



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

PERFILES DE EXPRESIÓN DE miRNA's
EN LA LÍNEA CELULAR DE
ADENOCARCINOMA MAMARIO MDA-MB-
231 Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN
DEL GEN PROAPOPTÓTICO BIK/NBK.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

ALEJANDRO XCHEL RIVERA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS
ARANDA. Instituto Mexicano del Seguro Social.

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA.
Facultad de Medicina.

DRA. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO. Facultad de Ciencias.

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

PERFILES DE EXPRESIÓN DE miRNA's
EN LA LÍNEA CELULAR DE
ADENOCARCINOMA MAMARIO MDA-MB-
231 Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN
DEL GEN PROAPOPTÓTICO BIK/NBK.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

ALEJANDRO XCHEL RIVERA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS
ARANDA. Instituto Mexicano del Seguro Social.

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA.
Facultad de Medicina.

DRA. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO. Facultad de Ciencias.

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de octubre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del alumno RIVERA GONZÁLEZ ALEJANDRO XCHEL con número de cuenta 303233239, con la tesis titulada "Perfiles de expresión de miRNAs en la línea de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 y su relación con la expresión del gen proapoptótico BIK/NBK." realizada bajo la dirección del DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA:

Presidente: DRA MARTHA ROBLES FLORES
Vocal: DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA
Secretario: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
Suplente: DR. FEDERICO AVILA MORENO
Suplente: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de noviembre de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México**, por brindarme una educación de calidad y por darme la oportunidad de iniciar mi formación como investigador.

Al **CONACYT** por el apoyo económico brindado (No de Becario: 254287) sin el cual hubiera sido difícil la realización y el éxito del presente trabajo. Al **I.M.S.S.** por el apoyo económico brindado (Matrícula: 99096418) ya que representó un estímulo que reforzó mi compromiso para el término en tiempo y en forma del presente trabajo.

Al **Dr. Diego Julio Arenas Aranda**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y darme la oportunidad de desarrollarme en su laboratorio, por su tiempo y sus sugerencias en diversos aspectos del presente trabajo y sobre todo por confiar en mí y apoyarme en todo momento.

A la **Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa** por formar parte de mi comité tutor, por los atinados comentarios y correcciones al presente trabajo y por la confianza y apoyo que depositó en mí persona.

A la **Dra. Sandra Díaz Barriga-Arceo** por formar parte de mi comité tutor, por sus aportaciones al presente trabajo y por todos los conocimientos que me transmitió a lo largo de mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres **Rosa María** y **Luis Javier** por todo el amor, apoyo y confianza que han depositado en mi a lo largo de todos estos años, por hacer de mi una mejor persona, por mantenerme con los pies en la tierra y por hacerme entender que puedo lograr lo que sea siempre y cuando me lo proponga y trabaje duro por ello. A mi hermano **Guillermo** por confiar en mi, por siempre impulsarme a superarme día con día, por ser un gran ejemplo a seguir y por toda la ayuda que recibí de su parte. A mi hermana **Zacniete** por todos los buenos momentos que hemos compartido y por su cariño y apoyo incondicional. A mi abuela **Irene** por sus atenciones, cariño y apoyo. A mis **tíos** y **primos** por ser una pieza fundamental en la familia, por todo el apoyo y muestras de cariño que siempre he recibido de su parte, sin las cuales no hubiera podido terminado esta etapa.

Al **Dr. Alfredo Hidalgo Miranda**, a la **Bióloga Sandra Lorena Romero Córdoba** y a la **Dra. Patricia Piña Sánchez** por su apoyo, comentarios y contribuciones al proyecto, sin su ayuda no hubiera podido llevar a buen termino este trabajo.

A todos mis **compañeros y amigos de la UIMGH (Moe, Alex, Aglaé, Araceli, Areli, Rodrigo, Conny, Pilar, Judith, Elisa, Mirna, Sandy, Sussy Osorio, Abraham Pedroza y Dr. Miguel Velázquez)** y **FES-C (Aldo, Lashi, Alan-Rigo, Gustavo, Gaby Elizabeth, Danira, Iván y Gaby Bravo)** por todos los buenos momentos que nos tocó vivir juntos, por su apoyo y comprensión en los tiempos difíciles y por que a pesar de la distancia y el tiempo siempre los recordaré con alegría y cariño.

A mis amigos **Noé, Fallo, Alejandro, Julio, Polo, Víctor, Ángel, Alfredo, Tania y Ariadna** por que me han permitido compartir con ustedes los mejores años de mi vida y nunca dejaron de creer en mi.

A **Gaby** por nunca rendirse, por nunca perder la fe en mi y en mi trabajo, por siempre saber escucharme, entenderme y quererme, por siempre lograr sacar lo mejor de mi y por nunca abandonarme aun en mis momentos más oscuros. Sin ti nunca lo hubiera logrado. Siempre tendrás un lugar especial en mi corazón. ¡Te quiero!

A mi jurado integrado por la **Dra. Martha Robles Flores, Dr. Jorge Meléndez Zajgla, Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo, Dr. Federico Ávila Moreno y Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa** por sus valiosos comentarios y contribuciones al escrito de tesis.

A la **Dra. Martha Ruiz** por el apoyo al presente proyecto, a **Miguel Sandoval** por su amistad y a **Pilar García** por todo el apoyo, las buenas pláticas y toda la motivación que me brindó. Muchas gracias.

“As a man's real power grows and his knowledge widens, ever the way he can follow grows narrower: until at last he chooses nothing, but does only and wholly what he must do...”

Ursula K. Leguin.

“It is not our part to master all the tides of the world, but to do what is in us for the succour of those years wherein we are set, uprooting the evil in the fields that we know, so that those who live after may have clean earth to till. What weather they shall have is not ours to rule.”

J.R.R. Tolkien.

“Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world. Science is the highest personification of the nation because that nation will remain the first which carries the furthest the works of thought and intelligence.”

Louis Pasteur

DEDICATORIAS

- A mis **padres** y a mis **hermanos** por el amor y apoyo infinito que siempre he recibido de su parte y por que estoy seguro que mejor familia no pude tener.
¡Los amo!
- A los abuelos **Héctor, Elvira** y **Federico**, por que en donde quiera que se encuentren se que se sentirán orgullosos.
- A mi **Tía Tere** y a mi **Tío Lalo** que han sido como unos segundos padres para mi, por siempre procurarme, apoyarme y darme todo su amor desde que tengo memoria.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
II. ÍNDICE DE TABLAS	3
III. ABREVIATURAS.....	4
IV. RESUMEN/ABSTRACT.....	6
V. INTRODUCCIÓN.....	8
5.1 Cáncer.....	8
5.2 Carcinogénesis.....	9
5.3 Epidemiología del Cáncer de Mama.....	10
5.4 Aspectos Moleculares del Cáncer de Mama.....	11
5.5 Apoptosis y Cáncer.....	13
5.6 <i>BIK</i> y su asociación a Cáncer.....	18
5.7 Regulación de calcio por proteínas “BH3-only.”.....	21
5.8 Otras funciones de la familia <i>BCL-2</i>	22
5.9 microRNAs: Biogénesis y función.....	25
5.10 miRNAs y su relación en Cáncer de Mama.....	28
5.11 Modelos Experimentales.....	34
VI. JUSTIFICACIÓN.....	36
VII. OBJETIVOS.....	37
VIII. ANTECEDENTES.....	38
IX. HIPÓTESIS.....	40
X. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
XI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
11.1 Cultivo celular.....	42
11.2 Inmunocitoquímicas para RE α , RP, BIK y BIK-P.....	42
11.3 Extracción de RNA para RT-PCR de CK-19.....	43
11.4 Síntesis de cDNA y RT-PCR.....	43
11.5 Transfecciones transitorias.....	44
11.6 PCR en tiempo real.....	45

11.7	Extracción de proteínas.....	46
11.8	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.....	46
11.9	Electrotransferencia e Inmunodetección (“Western Blot”).....	47
11.10	Revelado de la membrana de PVDF.....	47
11.11	Extracción de RNA total para microarreglos.....	48
11.12	Microarreglos de miRNAs.....	49
11.13	Normalización de datos y análisis de expresión de miRNAs.....	52
11.14	Análisis de miRNAs y predicción con posibles rutas biológicas/ metabólicas.....	54
XII.	RESULTADOS.....	55
12.1	Estado de los receptores de Estrógenos, Progesterona y de la proteína BIK y BIK-P.....	55
12.2	Amplificación de CK-19 por RT-PCR.....	58
12.3	Evaluación de los niveles del mensajero de <i>BIK</i> después de la transfección.....	59
12.4	Evaluación de los niveles de la proteína BIK por Western Blot.....	62
12.5	Normalización de datos y miRNAs diferencialmente expresados.....	63
12.6	Predicción de rutas celulares afectadas por el efecto combinatorio de varios miRNAs.....	67
XIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	79
13.1	Ruta de señalización canónica Wnt.....	81
13.2	Ruta no canónica Wnt/Ca ²⁺	83
13.3	Relación de BIK con niveles intracelulares de Ca ²⁺	85
13.4	Posible relación de la ruta Wnt/Ca ²⁺ con la expresión del gen BIK.....	86
13.5	Ruta de Biosíntesis de Glicosaminglicanos-Heparan Sulfato.....	87
XIV.	CONCLUSIONES.....	93
XV.	PERSPECTIVAS.....	94
XVI.	BIBLIOGRAFÍA.....	95
XVII.	ANEXOS.....	107
	Anexo I. miRNAs con sus respectivos genes blanco predichos por el programa miRpath V.2.0.....	107

Anexo II. miRNAs sobreexpresados con sus genes blanco validados de acuerdo a la base miRWalk.....	116
---	-----

I. LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Estructura de la glándula mamaria.....	12
2. Estructura de los miembros de la familia BCL-2.....	17
3. Mecanismo de apoptosis mediado por BIK.....	20
4. Biogénesis y mecanismo de acción general de los miRNAs.....	27
5. Análisis de agrupamiento y Dendograma de genes de la familia BCL-2.....	39
6. Reacción de poliadenilación, ligación y marcaje para las muestras de microarreglos.....	50
7. Inmunocitoquímicas para RE y RP en MCF-7 y MDA-MB-231.....	56
8. Inmunocitoquímicas para la proteína BIK y BIK-P para la línea MCF-7 y MDA-MB-231.....	57
9. Productos de amplificación por RT-PCR.....	58
10. Curvas de amplificación y disociación para <i>HPRT</i> y <i>BIK</i> en las reacciones de qRT-PCR.....	60
11. Curva de silenciamiento a las 24, 48 y 72 horas de iniciada la transfección con dos concentraciones de siRNA: 400 y 600 nM.....	61
12. Gráfica de expresión del gen BIK de las muestras usadas para los microarreglos.....	61
13. Western blot de las transfecciones a 400 nM y 600 nM.....	62
14. “Blox plots” de los seis microarreglos antes (valores crudos) y después de la normalización por el método RMA.....	64
15. Mapa de calor y dendograma de los 17 miRNAs que se encontraron diferencialmente expresados en comparación con su expresión en el grupo “Scrambled”.....	66
16. Ruta de señalización de Wnt.....	71
17. Ruta de Biosíntesis de Heparán Sulfato.....	72

18. Ruta de Adhesión Focal.....	73
19. Rutas en cáncer.....	74
20. Dendograma de agrupación jerárquica de rutas celulares y de miRNAs que se encontraron sobreexpresados.....	76 y 77
21. Mapa de calor de los miRNAs y sus rutas predichas.....	78
22. Ruta de activación de la señalización Wnt/Ca²⁺	84
23. Mecanismo de liberación de Ca²⁺ del RE mediado por BIK.....	86
24. Esquema de la Biosíntesis del HS y las principales modificaciones llevadas a cabo en el polímero.....	88

II. LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1 Mezcla para la reacción de adición de la cola de Poli (A).....	49
2 Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de hibridación.....	51
3 Protocolo de lavado y tinción con la estación de fluidos 450.....	52
4 miRNAs sobreexpresados en el grupo siRNA en comparación con el grupo “Scrambled”.....	65
5 Predicción de rutas celulares alteradas debido a los miRNAs sobreexpresados, análisis de Unión de Genes (prueba <i>a priori</i>).....	69
6 Predicción de rutas celulares alteradas debido a los miRNAs sobreexpresados, análisis de Unión de Rutas (prueba <i>a posteriori</i>).....	80

III. ABREVIATURAS

Ago	Proteína Argonauta
BH	Dominio de homología a BCL-2
Ca ²⁺	Calcio
cDNA	DNA complementario
CRDs	Dominios ricos en cisteínas
CSC	Cancer stem cells
DAG	Diacilglicerol
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DD	Dominios de muerte
dNTP's	desoxinucleótidos trifosfatados
EMT	Transición epitelio-mesénquima
g	gravedades
IFN γ	Interferón gamma
MAPK	Proteínas activadas por mitógenos
miRNA	microRNA
mL	mililitros
nM	nano molar
NOD	Dominio de unión a nucleótidos
OMS	Organización mundial de la salud
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
pre-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNA	microRNA primario
RE	Retículo Endoplásmico
RE α	Receptor de Estrógenos
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RMA	Análisis robusto de multiarreglos
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
RP	Receptor de Progesterona
rpm	revoluciones por minuto
Ser	Serina
siRNA	RNA pequeño interferente
TEMED	Tetrametilenetilendiamino
TM	Dominio transmembranal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-R	Receptor del factor de necrosis tumoral
THD	Dominios de homología TNF
Thr	Treonina
μ g	microgramos
μ l	microlitros

μM
UTR
V

micromolar
Región no traducida
Volts

IV. RESUMEN

El gen *BIK* es el miembro fundador de la subfamilia *BH3*-only que promueve la apoptosis en diferentes tejidos. En diversos tipos de cáncer este gen se encuentra mutado, deletado o silenciado epigenéticamente; controversialmente, su expresión es elevada en cáncer de mama. En el presente trabajo se indagó la posible relación entre la expresión de este gen con los perfiles globales de miRNAs en un modelo celular de cáncer de mama.

Se realizó el cultivo celular de la línea MDA-MB231 en el cual se determinó el estado de expresión del receptor de estrógenos (RE), progesterona (RP), *BIK* y *BIK-P* mediante inmunocitoquímica, para verificar la identidad de la línea celular. Los cultivos fueron transfectados con un siRNA específico para interferir la expresión del gen *BIK*. Como control para las transfecciones se usó una secuencia "Scrambled" de RNA, la cual no posee homología por ningún transcripto humano conocido y un grupo donde solo se usó el vehículo de transfección (Oligofectamina). Transcurridas 60 horas las células fueron cosechadas y se realizó extracción de RNA y proteínas. Mediante qRT-PCR y Western Blot se confirmó el silenciamiento del gen *BIK*. Una vez estandarizado el silenciamiento se extrajo RNA total del grupo de células transfectadas y de sus grupos controles para su posterior uso en microarreglos de miRNAs interrogando toda la miRBase en su versión V15: representando 1,105 miRNAs en su forma madura.

Se identificaron 17 miRNAs en un estado de sobreexpresión. Posteriormente un análisis de redes predijo diversas rutas celulares y de señalización asociadas a la sobreexpresión de estos miRNAs, entre ellas la ruta Wnt, MAPK y la ruta biosintética de Glicosaminoglicanos-Heparán Sulfato. La gran mayoría de estas rutas tienen en común que son reguladas en parte por los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Debido a que *BIK* posee una participación importante en la regulación de los niveles de Ca^{2+} , proponemos que al disminuir los niveles de la proteína se induce un cambio en los niveles de Ca^{2+} , lo que en consecuencia produce alteraciones en la expresión de los miRNAs como sucede con el hsa-miR-611, hsa-miR-1914-3p y hsa-miR-30c-1-3p.

ABSTRACT

BIK is the founding member of the BH3 only family of proteins. The expression of *BIK* triggers the apoptotic process in several tissues. Among distinct types of cancer this gene is found mutated, deleted or down regulated by epigenetic repression, however, *BIK* expression has been found to be high in sporadic breast tumors. The aim of this work was to establish a link between the expression of the *BIK* gene and the global profiles of miRNAs in a breast cancer cell line.

The cell line MDA-MB-231 was cultured under standard conditions and by immunocytochemistry the status of the oestrogen, progesterone receptor and *BIK* protein was determined. We perform transient transfections in cell cultures using a siRNA to knock down *BIK* expression. RNA scrambled sequence with no homology for any human transcript and cell cultures only treated with the transfection vehicle (Oligofectamine) were used as a controls. Following 60 hours after transfection, cells were harvested to perform RNA and protein extractions. The knockdown was evaluated by real time PCR and Western Blot. After the best conditions for *BIK* knockdown were found, RNA of transfected and controls groups was extracted. Microarray expression assays (Affymetrix) were used to measure the expression of all miRNAs contained in the miRBase v15: with a total of 1,105 mature miRNAs.

We found 17 overexpressed miRNAs and after a subsequent miRNA pathway analysis we found several pathways altered: Wnt, MAPK and biosynthesis of Heparan sulfate among others. The great majority of these pathways can be activated by Ca^{2+} signaling. On the other hand it is well known the role of *BIK* protein as a key regulator of intracellular Ca^{2+} levels. In consequence we propose that the observed changes in the global profiles of miRNA expression may be is a result of the depletion of *BIK* protein and the alteration of Ca^{2+} levels.

V. INTRODUCCIÓN

5.1 CÁNCER.

Cáncer representa un concepto ampliamente usado para clasificar a un largo grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. De manera general este grupo de enfermedades consiste en el crecimiento no controlado de células que se han transformando y han adquirido una serie de características que les permiten diferenciarse fenotípica y genótipicamente de una célula histológicamente normal. El crecimiento no controlado es una de las principales características que definen a este grupo de enfermedades. Durante el curso de esta enfermedad las células anormales después de cierto tiempo y bajo ciertas condiciones pueden llegar a formar un tumor, es decir una masa celular heterogénea dentro de la cual se identifican células cancerosas que pueden migrar e invadir otros órganos del cuerpo, desencadenando la formación de un tumor secundario. A este proceso se le conoce como metástasis, siendo esta la primera causa de muerte debido al cáncer en todo el mundo (Globocan 2010).

El cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial. En el 2008 produjo 7.8 millones de muertes (13% de las muertes totales). A pesar de que existen diversos tipos de cáncer los de más incidencia son (Globocan 2010):

- Pulmonar: 1.4 millones de defunciones
- Gástrico : 740,000 defunciones
- Hepático: 700,000 defunciones
- Colorectal: 610,000 defunciones
- Mamario: 460,000 defunciones

Las células cancerosas se caracterizan por presentar una desregulación global en diversos procesos celulares como proliferación, crecimiento celular, apoptosis y diferenciación, entre otros. Durante el proceso carcinogénico las células que se encuentran en tejidos normales sufren de uno o varios eventos oncogénicos y ó alteraciones en la expresion de genes supresores de tumores lo que ocasiona que se

pierdan rigurosos mecanismos de control y homeostasis celular. Como consecuencia de estas pérdidas en los mecanismos de control estas células son propensas a iniciar una serie de divisiones celulares no controladas. Esta desregulación generalizada conduce a la formación de tumores, los cuales a través de una serie de cambios genéticos y epigenéticos evolucionan seleccionando una serie de características que promueven un fenotipo cada vez más agresivo, causando complicaciones clínicas al paciente. A pesar de ser una enfermedad de etiología multifactorial, en las últimas décadas se ha demostrado que el componente genético juega un papel determinante en el inicio, promoción y desarrollo de la enfermedad. Hanahan y Weinberg (2001), plantearon una serie de características biológicas que presentan la gran mayoría de células cancerosas y afirman que la selección de estas características ocurren de manera gradual y aleatoria durante el desarrollo de la enfermedad. estas características comprenden: señales de proliferación sostenidas, evasión de las señales supresoras del crecimiento, invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, angiogénesis resistencia a la muerte celular y un metabolismo reductor. Cada una de estas características posee un vasto trasfondo genético, donde uno o varios genes maestros encargados de la regulación de estos procesos se ven afectados ya sea por alteraciones genéticas como mutaciones, inversiones, deleciones, amplificaciones, etc. (Hanahan y Weinberg 1999).

5.2 CARCINOGENESIS.

El proceso mediante el cual una célula normal es transformada hacia una célula cancerosa involucra una serie de cambios graduales y progresivos a nivel morfológico, genético y epigenético. En la mayoría de los casos es imposible determinar la causa inicial de los diferentes tipos de cáncer, sin embargo hoy en día existen diversas teorías que intentan explicar la naturaleza del proceso carcinogénico.

La primera hipótesis conocida como **modelo estocástico** asume que cada célula dentro del tumor tiene el mismo potencial tumorigénico y que las actividades de cada una de las células están parcialmente determinadas por varios factores intrínsecos estocásticos. Esto significa que las actividades celulares dentro de un tumor no están determinadas por el microambiente en el que estas células se encuentran (Nguyen y Eaves 2012a).

La segunda hipótesis es conocida como el **modelo jerárquico** y esta propone la existencia de las células troncales (stem) del cáncer (CSC) para explicar la heterogeneidad celular encontrada en la mayoría de los tumores sólidos y la resistencia adquirida a diversos tratamientos. De acuerdo con este modelo existen células poco diferenciadas que acumulan mutaciones y alteraciones durante su periodo de vida, lo que resulta en la transformación de dichas células las cuales pueden generar una progenie maligna que presenta un programa de diferenciación aberrante (Rosen y Jordan 2009).

Las CSC representan una subpoblación biológicamente distinta al resto de las células tumorales. Es decir, es a partir de estas CSC en donde el tumor adquiere la capacidad de mantenerse y adquiere rasgos como la resistencia a tratamientos farmacológicos. Estas mismas células a su vez tienen el potencial de dar origen al resto de las poblaciones celulares dentro de un tumor. Las implicaciones clínicas de esta teoría es que al eliminar todas las CSC inevitablemente el tumor dejará de crecer; sin embargo mientras exista esta subpoblación las recaídas son altamente probables.

5.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer de mayor incidencia en todo el mundo solo después del cáncer de pulmón, la quinta causa de muerte más común por cáncer, y el primer lugar en muertes causadas por cáncer en mujeres. El total de casos por cáncer de mama en el mundo excede todos los otros tipos de cáncer y la incidencia tiende a incrementar con el paso de los años (Jemal et al. 2010).

En 2008, la organización mundial de la salud (OMS) estimó 1.38 millones de nuevos casos en todo el mundo, lo que representa un 23% de todos los cánceres. La tasa de incidencia varía ampliamente en todo el mundo con números tan altos como 99.4 casos por cada 100 000 en el Norte América y tasas moderadas en países del este de Europa, Sudamérica, Sudáfrica y el oeste de Asia. La incidencia más baja se ha detectado en varios países africanos pero aún en estos lugares se ha detectado un incremento en la incidencia del cáncer de mama.

La tasa de supervivencia al igual que la de incidencia en cáncer de mama es heterogénea alrededor del mundo, desde 80% en Norte América, Suiza y Japón hasta 60% en los países en desarrollo y 40% en los países pobres (Coleman et al. 2008). Los bajos índices de supervivencia en los países menos desarrollados pueden ser explicadas principalmente por la falta de programas para la detección temprana, dando como resultado una alta proporción de mujeres presentando un estadio avanzado de la enfermedad así como la falta de un diagnóstico adecuado e instalaciones para su tratamiento (Globocan 2008, IARC 2010).

En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres (13.8%), por encima del cáncer cérvico-uterino (12.1%). La tasa de defunción en promedio por esta causa es de 16.4 por cada 100 mil, en mujeres mayores de 25 años. Por estado destacan Baja California Sur, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Chihuahua, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas por tener una tasa superior a las 20 defunciones por cada 100 mil mujeres de este grupo de edad. Con tasas menores de un dígito se encuentran Campeche, Chiapas, Yucatán, Tabasco y Quintana Roo (INEGI, 2009).

5.4 ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA.

La susceptibilidad de la glándula mamaria a la tumorigénesis es influenciada por su desarrollo normal, particularmente durante los estados de pubertad y embarazo, los cuales están caracterizados por alteraciones muy marcadas en la proliferación y diferenciación de células mamarias. Diversos estudios de carácter epidemiológico han sugerido que diversos detalles en el proceso de diferenciación como el remodelamiento tisular al momento de la lactancia y la exposición del tejido mamario a diversas hormonas durante la pubertad juegan un papel crítico en el desarrollo de cáncer de mama (Kelsey y Gammon 1991).

Algunos de los factores de riesgo para cáncer de mama incluyen nuliparidad, embarazo después de los treinta años, inicio de la menarquia a edades tempranas, menopausia a edades tempranas e historia familiar de cáncer de mama. En contraste el embarazo a temprana edad, la menopausia a edades avanzadas y largos periodos de lactancia

proveen un efecto protector contra el cáncer de mama (Henderson, Ross, y Pike 1993). El cáncer de mama anatómicamente se origina en los ductos mamarios o conductos galactóforos de la glándula mamaria (Figura 1). A estos cánceres se le conoce como carcinoma ductal y suele presentarse en dos formas clínicamente distintas: una es el carcinoma ductal *in situ* cuya lesión se encuentra confinada exclusivamente a los ductos mamarios y el carcinoma ductal invasivo donde se presenta infiltración a otras regiones de la glándula mamaria con proliferación anormal de células neoplásicas. Al tipo de cáncer que llega a originarse en lobulillos mamarios que secretan la leche a los conductos galactóforos se le conoce como carcinoma lobulillar y de igual manera se reconocen dos subtipos; el carcinoma lobulillar *in situ* reconocido como una lesión premaligna que incrementa considerablemente el riesgo a cáncer (Afonso y Bouwman 2008) y el carcinoma lobulillar invasivo, el cual presenta infiltración de células neoplásicas en otras partes de la glándula mamaria con el potencial de metastatizar a otras regiones del cuerpo.

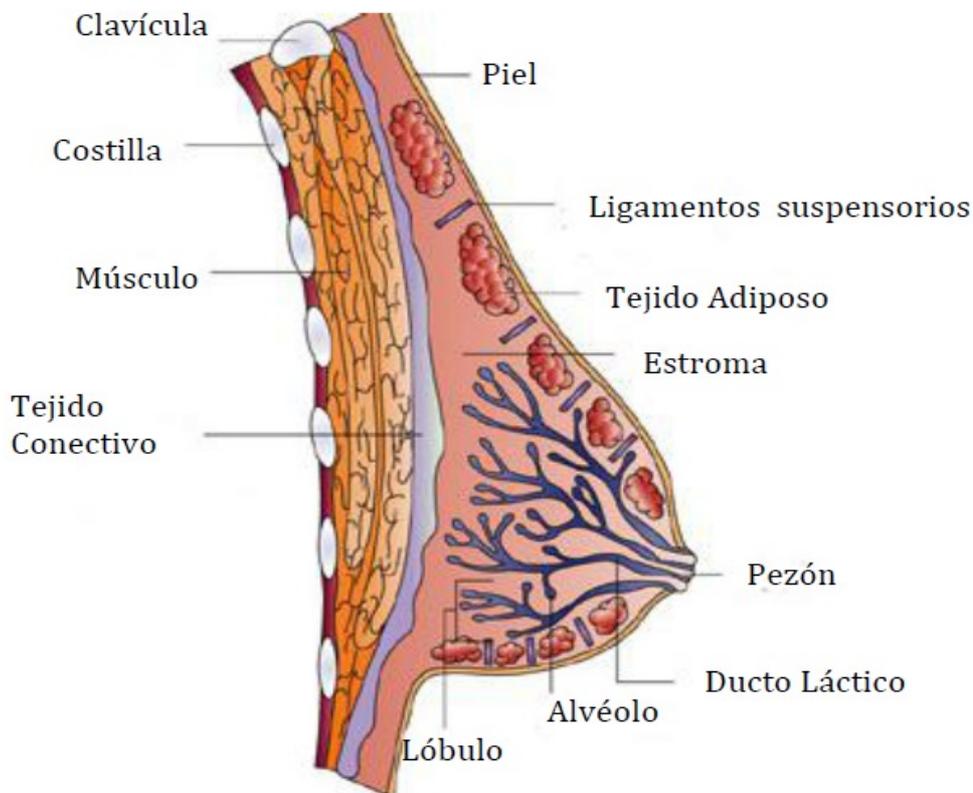


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria. El esquema representa la estructura de la glándula mamaria y el sistema de conductos lactíferos. (Tomado y modificado de Ali y Coombes 2002).

A pesar de los numerosos estudios, hasta la fecha es imposible determinar la causa del cáncer de mama. Sin embargo, hoy en día se han identificado numerosos factores de riesgo que determinan la predisposición de un individuo a contraer este tipo de cáncer. Se estima que 15 a 20% de mujeres con cáncer de mama tienen historia familiar de la enfermedad, con un 5% al 10% de todos los casos de esta neoplasia atribuidos a susceptibilidad de alelos dominantes, por lo que se han postulado varios genes asociados a la enfermedad (Vogelstein y Kinzler 1998).

Durante los años 90's mediante experimentos de clonaje posicional se identificaron mutaciones en los genes de susceptibilidad a cáncer de mama *BRCA1* (Miki et al. 1994) y *BRCA2* (Wooster et al. 1995), cuyas mutaciones de alta penetrancia confieren a sus portadores un riesgo de 10 a 30 veces mayor de contraer cáncer comparada con la población en general. Tanto *BRCA1* como *BRCA2* son genes que codifican para proteínas que llevan el mismo nombre respectivamente y que tienen participación en reparación por daño al DNA, debido a que la mayoría de las mutaciones caracterizadas en ambas proteínas alteran el marco de lectura abierto, dando como resultado proteínas anormalmente cortas, lo que impide que cumplan con la función de reparar mutaciones en otros genes. Estas mutaciones se acumulan promoviendo la proliferación celular incontrolablemente hasta originar un tumor. Hoy en día, se cuentan con espectros de mutaciones bien identificados para ambos genes incluyendo qué tipo de poblaciones alrededor del mundo llegan a presentar estas variantes mutadas con más frecuencia. También se han encontrado otros alelos de alta penetrancia pero baja frecuencia que contribuyen a la susceptibilidad de cáncer de mama, entre ellos se encuentran los genes *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* y *BRP1* que contribuyen aproximadamente al 5% del componente genético de riesgo.

5.5 APOPTOSIS Y CÁNCER.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo celular por medio del cual los organismos multicelulares pueden mantener la homeostasis de sus tejidos, controlando el ritmo de proliferación celular y/o eliminando a las células alteradas presentes en el organismo. Es un proceso celular regulado de manera activa y que puede

ser desatado por diversos estímulos como radiación, toxinas, drogas o por privación de hormonas o factores de crecimiento (Yang y Korsmeyer 1996). Morfológicamente, las células apoptóticas se caracterizan por la contracción de sus núcleos y picnosis que eventualmente termina en un fraccionamiento del núcleo y en fagocitosis de la células apoptóticas (Cummings, Winterford y Walker 1997). Bioquímicamente el resultado de un proceso apoptótico es la fragmentación del DNA por endonucleasas que producen fragmentos de aproximadamente 180-pb, los cuales son fácilmente detectados en una electroforesis de agarosa en un patrón de “escalera”.

Existen dos rutas principales a través de las cuales se puede inducir apoptosis en las células: 1) la ruta de los receptores de muerte o ruta extrínseca, que se pone en marcha por la activación de determinados miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y 2) la ruta mitocondrial o ruta intrínseca, inducida por diferentes formas de estrés celular, como puede ser la privación de factores de crecimiento en el medio, pérdida de adhesión, daño al DNA, estrés en el RE, activación de oncogenes, infección viral, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta, etc.

Entre los ligandos de muerte capaces de activar a la vía extrínseca encontramos a proteínas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), como FasL/CD95L, TRAIL o el propio TNF. Todas estas presentan en su región extracelular los dominios denominado de homología a TNF (THD) a través de los cuales se asocian a sus receptores (Bodmer, Schneider y Tschopp 2002). Estos ligandos son expresados por distintas células del sistema inmunológico como linfocitos T, células NK, monocitos y células dendríticas, participando y permitiendo la eliminación de células que han cumplido su función, células infectadas, autorreactivas y metaplásicas (Neve et al. 2006a; Perlman et al. 2001; Singh et al. 1999; Yang et al. 2001; Zhang et al. 2004).

Los receptores de muerte son proteínas transmembranales que se caracterizan por presentar en su región intracelular los denominados dominios de muerte (DD) a través de los que transmiten el estímulo apoptótico. Existen además receptores anti-apoptóticos o “señuelo” para dichos ligandos, denominados así, porque no transmiten la señal de apoptosis, siendo algunos de ellos receptores solubles (Gruss y Dower 1995).

Ambos tipos de receptores presentan en su región extracelular dominios ricos en cisteínas (CRDs) que se asocian con las regiones THD de los ligandos de muerte por medio de puentes disulfuro formando multímeros funcionales. La unión del ligando a su correspondiente receptor de muerte va a tener como consecuencia la trimerización y el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras con dominios DD homólogos a los del receptor, como la proteína TRADD. Estas proteínas, a través de dominios DD, van a permitir a su vez el reclutamiento de las caspasas iniciadoras - 8 y/o 10, formándose así el complejo de señalización de muerte inducida (DISC) donde se activarán dichas caspasas (Kischkel et al. 2000).

El TNF tiene un papel fundamental en inflamación e inmunidad. Se han descrito dos receptores para TNF: TNFR-1 y TNFR-2. Sólo el TNFR-1 se considera como un receptor de muerte, ya que el TNFR-2 carece del dominio de muerte intracelular necesario para transmitir la señal de apoptosis. A pesar de ello, el TNFR-1 puede o bien disparar la inducción de apoptosis o bien activar rutas de supervivencia celular, dependiendo del complejo de señalización que se active a nivel intracelular. La interacción de FasL/CD95L con su receptor de muerte Fas/CD95 da lugar generalmente a la inducción de apoptosis, aunque se han descrito algunas situaciones en las que Fas no tiene una acción citotóxica, sino que induce proliferación, migración y producción de citosinas (Bodmer et al. 2002).

