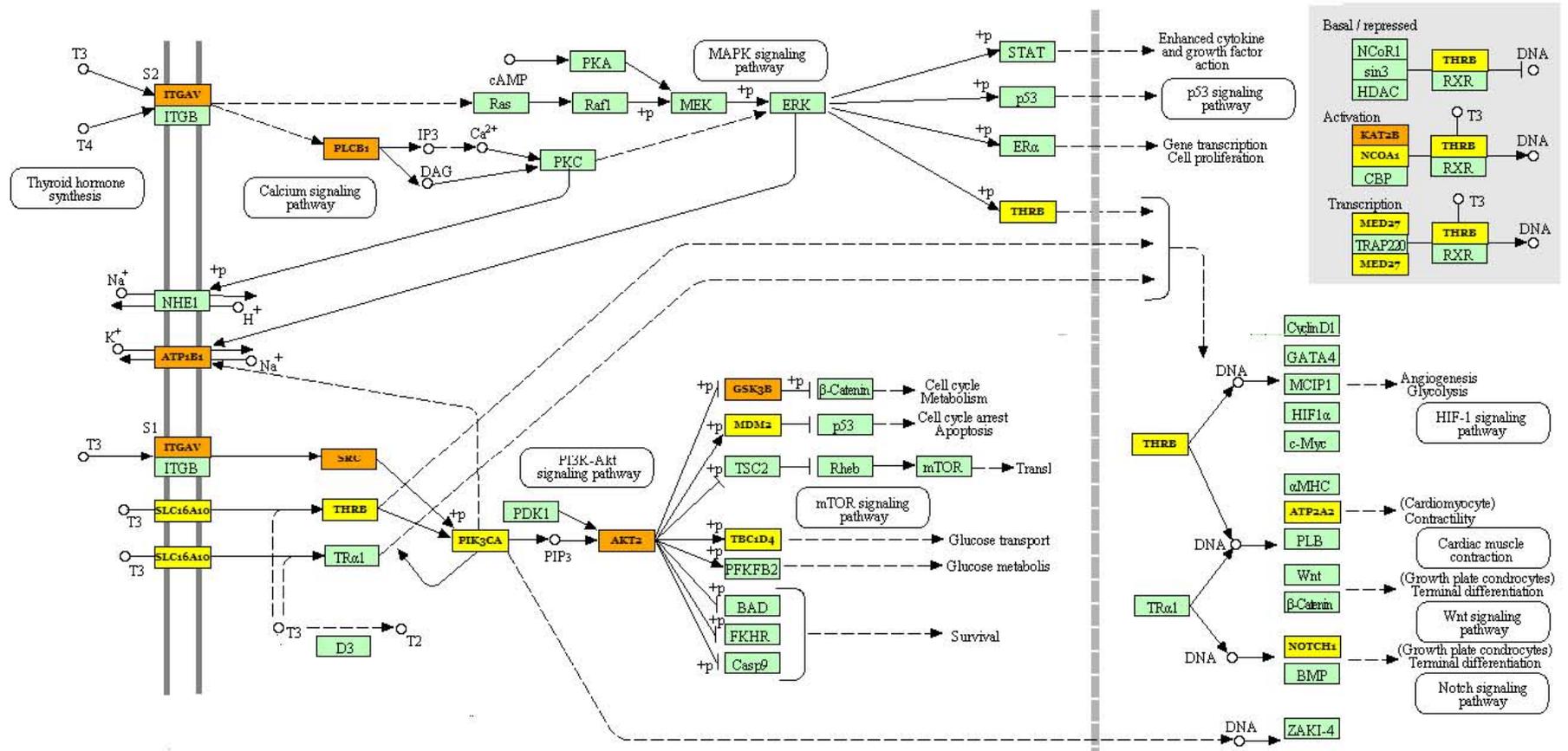
ANEXO 2. Vías biológicas potencialmente reguladas por el miR-137

A continuación, se presentan las esquematizaciones de las vías predichas para el miR-137 así como los genes que potencialmente regula. En amarillo se observan los genes que contenidos en una lista y en rojo los que se encuentran en más de dos listas.