En organismos multicelulares, el número total de células es el resultado entre los efectos mitóticos que generarán más células y la muerte celular que es inducida a través de la apoptosis. La idea de que el desarrollo y progresión tumoral puede ser influenciada por la apoptosis se remonta al trabajo de Kerr Wyllie y Curries en el año de 1972 donde demuestran que la tasa de crecimiento de los tumores es menor que la predicha, esto como resultado de los altos niveles de apoptosis dentro de algunas células del tumor (Cotter 2009). La importancia de la apoptosis en la homeostasis de los tejidos se refleja en el hecho de que se ve influenciada por varios genes relacionados a cáncer como *TP53*, el supresor de tumores *Rb* y *c-myc* (Rondinelli, Haslam y Fluck 1995; White 1996). Un grupo de genes importantes que regulan la apoptosis por la vía intrínseca es la familia *BCL-2* en vertebrados. La familia de genes *BCL-2* es un grupo heterogéneo,

que codifica para una serie de proteínas que gobiernan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, permitiendo así el paso de moléculas solubles que difunden al citosol. Estas moléculas tienen como fin provocar una cascada de señalización que induzca a la célula entrar en apoptosis. Las proteínas que pertenecen al grupo BCL-2, se clasifican de acuerdo a su funcionalidad como pro-apoptóticas o anti-apoptóticas; sin embargo, también son clasificadas con base en el número de dominios BH (Dominio de homología a BCL-2) que comparten. La subfamilia de proteínas anti-apoptóticas incluye a miembros como BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 y A1/BFL-1, cuyo grupo posee cuatro dominios del tipo BH (BH1-4), (Chipuk et al. 2010). Por su parte, el grupo de las proteínas pro-apoptóticas pueden subdividirse en dos grupos; el primero incluye a las proteínas BAX, BAK y BOK conteniendo éstos tres dominios BH1-3. Este grupo de proteínas pro-apoptóticas presentan la capacidad de formar heterodímeros con el grupo de proteínas anti-apoptóticas. Esto sugiere que uno de los mecanismos por el cual, los miembros de la familia *BCL-2* regulan la apoptosis puede ser mediante la formación de heterodímeros con las proteínas anti-apoptóticas (Giam, Huang y Bouillet 2009). De esta manera al formarse estos complejos las propiedades de ambas proteínas se antagonizan. El segundo subgrupo de las proteínas pro-apoptóticas lo conforman las proteínas NOXA, BID, BAD, BNIP3, BMF, BIM, EG1-1 y BIK, todas estas se caracterizan por poseer un solo dominio del tipo BH3, por lo que se les ha llamado “BH3 Only” (Figura 2). Este último grupo ha sido ampliamente estudiado debido a las funciones fisiológicas y patológicas en las que se han visto involucradas incluyendo el cáncer.

Existen abundantes ejemplos de cómo la regulación de miembros de genes antiapoptóticos o proapoptóticos pertenecientes a la familia *BCL-2*, están alterados en cáncer. De hecho el miembro fundador de la familia *BCL-2* fue descubierto por su participación en la translocación cromosómica t (14;18) observada en linfomas del tipo no Hodgkin (Tsujimoto et al. 1985), donde el gen *BCL-2* del cromosoma 18 se fusiona con el locus de una cadena pesada de inmunoglobulina en el cromosoma 14, dejando el gene *BCL-2* bajo el control del enhancer de la inmunoglobulina alterando la tasa transcripcional de *BCL-2*.

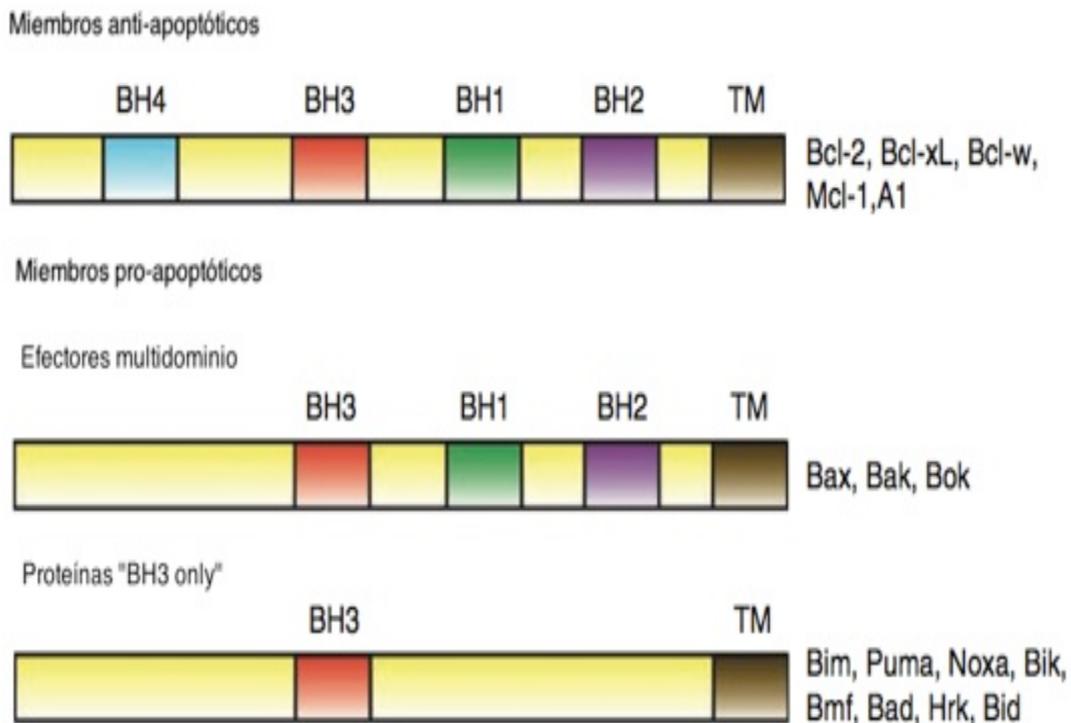


Figura 2. Estructura de los miembros de la familia BCL-2. Los diferentes dominios BH 1-4 están marcados con un color diferente, mientras que el dominio transmembranal (TM) se encuentra en color café (Tomado y modificado de Giam, Huang y Bouillet 2009).

De igual manera, defectos en la expresión de miembros pro-apoptóticos de la familia *BCL-2* ocurren en cáncer dando como resultado la pérdida de la función de supresor de tumores. Como ejemplo mejor documentado es el gen *BAX* en donde deleciones homocigotas o mutaciones que inactivan la expresión del gen han sido identificadas. El cáncer de mama no es la excepción en cuanto a alteración en la apoptosis. Algunos investigadores han demostrado que la apoptosis espontánea se pierde con la transformación neoplásica (Bodis et al. 1996). El epitelio mamario es conocido por sufrir fluctuaciones periódicas en los niveles de *BCL-2* y por lo tanto, de apoptosis a lo largo del ciclo menstrual (Sabourin et al. 1994). La expresión de *BCL-2* está modulada de una forma hormono-dependiente en las células mamarias ductales (Nathan et al. 1993). También ha sido demostrado que la expresión de *BCL-2* en adenocarcinomas humanos ha sido asociado significativamente con la actividad del receptor hormonal de progesterona y con un bajo grado histológico (Sabourin et al. 1994).

5.6 *BIK* Y SU ASOCIACIÓN A CÁNCER.

BIK, acrónimo de BCL-2 interacting killer, fue el primer miembro descubierto de las proteínas pro-apotóticas “BH3 only” (Boyd et al. 1994). El gen en humanos que codifica para la proteína *BIK* se encuentra en el cromosoma 22q13.3, consta de 5 exones y 4 intrones extendiéndose aproximadamente por 19 kb. La proteína humana *BIK* está conformada de aproximadamente 160 residuos de aminoácidos, contiene un dominio N-terminal transmembranal y un dominio del tipo BH3 (McDonnell et al. 1999). El análisis de la secuencia del genoma ha predicho la existencia de una isoforma más larga de aproximadamente 202 aminoácidos. Sin embargo la existencia de dicha isoforma sigue sin confirmarse hasta la fecha. El modelaje computacional de la estructura secundaria de la proteína sugiere que *BIK* está compuesta de seis alfa hélices con su respectivo dominio BH3 expuesto (McDonnell et al. 1999). Estudios de mutagénesis sitio-dirigida han demostrado que este dominio tipo BH3 es crucial para la actividad apoptótica de la proteína (Chittenden et al. 1995). En cuanto al dominio transmembranal que presenta la proteína, ha mostrado ser dispensable para la actividad apoptótica al menos en condiciones de sobreexpresión transitoria de *BIK* en modelos celulares (Elangovan y Chinnadurai 1997). Se ha reportado fosforilaciones en la proteína humana *BIK* en los residuos de Thr(33) y Ser(35) por la acción de una casein-kinasa tipo II. En experimentos donde se reprime la fosforilación en estos sitios se observa una disminución en la apoptosis y también en la interacción de *BIK* con otras proteínas anti-apotóticas (Verma 2000) lo que indica que estas modificaciones postraduccionales potencian la actividad pro-apoptótica de *BIK*. Su localización celular se ha reportado principalmente a nivel de RE sin embargo también se ha detectado presencia de *BIK* en mitocondria (Han, Sabbatini y White 1996). En cuanto a la regulación a nivel de proteína, se sabe que la degradación vía proteosoma es el método más común para controlar los niveles de la proteína (Zhu et al. 2005a). La expresión de *BIK* conduce a la apoptosis en una gran variedad de células de mamífero, el mecanismo mediante el cual induce la apoptosis ha sido investigado principalmente en células tumorales de origen epitelial por diversos grupos. Sobreexpresión de la proteína humana *BIK* mediante vectores de adenovirus ha revelado que la apoptosis mediada por *BIK* involucra la activación de la caspasa 9 y liberación de citocromo c por parte de la

mitocondria (Tong et al. 2001). El mecanismo de muerte en células epiteliales normales se ha refinado gracias a una serie de experimentos que han mostrado que la proteína BIK presente en el RE induce la apoptosis mediante la liberación de Calcio²⁺ (Ca²⁺). El mecanismo consiste en que como respuesta a un estímulo como puede ser estrés genotóxico, radiaciones, infecciones virales y sobreexpresión de algunos genes como p53 y E2F entre otros la célula activa la transcripción del gen *BIK*. Cuando los niveles de proteína BIK son lo suficientemente elevados esta proteína forma dímeros con proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 y BCL-xL. Estas últimas dos proteínas se caracterizan por inhibir a las proteínas efectoras de la apoptosis BAX y BAK las cuales una vez liberadas gracias a la proteína BIK inducen un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular ya son capaces de insertarse en la membrana del RE y la mitocondria formando poros y alterando la permeabilidad de ambos organelos. La proteína BIK, también promueve el reclutamiento de la proteína DRP1 desde el citosol a la mitocondria, así como el remodelamiento de las crestas de la membrana mitocondrial interna (Figura 3) (Germain et al. 2005), lo que provoca la liberación de citocromo c al espacio citoplasmático y termina por activar a la caspasa-9, estableciendo las bases moleculares para que, se desencadene el resto del proceso apoptótico. La salida de Ca²⁺ desde el RE ha demostrado ser clave para el proceso apoptótico. Esto ha quedado en evidencia en estudios donde mediante agentes quelantes de Ca²⁺ se suprime la liberación de citocromo c por acción de BIK (Shimizu y Tsujimoto 2000). También se ha observado cooperación entre BIK y la proteína NOXA que es otro miembro de la familia BH3 only. La expresión de NOXA por si sola no parece ser suficiente para provocar la salida del citocromo c de la mitocondria; sin embargo la co-expresión de BIK y NOXA ha mostrado inducir la activación conformacional de la proteína BAX y acelerar la liberación de citocromo c. Aunque el mecanismo de esta cooperación entre estas dos proteínas BH3 only que están localizadas en diferentes organelos no es conocido, es posible que esté relacionado con la activación cooperativa de la proteína BAX por BIK y a la liberación de la proteína BAK del complejo que forma con el miembro anti-apoptótico MCL-1 por parte de NOXA (Willis y Adams 2005).

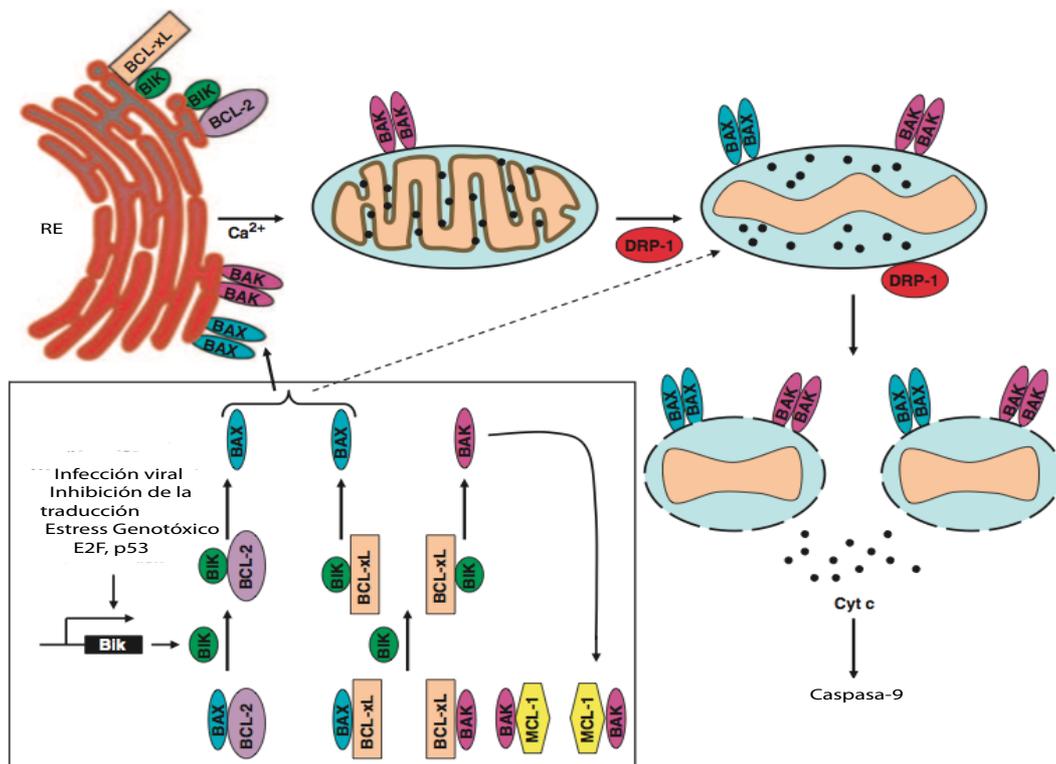


Figura 3. Mecanismo de apoptosis mediado por BIK (Tomado y modificado de Chinnadurai, Vijayalingam y Rashmi 2008a).

BIK está involucrado en etapas del desarrollo como la formación testicular y la espermatogénesis en donde la apoptosis juega un papel muy importante (Coultas et al. 2005). Las propiedades pro-apoptóticas de este gen se han relacionado a homeostasis tisular, inmunidad y supresión tumoral al igual que otros miembros de la familia Bcl-2 que comparten el dominio BH3 (Willis y Adams 2005). En años recientes se reportó que la proteína BIK es capaz de inhibir la translocación de las cinasas activas ERK1/2 desde el citoplasma al núcleo en cultivos de células de epitelio de ratón cuando éstas son inducidas a apoptosis por medio de Interferón gamma ($IFN\gamma$) (Mebratu et al. 2008a). Este modelo muestra que BIK tiene más de un mecanismo para promover la apoptosis. Existen diversos reportes que sugieren que BIK podría servir como un gen supresor de tumores en tejidos específicos. BIK ha mostrado tener una alta expresión en tejido epitelial de riñón sano, mientras que en carcinomas renales la expresión del gen *BIK* ha sido inactivada por pérdida de la heterocigocidad en el locus de BIK o por silenciamiento epigenético de su promotor a través de metilación (Sturm et al. 2005).

Análisis genómicos en gliomas humanos han identificado un segmento deletado en el cromosoma 22q, que abarca el locus de *BIK* (Bredel et al. 2005). Pequeñas deleciones cromosómicas en la región del locus *BIK* también han sido documentadas en casos de cáncer colorrectal (Castells et al. 1999) y en cánceres de cabeza y cuello (Reis et al. 2002). El gen *BIK* se ha encontrado ser frecuentemente mutado en linfomas de células B (Arena et al. 2003). Un estudio de microarreglos mostró un cambio en la expresión de RNAm de *BIK* entre 350 genes relacionados a apoptosis en líneas celulares humanas cancerosas de pulmón, próstata y riñón que fueron tratadas con un inhibidor de la DNMT1 la 5'-Aza-2'-Deoxicitidina y un inhibidor de las desacetilasas de histonas el Depsiptido (Dai et al. 2006). Diversos reportes han mostrado que en células cancerosas que expresan constitutivamente RNAm de *BIK*, la proteína es marcada activamente y degradada por la maquinaria del proteosoma (Marshansky et al. 2001).

Las evidencias aquí expuestas reforzarían la idea de que BIK posee una actividad de supresor de tumores. Sin embargo, paradójicamente se ha observado la sobreexpresión de BIK en adenocarcinomas mamarios (García et al. 2005) y también un mal pronóstico en cáncer de pulmón de células no pequeñas se ha relacionado con la alta expresión de *BIK* (Lu et al. 2006). Debido a la controversia que supone que BIK esté sobreexpresado en algunos cánceres mientras que en otros modelos se suprime su actividad apoptótica, ha dado pie a que se estudie más a como está regulado tanto el gen como la proteína.

5.7 REGULACIÓN DE CALCIO POR PROTEINAS “BH3-ONLY.”

Las proteínas “BH3-Only” se caracterizan por poseer solamente un dominio del tipo BH3. Este grupo incluye a BIM, BAD, BIK, BNIP3, PUMA y NOXA. De la misma manera que las proteínas multidominio de la familia BCL-2, las proteínas BH3 se localizan en RE y en mitocondria. En la mitocondria las proteínas BH3 facilitan la oligomerización de BAX/BAK. La función de las proteínas BH3 en la mitocondria ha sido estudiada extensivamente, por lo que hoy en día se cuenta con suficiente información para concluir que también regulan la apoptosis en el RE. Por ejemplo se ha demostrado que BIM tiene la capacidad de translocarse al RE en condiciones de estrés celular y puede ser requerida para la activación de la caspasa-12 (Morishima et al. 2004).

Por esta razón la localización en RE de BIM así como de BAK puede ser necesaria para la respuesta apoptótica inducida por estrés en el RE. Interesantemente se encuentra reportado que la dexametasona induce el transcrito y la proteína BIM en células T (Lu et al. 2006), un proceso que se ha asociado con la elevación citosólica de calcio. De manera intrigante se ha visto que células deficientes en BIM no poseen la misma capacidad que una célula normal de liberar calcio del RE cuando se induce estrés en este organelo. Esto se ha asociado a un incremento en la asociación de la proteína BCL-2 a los receptores IP₃R (Ludwinski et al. 2009).

Otro ejemplo es la proteína BIK, la cual se ha reportado que promueve una disminución en los niveles de calcio dentro del RE de una manera dependiente de BAX/BAK (Mathai et al. 2005). De manera similar trabaja la proteína BNIP3 que causa “fugas” de calcio presente en el RE cuando se recluta a este organelo. Por otro lado los genes NOXA y PUMA son blancos transcripcionales de la proteína p53 y estos son regulados positivamente en respuesta a estrés genotóxico. En un estudio quedó demostrado que NOXA funciona de manera cooperativa con BIK para promover la activación de BAK (Germain et al. 2005). Un estudio reciente indica que la región mitocondrial blanco de NOXA incrementa la permeabilidad y la liberación de calcio. Esto demuestra que las proteínas BH3 no solo son importantes para los mecanismos de muerte celular y autofagia sino también en procesos de flujo y homeostasis de calcio.

5.8 OTRAS FUNCIONES DE LA FAMILIA BCL-2.

La familia de los reguladores de la muerte celular, BCL-2 constituyen un punto crítico en la regulación de la apoptosis (Danial et al. 2008; Youle y Strasser 2008). A pesar de que estas proteínas son conocidas por su control en la apoptosis, algunos miembros de esta familia tienen papeles fisiológicos separados de la apoptosis, incluyendo funciones en el metabolismo de nutrientes.

Hay fuerte evidencia que sugiere que las proteínas con el dominio BH3 están involucradas en funciones vitales celulares más allá de su papel en la apoptosis (Hetz y Glimcher 2008). El mejor ejemplo de esto es BAD, el cual fue reportado por jugar un

papel en la progresión del ciclo celular a través de la dimerización con BCL-xL evitando el arresto de la transición G0/G1 (Chattopadhyay et al. 2001). En otro estudio diferente, la sobreexpresión de BAD se asoció al aumento de la progresión del ciclo celular y la producción de interleucina 2 después de la activación de células T, como consecuencia de la regulación de Akt/BAD en células T primarias (Mok et al. 1999).

Danial et al. (2008), informaron un nuevo papel fisiológico de la proteína pro-apoptótica Bad. Esta proteína reside en un complejo que contiene la enzima glucocinasa la cual regula la glucosa impulsada por la respiración mitocondrial. Hay evidencia genética de otro papel fisiológico de Bad en la secreción de insulina estimulada por la glucosa por parte de las células β -pancreáticas. Esta nueva función depende específicamente de la fosforilación de su secuencia BH3, previamente definida como un dominio de muerte esencial. El dominio BH3 alterna entre la función apoptótica y metabólica dependiendo del estado de fosforilación. La fosforilación en la Ser155 inactiva la función pro-apoptótica de Bad y es requerida para su control en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Danial et al. 2008). En el cerebro, Bad está presente en varias localizaciones anatómicas, incluyendo áreas que son fundamentales para detectar nutrientes y la regulación de la glucosa (Bu y Lephart 2005). Usando una combinación de herramientas genéticas, incluyendo ratones deficientes de Bad y experimentos de RNA de interferencia, se determinó el papel de Bad en el control de las respuestas hormonales reguladoras y la respuesta a la privación de alimento. Esto sugiere que la función de Bad en el cerebro es requerida para la detección de la hipoglucemia y el inicio de la respuesta hormonal a partir de la privación de alimento y la iniciación de respuesta hormonal (Osundiji et al. 2011).

Otro ejemplo de esto es la proteína pro-apoptótica BID, a la que se le ha descubierto otra función fisiológica como mediador crítico de la inflamación e inmunidad innata. La inmunidad innata es una respuesta de defensa fundamental que depende de receptores con patrones de reconocimiento conservados para detectar señales de peligro o infecciones (Garrett, Gordon y Glimcher 2010; Takeuchi y Akira 2010). Proteínas con dominios de oligomerización y unión a nucleótidos (NOD), son receptores con patrones de reconocimiento citosólicos de suma importancia en el intestino, y su desregulación es asociada con inflamación del intestino. Yeretssian y cols, usaron datos de experimentos

de RNA de interferencia y buscaron en todo el genoma para identificar genes candidatos que modulan la respuesta inflamatoria en células epiteliales del intestino. Sus resultados revelaron una correlación significativa entre la inmunidad innata y la apoptosis, identificando a la proteína BID como un componente crítico en la respuesta inflamatoria. Colonocitos con *BID* deletado o macrófagos de ratón con *Bid* *-/-* fueron marcadamente defectuosos en la producción de citocinas en respuesta a la activación de NOD, demostrando cómo es que esta proteína es el centro de la decisión celular para inducir respuesta inmune innata (y sobrevivir) o por inducir suicidio por apoptosis. Ellos anticiparon que el desarrollo de pequeñas moléculas blanco sería el escenario para emerger nuevas estrategias en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Yeretssian et al. 2011).

Asimismo, *BID* puede estar implicado en la transferencia de lípidos entre la mitocondria y otras membranas celulares sugiriendo que BID puede estar involucrado en el transporte y reciclaje de los fosfolípidos mitocondriales (Esposti et al. 2001). BNIP1 mostró participación en la organización y biogénesis del RE mediante la fusión de la membrana como un componente del complejo del receptor de proteínas SNAP (SNARE) (Nakajima et al. 2004). Interesantemente, el dominio BH3 de la proteína proapoptica BNIP1 fue importante para la unión a SNAP- α , un adaptador que sirve de unión entre la chaperona ATPasa, NSF y SNAREs (Nakajima et al. 2004).

Por otro lado, las caspasas son proteasas de cisteína que median la apoptosis. En el sistema nervioso maduro, las caspasas no solo están involucradas en la mediación de la muerte celular sino también en eventos reguladores que son importantes para las funciones neurales, tales como la poda de los axones y la eliminación de las sinapsis, los cuales son necesarios para refinar la maduración de circuitos neuronales. Más aún, las caspasas pueden ser reactivadas para causar muerte celular así como también numerosos cambios no letales en las neuronas durante numerosos procesos patológicos. Así, aunque una activación global de caspasas conduce a apoptosis, una activación restringida y localizada activación controlar la fisiología normal y la patofisiología en las neuronas vivas (Hyman y Yuan 2012).

5.9 MICRO-RNAs: BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN.

Los microRNAs (miRNAs) fueron descubiertos en los primeros años de la década de los 90s por Ambros y colaboradores mientras estudiaban ciertas fases del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Lee, Feinbaum y Ambros 1993). Sus análisis de genes que controlaban los tiempos de diferenciación en este nemátodo revelaron que el gen *lin-14* era necesario para la diferenciación a linajes específicos celulares y a su vez encontraron que el gen *lin-4* actuaba como un elemento en *trans* que regulaba de forma negativa a *lin-14*. Subsecuentemente se determinó que *lin-4* codificaba para un RNA no codificante de 22 nucleótidos de largo que regulaba negativamente la traducción del RNAm del gen *lin-14* por medio de una hibridación directa de pares de bases entre el RNA del gen *lin-4* y la región 3'UTR del RNAm de *lin-14*. Debido a que en ese momento existían muy pocos ejemplos de cómo un RNAm era regulado naturalmente por un RNA anti sentido, se pensó que esa forma de regulación era un fenómeno particular a este tipo de nemátodo. Siete años después, otro RNA pequeño regulatorio *let-7* fue identificado como otro regulador del desarrollo en *C. elegans* (Reinhart et al. 2000). Sorprendentemente tanto el patrón de la secuencia como la expresión de *let-7* se encontraron conservados en una amplia variedad de animales (Pasquinelli et al. 2000) sugiriendo un rol más general para los RNAs pequeños en la regulación génica. Estos nuevos RNAs reguladores de 18-24 nucleótidos de longitud fueron nombrados microRNAs y desde su descripción inicial, más de 4000 miRNAs han sido identificados en animales, plantas e incluso virus y en el genoma humano se han llegado a detectar mas de 45,000 sitios putativos en las regiones 3' no traducidas (UTR) como sitios blanco para miRNAs (Friedman et al. 2009). Los miRNAs ejemplifican la visión emergente que los RNAs no codificantes pueden rivalizar con las proteínas en importancia regulatoria. Se ha estimado que mas de la mitad del transcriptoma humano está bajo el control de miRNAs (Pasquinelli 2012).

Los miRNAs son inicialmente transcritos por la RNA polimerasa II como transcritos conocidos como microRNAs primarios (pri-miRNAs). Al igual que otros transcritos de la polimerasa II estos RNAs sufren modificaciones como el “capping” y poliadenilación, siendo su longitud de varios kilobases (Kim 2005). Aproximadamente,

la mitad de los pri-miRNAs parecen carecer de marcos de lectura abierta y por ende son considerados no codificantes. Sin embargo, estos transcritos normalmente sufren de empalme alternativo y muchos miRNAs se encuentran localizados en segmentos intrónicos. De hecho una fracción significativa de miRNAs (40%) se encuentran en intrones de genes que codifican para proteínas (Rodriguez et al. 2004). Adicionalmente, los miRNAs se encuentran frecuentemente en tandem por lo que un solo pri-miRNA contiene muchas secuencias de miRNAs. Dentro del pri-miRNA en una región de 60-80 nucleótidos se encuentra el miRNA maduro; esta región se dobla sobre sí misma para formar una estructura secundaria del tipo tallo-asa. Este tipo de estructuras son reconocidas y escindidas en el núcleo por el complejo microprocesador que incluye a la enzima Drosha que es una RNasa tipo III y la proteína DGCR8 (Kim 2005). Una vez llevado a cabo el corte, al producto se le conoce como miRNA precursor (pre-miRNA) y éste es rápidamente exportado al citoplasma por el factor nuclear exportina 5 que usa una proteína Ran-GTPasa como cofactor (Bohnsack, Czapinski y Gorlich 2004; Lund et al. 2004; Yi et al. 2003) Una vez en el citoplasma el pre-miRNA sufre un segundo corte por un complejo enzimático conocido como Dicer, dando como resultado un dúplex de RNA de 18-24 nucleótidos aproximadamente. Este dúplex es incorporado en una manera ATP-independiente a un largo complejo proteico conocido como complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) cuyo centro está conformado por proteínas del tipo Argonaute (Ago). Solamente una hebra del dúplex se vuelve el miRNA maduro y se mantiene asociada de manera estable dentro del complejo RISC. La hebra opuesta se conoce como hebra pasajera o miRNA*. Cuando el miRNA es cargado en el complejo RISC, la proteína Ago2, la única proteína Ago humana capaz de cortar los RNAm blanco, corta también la hebra pasajera (Gregory et al. 2005). Una vez montado en el complejo RISC el miRNA actúa como un guía que dirige al complejo RISC a sus RNAm blanco, estos RNAs son subsecuentemente degradados o traduccionalmente silenciados. El grado de complementariedad entre el miRNA y su blanco determina el mecanismo de regulación: cuando un miRNA y su RNAm exhiben complementariedad perfecta el RNAm es cortado y destruido por el complejo RISC, mecanismo predominante en plantas. Un apareamiento imperfecto de pares de bases entre el miRNA y el RNAm ocurre en la mayoría de los miRNAs de mamíferos conduciendo a un silenciamiento traduccional del RNAm (Figura 4).

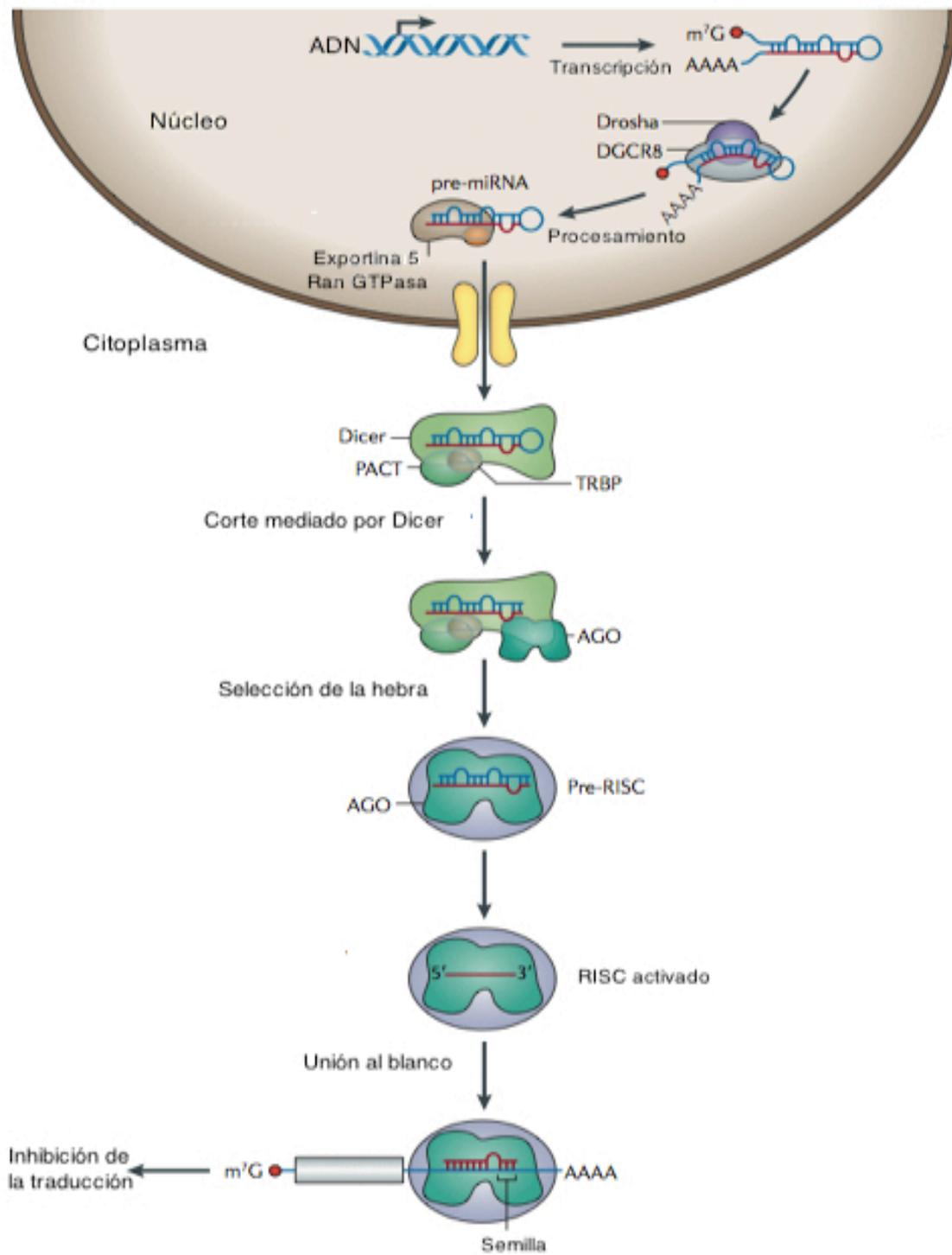


Figura 4. Biogénesis y mecanismo de acción general de los miRNA's. (Tomado y modificado de Davidson y McCray 2011).

5.10 miRNAs Y SU RELACIÓN EN CÁNCER DE MAMA.