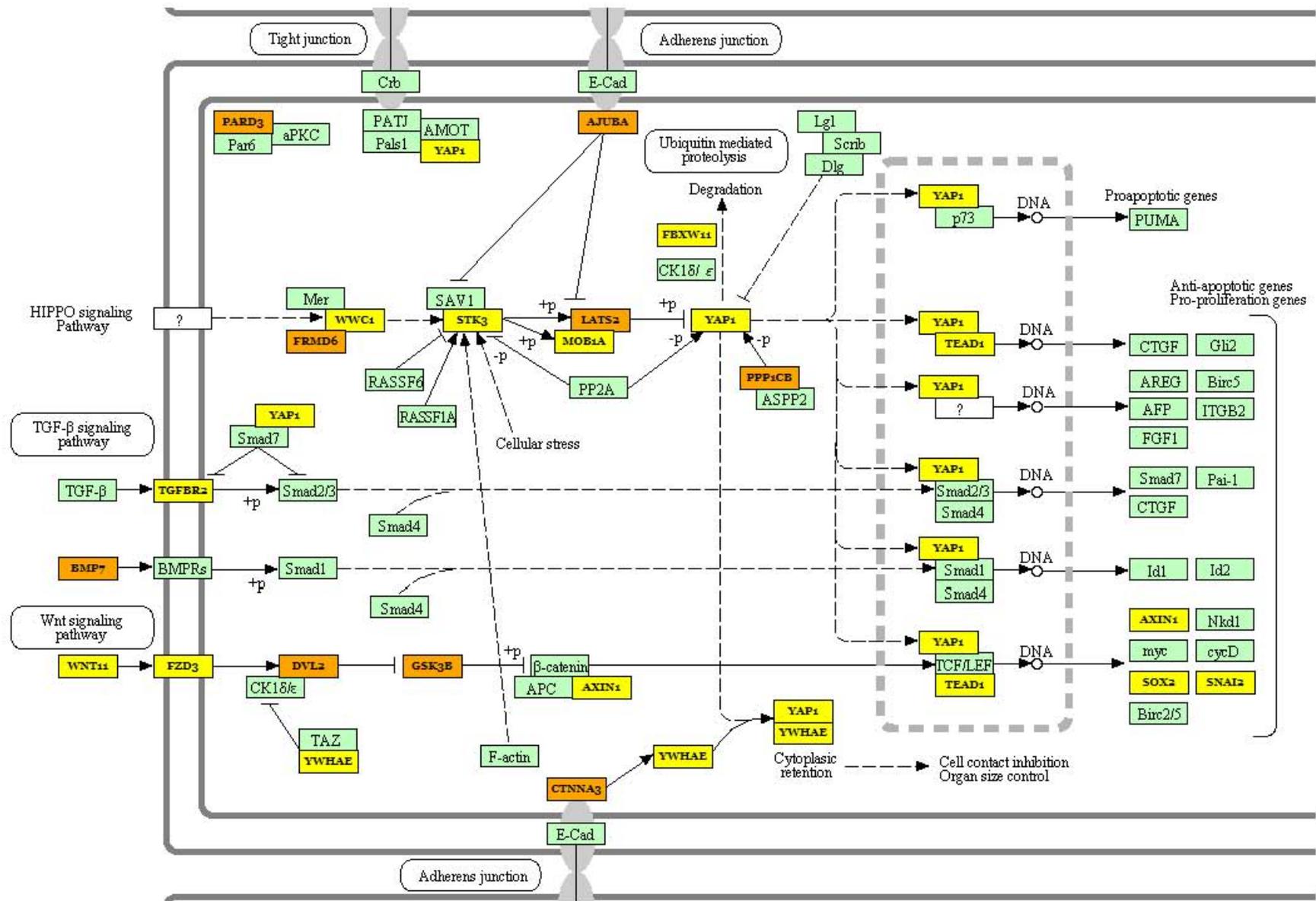
Vía de señalización ErbB