A la fecha se cuenta con evidencia que demuestra que los miRNAs juegan un papel crítico en la inicio y progresión del cáncer y que la alteración de los miRNAs es un fenómeno ubicuo entre los cánceres humanos. Consecuentemente, eventos que activan o inactivan miRNAs cooperan a la alteración de expresión de genes involucrados en la tumorigénesis (Calin y Croce 2006). Por ejemplo, se ha encontrado que algunos miRNAs contribuyen a la oncogénesis funcionando como genes supresor de tumores que se encuentran subexpresados o regulados negativamente, como en el caso de la familia *let-7*, la cual tiene como blanco a los oncogenes *RAS* en cáncer de pulmón, y miR-15a y miR16-1 que tienen como blanco el oncogén *BCL-2* en leucemia linfocítica crónica. También se han encontrado miRNAs que funcionan como oncogenes sobrepresados como en el caso del “cluster” miR 17-92, los cuales tienen como blanco el oncogén *E2F1* en linfomas, o el miR-21 el cual regula el supresor de tumores *PTEN* en carcinomas hepatocelulares (Meng et al. 2007). Dada esta función, se ha dividido a los miRNAs en lo que hoy se conoce como “oncomirs” y miRNAs supresores de tumores dependiendo del tipo de actividad que tengan (Meng et al. 2007). A continuación y de manera general se describirán algunos ejemplos de miRNAs mas relevantes con función de supresores de tumores en cáncer de mama seguidos de los oncomirs más relevantes en esta misma neoplasia.

miRNAs SUPRESORES DE TUMORES.

miR-206

El papel potencial del miR-206 como supresor de tumores en cáncer de mama fue primeramente identificado gracias al empleo de microarreglos de miRNAs entre tejido sano y tumores mamarios (Iorio et al. 2005). El miR-206 se encontró sobrepresado en cánceres que resultaron negativos para la expresión de receptor de estrógenos (RE α) sugiriendo un rol de miR-206 en la regulación del gen de receptor de estrógenos (*ESR1*). De hecho, en años recientes quedó demostrado que miR-206 inhibe la

expresión de *ESR1a* a través de la unión en dos sitios distintos 3'UTR del RNAm (Adams, Furneaux y White 2007). último estudio también demuestra que la expresión de miR-206 es fuertemente reprimida por los agonistas de RE α . El rol de supresor de tumores de miR-206 en cáncer de mama fue posteriormente demostrado debido a la observación de que miR-206, miR-335 y miR126 son regulados negativamente en cáncer de mama metastásico comparado con células parentales (Tavazoie et al. 2008). Subsecuentemente, se observó que la restauración de la expresión de estos tres miRNAs reduce la capacidad invasiva de líneas celulares. La restauración de la expresión de miR-206 en células metastásicas no tiene influencia en la proliferación o sensibilidad a la apoptosis, sin embargo se observaron cambios en la morfología celular, esto probablemente a que miR-206 está involucrado en los procesos de migración celular.

miR-17-5p

También conocido como miR-91 se encuentra localizado en el cromosoma 13q31, una región genómica que sufre de pérdida de la heterocigosidad en múltiples tipos de cánceres incluido el de mama (Eiriksdottir et al. 1998). El oncogén *AIB1* (amplificado en cáncer de mama) es un blanco directo de miR-17-5p. La proteína codificada por el gen *AIB1* es un receptor esteroideo que potencia la actividad transcripcional de RE α , *E2F1* y otros genes codificantes para factores de transcripción por lo que miR-17-5p reprime la traducción del RNAm de *AIB1* inhibiendo la función de *E2F1* y RE α . La baja expresión de *AIB1* por acción del miR-17-5p resulta en la supresión de la proliferación por la vía estimulada por estrógenos. En células tumorales de mama el gen de la ciclina D1 (*CCND1*) que se encuentra sobreexpresado en aproximadamente 50% de los tumores se ha identificado como un blanco directo de miR-17-5p. Este miRNA inhibe la proliferación de células tumorales de mama mediante la supresión de la ciclina D1. De la misma manera, está demostrado que la ciclina D1 induce la expresión del miR-17-5p dando como resultado un mecanismo de retroalimentación.

miR-125a y miR-125b

El gen HER2 (*ERBB2*) codifica para un receptor de crecimiento epidérmico perteneciente a la familia de receptores con actividad de tirosina cinasa. A pesar de ser considerado un receptor “huérfano” puede unirse a otros receptores de la misma familia de factores de crecimiento para formar heterodímeros, aumentando la actividad de los receptores y activando vías de señalización celular en donde se ven involucradas las proteínas activadas por mitógenos (MAPK), así como la ruta de fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3K) (Baselga y Swain 2009). Amplificación y/o sobreexpresión de este gen se ha reportado en múltiples carcinomas mamarios, e incluso se le considera como un biomarcador. Los miR-125a y miR-125b son subexpresados en tumores que presentan amplificación y sobreexpresión de HER2 (Mattie et al. 2006). Ambos miRNAs son supresores tumorales en potencia y su sobreexpresión en la línea mamaria SKBR3 (una línea celular HER2-dependiente) suprime los niveles de RNAm y proteína de HER2 y HER3, lo que trae como consecuencia una reducción en el crecimiento, motilidad celular e invasividad (Scott et al. 2007). Tal efecto no ha sido observado en células no dependientes de HER2 y no transformadas como la línea MCF10A. Para fines de este trabajo, vale la pena mencionar que el miRNA 125b, es el único miRNA reportado experimentalmente hasta el día de hoy que tiene como blanco al gen *BIK*. Esto se comprobó cotransfectando la línea de monocitos humanos THP1 con un sistema reportero que contenía la región 3'-UTR de *BIK* río abajo del gen de la luciferasa junto con un precursor sintético del miR-125b. La inhibición de la actividad de la luciferasa fue comparada con células transfectadas únicamente con el vector (Duroux-Richard et al. 2010).

Familia miR-200

La invasión y la metástasis son fenómenos característicos de una progresión tumoral maligna. Evidencia creciente indica que la activación de programas celulares embrionarios como la transición epitelio-mesénquima (EMT) promueven la aparición de estos fenómenos permitiendo que las células pierdan adherencia entre ellas y aumentando la motilidad del tumor así como la diseminación del mismo (Thiery et al. 2009). En los últimos años se ha vuelto evidente que la activación aberrante de la EMT

es la responsable de la transformación maligna en muchos cánceres humanos. La EMT está regulada por una serie de proteínas que mantienen desactivada la vía. Cuando la EMT se activa, se inducen represores transcripcionales que tienen como blanco las proteínas encargadas de regular negativamente este fenómeno. Estos represores transcripcionales incluyen miembros de la familia Snail y de la familia ZHF (Peinado, Olmeda y Cano 2007). Estas proteínas inhiben la transcripción de genes epiteliales como el gen de la E-cadherina. Recientemente se demostró que ZEB1 (un miembro de la familia ZHF) es crucial en la activación de la EMT en cánceres humanos incluido el cáncer de mama (Aigner et al. 2007). Se ha demostrado que la familia miR-200 de miRNAs son inductores del fenotipo epitelial suprimiendo la expresión de los inductores de la EMT como ZEB1 y ZEB2 (Gregory et al. 2008). El hecho de que la expresión de *ZEB1* y *ZEB2* esté controlada por la familia de miR-200 sugiere que la supresión de la expresión de estos miRNAs es un paso esencial en la metástasis de los tumores mamarios. La sobreexpresión de miR-200 induce la diferenciación epitelial en la línea celular MDA-MB-231; esta línea se caracteriza por un fenotipo altamente agresivo con capacidad metastásica y tumorigénica.

Familia let-7

La familia let-7 se encuentra altamente conservada entre diversas especies. En cánceres humanos, estos miRNAs suelen encontrarse eliminados o pobremente expresados. Estudios recientes de expresión de miRNAs en células mamarias con capacidad de auto-renovación y en células diferenciadas mostró que la expresión de let-7 era significativamente reducida en las primeras y se veía aumentada su expresión en relación directa con el grado de diferenciación en la línea celular. Al respecto se ha demostrado que la expresión de let-7 reduce la capacidad proliferativa, la habilidad para formar cuerpos esferoides en cáncer de mama, la capacidad de formación de tumores y la inducción de metástasis. Let-7 posee como blancos algunos oncogenes como *H-RAS* y *HMGA2*, los cuales se ven regulados negativamente cuando let-7 se sobreexpresa. Como confirmación de su función supresora de tumores se ha encontrado que la expresión de let-7, es capaz de inhibir a las MAPK, a proteínas G acopladas a receptores de cinasa tipo 2 y a las cascadas de señalización dirigidas por NF- κ B (Dangi-Garimella

et al. 2009).

miR-34a

miR-34a es uno de los miRNAs que se encuentran subexpresados en múltiples tipos de cáncer (Gaur et al. 2007). Este miRNA se encuentra bajo el control transcripcional de p53, aunque en el contexto de cáncer de mama existen muy pocos estudios donde se observa que los niveles de este miRNA son bajos. Uno de estos estudios reporta baja expresión en células mamarias triple negativas y mesenquimales en comparación con líneas celulares de epitelio mamario normal. Los autores en este estudio proponen que las mutaciones en p53 en estos subtipos de cáncer pueden contribuir a la baja expresión de miR-34a. Adicionalmente, miR-34a se ha asociado a sensibilidad a radiaciones. Experimentos en líneas celulares han demostrado que baja expresión de este miRNA induce sensibilidad a radiación (Kato et al. 2009). Dicho en otras palabras, altos niveles de miR-34a ofrecen un efecto protector a las células tumorales. Estos resultados proyectan al miR-34a como un blanco terapéutico potencial en pacientes con resistencia a radioterapias.

ONCOMIRS.

miR-21

miR-21 se ha encontrado consistentemente sobreexpresado en diversos tumores incluyendo mamarios. En mama, su expresión es elevada cuando se le compara con muestras pareadas de tejido sano (Si et al. 2007), sugiriendo que miR-21 podría funcionar como un oncogén. En cultivos de células mamarias se ha llevado a cabo el silenciamiento de este miRNA, mostrando solo un efecto marginal en la sobrevivencia de líneas celulares de cáncer de mama. Por otro lado se sabe que el estradiol inhibe la expresión de miR-21 en el modelo de línea celular MCF-7 (Wickramasinghe et al. 2009). Esta reducción en la expresión de miR-21 correlaciona con un aumento en la expresión de los blancos de este miRNA entre ellos: *PCDC4*, *PTEN* y *BCL-2*, genes considerados como antimetastásicos, por lo que también miR-21 se ha relacionado con

este proceso. El miR-21 también se ha correlacionado con la sobrerregulación de HER2 y se ha involucrado funcionalmente con la invasión celular por vía de las MAPK (ERK1/2) (Wickramasinghe et al. 2009).

miR-10b

El miR-10b fue el primer miRNA al cual se relacionó con potencial metastásico en células de cáncer humanas. A diferencia de otros miRNAs que se sobreexpresan comúnmente en tumores mamarios, el miR-10b se encuentra altamente expresado solamente en células metastásicas y promueve migración celular e invasión *in vitro*; además de promover la iniciación de la invasión y metástasis de tumores mamarios *in vivo*. La expresión de miR-10b es inducida por el factor de transcripción Twist; logrando que miR-10b inhiba la traducción de factores de transcripción de la familia homeobox como D10 (*HOXD10*), resultando en una cascada de señalización alterada que incluye la inducción en la expresión de genes prometastáticos como *RHOC* (Teruya-Feldstein y Weinberg 2007).

Familia miR-373/520c

Los miRNAs de la familia miR-373/520c fueron identificados como prometastáticos usando un perfil genético que involucraba la sobreexpresión de casi 450 miRNAs en la línea celular MCF-7. Estas células fueron transfectadas con dichos miRNAs y sometidas a ensayos de migración para identificar los miRNAs relacionados con este proceso. Se encontró que miR-373 y miR520c promueven la invasión y metástasis *in vitro* e *in vivo*. Estos dos miRNAs provocan un fenotipo migratorio inhibiendo la expresión del receptor asociado con metástasis CD44. De manera importante la expresión ectópica de CD44 sin su región UTR 3' reduce significativamente la migración de células MCF-7 que expresa miR-373 o miR-520c sugiriendo que una regulación negativa de CD44 es requerida para la aparición de un fenotipo migratorio en células MCF-7 (Huang et al. 2008).

5.11 MODELOS EXPERIMENTALES.

Para el estudio del cáncer de mama en humanos contamos con diversos modelos experimentales. Un factor de gran importancia en la elección del modelo es tener claro hasta qué punto refleja la enfermedad en humanos y demostrar su eficacia en investigación (Clarke 1996).

Uno de los modelos experimentales más utilizados son las líneas celulares obtenidas a partir de biopsias o de líquido pleural de pacientes con cáncer de mama. Éstas han sido usadas para estudiar procesos como la proliferación, la apoptosis y la migración y cómo se ven alterados durante la progresión del cáncer de mama. Estos modelos se utilizan frecuentemente dado que son fáciles de propagar, relativamente sencillas de manipular genéticamente, y, bajo condiciones experimentales bien definidas, los resultados son reproducibles y cuantificables (Neve et al. 2006b; Vargo-Gogola y Rosen 2007). Los estudios se han realizado cultivando células en monocapa, en agar, en matrigel y también *in vivo* realizando xenotransplantes en ratones inmunosuprimidos.

Dentro de las líneas celulares que expresan receptores hormonales se han desarrollado varias líneas diferentes. Las más utilizadas han sido la MCF-7, la T47D y la HCC-1428. El trabajo con líneas celulares que expresan receptores hormonales ha permitido estudiar las vías de señalización reguladas por estrógeno y progesterona, hormonas esenciales en el desarrollo de la mama. En cuanto a las líneas celulares que son negativas a los receptores de estrógeno y progesterona las más estudiadas han sido MDA-MB-231, MDA-MB-435 y SKBR3. Estas líneas ofrecen un buen modelo para los estudios que se enfocan en comprender la biología del tumor mamario cuando éste se ha vuelto resistente a los tratamientos basados en drogas anti hormonales como los Taxoles (Neve et al. 2006a).

Es un tema a considerar cuánto se asemejan las líneas celulares al cáncer de mama en humanos. Ninguna línea celular aislada es realmente representativa, sin embargo, un estudio que involucra a 51 líneas celulares muestra que la mayoría posee las anomalías genómicas que se detectan en los tumores primarios (Neve et al. 2006b; Tong et al.

2001; Zou et al. 2002). Sin embargo existen otras diferencias como la falta de representación de todos los subtipos de carcinomas ductales, probablemente debido a que varias líneas celulares se obtuvieron a partir de tumores de estadios avanzados y representan las variantes de mayor malignidad que pueden ser adaptadas al cultivo celular en condiciones *in vitro*.

VI. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama hoy en día representa un grave problema de salud tanto a nivel nacional como internacional. En 2008, la OMS estimó 1.38 millones de nuevos casos en todo el mundo, lo que representa un 23% de todos los cánceres. En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Datos del INEGI estiman que alrededor de 10.7 de cada 100 mil mujeres de mayores de 25 años murieron por cáncer de mama en 2007. A pesar de los numerosos avances realizados a la fecha, el estudio de esta neoplasia resulta difícil debido a la compleja heterogeneidad genética que ésta representa (Curtis et al. 2012), existiendo diversos factores genéticos, epigenéticos y ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad y que aún no se encuentran descritos y/o han sido pobremente estudiados. La comprensión integral de los mecanismos mediante los cuales un gen como *BIK*, puede participar en el proceso de desarrollo y progresión de la neoplasia, en sus diferentes etapas, podrá dar luz a posibles nuevos elementos involucrados en este padecimiento por ser descritos y que podrían establecerse como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de dicha enfermedad.

VII. OBJETIVOS

GENERAL

- Establecer el perfil de expresión de miRNAs por medio de microarreglos de expresión en la línea celular MDA-MB-231 antes y después de silenciar de forma transitoria el gen *BIK*.

PARTICULARES

- Identificar mediante bioinformática posibles rutas alteradas debido al silenciamiento del gen *BIK*.
- Determinar cuál de los miRNAs estudiados en el perfil de expresión tienen una participación en la regulación de la apoptosis o en otros procesos celulares que puedan contribuir o estén relacionados al desarrollo de la neoplasia.

VIII. ANTECEDENTES

En el laboratorio del Dr. Diego Arenas Aranda se han realizado los siguientes estudios, los cuales sirven como antecedente al presente trabajo:

García *et al.* (2005). (A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females). Mediante el uso de microarreglos de cDNA (DNA complementario) se identificaron dos grupos de tumores de acuerdo a su perfil de expresión, probablemente relacionados con la progresión del cáncer. Diez genes no se expresaron en tejido normal sin embargo fueron expresados en algunos tumores. La expresión del gen propapoptótico Bik en particular fue alta en 14/15 tumores (Figura 5), con predominante expresión citoplásmica. El producto del gen *BIK* ha sido asociado con reversión tumoral en diferentes líneas celulares neoplásicas y ha sido propuesta como terapia para inducir apoptosis en cánceres incluyendo el de mama (Reczko *et al.* 2012; Tong *et al.* 2001; Zou *et al.* 2002).

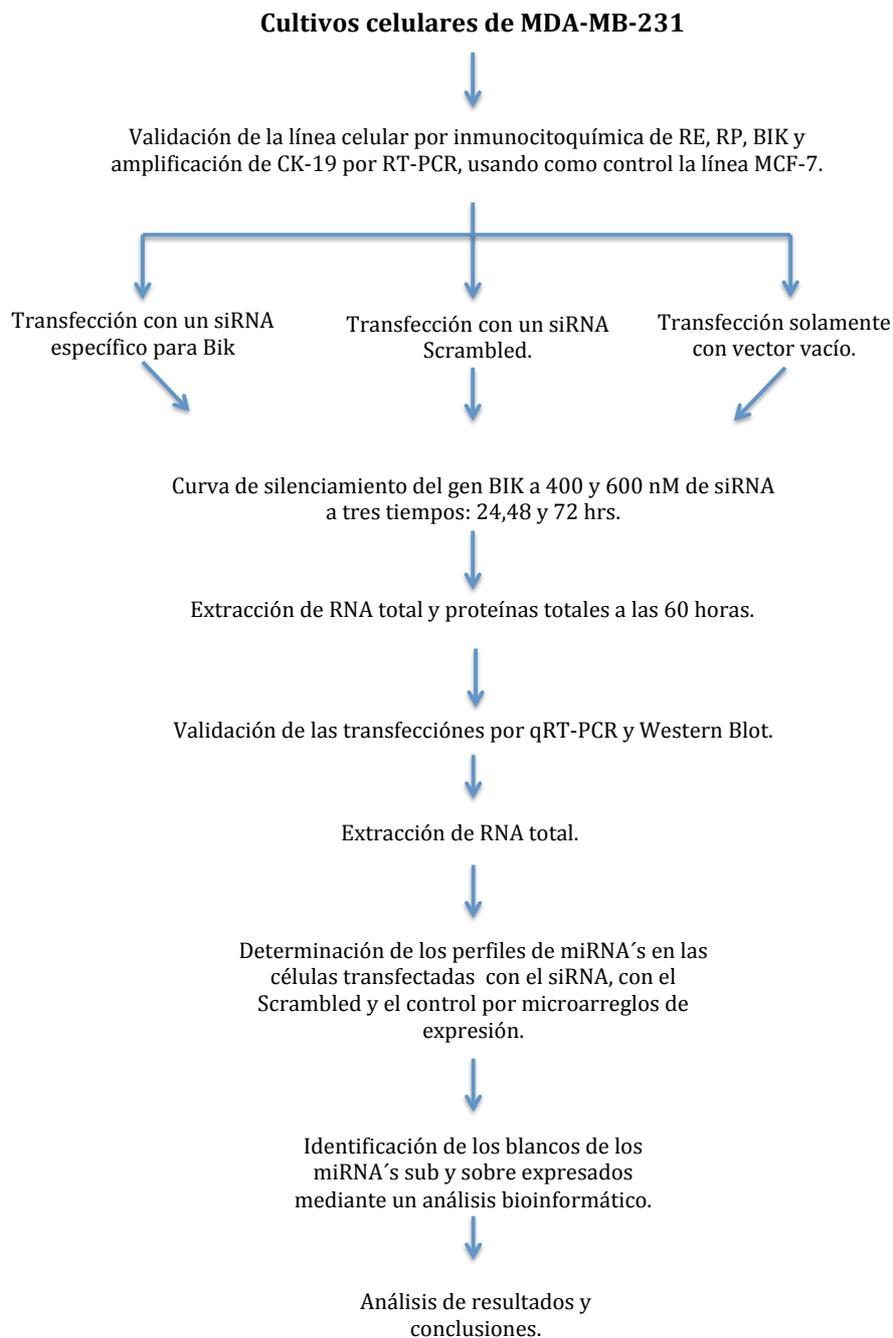
En el trabajo de López *et al.* (2012) (BIK/NBK gene as potential marker of prognostic and therapeutic target in breast cancer patients). Se estableció una correlación de la expresión del RNAm de BIK en tumores mamarios con la expresión del RE α . Los resultados muestran una asociación positiva entre la expresión del RNAm de BIK y el RE α , implicando que BIK puede ser un marcador predictivo en pacientes con cáncer de mama de acuerdo a la expresión de RE α .

Por otro lado en el trabajo titulado “Expression profiles of some apoptotic related proteins in breast cancer samples” (En preparación). Mediante el uso de microarreglos de tejidos y qRT-PCR (García *et al.* 2009). Determinaron la expresión del RNAm y la proteína de BIK en tumores de mama. Se encontró sobreexpresión del mensajero en 93% de las muestras mientras que a nivel de proteína BIK se encontró sobre-expresada en 30% de los tumores analizados. Esto sugiere que la proteína BIK podría estar desempeñando un papel diferente a su papel canónico proapoptótico.

IX. HIPÓTESIS

La reducción en la expresión del gen *BIK* mediante el uso de un siRNA, inducirá una o varias alteraciones celulares que se verán reflejadas en un cambio en la expresión de uno o más miRNAs. Mediante la identificación de estos miRNAs diferencialmente expresados podremos hacer una inferencia de otras posibles rutas o procesos celulares involucrados con la expresión del gen *BIK*.

X. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



XI. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Cultivo celular.

Las líneas empleadas MCF-7 y MDA-MB-231, todas ellas derivadas de glándula mamaria, fueron un generoso obsequio del Hospital de Oncología CMN-SXXI. Estas líneas fueron mantenidas en medio DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-Glutamina (2.5 mM) (GIBCO) y piruvato de sodio (0.5 mM) (GIBCO). Todos los cultivos fueron crecidos en una atmósfera a 37⁰C y con un 5% de CO₂.

11.2 Inmunocitoquímicas para RE, RP, BIK y BIK-P.

Se sembraron aproximadamente 4 x 10⁴ células MDA-MB-231 y 8 x 10⁴ células MCF-7 en laminillas de 4 pozos (BD Falcon), se dejaron crecer 24 horas y cada pozo fue lavado dos veces con 250µl de Buffer salino de Fosfatos (PBS)1X. Posteriormente el PBS fue retirado y las células fijadas con una solución de metanol:acetona (50:50) durante 20 minutos a 4⁰C. La solución de fijación se retiró y se realizó otro lavado con PBS 1X. Por último las laminillas con las células fijadas fueron almacenadas a 4⁰C hasta su uso. Las inmunocitoquímicas para RE α , receptor de progesterona (RP) y BIK fueron un trabajo en colaboración con la Dra. Patricia Piña Sánchez (UIMEO, Hospital de Oncología CMN-SXXI). Para esta técnica las laminillas pasaron por un tren de hidratación con una serie de alcoholes graduales (etanol absoluto, etanol 96%, etanol 70% y agua destilada) por dos minutos cada uno. Las células ya hidratadas se colocaron en PBS 1X, pH 7.2 y posteriormente se realizó la recuperación antigénica incubando las laminillas con el reactivo Trilogy 1X (Cell Marque) en una olla a presión 100⁰ C por 15 minutos con el fin de desenmascarar el antígeno. Terminando esta incubación las laminillas fueron lavadas con una solución de metanol:peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos, con el fin de eliminar la actividad de cualquier peroxidasa endógena. Las laminillas se lavaron con PBS 1X y fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo primario correspondiente. El sistema de detección utilizado fue de peroxidasa de rábano acoplada a un anticuerpo secundario el cual fue revelado con

diaminobenzidina (DAB). Las laminillas fueron contrastadas con Hematoxilina, y deshidratados con alcoholes graduales (agua destilada, etanol al 70%, etanol al 96% y etanol absoluto), cada uno por dos minutos, aclarados en xilol y montados con resina sintética. Los anticuerpos anti-RE (ER α clona-10H12B10), anti-RP (clona F-4), anti-BIK (clona FL-160), anti-BIK-P (policlonal) y el anticuerpo secundario “anti-rabbit” (policlonal) fueron obtenidos de Santa Cruz Biothechnology y todos los anticuerpos fueron usados a una dilución 1:100.

11.3 Extracción de RNA para RT-PCR de CK-19.

Se sembraron 1×10^6 células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en cajas de cultivo de 100 mm x 20mm (Corning). Al alcanzar un 90% de confluencia a las células se les retiró el medio y fueron lavadas dos veces con PBS 1X. La extracción de RNA total se continuó usando el kit comercial RNeasy (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y consiste en los siguientes pasos. Una vez lavadas las células se agregó 350 μ l del buffer de lisis RLT a la placa de cultivo. Con ayuda de un raspador se recolectó todo el lisado y se pipeteó a un tubo eppendorf de microcentrífuga (1.5 mL). Se mezcló ligeramente por vortex y se le añadió al lisado 1 mL de etanol al 70% seguido de una homogenización por pipeteo suave. La mezcla se pipeteó dentro de una columna de purificación y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 s. Posteriormente fueron añadidos 700 μ l del buffer RW1 a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 s. Se realizaron dos lavados de la columna usando 500 μ l del buffer RPE centrifugando a 10,000 rpm durante 15 s. El RNA fue eluído en un tubo eppendorf estéril, aplicando a la columna 25 μ l de agua DEPC y centrifugando a 10,000 rpm durante 1 min.

11.4 Síntesis de cDNA y RT-PCR.

El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA total usando el kit comercial SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y consiste en los siguientes pasos. Se combinó en un tubo estéril de 0.2 ml el RNA, 1 μ l Oligo-dT₂₀ (50 μ M), 1 μ l del mix de dNTPs (10 mM) y se llevó a un

volumen final de 10 μ l con agua DEPC incubándose a 65 $^{\circ}$ C por 5 minutos y al terminar poniendo en hielo al menos un minuto. Posteriormente se agregaron los siguientes reactivos en un tubo estéril de 0.6 ml: 2 μ l del buffer RT 10X, 4 μ l de MgCl₂ (25 mM), 2 μ l de DTT (0.1 M), 1 μ l de RNasa OUT (40 U/ μ l) y 1 μ l de la enzima SuperScript III (200 U/ μ l). Se adicionaron 10 μ l de este último mix a la mezcla que contiene el RNA y se mezcla gentilmente seguido de una incubación a 50 $^{\circ}$ C por 50 minutos y terminando la reacción a 85 $^{\circ}$ C por 5 minutos; el cDNA se almacenó a -70 $^{\circ}$ C hasta su uso. Para las reacciones de RT-PCR se utilizaron iniciadores específicos para un fragmento del transcrito del gen CK-19. Forward: 5'-AAGCTAACCATGCAGA-3' y Reverse: 5'TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC 3'. Todas las reacciones se hicieron bajo las siguientes condiciones: 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador correspondiente y 0.2 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado (dNTP's). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 $^{\circ}$ C durante 5 min., 35 ciclos de 95 $^{\circ}$ C, 30 s, 60 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 30 s y una extensión final de 72 $^{\circ}$ C durante 4 min. Los productos de la RT-PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% para su posterior análisis, el gel fue teñido con SYBR Gold 50,000X (Molecular Probes).

11.5 Transfecciones transitorias.

Para la interferencia del gen *BIK* se realizaron transfecciones transitorias utilizando un siRNA de doble cadena con la siguiente secuencia, Sentido: 5'-AAGACCCUCUC-CAGAGACAU-3', Antisentido: 5'-AAAUGUCUCUGGAGAGGGGUC-3. Se usaron dos tipos de controles; uno fue el control "Scrambled", en este control se transfectó un siRNA comercial (Ambion) el cual no tiene homología por transcritos humanos y el segundo control llamado control de transfección, el cual contiene lo necesario para transfectar a excepción del siRNA el cual fue cambiado por PBS 1 X. Como vehículo de transfección se utilizó la mezcla de lipofectaciones Oligofectamina (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para lo cual un día antes de la transfección se sembraron en placas de 12 pozos, 5 x 10⁴ células de la línea celular MDA-MB-231 por pozo de tal manera que al día siguiente la confluencia celular quedara entre el 30-50%. Al día siguiente se preparó en un tubo eppendorf estéril la mezcla Oligofectamina-

Optimem para lo cual se mezclaron por pozo a transfectar 10 μ l de Oligofectamina con 1 μ l de Optimem (Gibco) dejándose incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los complejos siRNA-Oligofectamina se prepararon agregando 15 μ l de un stock 20 μ M del siRNA (concentración final de 600 nM) diluyendo con 85 μ l de Optimem. Se mezcló suavemente por pipeteo y la mezcla se añadió al primer tubo que contenía la mezcla Oligofectamina-Optimem. Los complejos se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X, añadiendo 400 μ l de medio DMEM:F12 no suplementado. Una vez formados los complejos, los 100 μ l de la mezcla de transfección se añadieron por goteo en el pozo seguido de una agitación suave. El silenciamiento fue evaluado por tiempo real y por Western Blot a las 60 posterior al inicio de la transfección. Ya que a este tiempo encontramos un silenciamiento significativo y sin que los cultivos llegaran a confluencias superiores al 80%

11.6 PCR en tiempo real.

Se extrajo RNA de los pozos transfectados y se utilizaron 50ng del RNA total por reacción. Empleando el equipo PCR en tiempo real Step One (Applied Biosystems) y el kit Power SYBR Green RNA to Ct (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante para evaluar los niveles de mRNA de *BIK* y *HPRT* éste último como gen endógeno. La secuencia de los iniciadores específicos para cada gen fueron las siguientes *HPRT* Forward: 5`-CGTG-GGGTCC-TTTTCACCAGCAAG-3`, *HPRT* Reverse: 5`-AATTATGGACAGGACTG-AACGTC-3`, *BIK* Forward: 5-GAG ACATCTTGATGGAGACC-3', *BIK* Reverse: 5'-TCTAAGAACATCCCTGATGT-3'. Por reacción se agregaron los siguientes reactivos: 10 μ l de Power SYBR Green RT-PCR Mix (2X) 10 pmol de cada uno de los iniciadores, 0.16 μ l de enzima RT-Mix, 50 ng de RNA total y agua DEPC para un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de reacción para los iniciadores de *HPRT* y *BIK* fueron las siguientes: 55⁰C por 15 minutos, 95⁰C por 3 minutos, y 45 ciclos de 95⁰C por 30 segundos, 58⁰C por 30 segundos y 72⁰C por 30 segundos. Al termino se programaron curvas de disociación de 60⁰C a 95⁰C, con lectura de fluorescencia cada 0.5 ⁰C para verificar la especificidad de la reacción. Asimismo, se realizaron diluciones seriadas para evaluar la eficiencia de

amplificación de cada par de iniciadores. A través del uso del reactivo de SYBR Green podemos realizar una cuantificación relativa del gen de interés, en relación a un gen endógeno como *HPRT*, permitiéndonos conocer cuántas veces más o cuántas veces menos hay un mismo mRNA en las muestras. Para hacer el cálculo de los valores de expresión relativa fue usado el método de Livak. El cual supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak y Schmittgen. 2001).

11.7 Extracción de proteínas.

Después de las 60 horas de transfección se recolectaron células transfectadas. Para ello se retiró el medio y se lavo dos veces con PBS 1X, se agregaron 250 μ l de una solución Tripsina-EDTA 0.25% (Sigma) y se incubó a 37 °C durante 3 minutos. Posteriormente se adicionó un volumen de medio DMEM:F12 suplementado al 10% con SFB y se aspiraron las células a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, después se decantó el sobrenadante y lavó la pastilla dos veces con PBS 1X. A la pastilla celular se añadieron 50 μ l del buffer de lisis RIPA 1X (PMSF 1mM, EDTA 1mM, SDS 0.2%, Tritón 2%, H₂O c.b.p., RIPA 2X: EGTA 2mM, NaCl 316mM, Na₂Mo₄ 20mM, NaF 50mM, Tris-HCl 20mM, pH=7.5) y 10 μ l de un coctel inhibidor de proteasas (Roche). Mezclando por pipeteo suave y se dejó tres horas en agitación constante a 1200 rpm a 4°C en agitación constante (Thermomixer, Eppendorf). Posteriormente se centrifugaron las proteínas a 14,000 rpm durante 5 minutos, al termino se tomó el sobrenadante y almacenó a -30 °C hasta su uso.

11.8 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

Para la electroforesis se preparan dos geles: el gel concentrador y el gel separador. Primero se prepara el gel separador (10 ml: Tris-HCl pH 8.8, 0.375M, Acrilamida 12%, SDS 10%, APS 10%, Tetrametilenetilendiamino (TEMED) 4 μ l, H₂O destilada c.b.p.) el cual se dejó a temperatura ambiente hasta polimerizar. Posteriormente se preparó el gel concentrador (10 ml: Tris-HCl pH 6.8, 0.125M, Acrilamida 4%, SDS 10%, APS 10%, TEMED 10 μ l, H₂O c.b.p.). A las muestras se adicionó un volumen de buffer de

muestra (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, Glicerol, Azul de bromofenol al 0.4% en Tris 0.5 M pH 6.9) y se colocaron en baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Después se montó el gel en la cámara de electroforesis y se adicionó el buffer de corrida (Tris – Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%). Las muestras, 50 µg de proteína se depositaron en el gel y se llevó a cabo la electroforesis a 150 V durante 2 horas.

11.9 Electrotransferencia e Inmunodetección (“Western Blot”).

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de Polivinil-Fluorido (PVDF), haciéndoles pasar una corriente constante de 200 mA durante 2 horas en un buffer de transferencia (Tris-base 48mM, Glicina 39 mM, Metanol 20%). Una vez terminada la transferencia la membrana se bloqueó por 2 horas con una solución de TBS-Tween (0.1%) que contenía leche al 5%. Finalizado el tiempo, se lavó la membrana con TBS-Tween (0.1%) en tres ocasiones por 5 minutos cada lavado. Se incubó con el anticuerpo primario en una dilución 1:500 para BIK y 1:2000 para el control GADPH durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente el exceso de anticuerpo primario se retiró realizando lavados en tres ocasiones con TBS-Tween (0.1%) de 5 minutos cada lavado. Posterior a los lavados se realizó la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa en una dilución 1:5000 para BIK y 1:10000 para GADPH dejando incubar 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo fue retirado lavando en tres ocasiones con TBS-Tween (0.1%) por 10 minutos cada lavado.

11.10 Revelado de la membrana de PVDF.

Una vez lavadas las membranas con TBS-Tween se mezclaron por pipeteo suave 200 µl de Luminol (Sigma Aldrich) con 200 µl del sustrato para peroxidasa de rábano (Pierce) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente la mezcla y agregaron 100 µl de esta mezcla a la membrana de PVDF; después ésta se cubrió con un cuadro de acetato con la finalidad de esparcir la mezcla uniformemente por toda la membrana. Posteriormente se colocó una película fotográfica (Kodak) sobre el papel acetato y todo se colocó sobre una cámara de revelado para western blot, se usó un tiempo de exposición de aproximadamente 40 segundos. La película fotográfica se

enjuagó medio minuto con solución de revelado y posteriormente se pasó a una solución fijadora por 30 segundos para terminar enjuagándose con agua destilada.

11.11 Extracción de RNA total para microarreglos.

Para la obtención de las muestras de RNA que se utilizaron en los microarreglos se realizaron dos experimentos individuales: en cada uno de los experimentos se transfectaron 5 pozos con siRNA específico para *BIK*, 5 pozos se transfectaron usando el RNA “Scrambled” y a 5 pozos se le agregó la mezcla de transfección libre de ácidos nucleicos. A 60 horas de iniciada la transfección se realizó la extracción de RNA de cada uno de los pozos y se combinaron las muestras de RNA de cada uno de los grupos de ambos experimentos. El resultado final fue de seis muestras que se analizaron por microarreglos de miRNAs: la muestra de RNA de células tratadas con un siRNA específico para *BIK*, la muestra de RNA células donde se transfectó con RNA “Scrambled” y la muestra de RNA de células a las que se agregó la mezcla de transfección sin ningún ácido nucleico. Cada uno de estos tres grupos con su respectiva réplica biológica.