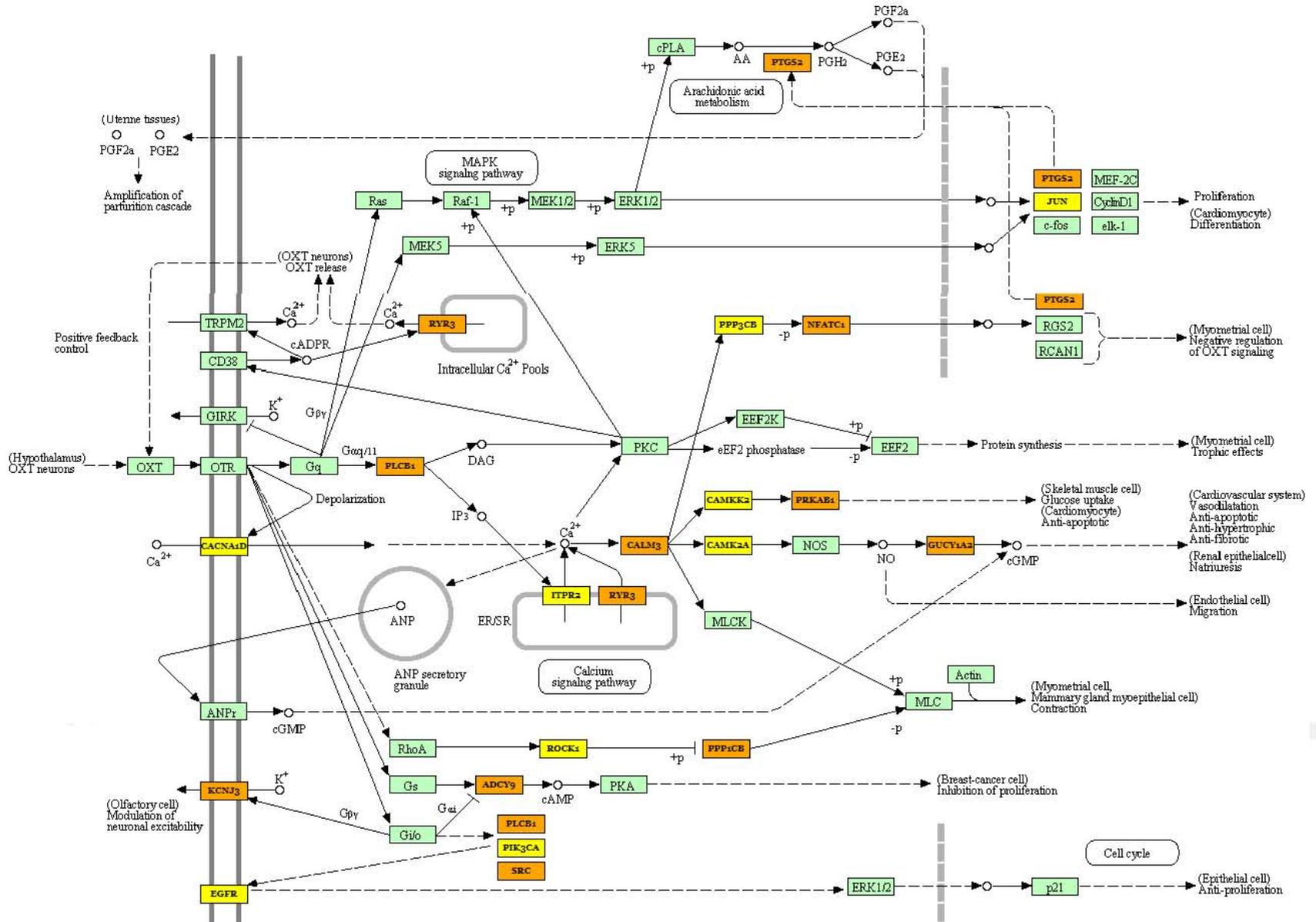
Vía de señalización de la hormona tiroidea



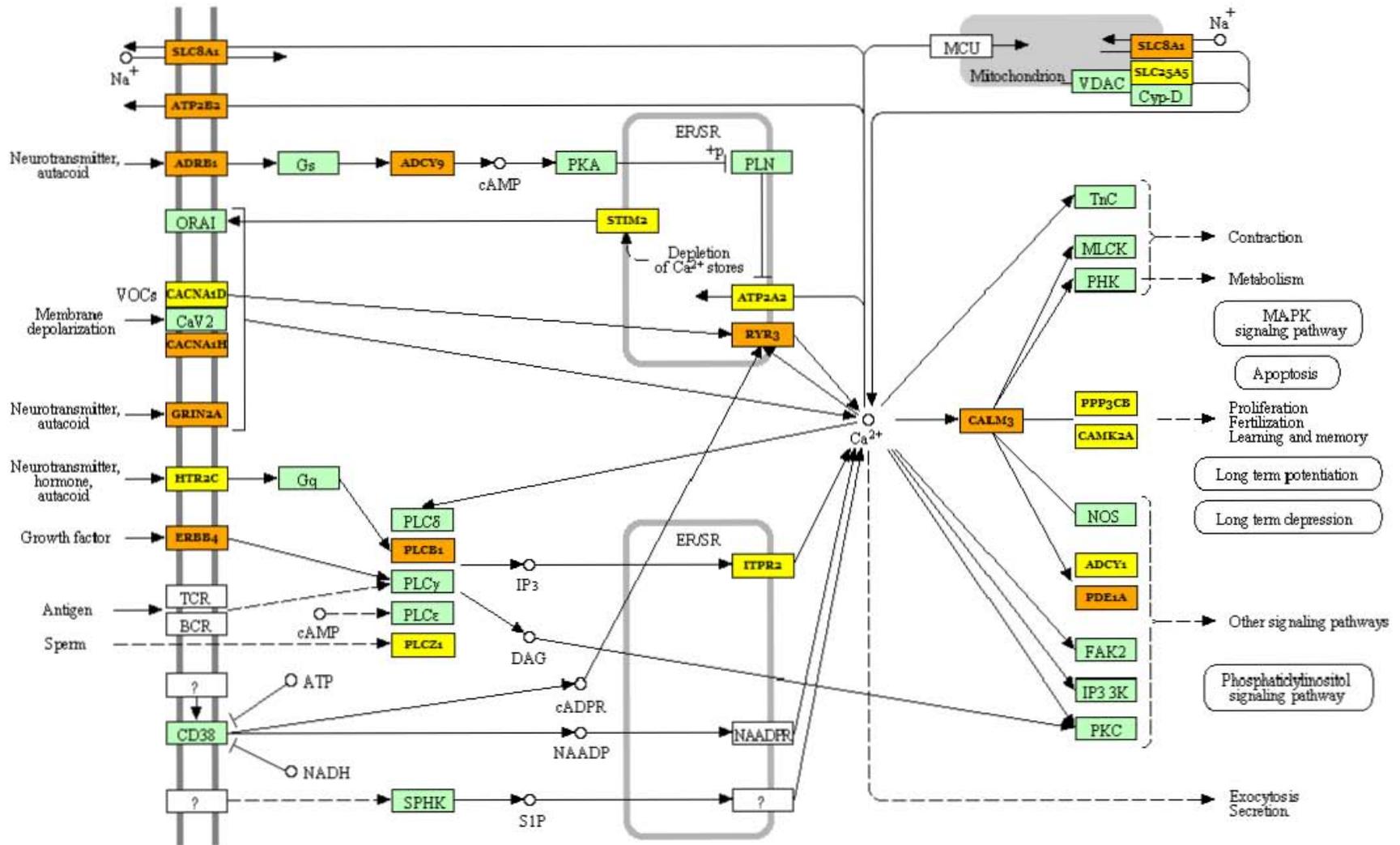