La extracciones de RNA de cada uno de los pozos se llevó a cabo usando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones las cuales se describen a continuación. Después de 60 horas de transfección los pozos fueron lavados dos veces con PBS 1X y añadieron 500 μ l de Trizol directo al pozo. Se agitó suavemente la placa por 3 minutos y se homogenizó el Trizol en cada pozo por pipeteo. El lisado se pasó a un tubo eppendorf nuevo incubando 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente dejar el lisado una noche a -80°C . Al día siguiente se agregaron 100 μ l de Cloroformo (Sigma) al lisado y agitó vigorosamente durante 1 minuto para después dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos fueron centrifugados durante 20 minutos a 12,000 rpm a temperatura de 4°C . Terminada la centrifugación se observaron dos fases en los tubos, la fase superior o fase clorofórmica y la fase inferior o fase fenólica. Con ayuda de una micropipeta y teniendo cuidado de no perturbar la fase inferior se tomó toda la fase clorofórmica y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. El RNA en la fase

clorofórmica se precipitó con 250 μ l de isopropanol al 100% (Sigma Aldrich) dejándose a -30°C durante una noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla de RNA fue lavada tres veces con etanol al 75% y resuspendida en 20 μ l de agua DEPC. La cantidad y calidad de los RNAs extraídos fueron verificados mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y electroforesis en gel de agarosa.

11.12 Microarreglos de miRNAs.

Adición de cola Poli (A) a las muestras de RNA

Los microarreglos de miRNAs se realizaron en colaboración con el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda en la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión (INMEGEN). Para la realización de éstos se usó el kit de marcaje “Flash Tag Biotin HSR RNA Labeling kit” (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante el cual de manera general consiste de dos pasos: 1) La adición de una cola Poli (A) a las moléculas de RNA y 2) ligación y marcaje de estas mismas (Figura 6). Para la adición de la cola Poli (A) a muestras de RNA se tomaron 800 ng de RNA total de cada una y ajustó el volumen de la muestra a 8 μ l finales con agua libre de RNAsas. Posteriormente se agregaron 2 μ l de la solución “RNA Spike Control Oligos” por muestra y se colocaron en hielo hasta su uso. Por separado se diluyo el mix de ATP 1:500 con una solución de Tris 1mM y preparó una mezcla de reacción de acuerdo a lo establecido en la Tabla 1.

Tabla 1. Mezcla para la reacción de adición de la colita de Poli (A), las cantidades mostradas son por reacción

Componente	Cantidad (μ l)
Buffer de reacción 10X	1.5
MnCl ₂ 25 mM	1.5
Mezcla de ATP diluido 1:500	1.0
Enzima PAP	1.0

Posteriormente se añaden 5 μ l del mix de reacción a 10 μ l que contenían la muestra de RNA y se mezcla por pipeteo suave obteniendo un volumen final de 15 μ l. El tubo se deja en incubación a 37°C durante 15 minutos para completar la reacción de poliadenilación.

Ligación “Flash Tag”

Después de la incubación de la reacción de poliadenilación se centrifuga brevemente el tubo y se agregan 4 μ l del mix de ligación “Flash Tag Biotin HSR” 5X a cada muestra. Posteriormente se agregan 2 μ l de la DNA ligasa T4 a cada muestra. Es importante no hacer un mix en este paso ya que se puede favorecer el proceso de auto-ligación. La reacción se mezcla suavemente por pipeteo y se centrifuga brevemente incubándose a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 minutos, por último, la reacción se detiene agregando 2.5 μ l de la solución HRS (Figura 6).

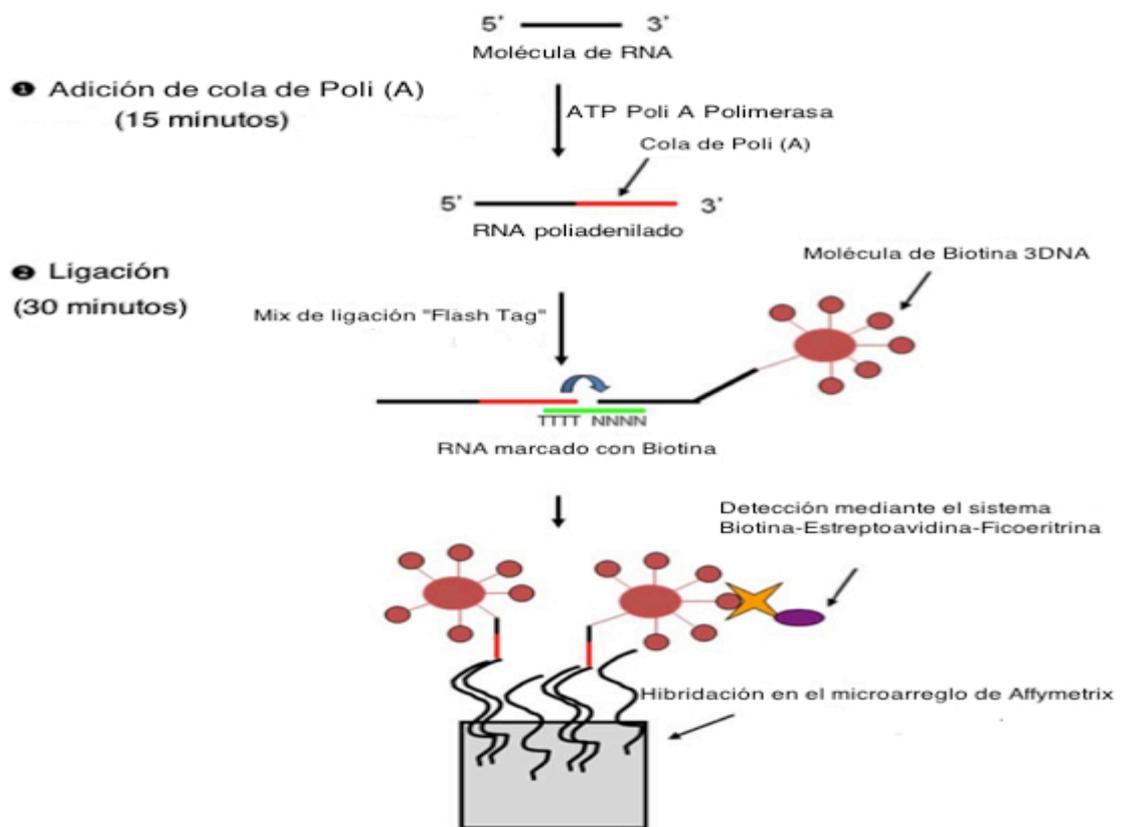


Figura 6. Diagrama general de la reacción de poliadenilación, ligación y marcaje para las muestras de microarreglos.

Hibridación, Lavado y Tinción

Para la hibridación, lavado y tinción de las muestras, se utilizó el kit GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit (Affymetrix) y el horno de hibridación GeneChip Hybridization Oven 645 (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. El horno se dejó precalentar por lo menos una hora antes del proceso a 48 °C y dejando el rotor encendido a una velocidad de 60 rpm. Los arreglos se sacaron del empaque y se dejaron a temperatura ambiente entre 10 y 15 minutos, mientras tanto se añadieron los reactivos de la Tabla 2 en el orden indicado a las muestras previamente marcadas, los volúmenes están dados por reacción.

Tabla 2. Reactivos para preparar la mezcla de hibridación, las cantidades están dadas por muestra

Componente	Volumen para arreglo V 2.0 (µl)
Mezcla de hibridación 2X	50
Formamida 27.5%	15
DMSO	10
Controles de hibridación 20X	5
Oligo control 3 nM	1.7
Volumen total	81.7

Por último, la mezcla de hibridación se incubó a 99 °C por 5 minutos y posteriormente a 45 °C por 5 minutos. Posterior a ello se tomaron 100 µl y se inyectaron en el microarreglo. Los microarreglos se cargaron en el horno de hibridación e incubaron a 48 °C por 18 horas. Una vez terminada la hibridación, se retiraron los microarreglos del horno y se extrajo con una micropipeta la mezcla de hibridación. Posteriormente se llenó cada microarreglo con el buffer de almacenamiento de microarreglos y se dejó que se equilibrara a temperatura ambiente antes de proseguir con los lavados. Para los lavados y tinciones se usó la estación de lavados GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) la cual se programó de acuerdo con el protocolo de la Tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de lavado y tinción con la estación de fluidos 450 (Affymetrix)

	Protocolo en la estación de fluidos 450
Lavado Post-hibridación #1	10 ciclos de 2 mezclas/ciclo con buffer de lavado A a 25 °C.
Lavado Post-hibridación #2	8 ciclos de 15 mezclas/ciclo con buffer de lavado B a 50 °C.
Tinción 1	Tinción del microarreglo por 10 minutos con el cocktail de tinción 1 a 25 °C.
Lavado Post-tinción	Lavado de 10 ciclos de 4 mezclas/ciclo con buffer de lavado A a 30 °C.
Tinción 2	Tinción del microarreglo por 10 minutos con el cocktail 2 de tinción a 25 °C
Tinción 3	Tinción del microarreglo por 10 minutos con el cocktail de tinción 1 a 25 °C.
Lavado Final	15 ciclos de 4 mezclas/ ciclo con el buffer de lavado A a 35 °C
Buffer de almacenamiento de microarreglos	Llenar el microarreglo con el buffer de almacenamiento.

Una vez lavados y teñidos los microarreglos, se leyeron en el equipo GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Las intensidades de las señales fueron convertidas en valores numéricos que se almacenaron en archivos con el formato .CEL para su posterior análisis.

11.13 Normalización de datos y análisis de expresión de miRNAs.

En cualquier microarreglo tras escanear la imagen se obtiene una serie de valores de intensidad de cada elemento dentro del microarreglo, los cuales deben de procesarse antes de realizar cualquier análisis basado en ellos. Esto consiste básicamente en: 1) corrección del ruido de fondo, 2) normalización y 3) resumen o sumarización de los

valores de cada uno de los elementos dentro del microarreglo. La normalización de los datos y el análisis de expresión se realizó en colaboración con la Bióloga Sandra Lorena Romero Córdoba (INMEGEN). Para lo que se usó el software R (<http://www.r-project.org/>) usando la plataforma de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) para descargar la paquetería de Affymetrix (affy) para la normalización de los datos y la paquetería de Limma (limma) para obtener los miRNAs diferencialmente expresados. La corrección de fondo se hizo por el método de RMA (“Robust Multi-array average”) que implica el uso de modelos lineales con una estimación basada en métodos estadísticos robustos como lo es “median polish”. La corrección por RMA solamente toma en cuenta los valores “perfect match” (PM) en el microarreglo es decir aquellas sondas que tienen una hibridación perfecta y transforma a logaritmos base 2 cada una de las intensidades de cada sonda ajustada por el fondo. También realiza un proceso conocido como “median polish” separadamente para cada conjunto de sondas sobre una matriz comprendida por los microarreglos en filas y las sondas en columnas. Los datos de expresión fueron normalizados por el método de cuantiles. Este tipo de normalización asume que la distribución global de la intensidad de señal en los microarreglos debe ser similar entre dos condiciones cualesquiera, con solo un subconjunto de sondas que cambian su expresión relativa en una manera simétrica. Bajo esta suposición, la mediana de la señal de expresión del percentil superior (99% de los datos) debería ser ampliamente parecida a cualquier otro de los microarreglos normalizado por el método de cuantiles. La normalización por cuantiles es la normalización usada por omisión en la mayoría de los chips de Affymetrix (Irizarry et al. 2003). Una vez realizada la corrección de fondo y la normalización de datos, se calcularon los miRNAs diferencialmente sobreexpresados para lo cual se realizó un análisis lineal y un análisis Bayesiano, realizando una prueba de hipótesis y un estadístico t para cada una de las sondas dentro del microarreglo. Se realizaron contrastes o comparaciones entre los grupos “Scrambled” vs Control, “Scrambled” vs siRNA y Control vs siRNA. Los resultados incluyen un valor de cambio en la expresión (fold change) en logaritmo base 2, el estadístico-t, valores de *p* y el parámetro bayesiano B (Smyth 2012).

11.14 Análisis de miRNAs y su predicción con posibles rutas biológicas/metabólicas.

Una vez determinados qué miRNAs particulares se encontraban diferencialmente expresados, se realizó un análisis de redes biológicas mediante el software DIANA miRPath v.2.0. ([http:// www.microrna.gr/miRPathv2](http://www.microrna.gr/miRPathv2)). Este software permite al usuario predecir los potenciales genes blanco de los miRNAs seleccionados y combina estos resultados con algoritmos de intercalación y meta-análisis, dando como resultado un agrupamiento jerárquico de las rutas celulares posiblemente afectadas, basado en los niveles de interacción de estos miRNAs. La información relacionada a los miRNAs y a las rutas celulares el software la obtiene de la miRBase v 18 y de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Vlachos et al. 2012). En este software el usuario puede seleccionar entre genes blancos predichos *in silico* y genes blanco validados experimentalmente. La predicción *in silico* se lleva a cabo usando el algoritmo de DIANA-microT-CDS el cual computa el valor de la interacción miRNA-gen para blancos predichos en la región 3'-UTR y en la región de la secuencia codificante de los transcritos. Este algoritmo ha sido probado contra datos experimentales de alta resolución, exhibiendo la más alta sensibilidad y especificidad en comparación con otros algoritmos de predicción de blancos para miRNAs (Reczko et al. 2012). Para analizar nuestros datos de miRNAs solo se realizaron predicciones *in silico* debido a la falta de blancos descritos o comprobados experimentalmente para ninguno de los miRNAs que resultaron sobreexpresados.

XII. RESULTADOS

12.1 Estado de los receptores de Estrógenos, Progesterona y de la proteína BIK y BIK-P.

Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con el fin de conocer el estado de los receptores de Estrógeno (RE) y Progesterona (RP) con el fin de asegurar la identidad molecular de nuestros cultivos. En nuestro modelo de trabajo, la línea celular MDA-MB-231, diversos reportes en la literatura la describen negativa para ambos receptores. Con el fin de tener una línea celular para comparar el estatus negativo de los receptores de estrógeno y progesterona se usó a la línea MCF-7 ya que esta línea celular esta reportada como positiva para ambos receptores (Neve et al. 2006a). Después de realizar los ensayos de inmucitoquímica observamos que la línea MDA-MB-231 se mostró de acuerdo a lo reportado siendo negativa para ambos receptores, mientras que en la línea MCF-7, se observó señal del compuesto cromógeno para ambos receptores, aunque con cierta heterogeneidad observado en los diferentes campos examinados por laminilla, presentando algunas células con una señal más fuerte que otras (Figura 7). Como control negativo se usó una laminilla donde se sembraron y fijaron ambas líneas celulares, incubadas con el anticuerpo secundario. De manera similar se realizaron inmunocitoquímicas para evaluar si nuestros cultivos contaban con la presencia de la proteína BIK y con su versión fosforilada en el residuo Treonina (Thr) 33 (BIK-P), usando ambas líneas celulares. Aunque hasta ahora no se cuenta con antecedentes que indiquen claramente la presencia y localización de proteína BIK y su forma fosforilada en estas líneas, se ha reportado que ambas líneas cuentan al menos con la presencia del transcrito y la proteína de BIK. Una vez realizadas las inmunocitoquímicas se observó que en la línea MCF-7 la señal que corresponde a la proteína BIK aparece con una localización predominantemente citoplasmática, mientras que en la línea MDA-MB-231 se observa una posición predominantemente nuclear (Figura 8). El patrón observado es muy similar para la versión fosforilada de BIK (Figura 8).

MCF-7

MDA-MB-231

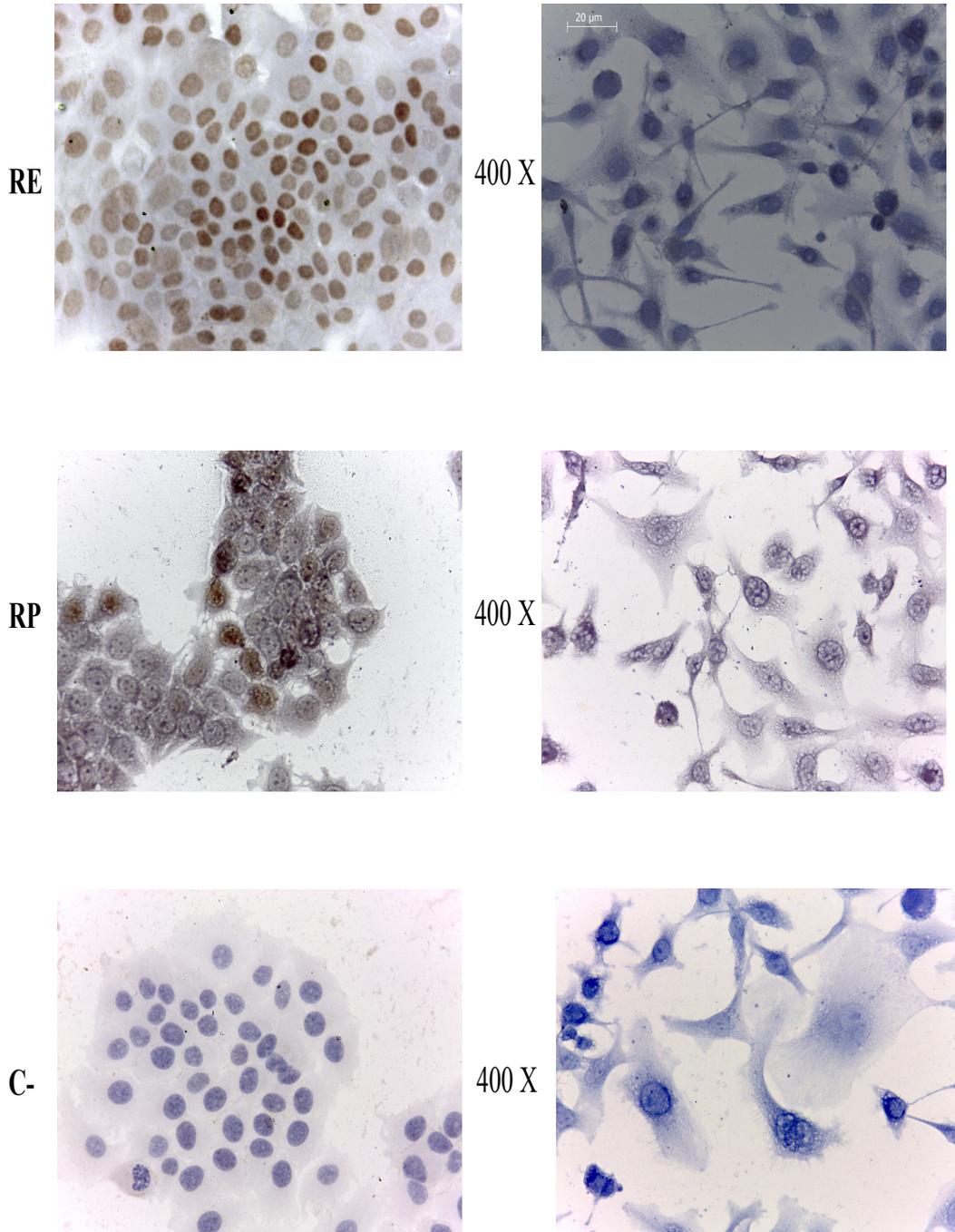


Figura 7. Inmunocitoquímicas para RE y RP en MCF-7 (columna izquierda) y MDA-MB-231(columna derecha), esta ultima comportándose de acuerdo a lo reportado. En MCF-7 tanto para RE y RP se observan diferentes grados de intensidad en la señal. Para el control negativo (C-) la incubación solamente se llevó a cabo con el anticuerpo secundario.

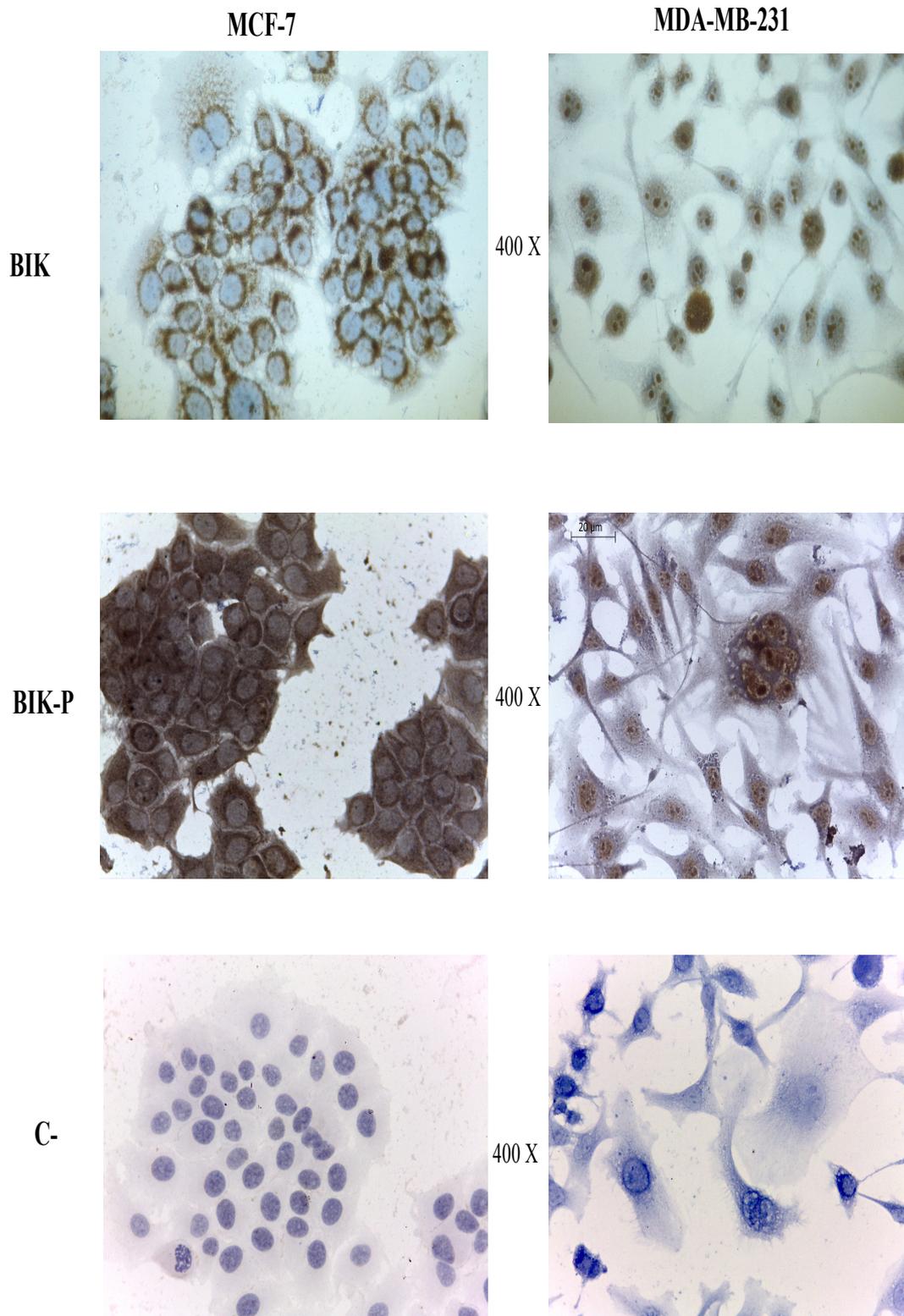


Figura 8. Inmunocitoquímicas para la proteína BIK y BIK-P para la línea MCF-7 (columna de la izquierda) y MDA-MB-231 (columna de la derecha). Para el control negativo (C-) la incubación solamente se llevó a cabo con el anticuerpo secundario.

12.2 Amplificación de CK-19 por RT-PCR.

La citoqueratina 19 (CK-19) se ha reportado como abundantemente expresada en tumores de origen epitelial, incluyendo el mamario (Stathopoulou et al. 2003). Por lo tanto se amplificó un fragmento en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 como un posible marcador que nos indicara el origen epitelial de esta línea celular. El fragmento de cDNA amplificado para cada línea celular tiene un tamaño correspondiente a los 751 pares de bases (pb). Ambas líneas celulares mostraron presencia del amplificado. Como control se usó cDNA de leucocitos el cual no mostró ninguna banda de amplificación en el gel de agarosa donde fueron separados electroforéticamente los productos de la RT-PCR (Figura 9).

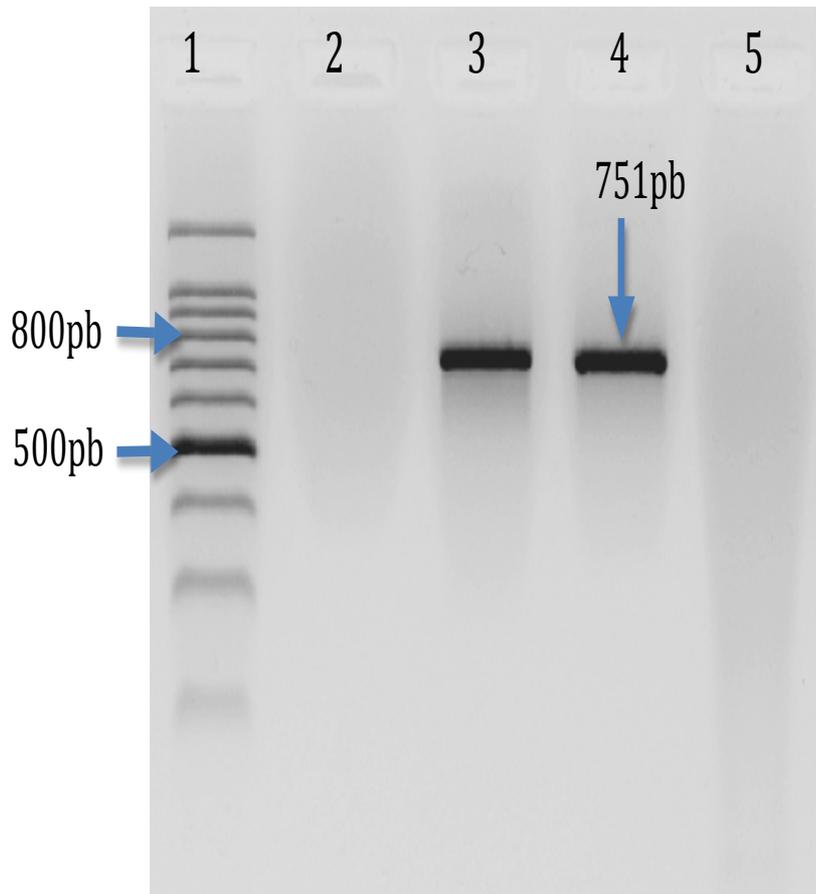


Figura 9. Productos de amplificación por RT-PCR. Carril 1 marcador de peso molecular 100 pb, carril 2 control negativo, carril 3 producto de la línea MCF-7, carril 4 producto de la línea MDA-MB-231 y carril 5 muestra de cDNA de leucocitos humanos.

12.3 Evaluación de los niveles del mensajero de *BIK* después de la transfección.

Para corroborar el efecto del siRNA específico para *BIK* se evaluaron los niveles de mensajero de *BIK* realizando una curva de tres tiempos: 24, 48 y 72 horas de iniciada la transfección con dos concentraciones del siRNA específico para *BIK*: 400 y 600 nM en la línea celular MDA-MB-231. Mediante el uso de PCR en tiempo real, la cuantificación del transcrito del gen *BIK* se llevó a cabo empleando al transcrito del gen *HPRT* como normalizador, haciendo uso del método de Livak para cuantificar los niveles de RNAm. Las curvas de amplificación muestran la clásica cinética sigmoidea de las reacciones de amplificación en tiempo real, mientras que las curvas de disociación corroboran la especificidad de la reacción al presentar un solo pico por cada producto amplificado (Figura 10). El análisis mostró que la concentración de 600 nM de siRNA causa disminución sobre el mensajero de *BIK* en el grupo siRNA de aproximadamente 76.5% ($p=0.018$) entre las 48 y 72 horas cuando se compara con el grupo “Scrambled”; mientras que se observó una disminución de 42.5% ($p=0.009$) en el grupo siRNA entre las 48 y 72 con la concentración de 400 nM cuando se compara con el grupo “Scrambled” (Figura 11). Debido a lo anterior se decidió trabajar con la concentración de 600 nM y un tiempo de recolección de la muestra de 60 horas debido a que a las 72 horas los pozos se mostraban demasiado poblados haciendo que las células empezaran a perder adherencia. Las muestras de RNA empleadas para los microarreglos también se evaluaron por tiempo real mostrando resultados muy parecidos a los anteriores, 76% de silenciamiento ($p=0.023$) en la réplica 1 y 79% ($p=0.013$) de silenciamiento en la réplica 2 (Figura 12). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se realizó una prueba T de Student para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y el grupo transfectado, así como entre el grupo control y el grupo “Scrambled”. La prueba T no arrojó ninguna diferencia significativa entre el grupo control y el grupo “Scrambled”.

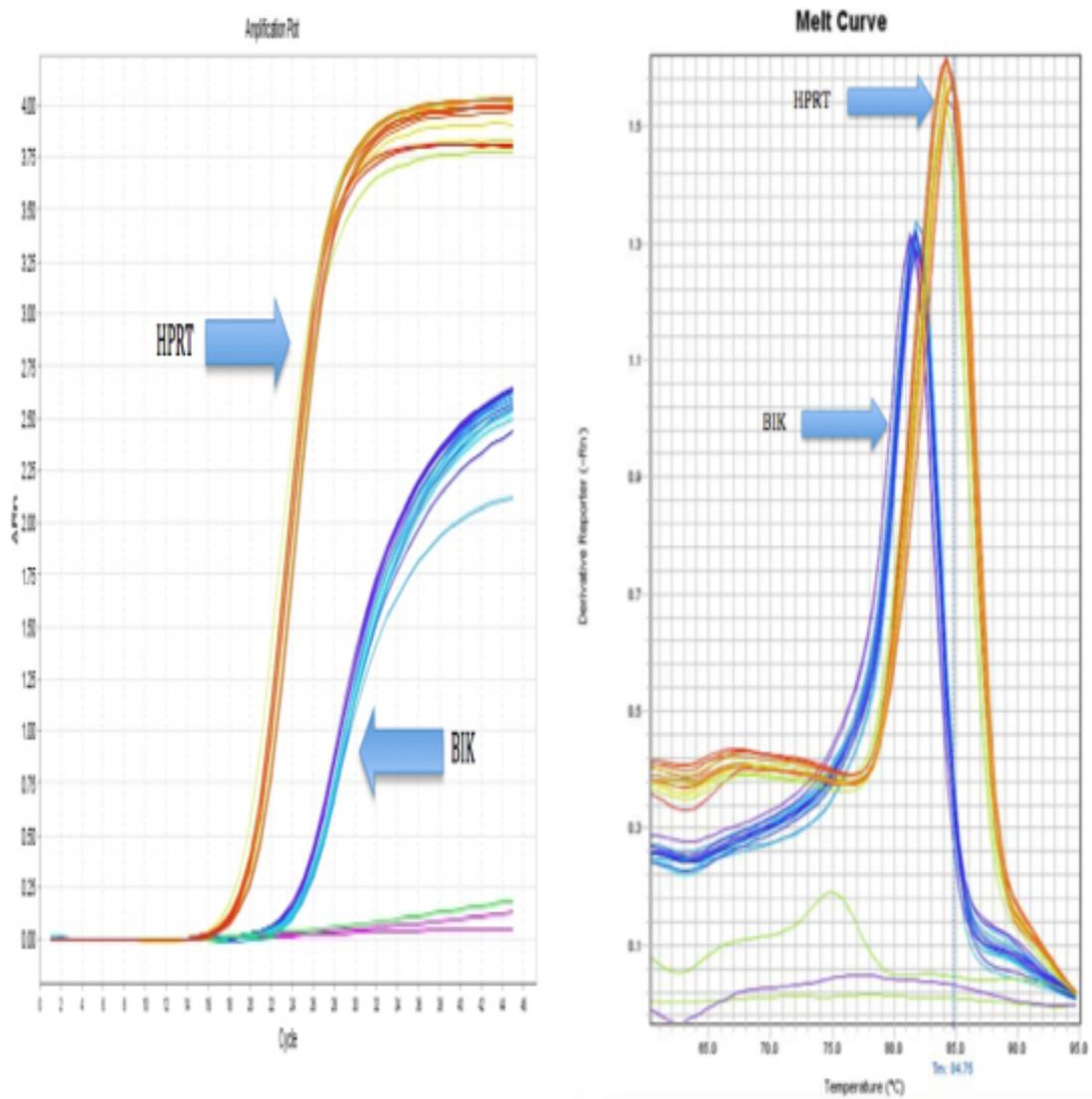


Figura 10. Curvas de amplificación (derecha) y disociación (izquierda) para *HPRT*(amarillo) y *BIK*(azul) en las reacciones de qRT-PCR.

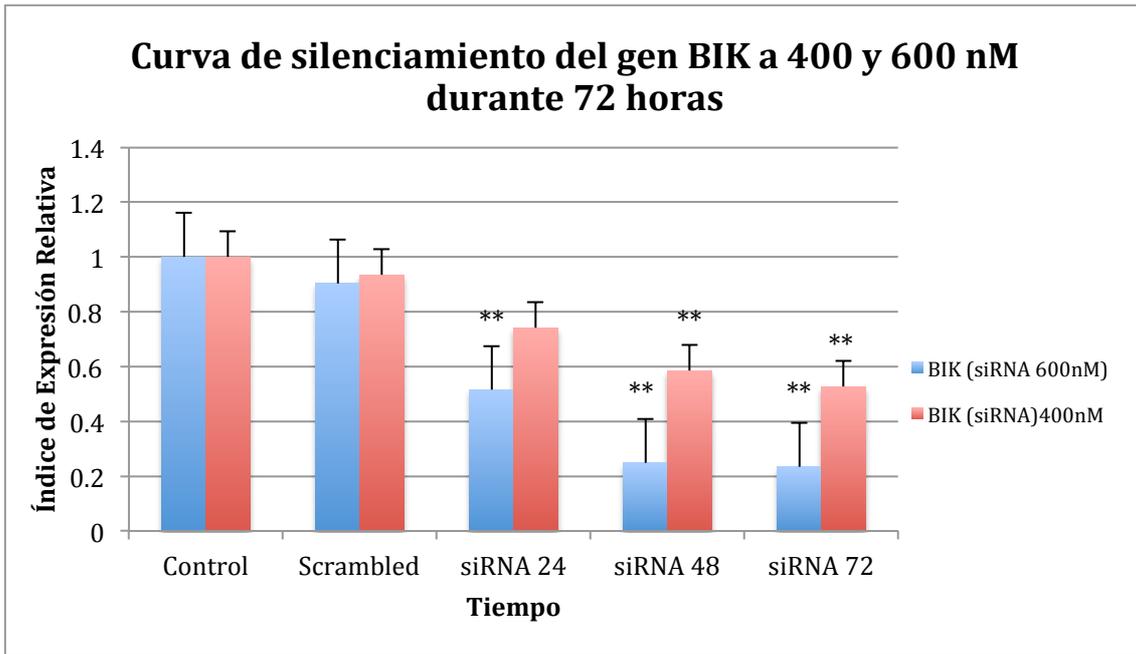


Figura 11. Curva de silenciamiento a 24, 48 y 72 horas de iniciada la transfección empleando dos concentraciones de siRNA: 400 y 600 nM, se observa silenciamiento del transcrito de BIK de aproximadamente 76.5% entre las 48 y 72 horas a 600 nM y de un 42.5% entre las 48 y 72 horas a 400 nM. El símbolo ** denota un valor de p menor a 0.05 en la prueba T de Student.

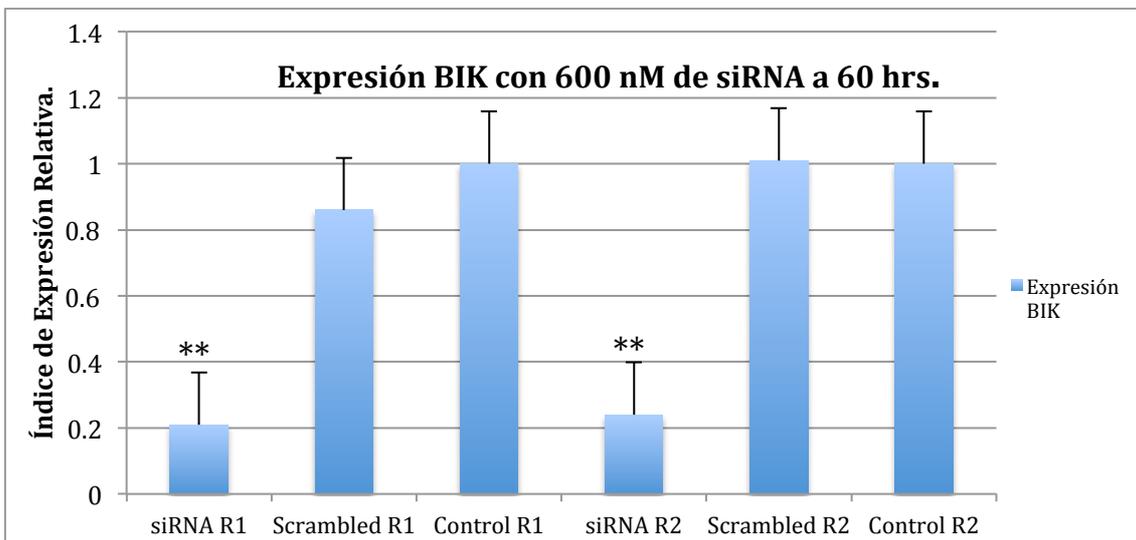


Figura 12. Gráfica de expresión del gen BIK de las muestras usadas para los microarreglos, la réplica uno muestra un 79% de silenciamiento mientras que la réplica 2 muestra un 76% de silenciamiento. El símbolo ** denota un valor de p menor a 0.05 en la prueba de Student.

12.4 Evaluación de los niveles de la proteína BIK por Western Blot.

La expresión de la proteína BIK se evaluó después de 60 horas de iniciada la transfección por medio de Western Blot. Se usaron dos concentraciones de siRNA interferente para valorar la disminución de la proteína: 400 nM y 600 nM usando células transfectadas con “RNA scrambled” como control negativo. Se encontró que con 600 nM se abate aproximadamente un 94% ($p=0.022$) la expresión de la proteína mientras que 400 nM se abate un 36% ($p=0.016$). Como control de carga se empleó la detección de la proteína Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). La proteína BIK y GAPDH no mostraron cambios en el grupo “Scrambled” a las diferentes concentraciones utilizadas (Figura 13). La normalización de la intensidad del pixelaje se hizo con el programa “AlphaEaseFC 4.0.”

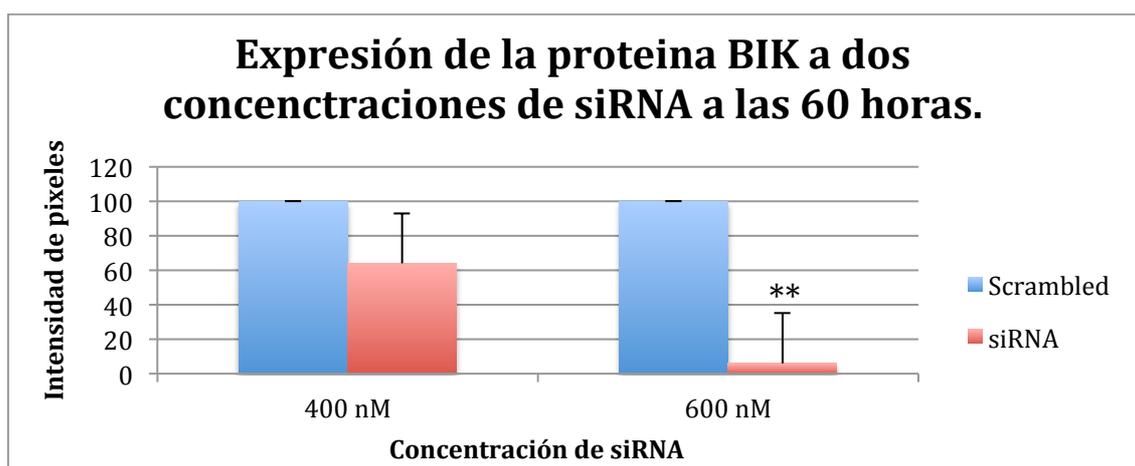
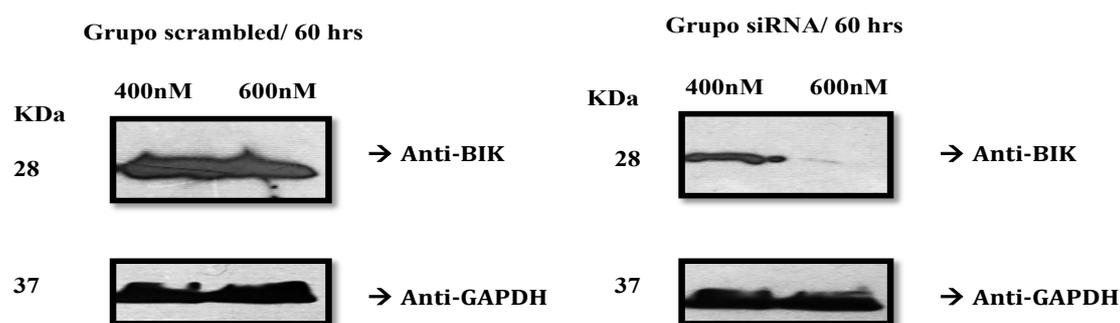


Figura 13. Western blot de las transfecciones a 400 nM y 600 nM. Se utilizó la proteína GAPDH para normalizar los datos de intensidad de pixeles. En la gráfica se puede apreciar una depleción de la proteína de aproximadamente un 94% con respecto a su control. El símbolo ** denota un valor de p menor a 0.05 en la prueba de Student.

12.5 Normalización de datos y miRNAs diferencialmente expresados.

La tecnología de microarreglos forma parte de una clase de metodologías que permiten monitorear la expresión de miles de genes dentro de la célula de manera simultánea. Para que estas mediciones de la expresión sean exactas y precisas es importante tomar en cuenta las variaciones sistemáticas y experimentales que pudieran ocurrir en cada uno de los experimentos de microarreglos. Algunas fuentes de variación (no debidas a diferencias biológicas en las muestras) incluyen: diferencias en el marcaje, diferencias en la preparación de la muestra, diferencias en la hibridación y diferencias en la foto-detección. El objetivo de la normalización de los datos es hacer un ajuste a éstos y que las variaciones que arrojen sean intrínsecas a su comportamiento biológico y no a alguna variación durante el procesamiento de los microarreglos. Como una herramienta de diagnóstico se usaron los gráficos “box plots” en donde se graficaron todos los datos de los seis microarreglos utilizados (Figura 14) antes y después de la normalización por cuantiles y corrección de fondo (RMA). Como se observa en el gráfico después de la normalización, la mediana de los datos es la misma para todos los microarreglos.

Para la obtención de los miRNAs diferencialmente expresados en la comparación “Scrambled” vs siRNA se tomaron como líneas de corte los siguientes parámetros: que los miRNAs seleccionados tuvieran un cambio en su expresión (fold change) igual o mayor a 2, un valor de p ajustado igual o menor a 0.05 y un valor de B mayor o igual a 3 lo que nos da una un valor de confianza del 95%. El parámetro estadístico B fue considerado como criterio de selección debido a que se ha demostrado que B es un mejor parámetro estadístico en comparación con el parámetro p en el sentido de que minimiza la probabilidad de seleccionar genes como falsos positivos dando una mayor confianza estadística (Lönstedt y Speed. 2012).

Estas condiciones de alta astringencia nos permiten seleccionar de forma única los miRNAs con la mayor significancia estadística y dejar fuera a los miRNAs posibles falsos positivos. Bajo estas condiciones se encontraron 17 miRNAs sobreexpresados en el grupo transfectado con el siRNA específico para BIK en contraste del grupo transfectado con “Scrambled siRNA” (Tabla 4). Interesantemente, no se encontró

ningún miRNA en condiciones de subexpresión utilizando estos mismos criterios de selección. El mismo procedimiento fue realizado entre los grupos “Scrambled” vs Control de transfección utilizando las mismas líneas de corte, dando como resultado ningún miRNA diferencialmente expresado. Utilizando los datos de expresión de estos 17 miRNAs diferencialmente expresados se construyó un mapa de calor, utilizando una correlación de Pearson, como el método de elección para la medición de las distancias entre los genes de miRNAs en conjunto con un análisis de ligación completo para la agrupación jerárquica de los mismos (Figura 15). Para la construcción del mapa de calor se tomaron en cuenta el grupo transfectado con el siRNA específico para BIK y su réplica biológica (siRNA R1 y siRNA R2) así como el grupo transfectado con el “siRNA Scrambled” y su replica biológica (Scram R1 y Scram R2).

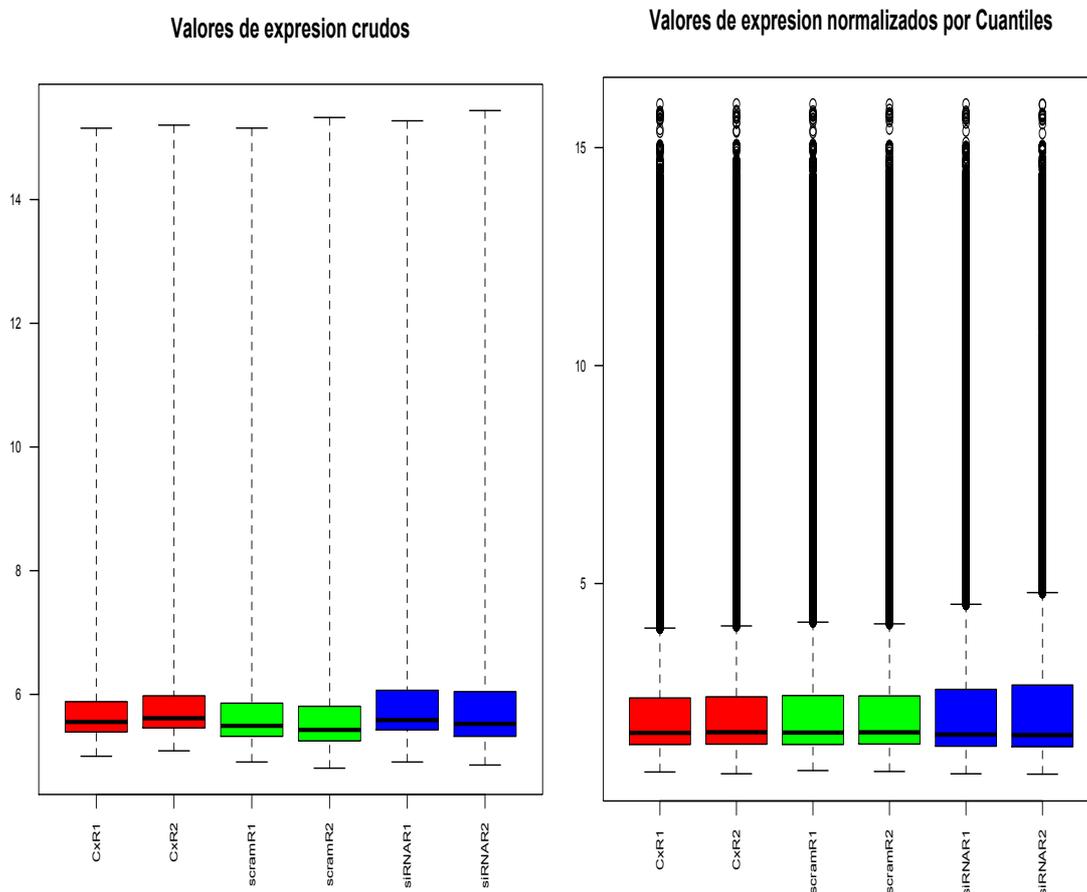


Figura 14. Blox plots de los seis microarreglos antes (valores crudos) y después de la normalización por el método RMA: en rojo grupos Control, en verde grupos “Scrambled” y en azul grupos transfectados

Tabla 4. miRNAs sobreexpresados en el grupo siRNA en comparación con el grupo “Scrambled”

No.	miRNA	Fold Change	Valor de p ajustado	Valor de B	Comparación
1	hsa-miR-611	92.92330891	0.00026596	8.330405302	siRNA vs scram
2	hsa-miR-1914-3p	41.91475586	0.000343305	7.861160863	siRNA vs scram
3	hsa-miR-3184-5p	6.821220229	0.000921775	6.46570342	siRNA vs scram
4	hsa-miR-615-5p	9.622935381	0.001159645	6.24140076	siRNA vs scram
5	hsa-miR-636	3.847363216	0.002773941	4.715361244	siRNA vs scram
6	hsa-miR-675-3p	23.31423434	0.003649704	4.142966118	siRNA vs scram
7	hsa-miR-1303	35.72852516	0.003649704	4.096979979	siRNA vs scram
8	hsa-miR-4292	8.185945678	0.003687473	4.051543256	siRNA vs scram
9	hsa-miR-638	3.327302966	0.00387805	3.962164331	siRNA vs scram
10	hsa-miR-1908	3.61320118	0.004064447	3.868356822	siRNA vs scram
11	hsa-miR-2861	3.74699015	0.004425363	3.627071101	siRNA vs scram
12	hsa-miR-659-3p	10.31217247	0.004505399	3.598861072	siRNA vs scram
13	hsa-miR-4259	47.09267885	0.004560307	3.57656614	siRNA vs scram
14	hsa-miR-1915-3p	3.603622831	0.0045979	3.558215445	siRNA vs scram
15	hsa-miR-3185	4.334682812	0.004722163	3.49181565	siRNA vs scram
16	hsa-miR-149-3p	3.063154694	0.005072337	3.314121154	siRNA vs scram
17	hsa-miR-30c-1-3p	39.38426298	0.0054833	3.162314181	siRNA vs scram

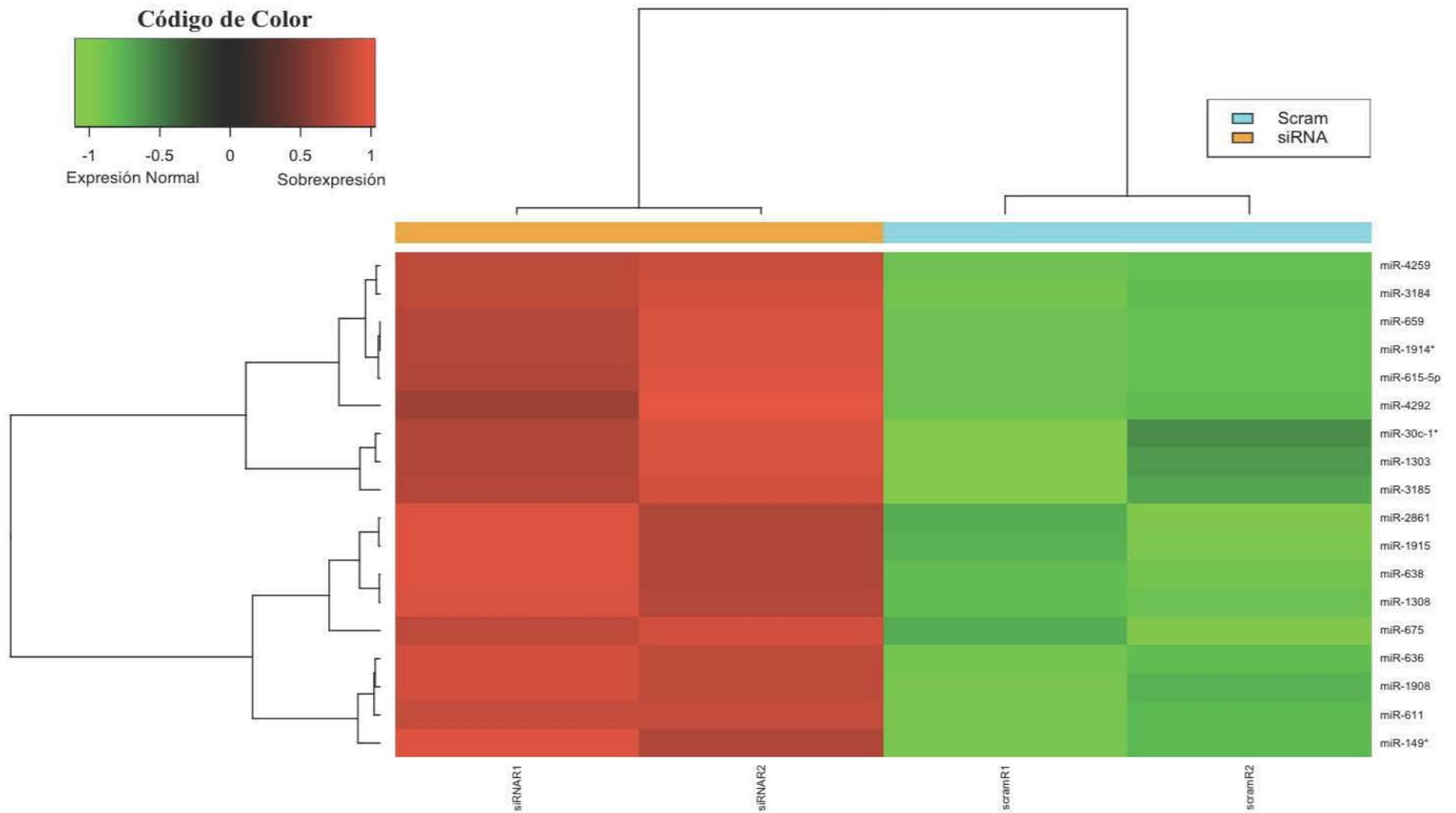


Figura 15. Mapa de calor y dendrograma de los 17 miRNAs que se encontraron diferencialmente expresados en comparación con su expresión en el grupo “Scrambled.”

12.6 Predicción de rutas celulares afectadas por el efecto combinatorio de varios miRNAs

El efecto combinatorio de los 17 miRNAs sobreexpresados se analizó por medio del software DIANA miRPath v.2.0. Este llevó a cabo un análisis de enriquecimiento entre los genes blanco de los miRNAs en la base de datos KEGG. Los genes blanco encontrados por medio de este análisis (Anexo I), solamente son predicciones, debido a que de acuerdo a la base de datos TarBase que se utilizó para el análisis, no se cuentan con blancos experimentalmente comprobados para ninguno de los miRNAs que mostraron sobreexpresión. Sin embargo un análisis posterior en la base de datos miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) nos arrojó una lista de 531 genes validados para los 17 miRNAs que se mostraron sobreexpresados (Anexo 2). El algoritmo utilizado en la predicción por el software DIANA miRPath fue la prueba exacta de Fisher de una cola. Adicionalmente a este análisis de enriquecimiento, al conjunto de datos se le practicó el método de tasa de falso descubrimiento (False Discovery Rate) para producir resultados con valores de p más significativos. Este análisis de enriquecimiento se realizó bajo dos diferentes escenarios: 1) **Unión de genes**, bajo esta opción primero se predijeron los blancos potenciales de mayor significancia para nuestro conjunto de miRNAs, posteriormente estos blanco se usaron para el análisis estadístico de enriquecimiento, es decir el resultado de la combinación es *a priori*. 2) **Unión de rutas**, en este modo el servidor identifica todas las rutas que son blancos potenciales por la combinación de los miRNAs seleccionados. En este segundo modelo el servidor calcula los niveles de significancia entre todos los pares de miRNAs-rutas celulares que arroja el programa, en el segundo paso del proceso el servidor combina los anteriores niveles de significancia y provee un valor de p para cada ruta celular mostrada, esto lo hace aplicando el método combinado de probabilidad de Fisher es decir el análisis es *a posteriori*. Como resultado de estas dos modalidades obtuvimos listados con diferentes rutas y valores de significancia o valores de p . Dentro de los resultados podemos encontrar el número de genes afectados dentro de esa ruta, y el número de miRNAs involucrados en la misma (Tabla 5 y 6). Aunque ambas estrategias producen resultados bastante similares, la prueba de “Unión de Genes” arroja vías celulares que no se mostraron en la prueba de “Unión de Rutas” y

viceversa.

Es importante mencionar que el software no se basa en algún modelo experimental en particular para realizar la predicción de las rutas afectadas por los miRNAs, simplemente analiza todas las rutas celulares depositadas para *Homo sapiens* en la base de datos KEGG y calcula la significancia de las interacciones miRNAs-Rutas celulares. Debido a esto es que podemos encontrar dentro de nuestro listado genes involucrados en otros tipos de cáncer como cáncer pancreático y leucemia mieloide crónica o rutas celulares que no guardan una relación estrecha con nuestro modelo de cáncer de mama como la señalización en el axón o la depresión a largo plazo, las cuales son rutas celulares que son características de células de sistema nervioso central, sin embargo no descartamos la posibilidad de que *BIK* pueda jugar un papel en estas rutas.

El software utilizado también despliega un esquema de cada una de las rutas mostradas en las listas, señalando cuáles son los genes afectados mostrándolos en color amarillo y los genes que participan en más de una de las rutas en las listas en color naranja. En la pestaña de detalles despliega qué genes de una ruta en particular son blancos potenciales de los miRNAs ingresados al análisis. A continuación se presentan los esquemas de algunas de las rutas obtenidas con el software. Las rutas mostradas en los esquemas no son necesariamente aquellas con valores más significativos de p (Figura 16,18 y 19) sino aquellas que guardan una relación más estrecha con nuestro modelo de cáncer de mama y con los procesos donde se ha involucrado el gen *BIK*, esto con el objetivo de darle un sentido biológico a los resultados. No obstante todas las rutas mostradas son estadísticamente significativas.

Tabla 5. Predicción de rutas celulares alteradas que corresponden a los 17 miRNAs sobreexpresados por efecto del silenciamiento de BIK a través de experimentos de interferencia. Se muestra las rutas celulares alteradas bajo el análisis de Unión de Genes (*prueba a priori*). El símbolo * denota aquellas rutas que no aparecieron en el segundo análisis de Unión de Rutas.

Ruta (KEEG)	Valor de <i>p</i>	# Genes	#miRNAs
Biosíntesis de Glicosaminglicano-Heparán Sulfato	3.575182e ⁻⁰⁶	7	5
Interacciones de receptores de Matriz Extracelular (ECM)	3.5751523e ⁻⁰⁶	22	8
Degradación de Lisina	2.362535e ⁻⁰⁵	15	12
Señalización del Axón	0.0001858904	34	11
Cáncer Pancreático*	0.0005665476	23	12
Biosíntesis de Glicoesfingolípidos	0.002426804	5	5
Ruta de señalización de Wnt	0.002426804	43	13
Depresión a largo plazo (LTD)	0.006916551	17	10
Reabsorción de agua regulada por vasopresina*	0.006916551	13	10
Moléculas de adhesión celular	0.006916551	33	12
Señalización de las MAPK*	0.006916551	63	13
Rutas en Cáncer	0.006916551	69	13
Uniones adherentes*	0.01119066	21	10
Leucemia Mieloide Crónica*	0.01798804	20	11
Cáncer de Próstata*	0.02160884	23	11
Adhesión Focal*	0.02160884	48	14
Secreción de Saliva*	0.0301172	25	11
Cáncer de Pulmón de células no pequeñas*	0.03803951	16	11

Tabla 6. Predicción de rutas celulares alteradas que corresponden a los 17 miRNAs sobreexpresados por efecto del silenciamiento de BIK a través de experimentos de interferencia. Se muestra las rutas celulares alteradas bajo el análisis de Unión de Rutas (*prueba a posteriori*). El símbolo * denota rutas que no aparecen en el primer análisis de Unión de genes

Ruta (KEEG)	Valor de p	# Genes	#miRNAs
Biosíntesis de Glicosaminoglicano-Heparán Sulfato	$<1e^{-16}$	6	3
Biosíntesis de Mucina tipo O-Glicano*	$<1e^{-16}$	4	4
Interacciones de Receptores de la Matriz Extracelular (ECM)	$2.288244e^{-12}$	17	4
Degradación de Lisina	$6.298554e^{-09}$	13	9
Moléculas de Adhesión Celular	$1.123062e^{-05}$	22	5
Señalización del Axón	0.0005067435	28	6
Biosíntesis de Glicoesfingolípidos	0.000606843	4k	4
Ruta de Señalización de Wnt	0.004060821	23	3
Uniones Adherentes	0.01098764	8	2
Rutas en Cáncer	0.01633660	30	3
Depresión a largo plazo	0.04804863	9	3

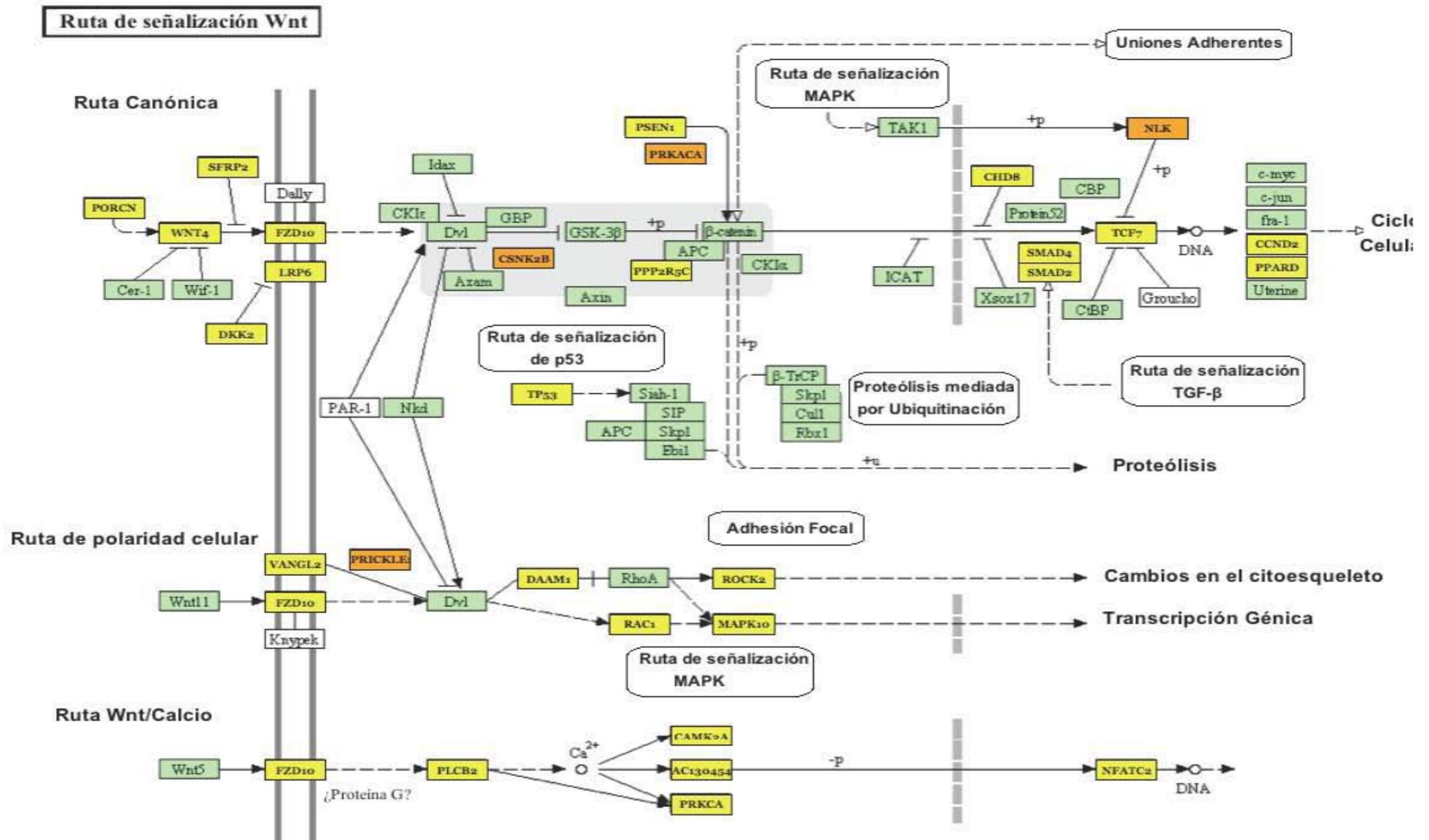


Fig. 16. Ruta de señalización de Wnt, los genes en amarillo son los blancos predichos por el software, los genes en naranja son genes blanco que aparecen en mas de una ruta celular predicha.

Biosíntesis de Glicosaminglicano-Heparan Sulfato

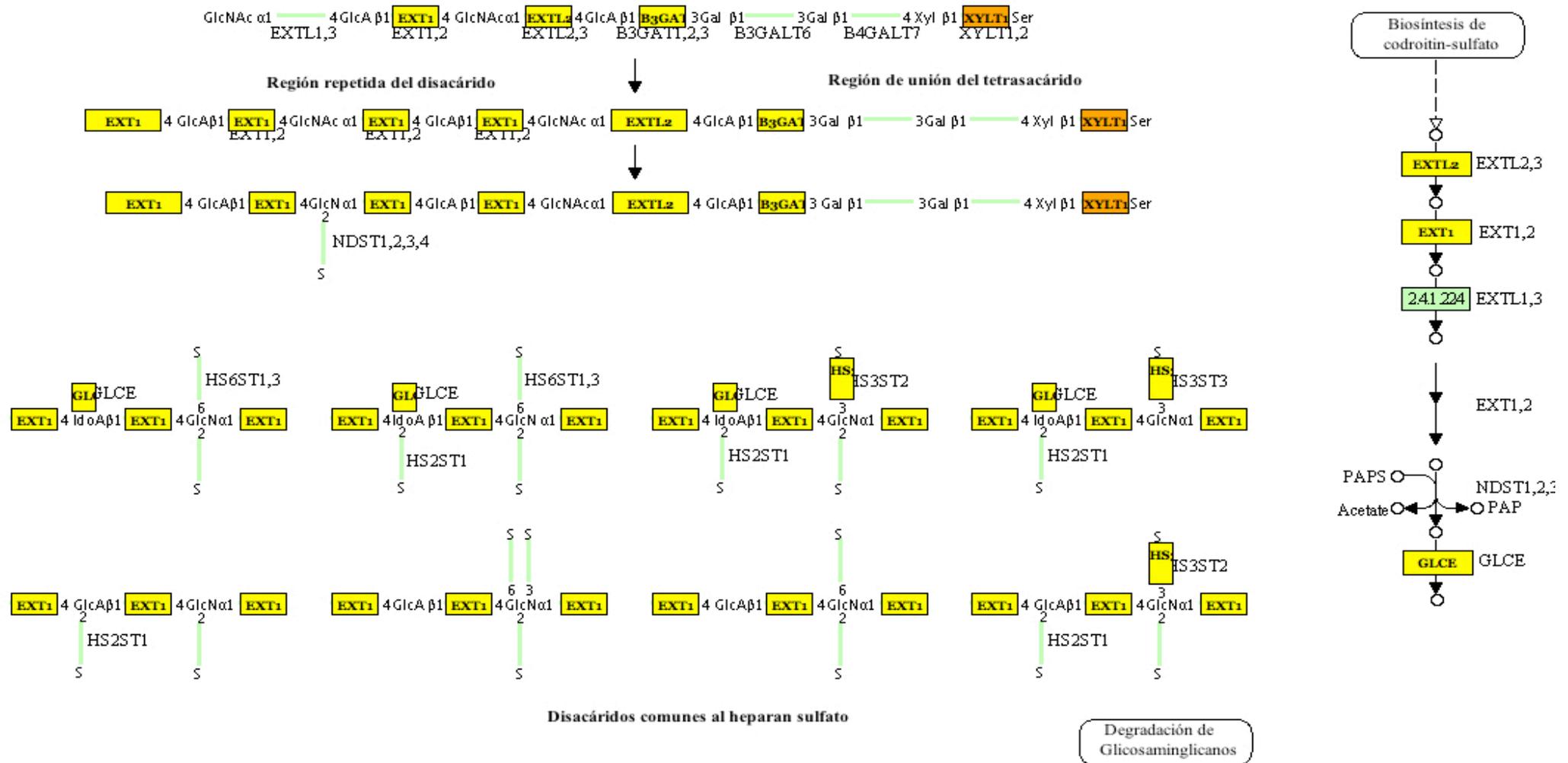


Figura 17. Ruta de Biosíntesis de Heparán sulfato, los genes coloreados en amarillo representan los genes blancos predichos por el software, los genes en naranja son genes blanco que aparecen más de una ruta celular predicha.