Vía de señalización Hippo



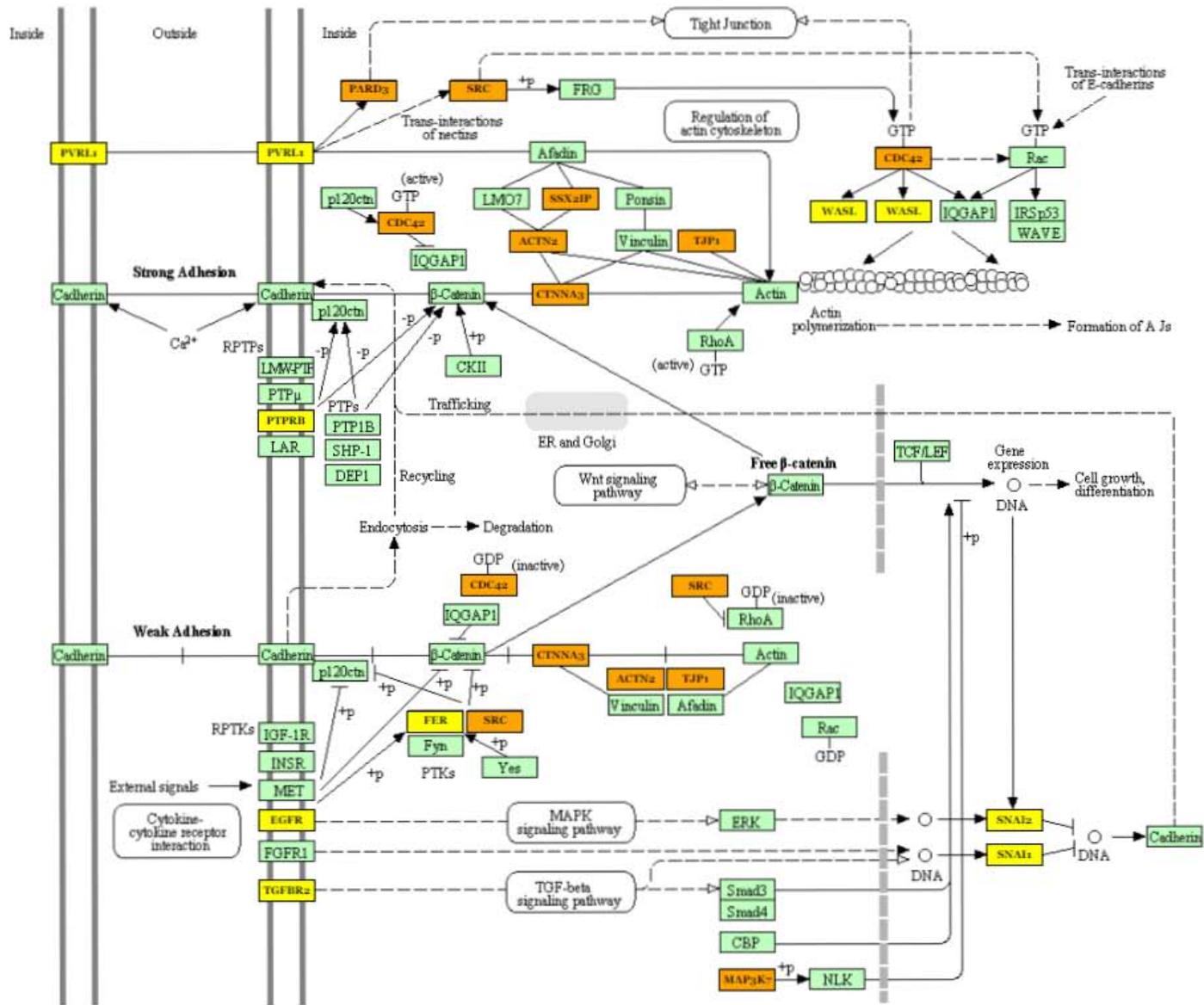