ADHESIÓN FOCAL

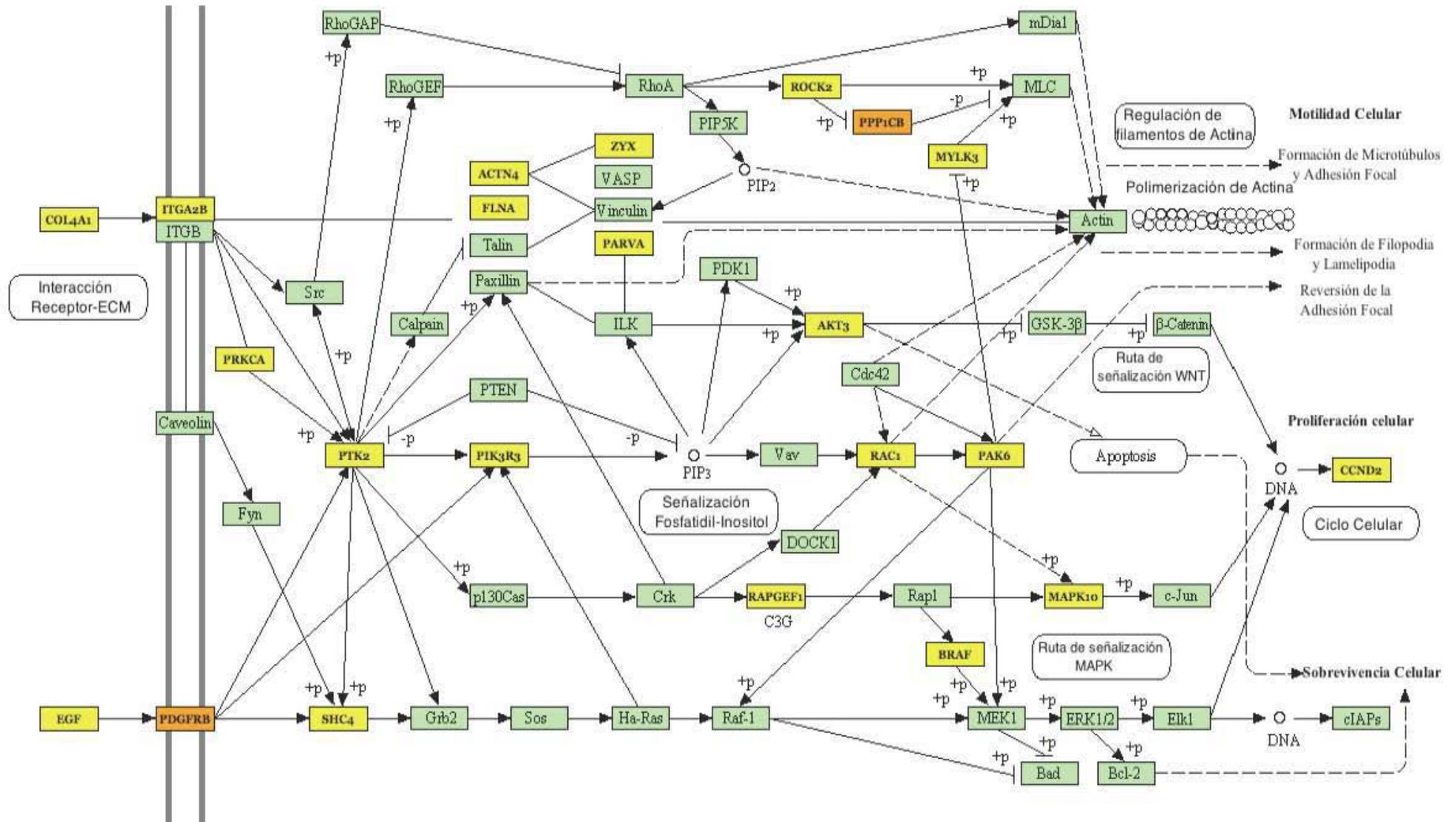


Figura 18. Ruta de Adhesión Focal, los genes coloreados en amarillo representan los genes blancos predichos por el software, los genes en naranja son genes blanco que aparecen en más de una ruta celular predicha.

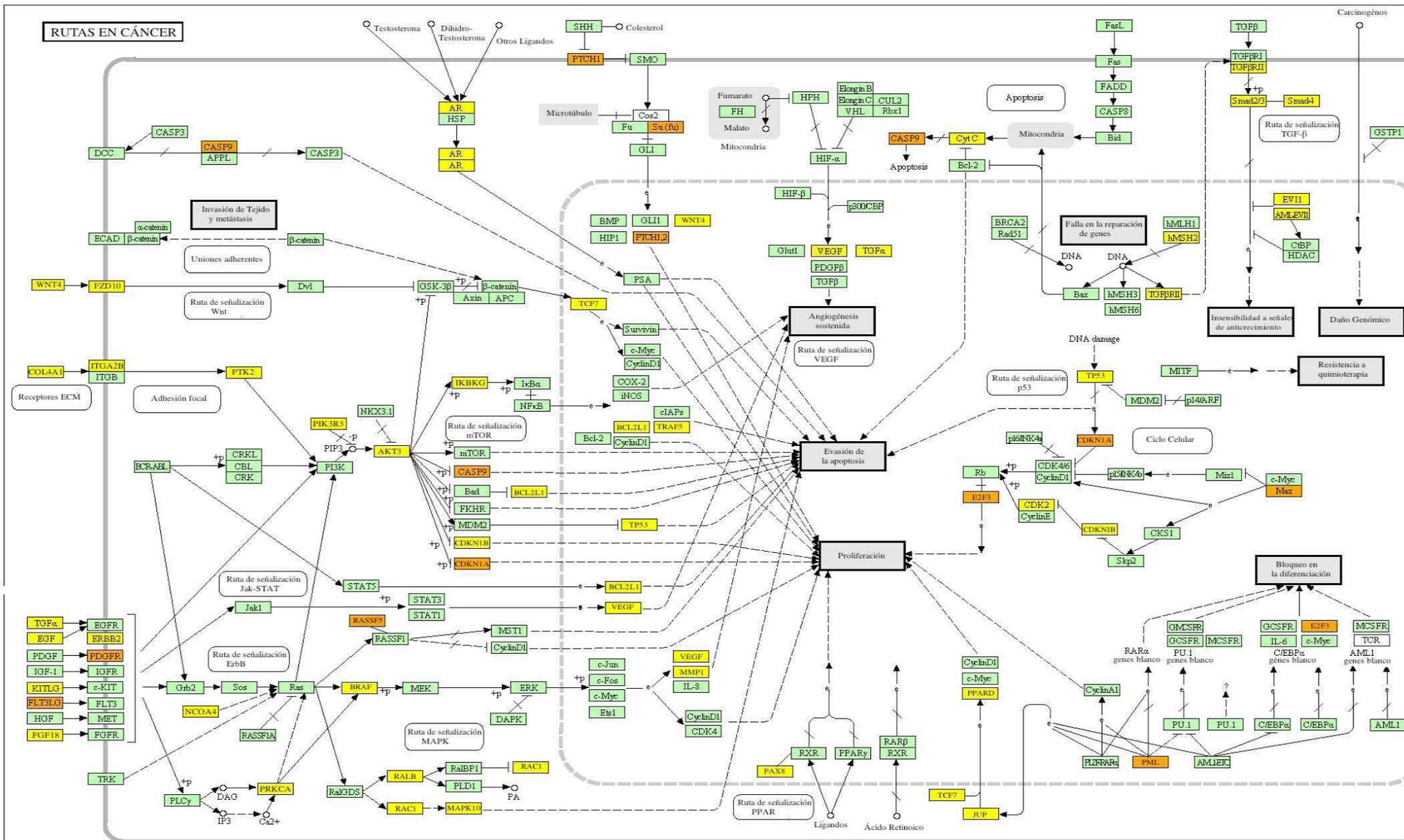


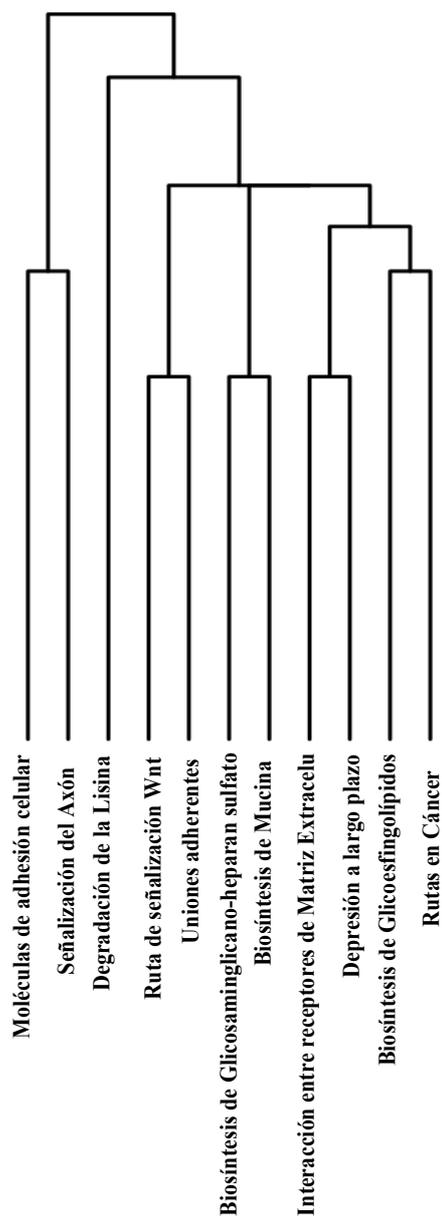
Fig. 19. Rutas en cáncer, los genes en amarillo son los blancos predichos por el software, los genes en naranja son genes blanco que aparecen en más de una ruta celular de las predichas.

El software utilizado también permite la realización de un análisis de seguimiento como es un agrupamiento jerárquico de los miRNAs y sus rutas blanco, además de sus mapas de calor (heat maps). En éstos se representan los niveles de influencia que tienen los miRNAs en las rutas celulares a manera de dendogramas (Figura 20). Mientras que el mapa de calor es una representación esquemática de los datos, en una matriz de color (Figura 21). El programa realiza estos análisis teniendo como base un método de ligación y agrupamiento mediante el cual el cuadrado de las distancias euclidianas son calculadas como medidas de distancias. El servidor en este análisis usa valores binarios asignando un valor = 1 a rutas celulares blanco estadísticamente significativas y un = 0 a rutas celulares no blanco. Utilizando esta opción, el algoritmo agrupa miRNAs que tienen rutas celulares que son blanco de un grupo similar de miRNAs y viceversa. Vale la pena mencionar que este tipo de análisis de seguimiento solo está disponible para los resultados provenientes de los análisis *a posteriori* (Vlachos et al. 2012).

Basado en nuestros resultados del dendograma y en el mapa de calor se muestran algunas rutas como la de reabsorción de agua mediada por vasopresina. Es necesario aclarar que debido a que éstos son análisis *in silico*, los miRNAs que se ingresaron al análisis también tienen como posibles blanco estas rutas celulares. En este punto es necesario discriminar aquellas rutas que poseen relevancia biológica con nuestro modelo y proyecto de aquellas que no. Como por ejemplo nuestra línea celular no guarda relación alguna con los procesos de señalización en el axón o con la depresión a largo plazo, por lo que se decidió poner atención únicamente a aquellas rutas con la relevancia biológica antes mencionada.

A)

DENDOGRAMA DE AGRUPACIÓN DE RUTAS CELULARES



B)

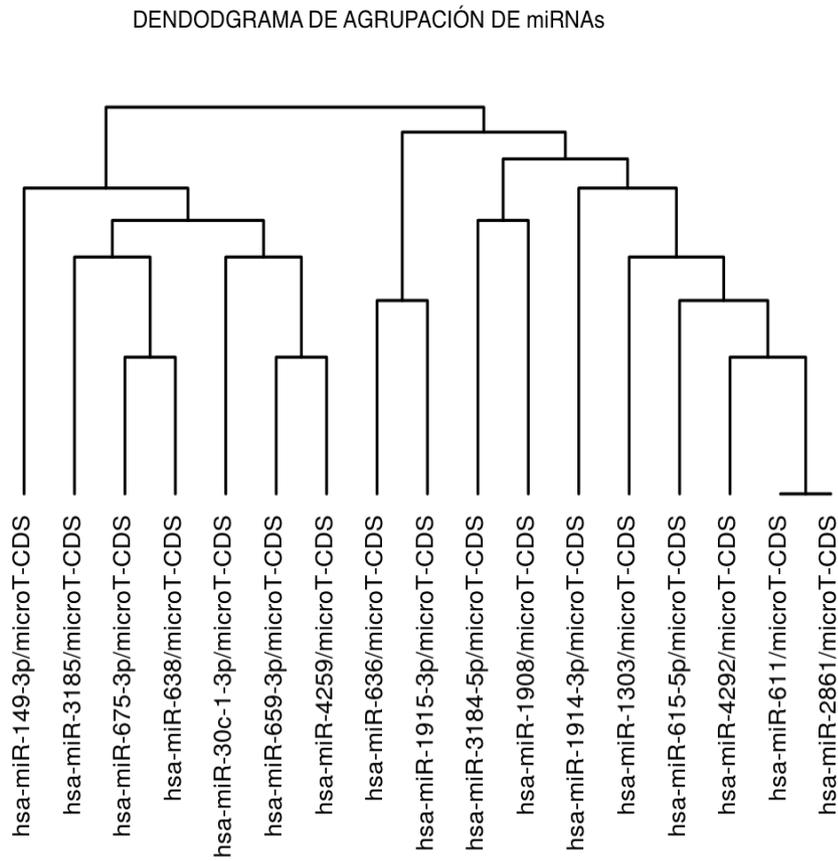


Figura 20. A) Dendrograma de agrupación jerárquica de rutas celulares y B) Dendrograma de agrupación jerárquica de miRNAs que se encontraron sobreexpresados en el presente estudio.

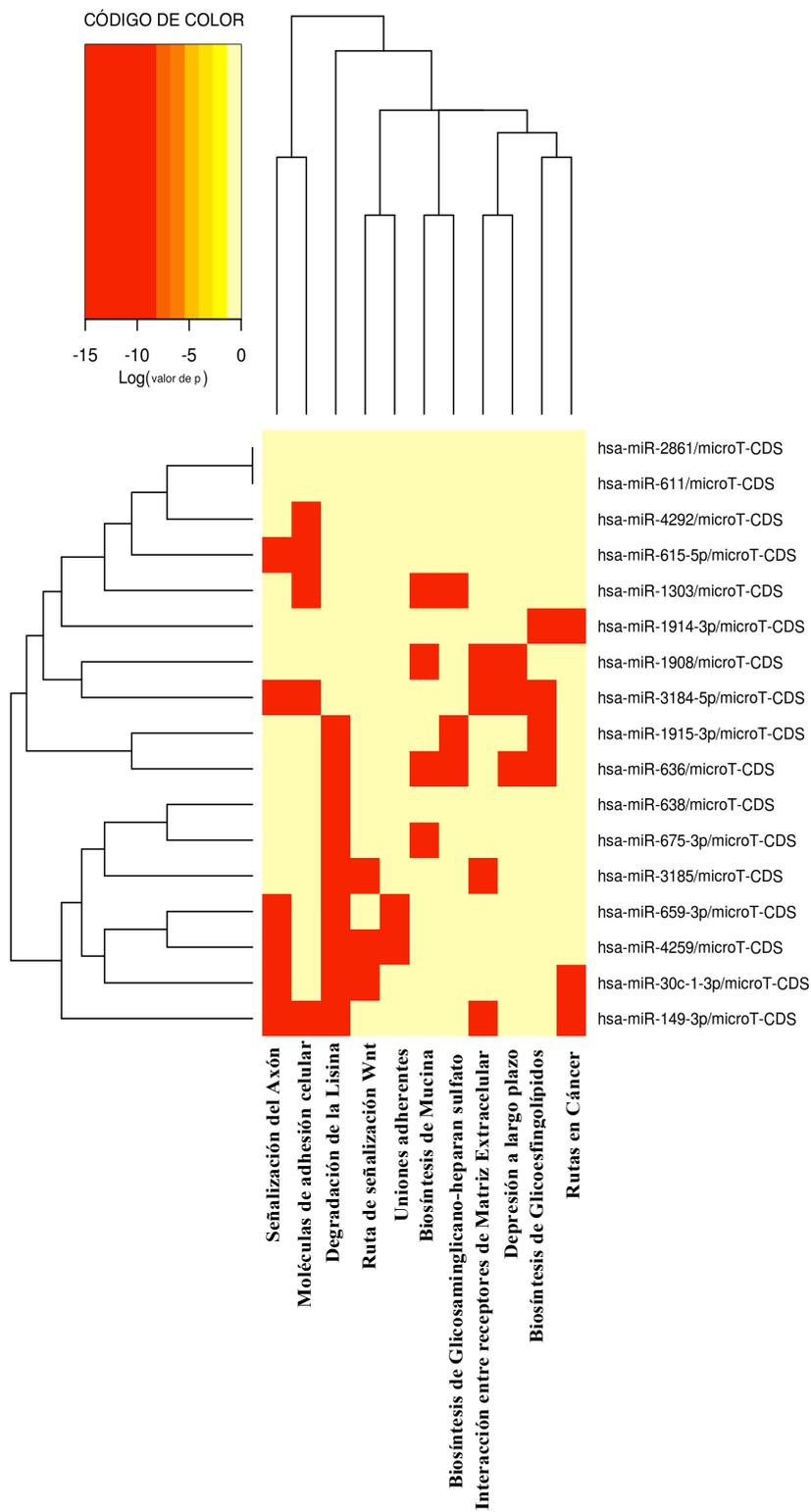


Figura 21. Mapa de calor de los miRNAs contra sus rutas predichas. La escala de color indica la significancia de la relación miRNA-ruta celular.

XIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer de mama es considerado como una neoplasia heterogénea a nivel clínico, histológico y en recientes años a nivel molecular. Por lo cual se dificulta enormemente la predicción certera de factores de pronóstico, tratamiento etc., por lo que nuevos blancos farmacéuticos y estrategias terapéuticas podrían llegar a ser más exitosas si se llega a entender los diversos factores que le confieren heterogeneidad a esta enfermedad.

La biología molecular actualmente es una herramienta fundamental para la comprensión integral de enfermedades complejas y multifactoriales, como es el cáncer de mama. Mediante estas nuevas herramientas se pretende establecer nuevas correlaciones entre factores no descritos con anterioridad y el desarrollo y progresión de la enfermedad. En el presente trabajo analizamos la posible relación entre el gen *BIK* con los perfiles de expresión globales de miRNAs en un modelo celular de cáncer de mama.

El papel proapoptótico del gen *BIK* y su participación en diversas neoplasias se encuentra ampliamente documentando (Chinnadurai, Vijayalingam y Rashmi 2008b). Sin embargo el hecho de que algunos estudios encuentren a este gen sobreexpresado en tejidos de neoplasias malignas (García et al. 2005; Lu et al. 2006) fueron una de las evidencias motivó estudiar más a fondo las posibles funciones alternativas de este gen. La metodología planteada en el presente trabajo fue la de interferir la producción del transcrito del gen *BIK* y hacer una evaluación de los perfiles de expresión de miRNAs por medio de microarreglos. El silenciamiento del gen *BIK* se midió a nivel de RNAm y proteína y aunque la interferencia no fue del 100% a nivel de RNAm, los experimentos de Western Blot mostraron que se alcanzó un silenciamiento casi total a nivel de proteína (94% de silenciamiento). Existen diversos mecanismos que podrían explicar que no hubiera una correlación lineal entre los niveles de RNAm y de proteína de *BIK*, uno particularmente descrito en cultivos celulares de líneas de cáncer de pulmón, colorrectal y de ovarios ha sido el marcaje de la proteína *BIK* para su degradación vía proteosoma, disminuyendo de esta manera su tiempo de vida media (Zhu et al. 2005b).

Uno de los primeros resultados en llamar la atención fue el hecho de que hayamos encontrado a la proteína BIK y a su forma fosforilada en localizaciones aparentemente distintas cuando se realizaron las inmunocitoquímicas y se compararon las líneas MDA-MB-231 y MCF-7. La proteína BIK y BIK-P tienen una posición nuclear en MDA-MB-231 con respecto a la clara posición citoplasmática de ambas proteínas en la línea MCF-7. La proteína BIK ha sido informada principalmente en RE, pero también se ha demostrado su presencia en mitocondria (Han et al. 1996; Szegezdi et al. 2009a). Cabría la posibilidad que debido a la proximidad del RE con el núcleo pudiera mal interpretarse estos resultados, sin embargo como se mencionó en la introducción del presente trabajo, no sería inesperado detectar a la proteína BIK en otra localización diferente a las ya descritas, ya que en los últimos años se ha informado de diversos miembros de la familia BCL-2 en posiciones no usuales y realizando funciones diferentes a las que canónicamente se reconocen (Danial et al. 2008; Hetz y Glimcher 2008). Por otro lado se ha mostrado que la proteína BIK puede interactuar directamente con las proteínas ERK1/2 en un modo que no es dependiente de su dominio BH3 (Mebratu et al. 2008b), la interacción de BIK con estas proteínas evita que éstas se transloquen al núcleo. Sin embargo debido al tamaño relativamente pequeño de la proteína BIK (18 kDa) no sería difícil pensar que este complejo BIK/ERK1/2 pudiera translocarse al núcleo. Sin embargo aunque los experimentos realizados en el presente trabajo no permiten afirmar tal hipótesis, en estos momentos nos encontramos trabajando con técnicas de microscopía confocal para determinar si es que la proteína BIK realmente se encuentra en una posición nuclear en la línea MDA-MB-231 y también se tienen contemplados experimentos de co-inmunoprecipitación en fracciones nucleares y fracciones citoplasmáticas en esta misma línea, para corroborar la hipótesis de la translocación al núcleo de BIK junto con ERK1/2.

Los microarreglos de expresión evaluaron un total de 1105 miRNAs, mientras que bajo las altas condiciones de astringencia al momento de seleccionar los miRNAs diferencialmente expresados nos permitió la suficiente certeza estadística para evitar falsos positivos, obteniéndose como resultado final una lista de 17 miRNAs sobrepresados, mientras que ningún miRNA en condiciones de subexpresión. De acuerdo al análisis realizado en la base de datos TaRBase 6.0

(<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index>) a la fecha no existen blancos comprobados experimentalmente para ninguno de estos 17 miRNAs. Sin embargo, un análisis posterior en la base miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) arrojó 531 genes blanco validados para los 17 miRNAs diferencialmente expresados (Anexo 2) y algunos de estos genes se comparten con los predichos por el software DIANA miRPath. Adicionalmente el análisis de enriquecimiento y rutas afectadas, arrojó una lista de rutas celulares y de señalización que podrían encontrarse alteradas debido al efecto combinatorio de la sobreexpresión de estos 17 miRNAs. A continuación se discutirán y analizarán los posibles nexos entre el gen BIK y cómo su expresión podría afectar a diversos elementos de estas rutas.

13.1 Ruta de señalización canónica Wnt.

Las proteínas Wnt son una serie de glicoproteínas secretadas que actúan como moléculas de señalización. Para liberar una respuesta celular y activar transducción intracelular de señales estas proteínas se unen a la familia de receptores Frizzled y a varios correceptores como LRP (lipoprotein receptor-related)-5/6, Ryk y Ror2. En humanos se conocen 19 miembros de la familia Wnt y 10 miembros de la familia Frizzled, estos pueden subdividirse en subclases basándose en la actividad biológica que desencadenen (Rao y Kuhl 2010). El mecanismo clásico de la vía canónica Wnt es la regulación de los niveles de β -catenina citoplásmica. La β -catenina es una proteína multifuncional que combina las características de una proteína estructural de uniones adherentes con aquellas de un factor de transcripción. En ausencia de ligando Wnt, la proteína β -catenina es fosforilada por la cinasa de serina/treonina caseína cinasa Ia (CKIa), lo que a su vez permite la fosforilación por parte de la cinasa de la glucógeno sintetasa 3b (GSK-3b). La interacción entre estas cinasas y la β -catenina es facilitada por las moléculas de andamiaje Axina y APC, que en conjunto forman el complejo de degradación de la β -catenina. Así, la β -catenina fosforilada es reconocida por el sistema ubiquitina-proteosoma y subsecuentemente degradada.

Cuando los ligandos Wnt se unen a su complejo de receptores, formado por el receptor de siete dominios membranales de la familia Frizzled y el co-receptor LRP/Arrow,

inhiben la actividad de la GSK-3b a través de la fosfoproteína Dishevelled (Dvl), lo cual resulta en la estabilización y acumulación de β -catenina en el citoplasma. La acumulación citoplásmica de la β -catenina es un factor clave para su posterior translocación al núcleo, donde interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción LEF/TCF, funcionando como activador transcripcional de genes relacionados a la proliferación celular como c-myc y ciclina D1 (Logan y Nusse 2004).

Ahora bien, la asociación entre la ruta de señalización Wnt y apoptosis (que es donde el gen *BIK* tiene una participación importante) ha crecido durante los últimos años con evidencias más claras. Por ejemplo, se ha demostrado que la inducción de la expresión de la proteína APC induce apoptosis en cultivos celulares, mientras que la sobreexpresión de mutantes truncas mantienen un efecto antiapoptótico en las células (Brocardo y Henderson 2008). Sin embargo los mecanismos mediante los cuales APC puede promover o reprimir la apoptosis aún no son conocidos. Por otro lado se ha reportado que algunos inhibidores de la ruta Wnt pueden potenciar un fenómeno de resistencia a la apoptosis, cuando cultivos de células son expuestos a agentes alquilantes entre ellos el gen SFRP1 y Dickkopf-1, esto mediante un mecanismo que implica la disminución de los niveles de β -catenina (Shou et al. 2002). De hecho está reportado en un modelo de fibroblastos que la expresión de SFRP1 tiene un efecto protector contra la apoptosis cuando está es inducida en los cultivos por medio de ceramidas, demostrando por Western blot que cuando aumentan los niveles de SFRP1 disminuyen los niveles de BIK (Han 2003).

Si observamos con detalle la figura donde se muestra sobre qué genes impacta la sobreexpresión de los miRNAs del presente trabajo, en la ruta Wnt (Figura 16), podemos observar que a nivel de la ruta canónica el receptor Frizzled 10, el correceptor LRP6 y el ligando WNT4 se muestran como algunos blancos potenciales para los miRNAs de nuestro estudio. Con base en este análisis *in silico* podríamos predecir que la inactivación del gen BIK podría llevar a la atenuación de la ruta canónica de Wnt; sin embargo si tomamos en cuenta que tanto la familia de proteínas Frizzled como WNT tienen actividades redundantes, por que la pérdida de actividad de un miembro puede ser fácilmente sustituida por otro (Logan y Nusse 2004). Además la información hasta

hoy en día no permite establecer un nexo claro entre las funciones del gen *BIK* y la vía canónica de la ruta Wnt.

13.2 Ruta no canónica Wnt/Ca²⁺.

Al momento de analizar los posibles blancos de la ruta de señalización no canónica Wnt una de las particularidades que sobresale fue la señalización Wnt/Ca²⁺. En esta ramificación de la ruta Wnt la mayoría de los genes participantes fueron predichos como blancos potenciales de los miRNAs sobreexpresados. Al respecto se ha reportado que el Ca²⁺ está implicado como segundo mensajero en la ruta de señalización Wnt, cuando se encontró que inyecciones de RNAm de Wnt5a o Wnt11 en embriones de pez cebra duplicaban el tránsito de Ca²⁺ en la membrana que envolvía el blastodisco. No se observó el mismo efecto cuando se sobreexpresaba Wnt8, el cual activa β -catenina, sugiriendo cierta selectividad de ligandos de la familia Wnt capaces de utilizar Ca²⁺ como segundo mensajero para alcanzar su efecto biológico (Kohn y Moon 2005).

Hoy en día es conocido que la unión de ligandos específicos como Wnt5a o Wnt11 a receptores “Frizzled” llevan a la activación de proteínas G heterotriméricas y a la subsecuente activación de la fosfolipasa C. La fosfolipasa C corta al fosfatidil inositol-4-5-bisfosfato (PIP₂) en el carbono tres y se convierte a inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ liberado de la membrana se une a receptores localizados en RE conocidos como receptor de IP₃ (IP₃R). La unión a estos receptores conduce a la liberación de Ca²⁺ del RE. Este Ca²⁺ liberado es localmente restringido de manera que subsecuentemente puede activar proteínas como la Proteína Kinasa C (PKC), la Ca²⁺/Calmodulina Proteína Kinasa II (CamKII) y/o calcineurina (CaCN) (Figura 22). Una vez activadas estas proteínas el IP₃ es degradado a inositol por fosfatasaes específicas y reciclado a PIP₂ (Kühl 2003). Curiosamente estas últimas dos proteínas junto con la Fosfolipasa C resultaron blancos predichos en nuestros análisis *in silico*.

Los niveles de Ca²⁺ liberados al citoplasma son regulados por medio de una bomba de ATPasa de Calcio localizada en el RE (SERCA), la cual transporta activamente iones calcio desde el citoplasma hasta el interior de la membrana del RE. Un dato interesante

para este trabajo es que se ha observado que en modelos murinos, Bcl-2 puede interactuar con SERCA disminuyendo los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} (Dremina et al. 2004). Como se discutirá más adelante este hecho es de llamar la atención debido a las interacciones que presenta BCL-2 con miembros de la familia BH3 como BIK.

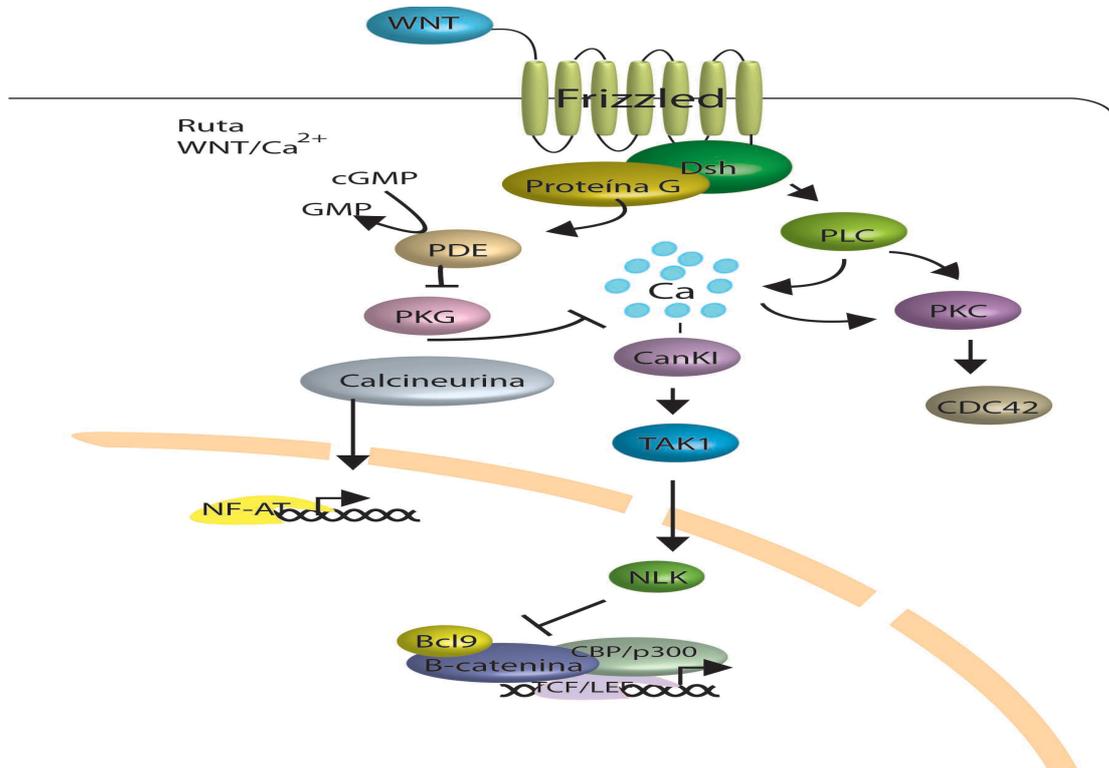


Figura 22. Ruta de activación de la señalización Wnt/ Ca^{2+} . (Tomado y modificado de Sonderegger, Pollheimer y Knöfler 2010).

La ruta de señalización de Ca^{2+} continúa una vez activada la CaCN. Ésta a su vez regula a diversas proteínas entre ellas a los factores de transcripción Elk-1 y a la familia de factores de transcripción factor nuclear activado de células T (NF-AT 1-4). Si bien los genes blanco de esta última familia de factores de transcripción han sido ampliamente estudiados en células T, también existen estudios de su implicación en cáncer de mama donde reportan que la expresión de NF-AT promueven la capacidad de invasión de cultivos celulares de células mamarias cancerosas (Yiu y Toker 2006), también existen reportes donde se relaciona la expresión de estos factores de transcripción con procesos como angiogénesis y metástasis (Mancini y Toker 2009).

13.3 Relación de BIK con niveles intracelulares de Ca^{2+} .

A pesar de que a BIK se le ha considerado casi de forma exclusiva como una proteína con funciones proapoptóticas, también se le han imputado papeles en otros procesos celulares que no necesariamente desencadenan en apoptosis. Uno de ellos es la regulación de los niveles de Ca^{2+} y procesos de autofagia. De hecho existe evidencia que sugiere que la proteína BIK juega un papel central entre las rutas apoptóticas y de autofagia (Leber y Andrews 2010; Maiuri, Criollo y Kroemer 2010). Para explicar la relación entre BIK y Ca^{2+} retomaremos a los receptores IP_3R , los cuales son los encargados de regular la salida de Ca^{2+} del RE al espacio citoplasmático dependiendo de las necesidades fisiológicas de la célula. El descubrimiento original de que proteínas de la familia BCL-2 afectan la señalización de Ca^{2+} se dio hace una década. En estos estudios la sobreexpresión de BCL-2 redujo los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Szegezdi et al. 2009b). Hoy en día es conocido el mecanismo de acción mediante el cual la proteína BCL-2 provoca la caída de los niveles de Ca^{2+} , esto es mediante la unión a la proteína NAF-1, que es un componente esencial del receptor IP_3R , inhibiendo la salida de Ca^{2+} del RE y de igual manera reprimiendo procesos como la autofagia.

La capacidad de la proteína BIK de formar heterodímeros con miembros proapoptóticos como BCL-2 y BCL-XL ha sido reportada principalmente como un mecanismo de regulación de la apoptosis (Chinnadurai, Vijayalingam y Rashmi 2008b). Sin embargo, estas mismas propiedades de la proteína BIK de unirse a BCL-2 toman un papel diferente observándolo desde la perspectiva de la regulación de Ca^{2+} . Se ha descubierto que BIK es capaz de desplazar a BCL-2 del complejo que se encuentra formando con la proteína NAF-1, permitiendo de esta manera la liberación de Ca^{2+} del RE (Figura 23) y promoviendo procesos como la autofagia (Maiuri et al. 2010). A pesar de que el proceso de autofagia sigue siendo un mecanismo controversial en cuanto a sus aportaciones a la progresión tumoral existen evidencias cada vez más abundantes que señalan que la autofagia dota de sobrevivencia y resistencia a quimioterapia a las células de cáncer de mama (Berardi et al. 2011).

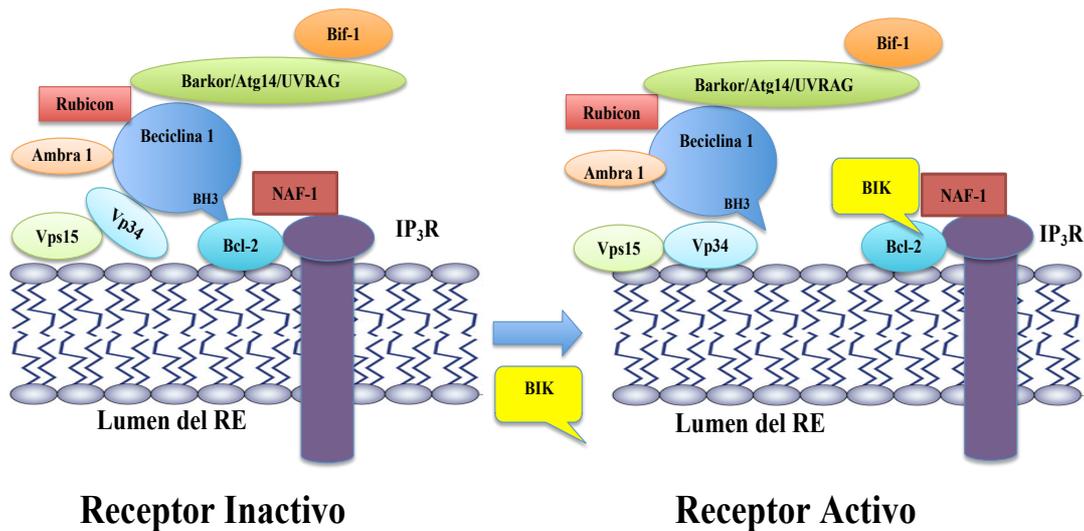


Figura 23. Mecanismo de liberación de Ca^{2+} del RE mediado por BIK. (Tomado y modificado de Maiuri et al. 2010)

13.4 Posible relación de la ruta $\text{Wnt}/\text{Ca}^{2+}$ con la expresión del gen BIK.

Una vez descritas las bases moleculares de cómo BIK es capaz de modular los niveles de Ca^{2+} , cómo es que trabaja la ruta Wnt y haciendo inferencia a las predicciones *in silico* resultado del análisis de miRNAs, no resulta difícil imaginar un nexo entre la expresión del gen BIK y la ruta no canónica de Wnt modulada por Ca^{2+} . La hipótesis que se propone con base en lo descrito anteriormente es que al disminuir la expresión de la proteína BIK en nuestros experimentos, se indujo una disminución en los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Esto impactaría la ruta no canónica $\text{Wnt}/\text{Ca}^{2+}$ causando una regulación negativa provocada por miRNAs que probablemente son transcritos como una respuesta a la baja de los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Un posible abordaje experimental para corroborar esta hipótesis sería, la interferencia del gen BIK bajo las mismas condiciones midiendo los niveles intracelulares de Ca^{2+} , antes y después de la transfección. Si se observa un cambio en las concentraciones de Ca^{2+} , podría hacerse un microarreglo de expresión de RNAm para identificar si existen factores de transcripción que están respondiendo a este cambio en los niveles de Ca^{2+} , y si estos mismos factores de transcripción tienen como blancos a los genes de miRNAs predichos en el presente trabajo.

Existen diversos informes que documentan cómo es que diferentes miRNAs tienen como blancos rutas de señalización de Ca^{2+} , por ejemplo, en el modelo de *C. elegans* se encontró que el mir-71 inhibía la señalización de Ca^{2+} , esto mediante una regulación negativa de uno de los componentes fundamentales de esta vía de señalización la proteína TIR-1/sarm-1 (Hsieh, Chang y Chuang 2012).

Otro grupo de trabajo experimentalmente verificó que en un modelo de ratón que simula la calcificación vascular en la aorta, los miRNAs miR-135a*, miR-762, miR-714 y miR-712* se encuentran sobrepresados en comparación con ratones silvestres. Un análisis computacional mostró que estos miRNAs tienen como blancos predichos proteínas que controlan el flujo de Ca^{2+} , como NCX1, PMCA1 y NCKX4. Posteriormente se encontró que al transfectar los miRNAs descritos anteriormente en células vasculares de ratón, los niveles de estas proteínas relacionadas con el flujo de Ca^{2+} caían dramáticamente (Gui et al. 2012).

Con base en los argumentos anteriormente expuestos es un hecho que la regulación de la señalización de Ca^{2+} por miRNAs no es algo nuevo en el conocimiento científico, sin embargo nuestra hipótesis involucra que estos elementos de control postranscripcional son capaces de responder a los cambios de concentración de Ca^{2+} intracelulares, idea que hasta la fecha se mantiene sin explorar. Sin embargo la corroboración de esta y otras hipótesis requiere de más investigación experimental.

13.5 Ruta de Biosíntesis de Glicosaminoglicanos-Heparán Sulfato.

El Heparán Sulfato (HS) es un polisacárido lineal encontrado en casi todos los tejidos humanos. Se encuentra en forma de proteoglicano (HSPG) en el que dos o tres moléculas de HS son unidas en proximidad a proteínas de superficie o matriz extracelular. Es en esta forma que el HS puede unirse a diversas proteínas ligando y regular diversos procesos biológicos como procesos de desarrollo embrionario, angiogénesis, coagulación y metástasis en tumores (Bishop et al. 2007). La biosíntesis del Heparán Sulfato-Glicosaminoglicanos (HS-GAGs) ocurre en el aparato de Golgi y puede ser dividida en tres fases: iniciación de la cadena, polimerización y modificación.

La iniciación de la cadena comienza con la adición de la región de unión de un tetra-sacárido (ácido glucurónico-galactosa-galactosa-xilosa) al centro de una proteína. Subsecuentemente la cadena es extendida por la adición de disacáridos de N-acetilglucosamina. La adición del disacárido es llevada a cabo por dos glicosiltransferasas (EXT1 y EXT2) que forman un complejo heterodimérico estable en Golgi. A medida que la cadena crece, enzimas modificadoras introducen grupos sulfato en varias posiciones y algunos residuos de ácido glucurónico son convertidos a ácido idurónico. Este proceso requiere de una serie de enzimas que trabajan en conjunto y que incluyen a la C5-Epimerasa y varias Sulfotransferasas (Figura 24) (Lin 2004).

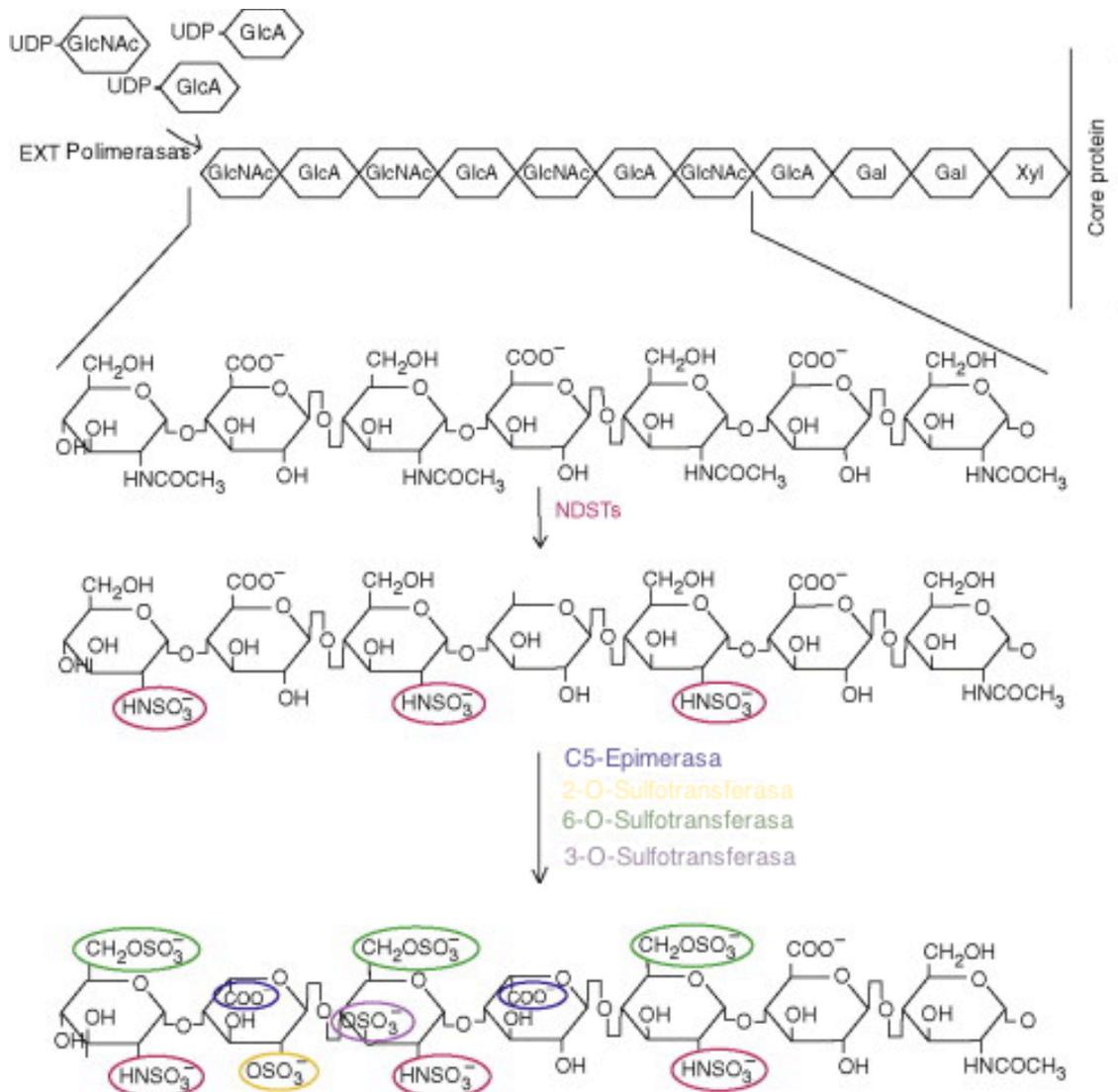


Figura 24. Esquema de la Biosíntesis del HS y las principales modificaciones llevadas a cabo en el polímero (Tomado y modificado de Lin 2004).

Como ya se mencionó el HS está involucrado en diversos procesos celulares y en cáncer de mama no es la excepción, ya que se conoce que el HS, junto con otras proteínas de la matriz extracelular, controlan diversas rutas de señalización que promueven el desarrollo, crecimiento y metástasis de los tumores mamarios. Por esta razón se les ha propuesto como importantes blancos farmacológicos (Koo et al. 2008). Si observamos los genes blanco que obtuvimos como resultado en nuestro análisis de redes, de la ruta biosintética de HS (Figura 17), tenemos que los genes de las polimerasas *EXT1* y *EXT2*, la 3-O-Sulfotransferasa 2 (*HS3ST2*) y la epimerasa de ácido glucurónico (*GLCE*) entre otros genes de esta ruta fueron blancos predichos para algunos de los miRNAs. Particularmente, es de llamar la atención el miRNA hsa-miR-1303 el cual tuvo un valor de p de $1.143400e^{-28}$ para el gen *EXT1*. Este dato nos indica que la probabilidad de que este gen sea el blanco del hsa-miR-1303, es muy alta. Esta observación hace del hsa-miR-1303 un candidato idóneo para comprobar por ensayos de luciferasa la interacción con el transcrito del gen *EXT1*. Sin embargo vale la pena mencionar que existen otros métodos que nos permiten comprobar si un miRNA en particular está regulado a un RNAm dado. Por ejemplo los métodos genéticos, los cuales identifican blancos de miRNAs a través de pruebas de supresión fenotípica. Los métodos bioquímicos para la identificación de genes blanco de miRNAs son variados por ejemplo tenemos la inmuno-purificación de complejos miRNA-Ribonucleoproteína (miRNP), seguida de la identificación del RNAm blanco por medio de secuenciación o microarreglos y el método basado en la formación de enlaces cruzados entre proteínas ribonucleoproteicas acopladas con inmunoprecipitación y secuenciación (Paquinelli. 2012).

La ruta de biosíntesis de Glicosaminglicanos-Heparán Sulfato fue la ruta con los valores más significativos de p tanto en las pruebas *a priori* como en las pruebas *a posteriori* (Tablas 5 y 6). Sin embargo, la posible conexión que exista entre esta ruta con la expresión del gen *BIK* pudiera no parecer tan clara. Retomando cómo es que *BIK*, es capaz de modular los niveles de Ca^{2+} intracelulares, nos dimos cuenta que existe una conexión directa entre la biosíntesis del HS y el Ca^{2+} . Por ejemplo se ha demostrado en células endoteliales de conejo que la biosíntesis de los Glicosaminglicanos Heparán y Heparina Sulfato induce la activación de proteínas de adhesión focal como son FAK, Scr y Paxalina. Aquí, es necesario abrir un paréntesis y mencionar que curiosamente la

ruta de adhesión focal fue una de las rutas predichas como afectada por la sobreexpresión de 14 de los 17 miRNAs que resultaron sobreexpresados. Si observamos la ruta de adhesión focal (Figura 18), nos podremos dar cuenta que es una ruta íntimamente relacionada con el sistema de señalización de Fosfatidil Inositol (PIP_3) que a su vez guarda una estrecha relación con los niveles de Ca^{2+} intracelulares, promoviendo que aumenten los niveles de iones Ca^{2+} cuando está activada la ruta (ONEil y Leng. 1997).

Retomando la idea de que el HS promueve la activación de proteínas de adhesión focal, se demostró que al mismo tiempo el HS promueve la liberación de Ca^{2+} intracelular, teniendo como consecuencia la activación de la Fosfolipasa $C\gamma$ ($PLC\gamma$) y la Ca^{2+} /CalmodulinaProteína Kinasa II ($CamKII$). Estas dos enzimas como ya se habló, están íntimamente relacionadas con la vía de señalización de Wnt y sus actividades son moduladas por las concentraciones de Ca^{2+} . En este mismo estudio se usaron agentes quelantes del Ca^{2+} , así como inhibidores de señalización de Ca^{2+} en las células endoteliales, dando como resultado la inhibición de la síntesis de HS (Medeiros et al. 2011).

Aunque en este estudio se propone que la síntesis de Heparán y Heparina Sulfato están ligadas a la señalización de Ca^{2+} , no se indaga acerca de los posibles mecanismos que expliquen cómo es que al disminuir los niveles de Ca^{2+} o al detener su señalización se detiene la biosíntesis de HS.

Nuestros análisis de resultados predicen que la ruta biosintética de HS se encuentra afectada a diversos niveles, lo que nos hace pensar que la expresión de HS y otras moléculas involucradas en esta ruta disminuyen su expresión. Como se expuso en el párrafo anterior, está demostrado que la señalización de Ca^{2+} se relaciona con la síntesis de HS y Glicosaminoglicanos, los miRNAs surgen como una propuesta viable y versátil. De la misma manera que se expuso para la vía de señalización de Wnt, la hipótesis que proponemos para el caso de la ruta biosintética de HS es que al abatir los niveles de la proteína BIK, el flujo de Ca^{2+} intracelular se ve disminuido, por lo que la

señalización celular de Ca^{2+} se ve afectada también. Esto detiene la síntesis de HS y otros Glicosaminglicanos por medio de la expresión de miRNAs que van dirigidos contra la maquinaria de síntesis de HS como son las enzimas EXT1 y EXT2, así como la C5-Epimerasa que participa en modificaciones al polisacárido.

La hipótesis que planteamos en este análisis de resultados involucra la idea de que es posible que se sinteticen miRNAs en respuesta a un cambio en los niveles de Ca^{2+} intracelulares provocados por el abatimiento de la proteína BIK. Sin embargo, aunque existen estudios que demuestran que algunos miRNAs tienen como blanco proteínas que participan en la señalización y modulación de los niveles de Ca^{2+} (Gui et al. 2012), no existen estudios que demuestren si es que estos niveles tienen la capacidad de producir un cambio en la expresión de estos miRNAs.

En la imagen de rutas del cáncer (Figura 19) se tiene una visión más integrada a la mayoría de las rutas que se predijeron afectadas por la sobreexpresión de los miRNAs encontrados en este estudio. Algunas de las rutas predichas como Wnt y la ruta de las MAPK tienen que ver con procesos de proliferación, mientras que las rutas como adhesión focal, uniones adherentes, la ruta Wnt / Ca^{2+} no canónica y biosíntesis de HS se relacionan con procesos de motilidad celular, invasión y metástasis.

De manera general nuestros resultados predicen que al disminuir la proteína BIK estaríamos promoviendo la alteración de diversas rutas que ayudan a la progresión tumoral, lo que vendría a contradecir el papel de gen supresor de tumores que otros estudios le han dado al gen *BIK*. Sin embargo, como se presento en la introducción de este trabajo, el papel que juega *BIK* en el proceso neoplásico aún es controversial y probablemente dependa en gran parte del contexto celular. Sin embargo, abordar de una manera integral la relación de estas rutas en su conjunto con la expresión del gen *BIK* y con la sobreexpresión de los miRNAs hallados resulta complicado debido a que es solo una predicción basada en un algoritmo, además que no todos los genes y rutas que se mostraron predichos guardan o tienen una conexión directa con BIK o con los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Esto limita que el análisis solo quede a nivel de predicción, aunque vale la pena mencionar que hoy en día los algoritmos de predicción de blancos

han mostrado altos niveles de precisión y exactitud. También, cabe la posibilidad que el hecho que *BIK* presente funciones diversas sea el resultado del desarrollo carcinog neoplásico o maligno, por lo que evaluar la función de este gen en un modelo epitelial normal, o al menos no carcinogénico, sería de utilidad.

Por otro lado, las transfecciones transitorias tienen la característica de que después de cierto periodo de tiempo la expresión del gen que se interfirió vuelve a sus niveles normales. Esto puede llegar a presentar una desventaja, ya que no se alcanzan a apreciar los efectos del silenciamiento a largo plazo. Esta puede ser una de las razones por las cuales tal vez no se encontraron miRNAs regulados negativamente. Una solución a corto plazo sería transfectar los cultivos constantemente para que se mantuviera el efecto durante periodos más largos de tiempo. Sin embargo, los reactivos usados en estas transfecciones, sobre todo las mezclas de lipocaciones tienen efectos de citotoxicidad, que a la larga podrían afectar los ensayos de expresión (Huppi, Martin y Caplen 2005). Una solución más efectiva sería la transfección de un RNA corto-horquilla (shRNA), estos usualmente vienen en una construcción génica acoplados a un promotor fuerte, lo que permite tener una expresión constante una vez transfectados. Medir el efecto del silenciamiento a tiempos más largos también es un abordaje aconsejable.

Por último, los miRNAs no pueden ser vistos como elementos aislados que tienen participación en la regulación génica. Como se expuso con anterioridad el cáncer de mama y las neoplasias en general son enfermedades complejas y heterogéneas esto en parte gracias a las miles de interacciones que se forman entre las miles de moléculas que conforman y regulan las actividades de una célula. Por esta razón es de vital importancia tratar de entender estas interacciones como un conjunto para poder tener una visión integral de la enfermedad.

XIV. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró realizar un perfil de expresión de miRNAs antes y después de silenciar transitoriamente el gen proapoptótico *BIK*, generando como resultado una lista de 17 miRNAs que presentaron sobreexpresión. El análisis de datos predijo que estos miRNAs se encuentran involucrados en diversas rutas celulares, algunas de las cuales han sido ampliamente estudiadas en diversos tipos de neoplasias como la ruta Wnt y MAPK entre otras. Sin embargo, los resultados también mostraron rutas no tan convencionales como lo es la ruta de la degradación de la Lisina. El presente estudio da la pauta con una serie de predicciones de alta significancia estadística para la investigación sobre la participación del gen *BIK* en cualquiera de estas rutas predichas.

Los resultados de este trabajo sugieren que la disminución de los niveles de la proteína *BIK* podría conducir a una alteración en diversas rutas celulares, promoviendo que se detengan procesos como proliferación y crecimiento celular. Esta idea sugiere que el papel que desempeña *BIK* en nuestro modelo celular no es el de un gen supresor de tumores, sino más bien, es más complejo de lo que inicialmente se pensaba. Por otro lado la disminución de los niveles de Ca^{2+} mediado por *BIK* es uno de los mecanismos más probables para explicar el cambio en la expresión de los miRNAs, sin embargo es necesario más trabajos de investigación para elucidar puntualmente el mecanismo responsable del cambio en la expresión de estos miRNAs. Así como la aparente localización de la proteína *BIK* en el núcleo de la línea celular MDA-MB-231.

XV. PERSPECTIVAS

- Realizar una transfección permanente en la línea MDA-MB-231 por medio de un shRNA para que los niveles de BIK se mantengan permanente bajos.
- Realizar experimentos de co-localización para comprobar si es que la proteína BIK se encuentra efectivamente en el núcleo de la línea celular MDA-MB-231.
- Corroborar experimentalmente que el silenciamiento de BIK disminuye los niveles intracelulares de Ca^{2+} , midiendo los niveles de este elemento, antes y después de la transfección
- Corroborar experimentalmente la asociación entre el hsa-miR-1303 y el gen EXT1 debido a la alta probabilidad estadística que tiene este miRNA de regular a este gen.
- Validar mediante q-PCR, los cambios en la expresión, de algunos de los miRNAs que mostraron más sobreexpresión como el hsa-miR-611 y el hsa-miR-4259.

XVI. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams BD, Furneaux H y White BA. 2007. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ER alpha) and represses ER alpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol* 21(5):1132–1147.
2. Afonso N y Bouwman D. 2008. Lobular carcinoma in situ. *Eur Cancer Prev.* 17(4): 312–316.
3. Aigner K, Drampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Stran D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitzing A, Beug H, Foisner R y Eger A. The transcription factor ZEB1 (delta EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26(49):6979–6988.
4. Ali S y Coombes RC. 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2(2):101–112.
5. Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A y Larocca LM. 2003. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 38(1):91–96.
6. Baselga J y Swain SM. 2009. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9(7):463–475.
7. Berardi DE, Campodónico PB, Díaz Bessone MI, Urtreger AJ y Todaro LB. 2011. Autophagy: Friend or Foe in Breast Cancer Development, Progression, and Treatment. *Int J of Breast Cancer* 2011:1–7.
8. Bishop, JR, Schuksz M, Esko JD. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 446(7139): 1030-1037.
9. Bodis S, Siziopikou KP, Schnitt SJ, Harris JR, y Fisher DE. 1996. Extensive apoptosis in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 77(9):1831–1835.
10. Bodmer JL, Schneider P y Tschopp J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 27(1):19–26.
11. Bohnsack MT, Czaplinski K y Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 10(2):185–191.

12. Boyd JM, Malstrom Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C y Chinnadurai G. 1994. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*. 79(2):341–351.
13. Bredel M, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD y Sikic BI. 2005. High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res*. 65(10):4088–4096.
14. Brocardo M y Henderson BR. 2008. APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol*. 18(12):587–596.
15. Bu L y Lephart ED. 2005. Soy isoflavones modulate the expression of BAD and neuron-specific beta III tubulin in male rat brain. *Neurosci Lett*. 385(2):153–157.
16. Calin GA y Croce CM. 2006. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res*. 66(15):7390–7394.
17. Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF y Rustgi AK. 1999. Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology*. 117(4):831–837.
18. Chattopadhyay A, Chiang CW y Yang E. 2001. BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene*. 20(33):4507–4518.
19. Chinnadurai G, Vijayalingam S y Rashmi R. 2008a. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*. 27:S20–S29.
20. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ y Green DR. 2010. The BCL-2 Family Reunion. *Mol Cell*. 37(3):299–310.
21. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G y Lutz RJ. 1995. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*. 14(22):5589–5596.
22. Clarke R. 1996. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res and Treat*. 39(1):1–6.
23. Coleman P, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, E Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH y Young JL. 2008. “Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*. 9(8):730–756.

24. Cotter TG. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 9(7):501–507.
25. Coultas L, Bouillet P, Loveland KL, Meachem S, Perlman H, Adams JM y Strasser A. 2005. Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis. *EMBO J*. 24(22):3963–3973.
26. Cummings MC, Winterford CM y Walker NI. Apoptosis. 1997. *The Am J Surg Pathol*. 21(1):88–101.
27. Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ y Rosner MR. 2009. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J*. 28(4):347–358.
28. Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJ, Datta SR, Pitter KL, Bird GH, Wikstrom JD, Deeney JT, Robertson K, Morash J, Kulkarni A, Neschen S, Kim S, Greenberg ME, Corkey BE, Shirihai OS, Shulman GI, Lowell BB y Korsmeyer SJ. 2008. Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med*. 14(2):144–153.
29. Davidson BL y McCray PB Jr. 2011. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Gene*. 12(5):329–340.
30. Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, Rahimi N. 2001. Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. 2001. *J Biol Chem*. 276(21):17686–17692.
31. Dremina ES, Sharov VS, Kumar K, Zaidi A, Michaelis EK, Schoneich C. 2004. Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *Biochem J*. 383: 361-370
32. Duroux-Richard I, Presumey J, Pers YM, Fabre S, Lecellier CH, Gruen J, Häulp T, Grützkau A, Burmester G, Jorgensen C y Aparaili F. 2010. BIK is a novel proapoptotic target gene for miR-125b in human monocytes. *J Transl Med*. 8(Suppl 1):P56.
33. Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Björnsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, Hallgrímsson J, Gudmundsson J, Egilsson V, Sigurdsson H, Barkardottir RB.. 1998. Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur J Cancer*. 34(13):2076–2081.

34. Elangovan B y Chinnadurai G. 1997. Functional dissection of the pro-apoptotic protein Bik. Heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem.* 272(39):24494–24498.
35. Esposti MD, Erler JT, Hickman JA y Dive C. 2001. Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol.* 21(21):7268–7276.
36. Friedman RC, Farh KK, Burge CB y Bartel DP. 2009. “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19(1):92–105.
37. García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Peñaloza R y Arenas D. 2005. A molecular analysis by gene expression profiling reveals *Bik/NBK* overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer* 5(1):93.
38. Garrett WS, Gordon JI y Glimcher LH. 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 140(6):859–870.
39. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR y Israel MA. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67(6):2456–2468.
40. Germain M, Mathai JP, McBride HM y Shore GC. 2005. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24(8):1546–1556.
41. Giam M, Huang DC, Bouillet P. 2009. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene.* 27(S1):S128–S136.
42. Globocan, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, <http://globocan.iarc.fr/>. (Acceso: 13-Septiembre-2012).
43. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y y Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 10(5):593–601.
44. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N y Shiekhattar R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123(4):631–640.
45. Gruss, HJ y Dower SK. 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* 85(12):3378–3404.

46. Gui T, Zhou G, Sun Y, Shimokado A, Itoh S, Oikawa K, yMuragaki Y. 2012. MicroRNAs that target Ca(2+) transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. *Lab Invest.* 92(9):1250–1259.
47. Han J, Sabbatini P y White E. 1996. Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Moll Cell Biology.* 16(10):5857–5864.
48. Han X y Amar S. 2003. Secreted Frizzled-related Protein 1 (SFRP1) Protects Fibroblasts from Ceramide-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 279(4):2832–2840.
49. Hanahan D y Weinberg RA. 1999. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* (100):57–70.
50. Hanahan D y Weinberg RA. 2011. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* (5):646-674.
51. Henderson BE, Ross RK y Pike MC. 1993. Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science.* 259(5095):633–638.
52. Hetz C y Glimcher L. 2008. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol.* 18(1):38–44.
53. Hsieh YW, Chang C y Chuang CF. 2012. The MicroRNA mir-71 Inhibits Calcium Signaling by Targeting the TIR-1/Sarm1 Adaptor Protein to Control Stochastic L/R Neuronal Asymmetry in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 8(8):e1002864.
54. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E y Agami R. 2008. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol.* 10(2):202–210.
55. Huppi K, Martin SE y Caplen NJ. 2005. Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Mol Cell.* 17(1):1–10.
56. Hyman BT y Yuan J. 2012. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci.* 13(6): 395–406.
57. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M y Croce CM. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65(16):7065–7070.
58. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U y Speed TP. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density

oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4(2):249–264.

59. Jemal A, Siegel R, Xu J y Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer Journal Clin*. 60(5):277–300.
60. Kato M, Paranjape T, Müller RU, Nallur S, Gillespie E, Keane K, Esquela-Kerscher A, Weidhaas JB y Slack FJ. 2009. The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene* 28(25):2419–2424.
61. Kelsey JL y Gammon MD. 1991. The epidemiology of breast cancer. *CA Cancer Journal Clin*. 41(3):146–165.
62. Kim VN. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(5):376–385.
63. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ y Ashkenazi A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 12(6):611–620.
64. Kohn AD, Moon RT. 2005. Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium*. 38(3-4):439–446.
65. Koo CY, Sen YP, Bay BH y Yip GW.. 2008. Targeting Heparan Sulfate proteoglycans in Breast Cancer treatment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2008(3): 151-158.
66. Kühl M. 2003. The Wnt/Calcium Pathway: Biochemical Mediators, Tools And Future Requirements. *Front Biosci*. (9):967–974.
67. Leber B y Andrews DW. 2010. Closing in on the link between apoptosis and autophagy. *F1000 Biol Rep* (2):88.
68. Lee RC, Feinbaum RL y Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843–854.
69. Lin X. 2004. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling development. *Development*. 131(24): 6009-6021.
70. Logan CY y Nusse R. 2004. The Wnt Signaling Pathway In Development And Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20(1):781–810.
71. Lönnstedt I y Speed T. 2002 Replicated microarray data. *Stat Sin*. 12(2002): 31-46
72. López-Muñoz E, Hernández-Zarco A, García-Hernández N, Alvarado-Cabrero I,

Zarco-Espinosa G, Salamanca-Gómez F y Arenas-Aranda D. 2012. BIK/NBK gene as potential marker of prognostic and therapeutic target in breast cancer patients *Clin Transl Oncol.* 14(8): 586-591.

73. Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E. 2004. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279: 50375–50381.

74. Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, Sun Z, Szoke J, Gerald WL, Watson M, Govindan R y You M.. 2006. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med.* 3(12):e467.

75. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE y Kutay U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 303(5654):95–98.

76. Ma L, Teruya-Feldstein J y Weinberg RA. 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449 (7163):682–688.

77. Maiuri MC, Ciriollo A y Kroemer G. 2010. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J.* 29(3):515–516.

78. Mancini M y Toker A. 2009. FAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 9(11):810–820.

79. Marshansky V, Wang X, Bertrand R, Luo H, Duguid W, Chinnadurai G, Kanaan N, Vu MD y Wu J. 2001. Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J Immunol.* 166(5):3130–3142.

80. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R y Haqq C. 2006. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 5:24.

81. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ y Cowburn D.. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell.* 96(5):625–634.

82. Mebratu YA, Dickey BF, Evans C y Tesfaigzi Y. 2008a. The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN- γ -induced cell death. *Journal Cell Biol.* 183(3):429–439.

- 83.** Medeiros VP, Paredes-Gamero EJ, Monteiro HP, Rocha HA, Trindade ES y Nader HB.. 2011. "Heparin-Integrin interaction in endotelial cells: downstream signalign and heparan sulfate expression. "*Journal of Cellular Physiology*. En impresión.
- 84.** Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST y Patel T. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 133(2):647–658.
- 85.** Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM y Ding W. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266(5182):66–71.
- 86.** Mok CL, Gil-Gómez G, Williams O, Coles M, Taga S, Tolaini M, Norton T, Kioussis D y Brady HJ. 1999. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J Exp Med*. 189(3):575–586.
- 87.** Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E. 2004. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 279: 50375-50381
- 88.** Nakajima K, Hirose H, Taniguchi M, Kurashina H, Arasaki K, Nagahama M, Tani K, Yamamoto A y Tagaya M.. 2004. Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion. *EMBO J*. 23(16):3216–3226.
- 89.** Nathan B, Anbazhagan, Dyer M, Ebbs SR y Gusterson BA 1993. Expression of bcl-2-like immunoreactivity in the normal breast and in breast cancer. *The Breast*. 2(3):134–137.
- 90.** Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A y Gray JW. 2006a. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 10(6):515–527.
- 91.** Nguyen LV, Vanner R, Dirks P y Eaves CJ. 2012a. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*. 12:133–143.
- 92.** O'Neil RG y Leng L. 1997. Osmo-mechanically sensitive phosphatidylinositol signaling regulates a Ca²⁺ influx channel in renal epithelial cells. *Am J Physiol*. 273(1):

F120-F128.

93. Osundiji MA, Godes ML, Evans ML y Danial NN. 2011. BAD modulates counterregulatory responses to hypoglycemia and protective glucoprivic feeding. *PLoS ONE*. 6(12):e28016.
94. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E y Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 408(6808):86–89.
95. Pasquinelli AE. 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Rev Genet*. 13(4):271–282.
96. Peinado H, Olmeda D y Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Rev. Cancer*. 7(6):415–428.
97. Perlman H, Pagliari LJ, Nguyen N, Bradley K, Liu H y Pope RM. 2001. The Fas-FasL death receptor and PI3K pathways independently regulate monocyte homeostasis. *Eur J Immunol*. 31(8):2421–2430.
98. Rao TP y Kühl M. 2010. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Cir Res*. 106(12):1798–1806.
99. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I y Hatzigeorgiou AG. 2012. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 28(6):771–776.
100. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR y Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403(6772):901–906.
101. Reis PP, Rogatto SR, Kowalski LP, Nishimoto IN, Montovani JC, Corpus G, Squire JA y Kamel-Reid S. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene*. 21(42):6480–6487.
102. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL y Bradley A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14(10A):1902–1910.
103. Rondinelli RH, Haslam SZ y Fluck MM. 1995. The role of ovarian hormones, age

and mammary gland development in polyomavirus mammary tumorigenesis. *Oncogene* 11(9):1817–1827.

104. Rosen JM y Jordan CT.. 2009. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science*. 324(5935):1670–1673.

105. Sabourin JC, Martin A, Baruch J, Truc JB, Gompel A y Poitout P. 1994. Bcl-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. *Int J Cancer*. 59(1):1–6.

106. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CC y Benz CC. 2007. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. 282(2):1479–1486.

107. Shimizu S y Tsujimoto T. 2000. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *PNAS*. 97(2):577–582.

108. Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P y Srivenugopal KS. 2002. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene*. 21(6):878–889.

109. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F y Mo YY.. 2007. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 26(19):2799–2803.

110. Singh RK, Varney ML, Buyukberber S, Ino K, Ageitos AG, Reed E, Tarantolo S y Talmadge JE. 1999. Fas-FasL-mediated CD4+ T-cell apoptosis following stem cell transplantation. *Cancer Res*. 59(13):3107–3111.

111. Smyth GK. 2012. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 3(1):1–114.

112. Sonderegger S, Pollheimer J y Knöfler M. 2010. Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation. *Placenta*. 31(10):839–847.

113. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V y Lianidou ES. 2003. Real-Time Quantification of CK-19 mRNA-Positive Cells in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients Using the Lightcycler System. *Clin Cancer Res*. 9:5141–5151.

114. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dörken B y Daniel PT. 2005. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only

protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ.* 13(4):619–627.

115. Szegezdi E, Macdonald DC, Ní Chonghaile T, Gupta S y Samali A. 2009a. Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Cell Physiol.* 296(5):C941–C953.

116. Takeuchi O y Akira S.. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140(6):805–820.

117. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL y Massagué J. 2008. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature.* 451(7175):147–152.

118. Thiery JP, Acloque H, Huang RY y Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 139(5):871–890.

119. Tong Y, Yang Q, Vater C, Venkatesh LK, Custeau D, Chittenden T, Chinnadurai G y Gourdeau H.. 2001. The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol Cancer Ther.* 1(2):95–102.

120. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E y Croce CM. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 228(4706):1440–1443.

121. Vargo-Gogola T y Rosen JM. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Rev Cancer.* 7(9):659–672.

122. Verma S, Zhao LJ y Chinnadurai G. Phosphorylation of the Pro-apoptotic Protein BIK. mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem.* 276(7):4671–4676.

123. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T y Hatzigeorgiou AG. 2012. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* 40(W1):W498–W504.

124. Vogelstein Bert y Kinzler K. 1998. The genetic basis of human cancer. 339(14):731pp.

125. White E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10(1):1–15.

126. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y y Klinge CM. 2009. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 37(8):2584–2595.

127. Willis SN y Adams JM. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce

apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 17(6):617–625.

128. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C y Micklem G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 378(6559):789–792.

129. Yang E y Korsmeyer SJ. 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88(2):386–401.

130. Yang R, Xu D, Zhang A y Gruber A. 2001. Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. *Int J Cancer.* 94(3):407–413.