Vía de señalización de la oxitocina



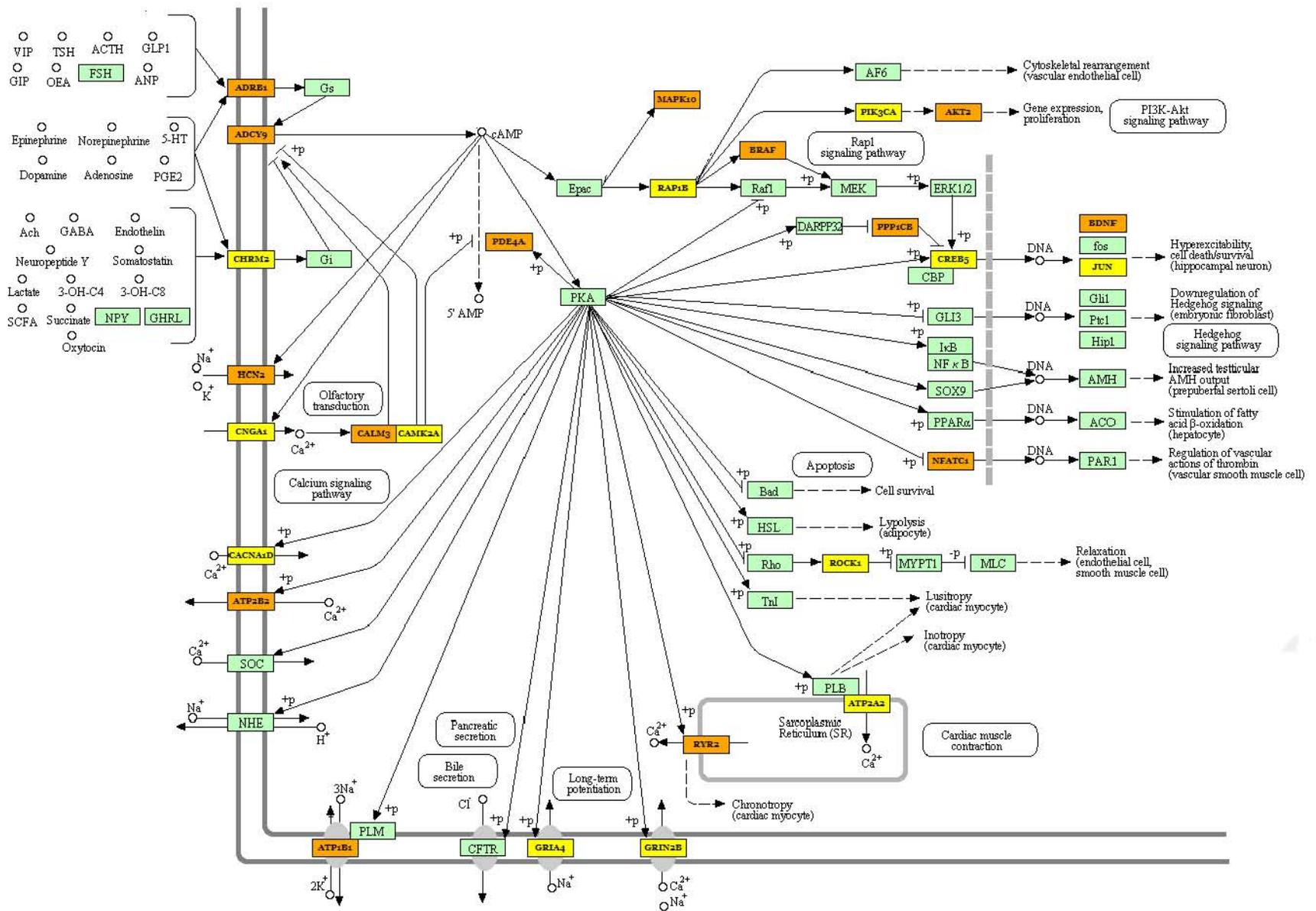
Vía de señalización del calcio



Uniones adherentes



Vía de señalización cAMP



Adhesión focal