131. Yeretssian G, Correa RG, Doiron K, Fitzgerald P, Dillon CP, Green DR, Reed JC y Saleh M. 2011. Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity. *Nature.* 474(7349):96–99.

132. Yi R, Qin Y, Macara IG y Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17(24):3011–3016.

133. Yiu GK, y Toker A. 2006. NFAT Induces Breast Cancer Cell Invasion by Promoting the Induction of Cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 281(18):12210–12217.

134. Youle RJ y Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 9(1):47–59.

135. Zhang JQ, Okumura C, McCarty T, Shin MS, Mukhopadhyay P, Hori M, Torrey TA, Naghashfar Z, Zhou JX, Lee CH, Roopenian DC, Morse HC 3rd y Davidson WF. 2004. Evidence for selective transformation of autoreactive immature plasma cells in mice deficient in FasL. *J Exp Med* 200(11):1467–1478.

136. Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Chiao PJ y Fang B. 2005a. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 24(31):4993–4999.

137. Zou Y, Peng H, Zhou B, Wen Y, Wang SC, Tsai EM y Hung MC. 2002. Systemic tumor suppression by the proapoptotic gene Bik. *Cancer Res* 62(1):8–12.

Anexo I. miRNAs con sus respectivos genes blanco predichos por el programa miRpath V.2.0 en las diferentes rutas celulares que se mostraron afectadas.

Ruta (KEEG)	miRNAs involucrados	Genes blanco en la ruta
Biosíntesis de Glicosaminglicano-Heparan Sulfato	hsa-miR-636	<i>HS3ST3B1, HS3ST2, B3GAT1, GLCE</i>
	hsa-miR-1303	<i>EXT1</i>
	hsa-miR-4292, hsa-miR-149-3p	<i>XYLT1</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>EXTL2</i>
Interacciones de receptores de Matriz Extracelular (ECM)	hsa-miR-3184-5p	<i>ITGA5, COL1A1, TBHS3</i>
	hsa-miR-636	<i>LAMB3, SV2B, RELN, CD47</i>
	hsa-miR-1303	<i>SV2B, LAMC1</i>
	hsa-miR-1908	<i>TNN</i>
	hsa-miR-2861	<i>HSPG2</i>
	hsa-miR-4259	<i>SV2A</i>
	hsa-miR-3185	<i>ITGA9, COL1A2, COL4A1</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>LAMA3, SV2A, HSPG2, LAMC3, ITGA11, COL1A1, ITGA10, CL11A2, SDC4, COL5A3, ITGA2B</i>
Degradación de Lisina	hsa-miR-1914-3p, hsa-mir-636, hsa-mir-4259	<i>MLL</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>OGDH</i>
	hsa-miR-675-3p	<i>MLL, MLL5, GLT25D1</i>
	hsa-miR-1303	<i>ASH1L</i>
	hsa-miR-638	<i>POLD1</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>ALDH3A2, MLL, SUV39H2</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>SETDB1</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>SETDB1, MLL2, SUV420H2</i>
hsa-miR-30c-1-3p	<i>SETDB1, MLL</i>	
Señalización del Axón	hsa-miR-3184-5p	<i>NTN1, SRGAP2, PAK3, SRGAP3,</i>

Señalización del Axón		<i>NFATC2, GNAI2</i>
	hsa-miR-615-5p	<i>PAK1</i>
	hsa-miR-636	<i>SEMA6A, SEMA4A, ARHGEF12, SRGAP2, ROBO1</i>
	hsa-miR-1303	<i>PPP3CA, SEMA3A</i>
	hsa-miR-4292	<i>SEMA7A</i>
	hsa-miR-2861	<i>PLXNA2, SLIT1</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>EPHB2, ROCK1, ARHGEF12, ROCK2, RAC1, ROBO1, SEMA6D</i>
	hsa-miR-4259	<i>RAC2, AC130454.2</i>
	hsa-miR-3185	<i>SEMA5A, NFAT5</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>SEMA4A, L1CAM, SEMA6B, EPHB3, SEMA4G, PTK2, NFAT5, SLIT1, PAK6, ABLIM1</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>L1CAM, CXCL12, PAK1, SEMA4G, AC012652.1, SRGAP3</i>
	Cáncer Pancreático	hsa-miR-1914-3p
hsa-miR-3184-5p		<i>CASP9</i>
hsa-miR-636		<i>TP53, AKT3, TGBR2</i>
hsa-miR-675-3p		<i>VEGF</i>
hsa-miR-1303		<i>AKT2</i>
hsa-miR-4292		<i>ERBB2</i>
hsa-miR-2861		<i>E2F2, AKT2</i>
hsa-miR-659-3p		<i>BRAF, MAPK9, RAC1</i>
hsa-miR-4259		<i>RAC2, PIK3R3, SMAD4</i>
hsa-miR-3185		<i>TGFA, E2F3, EGF, MAPK10</i>
hsa-miR-149-3p		<i>E2F2, IKBKG, BCL2L1, RALB</i>
hsa-miR-30c-1-3p		<i>SMAD2, E2F3</i>
Biosíntesis de Glicosfingolípidos	hsa-miR-1914-3p	<i>B4GALNT1</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>ST6GALNAC6, B4GALNT1</i>

Biosíntesis de Glicoesfingolípidos	hsa-miR-636	<i>ST8SIA5</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>ST6GALNAC3</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>HEXA</i>
Ruta de señalización de Wnt	hsa-miR-1914-3p	<i>CHD8, PLCB2</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>PLCB1, NFATC2, PRKACA, TCF7</i>
	hsa-miR-615-5p	<i>PPP2R5C</i>
	hsa-miR-636	<i>TP53, SFRP2, DAAMI</i>
	hsa-miR-1303	<i>PPP2R5E, PPP3CA</i>
	hsa-miR-4292	<i>PRKCA, WNT4</i>
	hsa-miR-2861	<i>PRKACA, CSNK2B</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>CSNK2A2, ROCK1, ROCK2, NLK, MAPK9, RAC1</i>
	hsa-miR-4259	<i>RAC2, NLK, SMAD4, AC130454.2</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>PRICKLE2</i>
	hsa-miR-3185	<i>LRP6, VANGL1, PORCN, CCND2, PLCB1, FZD10, VANGL2, PSEN1, MAPK10</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>WNT1, NFAT5, CSNK2B, PPARD</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>FZD7, SMAD2, WNT1, DKK2, TCF7L1, CAMK2A, AC012652.1, PRICKLE2</i>
	Depresión a largo plazo (LTD)	hsa-miR-1914-3p
hsa-miR-3184-5p		<i>PLA2G6, PLCB1, GRM1, GNAI2</i>
hsa-miR-636		<i>NOS1, GUCY1A2, GNAO1, PRKG1</i>
hsa-miR-4292		<i>PRKCA</i>
hsa-miR-1908		<i>GNAS</i>
hsa-miR-659-3p		<i>BRAF, ITPR1</i>
hsa-miR-1915-3p		<i>GRIA2</i>

Depresión a largo plazo (LTD)	hsa-miR-3185	<i>PCLB1</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>PLA2G2A, PLA2G4E</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>GRIA3</i>
Reabsorción de agua regulada por vasopresina	hsa-miR-1914-3p	<i>DCTN2</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>PRKACA</i>
	hsa-miR-636	<i>ADCY9</i>
	hsa-miR-1303	<i>DYNCILI2, NSF</i>
	hsa-miR-1908	<i>GNAS</i>
	hsa-miR-2861	<i>PRKACA</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>RAB5C</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>DCTN4</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>CREB3L2, CREB3L1, RAB11B, RAB5B</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>RAB5B, AQP2</i>
Moléculas de adhesión celular	hsa-miR-1914-3p	<i>NFASC</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>HLA-C, CADM3, CNTN2, SELL, CDH5, PDCD1</i>
	hsa-miR-615-5p	<i>PVR, NCAM1, NLGN3, CD99</i>
	hsa-miR-636	<i>PTPRM, CNTNAP2, PDCD1LG2</i>
	hsa-miR-1303	<i>NEGRI, CLDN18, JAM2, NCAM1, CNTNAP2, CLDN1</i>
	hsa-miR-4292	<i>ICOSLG, HLA-G, PVRL1</i>
	hsa-miR-2861	<i>PTPRC, PEDCD1</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>CD28</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>PVR</i>
	hsa-miR-3185	<i>ITGA9, NRXN1, NRXN2, CLDN1</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>F11R, LICAM, SDC4, PVRL1, HLA-A</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>SIGLECI, LICAM, CD34, CD8B</i>

Señalización de las MAPK	hsa-miR-1914-3p	<i>NTRK2, MAPT, MAX, CACNG3</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>NTRK2, HSPA1L, NFATC2, PRKACA, FLNA, PDGFRB</i>
	hsa-miR-615-5p	<i>PPP5C, PAK1, MEF2C</i>
	hsa-miR-636	<i>RPS6KA2, TP53, ZAK, RPS6KA3, AKT3, TNFRSF1A, EVI1, DUSP, TGFRB2</i>
	hsa-miR-1303	<i>NTRK2, FGF11, PPP3CA, AKT2, MAP3K2, MAP3K5</i>
	hsa-miR-4292	<i>PRKCA, PDGFRB</i>
	hsa-miR-1908	<i>RAPGEF2</i>
	hsa-miR-2861	<i>AKT2, PRKACA, DUSP8</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>BRAF, FGF12, CACNA2D3, CACNB4, BDNF, NLK, DUSP10, MAP3K14, MAPK9, RAC1, FGF18</i>
	hsa-miR-4259	<i>RAC2, MAPK8IP1, NLK, MAX, AC130454.2</i>
	hsa-miR-3185	<i>STK4, RAPGEF2, FGF2, EGF, MAPK10</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>DUSP2, CACNG7, IKBKG, PLA2G2A, MAPT, CACNG4, DUSP8, CACNA2D2, NGF, MAX, CACNA2D1, MKNK2, PLA2G4E</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>NTRK2, STK4, RPS6KA2, PAK1, MAP2K6, FGF11, AC012652.1, MAP4K1</i>
Rutas en Cáncer	hsa-miR-1914-3p	<i>PIK3R2, MSH2, CASP9, MAX, SUFU, JUP</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>PML, MMP2, CASP9, CDKN1A,</i>

Rutas en Cáncer		<i>TCF7, PDGFRB</i>
	hsa-miR-636	<i>CBL, LAMB3, CDKN1B, TRAF5, RET, TP53, AKT3, EVI1, TGFBR2</i>
	hsa-miR-675-3p	<i>VEGF</i>
	hsa-miR-1303	<i>PTCH1, PML, FADD, FGF11, AKT2, KITLG, LAMC1</i>
	hsa-miR-4292	<i>PRKCA, ERBB2, WNT4, RASSF5, PDGFRB</i>
	hsa-miR-2861	<i>E2F2</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>AKT2</i>
	hsa-miR-4259	<i>BRAF, FGF12, CDK2, MAPK9, RAC1, FGF18</i>
	hsa-miR-1915-3p	<i>MMP1, CYS</i>
	hsa-miR-3185	<i>SKT4, TGFA, FZD4, FZD10, E2F3, FGF2, EGF, MAPK10, COL4A1</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>LAMA3, CBL, E2F2, WNT1, BCR, IKBKG, PTK2, LAMC3, AR, RASSF5, FLT3LG, MAX, BCL2L1, CDKN1A, RALB, NCOA4, SUFU, PPAR, ITGA2B</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>FZD7, SMAD2, STK4, WNT1, PTCH1, TCF7L1, BCR, FGF11, E2F3</i>
	Uniones adherentes	hsa-miR-1914-3p
hsa-miR-3184-5p		<i>TCF7</i>
hsa-miR-636		<i>PTPRM, ACTN1, TGFBR2</i>
hsa-miR-4292		<i>ERBB2, PVRL1</i>
hsa-miR-2861		<i>CSNK2B</i>
hsa-miR-659-3p		<i>CSNK2A2, PTPNI, NLK, RAC1,</i>

Uniones adherentes		<i>ACTN4</i>
	hsa-miR-4259	<i>RAC2, CTNND1, NLK, SMAD4</i>
	hsa-miR-3185	<i>CTNND1, INSR</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>CSNK2B, PTPRJ, PVRL1</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>SMAD2, TCF7L1, SNAI1</i>
Leucemia Mieloide Crónica	hsa-miR-1914-3p	<i>PIK3R2</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>CDKN1A</i>
	hsa-miR-636	<i>CBL, CDKN1B, TP53, PTPN11, SHC4, AKT3, EVI1, TGFBR2</i>
	hsa-miR-636	
	hsa-miR-1303	<i>AKT2</i>
	hsa-miR-4292	<i>GAB2</i>
	hsa-miR-2861	<i>E2F2, AKT2</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>BRAF</i>
	hsa-miR-4259	<i>PIK3R3</i>
	hsa-miR-3185	<i>E2F3</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>CBL, E2F2,, BCR, IKBKG</i>
hsa-miR-30c-1-3p	<i>BCL2L1, CDKN1A</i>	
Cáncer de Próstata	hsa-miR-1914-3p	<i>PIK3R2, CASP9</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>CASP9, CDKN1A, TCF7, PDGFRB</i>
	hsa-miR-636	<i>CDKN1B, TP53, AKT3</i>
	hsa-miR-1303	<i>AKT2, SRD5A2</i>
	hsa-miR-4292	<i>ERBB2, PDGFRB</i>
	hsa-miR-2861	<i>E2F2, AKT2</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>BRAF, CDK2</i>
	hsa-miR-4259	<i>PIK3R3</i>
	hsa-miR-3185	<i>TGFA, E2F3, EGF</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>E2F2, IKBKG, AR, CREB3L2, CREB3L1, CDKN1A</i>
hsa-miR-30c-1-3p	<i>TCF7L1, E2F3</i>	

Adhesión Focal	hsa-miR-1914-3p	PIK3R2
	hsa-miR-3184-5p	ITGA5, PAK3, COL1A1, FNLA, THBS3, PDGFRB
	hsa-miR-615-5p	PAK1
	hsa-miR-636	LAMB3, PP1CC, RELN, ACTN1, SHC4, AKT3
	hsa-miR-675-3p	VEGF
	hsa-miR-1303	AKT2, LAMC1, MYLK3
	hsa-miR-4292	<i>PRKCA, ERBB2, PDGFRB</i>
	hsa-miR-1908	<i>TNN</i>
	hsa-miR-2861	<i>AKT2</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>BRAF, ROCK1, ROCK2, MAPK9, RAC1, ACTN4, PPP1CB</i>
	hsa-miR-4259	<i>RAC2, PIK3R3, PPP1CB</i>
	hsa-miR-3185	<i>RAPGEF1, ITGA9, CCND2, COL1A2, EGF, MAPK10, COL4A1</i>
	hsa-miR-149-3p hsa-miR-149-3p	<i>LAMA3, ZYX, PTK2, LAMC3, ITGA11, COL1A1, ITGA10, COL11A2, PAK6, COL5A3, ITGA2B</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>PAK1, PARVA</i>
Secreción de Saliva	hsa-miR-1914-3p	<i>PLCB2</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>CALM3, PLCB1, PRKACA, ATP2B3, ATP1A1</i>
	hsa-miR-636	<i>PRH1, KCNMA1, NOS1, SLC12A2, GUCY1A2, STATH, PRKG1, ADCY9</i>
	hsa-miR-1303	<i>KCNMA1, STATH</i>
	hsa-miR-4292	<i>PRKCA, ADCY1, ADRB1</i>

	hsa-miR-1908	<i>GNAS</i>
	hsa-miR-2861	<i>PRKACA</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>ATP2B1, PRB1, ITPR1</i>
	hsa-miR-3185	<i>KCNMA1, PLCB1, ATP2B4, ADRB1</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>CST3, ATP1B2</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>DMBT1, ATP2B1</i>
Cáncer de Pulmón de células no pequeñas	hsa-miR-1914-3p	<i>PIK3R2, CASP9</i>
	hsa-miR-3184-5p	<i>CASP9</i>
	hsa-miR-636	<i>TP53, AKT3</i>
	hsa-miR-1303	<i>AKT3, FOXO3</i>
	hsa-miR-4292	<i>PRKCA, ERBB2, RASSF5</i>
	hsa-miR-2861	<i>E2F2, AKT2</i>
	hsa-miR-659-3p	<i>BRAF</i>
	hsa-miR-4259	<i>PIK3R3</i>
	hsa-miR-3185	<i>STK4, TGFA, E2F3, EGF</i>
	hsa-miR-149-3p	<i>E2F2, RASSF5</i>
	hsa-miR-30c-1-3p	<i>STK4, E2F3</i>

Anexo II. miRNAs sobreexpresados con sus genes blanco validados de acuerdo a la base miRWalk.

MicroRNA	Cromosoma.	Gen Blanco	Entrada ID	No. en Pubmed
hsa-miR-675-3p	11	<i>COL2A1</i>	1280	20529846
hsa-miR-675-3p	11	<i>SOX9</i>	6662	20529846
hsa-miR-675-3p	11	<i>RBI</i>	5925	19926638
hsa-miR-675-3p	11	<i>CTGF</i>	1490	18587395
hsa-miR-659-3p	22	<i>GRN</i>	2896	18723524
hsa-miR-615-5p	12	<i>MAPK8</i>	5599	20859756
hsa-miR-615-5p	12	<i>C9orf127</i>	51754	20859756
hsa-miR-615-5p	12	<i>CDKN2A</i>	1029	20483645
hsa-miR-615-5p	12	<i>IGF2R</i>	3482	20483645
hsa-miR-615-5p	12	<i>IGF2BP3</i>	10643	20483645
hsa-miR-615-5p	12	<i>HOXA7</i>	3204	18167555
hsa-miR-615-5p	12	<i>HOXB4</i>	3214	18167555
hsa-miR-615-5p	12	<i>HOXD1</i>	3231	18167555
hsa-miR-611	11	<i>DICER1</i>	23405	16505370
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DNAJB4</i>	11080	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LYCAT</i>	253558	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TXNDC12</i>	51060	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTPRF</i>	5792	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NARG1</i>	80155	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	20110569
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPIF</i>	10105	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PHC2</i>	1912	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LAMC1</i>	3915	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DUSP23</i>	54935	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UAP1</i>	6675	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TNFSF9</i>	8744	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AKT1</i>	207	20451494
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MBNL1</i>	4154	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TRMT1</i>	55621	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TYMS</i>	7298	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MPZL1</i>	9019	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>OAS1</i>	4938	18701917
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CLN5</i>	1203	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CHORDC1</i>	26973	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SFXN1</i>	94081	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HMGAI</i>	3159	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAB23</i>	51715	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RARS</i>	5917	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ADPGK</i>	83440	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DDX20</i>	11218	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>VTIIB</i>	10490	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PLXND1</i>	23129	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NEDD4</i>	4734	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTBPI</i>	5725	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BAT2</i>	7916	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PRDMI</i>	639	20966935
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DTD1</i>	92675	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RNASEN</i>	29102	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CTNNB1</i>	1499	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>COMMD9</i>	29099	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ITGA2</i>	3673	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>POLR2C</i>	5432	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MOSC1</i>	64757	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CUL4B</i>	8450	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC6A3</i>	6531	21338582
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SEC24A</i>	10802	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CORO1C</i>	23603	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>XIAP</i>	331	20451494
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PWP1</i>	11137	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ELMOD2</i>	255520	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GOLGA7</i>	51125	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTPRJ</i>	5795	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CDK5RAP3</i>	80279	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC25A13</i>	10165	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EGFR</i>	1956	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LCPI</i>	3936	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MRPL20</i>	55052	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SRPR</i>	6734	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SNAP23</i>	8773	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MET</i>	4233	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PRPF40A</i>	55660	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UGT8</i>	7368	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ZNF622</i>	90441	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NOTCH1</i>	4851	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MSI2</i>	124540	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BRPF3</i>	27154	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FADS2</i>	9415	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HMOX1</i>	3162	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GALNT7</i>	51809	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RBMS1</i>	5937	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SH3BGRL3</i>	83442	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CEBPB</i>	1051	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RCOR1</i>	23186	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NELL1</i>	4745	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTGFRN</i>	5738	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM43</i>	79188	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SOX2</i>	6657	20947512
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC38A5</i>	92745	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GEMIN4</i>	50628	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RDH10</i>	157506	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GSTM4</i>	2948	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ITGB4</i>	3691	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC38A2</i>	54407	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FNDC3B</i>	64778	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GTPBP3</i>	84705	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SNCA</i>	6622	21338582
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PGRMC1</i>	10857	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARFIP2</i>	23647	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NAPG</i>	8774	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BCL2</i>	596	20451494
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SEC23IP</i>	11196	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GAK</i>	2580	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HSD17B12</i>	51144	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTPRK</i>	5796	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SHOC2</i>	8036	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HUWE1</i>	10075	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RCAN2</i>	10231	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARID2</i>	196528	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARHGDI1A</i>	396	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GPR172B</i>	55065	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>STRN</i>	6801	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MLLT1</i>	4298	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TRMU</i>	55687	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>WNT5A</i>	7474	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>YIF1B</i>	90522	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PAX3</i>	5077	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IQGAP3</i>	128239	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARFIP1</i>	27236	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FHL5</i>	9457	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HSPA1A</i>	3303	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PGM1</i>	5236	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BCKDHB</i>	594	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ABHD11</i>	83451	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF2C1</i>	26523	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ANP32B</i>	10541	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SYNE2</i>	23224	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NOTCH2</i>	4853	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SCYL1</i>	57410	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DHX40</i>	79665	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LIN28</i>	79727	20947512
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GPR56</i>	9289	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DDX20</i>	11218	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MOSPD2</i>	158747	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SAC3D1</i>	29901	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>JUN</i>	3725	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FAM105A</i>	54491	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GPNPAT1</i>	64841	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LMNB2</i>	84823	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MYBL2</i>	4605	21187425
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EHMT2</i>	10919	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>POLA2</i>	23649	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TNFRSF10B</i>	8795	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TP53</i>	7157	20062521
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KLK8</i>	11202	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TXN2</i>	25828	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NT5C3</i>	51251	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PURA</i>	5813	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AARSD1</i>	80755	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF2C1</i>	26523	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>WDR68</i>	10238	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF4E</i>	1977	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FADS1</i>	3992	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPP1R7</i>	5510	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SYPL1</i>	6856	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MOV10</i>	4343	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BRWD2</i>	55717	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CA12</i>	771	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ASH2L</i>	9070	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PAX6</i>	5080	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DNAJC19</i>	131118	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CHMP2A</i>	27243	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC4A7</i>	9497	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HSPA1B</i>	3304	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SERPINE2</i>	5270	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RCN2</i>	5955	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HSDL1</i>	83693	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF2C2</i>	27161	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HBXIP</i>	10542	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>VPS39</i>	23339	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NP</i>	4860	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTGS2</i>	5743	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IPO4</i>	79711	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NFYC</i>	4802	20889907
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MARS2</i>	92935	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF2C1</i>	26523	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ADSS</i>	159	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AGRN</i>	375790	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMCO1</i>	54499	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CDCP1</i>	64866	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DOCK7</i>	85440	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NOS1</i>	4842	21134262
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PRSS21</i>	10942	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC7A11</i>	23657	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>THBS1</i>	7057	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TNFRSF10A</i>	8797	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DNM1L</i>	10059	20062521
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PRAF2</i>	11230	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>METTL7A</i>	25840	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SNX15</i>	29907	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PDE3A</i>	5139	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTBP2</i>	58155	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC25A32</i>	81034	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF2C2</i>	27161	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CALCOCO2</i>	10241	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTPLB</i>	201562	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FADS3</i>	3995	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPP2R4</i>	5524	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM41B</i>	440026	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CEP72</i>	55722	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC30A1</i>	7779	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CLDN1</i>	9076	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TRIM27</i>	5987	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GRPEL2</i>	134266	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAB30</i>	27314	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FXR2</i>	9513	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DNAJB1</i>	3337	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATP6VIC1</i>	528	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RHEB</i>	6009	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATAD3B</i>	83858	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RNASEN</i>	29102	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RPP38</i>	10557	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SYNE1</i>	23345	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATP2A2</i>	488	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NUFIP2</i>	57532	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC25A22</i>	79751	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SMAD2</i>	4087	20498632
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATP6V1F</i>	9296	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DGCR8</i>	54487	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CYP51A1</i>	1595	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KCNN4</i>	3783	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GNL3L</i>	54552	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MRPS24</i>	64951	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AP3B1</i>	8546	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>REG3A</i>	5068	21134262
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TOMM34</i>	10953	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM2</i>	23670	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPP2R5C</i>	5527	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TLOC1</i>	7095	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PEX11B</i>	8799	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LHX1</i>	3975	19906860
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DUSP12</i>	11266	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GALNT1</i>	2589	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DPP7</i>	29952	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UBE2J1</i>	51465	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SRPRB</i>	58477	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC38A1</i>	81539	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GEMIN4</i>	50628	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AKAP8</i>	10270	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>F2</i>	2147	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARL2</i>	402	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MTRR</i>	4552	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CAND1</i>	55832	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LUZP1</i>	7798	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DHX57</i>	90957	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SHH</i>	6469	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CPOX</i>	1371	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GNAI2</i>	2771	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SCAMP1</i>	9522	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HYAL1</i>	3373	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ACP2</i>	53	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SPCS3</i>	60559	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAB34</i>	83871	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DGCR8</i>	54487	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SPTLC1</i>	10558	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KIAA0776</i>	23376	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NPR3</i>	4883	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AADAACL1</i>	57552	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GEMIN7</i>	79760	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MET</i>	4233	20498632
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>XPO5</i>	57510	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AP2A1</i>	160	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KPNA3</i>	3839	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATRX</i>	546	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC1A4</i>	6509	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GFMI1</i>	85476	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DMN</i>	23336	21134262
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMED2</i>	10959	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SH3BP4</i>	23677	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPP3CA</i>	5530	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TNFAIP2</i>	7127	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NRP1</i>	8829	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	19906860
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LYPLA2</i>	11313	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM87A</i>	25963	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TRIP13</i>	9319	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC25A24</i>	29957	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ANKFY1</i>	51479	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SNX6</i>	58533	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>COIL</i>	8161	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DGCR8</i>	54487	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>OPRS1</i>	10280	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARL5B</i>	221079	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LPL</i>	4023	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MYO1E</i>	4643	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PRKCI</i>	5584	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CACNA2D1</i>	781	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC16A3</i>	9123	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTRH1</i>	138428	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GPD2</i>	2820	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MPDU1</i>	9526	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IDH1</i>	3417	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PLK1</i>	5347	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CCL13</i>	6357	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UTP15</i>	84135	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>XPO5</i>	57510	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PDLIM5</i>	10611	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KIAA0409</i>	23378	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NT5E</i>	4907	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>WDFY1</i>	57590	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EHMT1</i>	79813	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TGFB1</i>	7040	20498632
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TARBP2</i>	6895	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ZNF384</i>	171017	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM189</i>	387521	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LY6K</i>	54742	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC7A1</i>	6541	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SSNAI</i>	8636	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DMD</i>	1756	20807818
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MLLT11</i>	10962	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PISD</i>	23761	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LRP1</i>	4035	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPP3R1</i>	5534	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TPM1</i>	7168	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SQSTM1</i>	8878	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DGCR8</i>	54487	19906860
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FMNL2</i>	114793	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ZNF294</i>	26046	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>VAMP3</i>	9341	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PSAT1</i>	29968	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTPLAD1</i>	51495	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAB6A</i>	5870	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UNC93B1</i>	81622	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>Clorf183</i>	55924	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BET1</i>	10282	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FGF2</i>	2247	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MYO10</i>	4651	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PKN2</i>	5586	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PXDN</i>	7837	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RQCD1</i>	9125	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RNASEN</i>	29102	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KDELC2</i>	143888	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TTC9C</i>	283237	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM59</i>	9528	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IFRD1</i>	3475	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATP6V0A1</i>	535	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SDCBP</i>	6386	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>STX7</i>	8417	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TARBP2</i>	6895	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IGF2BP1</i>	10642	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMED3</i>	23423	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NUCB1</i>	4924	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RNF213</i>	57674	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AGMAT</i>	79814	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TGFBR1</i>	7046	20498632
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PIWIL1</i>	9271	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DSG2</i>	1829	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RHOB</i>	388	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPIB</i>	5479	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC12A2</i>	6558	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MAP2K1IP1</i>	8649	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ID1</i>	3397	20807818
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMED10</i>	10972	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IFIT5</i>	24138	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TACSTD2</i>	4070	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ABHD10</i>	55347	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TPM2</i>	7169	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AP3D1</i>	8943	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GRIA2</i>	2891	20582287
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PTPMT1</i>	114971	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAI14</i>	26064	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SNAP29</i>	9342	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GYS1</i>	2997	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TAF9B</i>	51616	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAB27B</i>	5874	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CAPG</i>	822	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MAP3K12</i>	7786	19851984
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CDIPT</i>	10423	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FGF13</i>	2258	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HNRPM</i>	4670	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LRRC8A</i>	56262	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IFRD2</i>	7866	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CLTC</i>	1213	21070682
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RFT1</i>	91869	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NKX2-3</i>	159296	16574096
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CPNE8</i>	144402	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SPRYD4</i>	283377	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SF11</i>	9814	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AMIGO2</i>	347902	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>POLE3</i>	54107	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NCAPG</i>	64151	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MLSTD2</i>	84188	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PIWIL1</i>	9271	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GNAI3</i>	10672	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HARS2</i>	23438	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NAT6</i>	24142	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PAFAH1B2</i>	5049	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GPAM</i>	57678	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MRF1</i>	79922	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CHST14</i>	113189	20498632
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CHAF1A</i>	10036	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DSP</i>	1832	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KRT85</i>	3891	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CDKAL1</i>	54901	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC12A4</i>	6560	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CBFB</i>	865	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ITGB3</i>	3690	20498642
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FERMT2</i>	10979	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SMAD1</i>	4086	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPP5C</i>	5536	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TPM3</i>	7170	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>P4HA2</i>	8974	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>EIF2C2</i>	27161	20582287
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>THEM4</i>	117145	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GARS</i>	2617	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC9A3R2</i>	9351	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ANXA2</i>	302	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MRPS33</i>	51650	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAB5C</i>	5878	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARID1A</i>	8289	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UBE2I</i>	7329	19223510
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CID</i>	10438	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FNDC3A</i>	22862	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NARS</i>	4677	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>POLE4</i>	56655	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATG9A</i>	79065	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IFNA1</i>	3439	21070682
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>AURKB</i>	9212	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TPPP</i>	11076	14966264
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CSNK1D</i>	1453	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ARL10</i>	285598	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MRC2</i>	9902	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>IGF2R</i>	3482	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PODXL</i>	5420	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NXN</i>	64359	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FAM96A</i>	84191	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BRCA1</i>	672	19048628
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CTSC</i>	1075	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TRAM1</i>	23471	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>FRG1</i>	2483	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMED7</i>	51014	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>KIAA1618</i>	57714	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DOCK5</i>	80005	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PAH</i>	5053	20110569
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ABCF2</i>	10061	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DSPP</i>	1834	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RHOG</i>	391	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PPL</i>	5493	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SLC25A1</i>	6576	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RNMT</i>	8731	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UBE2I</i>	7329	20498642
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CHD1</i>	1105	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MAT2A</i>	4144	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PRIM1</i>	5557	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TXNRD1</i>	7296	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PHLDB2</i>	90102	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	18776119
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GALNTL2</i>	117248	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GFPT1</i>	2673	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>UBE4A</i>	9354	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>HARS</i>	3035	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CDK5RAP1</i>	51654	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RAD23B</i>	5887	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PICALM</i>	8301	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GEMIN4</i>	50628	19138993
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>SEC23A</i>	10484	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TRIM32</i>	22954	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>NCL</i>	4691	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RTN4</i>	57142	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TMEM109</i>	79073	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>BCL6</i>	604	20966935
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>PDLIM7</i>	9260	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>DICER1</i>	23405	20732906
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CSRPI</i>	1465	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ANPEP</i>	290	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>RBM19</i>	9904	18668040

hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>TICAM2</i>	353376	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>POLD2</i>	5425	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>ATG3</i>	64422	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>LRRC8C</i>	84230	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>GAPDH</i>	2597	18758992
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>MTHFD2</i>	10797	18668040
hsa-miR-30c-1-3p	1	<i>CARHSP1</i>	23589	18668040
hsa-miR-1915-3p	10	<i>NOTCH1</i>	4851	21042738
hsa-miR-1908	11	<i>SOX2</i>	6657	18583537
hsa-miR-1908	11	<i>DICER1</i>	23405	18583537
hsa-miR-1908	11	<i>DICER1</i>	23405	20224791
hsa-miR-1908	11	<i>RNASEN</i>	29102	20224791
hsa-miR-149-3p	2	<i>BRCA2</i>	675	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>NBN</i>	4683	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>SLC12A1</i>	6557	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>PSAT1</i>	29968	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>COX8A</i>	1351	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>ATM</i>	472	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>TCF21</i>	6943	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>COX8A</i>	1351	19676045
hsa-miR-149-3p	2	<i>CDKN1A</i>	1026	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>AKT1</i>	207	20623644
hsa-miR-149-3p	2	<i>PCNA</i>	5111	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>VEGFA</i>	7422	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>HOXB8</i>	3218	19514064
hsa-miR-149-3p	2	<i>CTSD</i>	1509	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>E2F1</i>	1869	20623644
hsa-miR-149-3p	2	<i>POLR2K</i>	5440	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>SEMA6A</i>	57556	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>BCL2</i>	596	19082544
hsa-miR-149-3p	2	<i>IGF1R</i>	3480	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>MYBL2</i>	4605	20623644
hsa-miR-149-3p	2	<i>RBI</i>	5925	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>KLK3</i>	354	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>PAWR</i>	5074	19082544
hsa-miR-149-3p	2	<i>IGFBP5</i>	3488	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>CISH</i>	1154	20549817
hsa-miR-149-3p	2	<i>TP53</i>	7157	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>CDH17</i>	1015	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>DICER1</i>	23405	19082544
hsa-miR-149-3p	2	<i>IGFBP6</i>	3489	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>ERBB4</i>	2066	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>BAP1</i>	8314	19950226

hsa-miR-149-3p	2	<i>HIF1A</i>	3091	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>AATF</i>	26574	19082544
hsa-miR-149-3p	2	<i>INS</i>	3630	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>KCNMA1</i>	3778	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>PCAF</i>	8850	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>HPRT1</i>	3251	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>MYC</i>	4609	18451220
hsa-miR-149-3p	2	<i>KPNA2</i>	3838	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>LOX</i>	4015	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>PPIA</i>	5478	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>CSH1</i>	1442	18218722
hsa-miR-149-3p	2	<i>MRE11A</i>	4361	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>PTPN13</i>	5783	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>RIT2</i>	6014	20378769
hsa-miR-149-3p	2	<i>BRCA1</i>	672	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>ATF1</i>	466	19950226
hsa-miR-149-3p	2	<i>SFRP1</i>	6422	20420713
hsa-miR-149-3p	2	<i>TBP</i>	6908	20378769