



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN
miRNAs Y mRNAs ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL FERNÁNDEZ ROJAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: [^]DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de febrero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **FERNÁNDEZ ROJAS MIGUEL ÁNGEL** con número de cuenta **305283845**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN miRNAs Y mRNAs ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA"**, realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**:

Presidente: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Vocal: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN
Suplente: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de febrero de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser pilar en el inicio de mi formación como investigador.

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado (No de Becario: 288752) sin el cual no habría sido posible la realización del presente trabajo.

Al **I.M.S.S.** por el estímulo económico brindado (Matrícula: 99096742) el cual reforzó aún más mi compromiso y dedicación para concluir el presente trabajo en tiempo y forma.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda Q.E.P.D, quien lamentablemente falleció una vez concluida la última etapa de este trabajo. Agradezco profundamente el que me haya permitido formar parte de su grupo de trabajo y el haberme brindado su apoyo y confianza durante estos años.

A las Dras. Vilma Araceli Maldonado Lagunas y Marcela Lizano Soberón cuyas observaciones, correcciones y críticas fueron fundamentales para enriquecer y mejorar el presente trabajo. Así mismo agradezco su enorme disposición y apoyo hacia mí, ante el triste fallecimiento de mi tutor.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia quienes, como siempre, me brindaron su apoyo, amor, confianza y tolerancia durante todo este tiempo. Por mostrarme que, a pesar de todo lo que podemos sufrir, somos fuertes juntos y podemos hacer esta vida un poco más amable. Sin ustedes no habría sido posible nada, una vez más gracias por todo.

A la M. en C. Brenda Anabel López Ruiz, gracias una vez más por tu cariño, entusiasmo, consejos, regaños, críticas y sobre todo paciencia durante todo este tiempo. Sin ti alentándome y dándome ánimo para superar las peripecias, tristezas y desaguisados que sucedieron no habría llevado a buen término este trabajo.

A los miembros de mí jurado Dr. Emilio Córdova Alarcón, Dr. Gonzalo Castillo Rojas y Dr. Federico Ávila Moreno, cuyas observaciones, críticas y comentarios hicieron de este, un mejor trabajo.

A las Dras. Lourdes Basurto Acevedo y Sara Vega García responsables de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades de Centro Medico SXXI. Por su colaboración en la obtención de las muestras control empleadas. Así mismo agradezco a la Q.F.B. Sandra Leticia Campos León, gracias Sandy por tu cariño, dedicación y cuidados para todos tus hijitos del laboratorio de Genética.

Al Dr. Javier Torres Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Parasitarias del Hospital de Pediatría de Centro Medico SXXI. Por su colaboración en la obtención de las muestras tumorales.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Mau, Mirna y Diana gracias por enseñarme, criticarme y ayudarme a mejorar, así como por hacer divertida y agradable mi estancia en el laboratorio, pero sobre todo gracias por ser mis queridos amigos. De manera especial a la B.Q.D Karen Amallinali Ayala Contreras, mi jefecita, gracias por todo tu apoyo, este trabajo en gran parte es gracias a ti.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi hermano Iván y mi maestro Dr. Diego Julio Arenas Aranda

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
Cáncer	3
Cáncer de mama (CaMa)	4
I. Clasificación clínica	6
II. Clasificación Molecular	13
III. Factores de Riesgo	15
MicroRNAs.....	18
I. Biogénesis y función de miRNAs	19
II. miRNAs y cáncer de mama	21
III. miRNAs y SNPs.....	23
a. SNPs en los genes del miRNA	26
b. SNPs en los genes de sitios blanco de miRNAs.....	27
c. SNPs en la maquinaria de procesamiento	29
4. JUSTIFICACIÓN	32
5. OBJETIVOS	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares	33
6. ANTECEDENTES	34
7. METODOLOGÍA	36
Obtención de muestras biológicas	36
Evaluación de la concentración y pureza del ADN	36

Diseño de iniciadores y PCR punto final	37
Purificación y secuenciación de productos de PCR	38
Presencia de SNPs en el clúster mir23a-mir27a-mir24-2 en líneas celulares de mama	38
Expresión Relativa de miR-27a en líneas celulares de mama	39
8. RESULTADOS	40
Muestras experimentales.	40
Determinación de la integridad y concentración de DNA.	40
Amplificación de regiones específicas de miRNAs	42
Purificación de productos de PCR.	46
Análisis de la secuenciación de las regiones amplificadas.....	47
Análisis del clúster mir23a-mir27a-mir24-2 en líneas celulares de mama	50
Expresión Relativa de miR-27a en líneas celulares de mama	51
9. DISCUSION	53
10. CONCLUSIONES	59
11. LITERATURA CITADA	60
ANEXO	71

1. RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) es un problema de salud pública a nivel mundial, diagnosticándose cerca de 1.67 millones de casos nuevos en 2012 y constituye la primera causa de muerte en mujeres mexicanas desde el 2006. En los últimos años se ha descrito a los miRNAs como importantes protagonistas en el desarrollo de cáncer de mama a través de su papel como Oncogenes o Supresores de Tumor. Se ha evidenciado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las secuencias de miRNAs, así como en sus sitios blanco, están asociados con el desarrollo de esta neoplasia. En este trabajo se identificaron los SNPs presentes en los genes de 6 miRNAs y 3 mRNAs asociados con el CaMa. Para esto, se obtuvo el DNA de 100 muestras de mujeres mexicanas, diagnosticadas con CaMa y de 100 muestras de DNA de mujeres sanas. Se amplificaron y secuenciaron 9 regiones de interés sobre 60 y 46 muestras control y tumorales, respectivamente. Mientras que en 40 y 54 muestras solo se amplificaron las regiones correspondientes a miR27a y miR196a-2-ii. Los electroferogramas de secuenciación mostraron el cambio de una sola base A>G, rs895819 localizado en miR-27a, en 32 de 68 (35.55%) muestras control y 31 de 51 (60.78%) muestras tumorales. Así mismo se realizó una búsqueda del polimorfismo rs895819 en cuatro líneas celulares mamarias, encontrando este mismo SNP en la línea celular MFC10A. Por otra parte, mediante ensayos de RT-PCR se identificó que las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 poseen una menor expresión de miR-27, constituyendo el modelo idóneo para ensayos funcionales de validación.

Palabras clave: Cancer de mama, miRNAs, SNPs, miR-27a.

2. ABSTRACT

Breast cancer is a worldwide public health problem, diagnosed about 1.67 millions of new cases in 2012, and is the leading cause of death among Mexican women since 2006. Recently has been described the miRNAs as important players in the development of breast cancer through his role of Oncogene or Tumor Suppressors. It has been shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in miRNAs sequences and their target sites, are associated with the development of this neoplasm. This study presents the identified SNPs in the genes of 6 miRNAs and 3 mRNAs associated with breast cancer. For this, 100 DNA samples of Mexican women diagnosed with breast cancer and 100 DNA samples from healthy women was collected. Nine regions of interest of 60 and 46 control and tumor samples, respectively, was amplified and sequenced, while the remaining 40 and 54 samples corresponding only for miR-27a and mir-196a-2-ii. Sequencing electropherograms showed a miR-27a single base change A>G rs 895819 in 32 of 68 (47.05%) control samples and in 31 of 51 (60.78%) tumor samples. Also a search for polymorphism rs895819 was performed in four mammary cell lines; finding the same SNP in the cell line in MCF10A. Furthermore through RT-PCR was identified cell lines MCF7 and MDA-MB-231 have lower levels of miR-27a, making them in the ideal models for functional assays of validation.

Key word: Breast cancer, miRNAs, SNPs, miR-27a

3. INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades complejo y heterogéneo causado por múltiples factores genéticos y no genéticos que alteran el ADN de una célula, la cual adquiere capacidades proliferativas anormales, desarrollándose el tumor y, debido a las alteraciones asociadas a su desarrollo, el cáncer puede adquirir la capacidad de metastizar (Torrades, 2003).

Existen más de 100 tipos distintos de cáncer, originados en tejidos diferenciados. Sin embargo, se han planteado una serie de características biológicas comunes a la gran mayoría de células cancerosas, dichas características incluyen: señales de proliferación sostenidas, evasión de las señales supresoras del crecimiento, invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, angiogénesis, resistencia a la muerte celular, un metabolismo reductor, desbalance en los procesos energéticos de la célula, evasión de la respuesta inmune, inestabilidad genómica e inflamación. Todas ellas ocurren de manera gradual y aleatoria durante el desarrollo de la enfermedad (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En el 2012 se presentaron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, 8.2 millones de muertes, mientras que 32.6 millones de personas viven con algún tipo de neoplasia maligna, siendo las de mayor mortalidad: el cáncer pulmonar (1,589,800 defunciones), cáncer de hígado (745,517 defunciones), cáncer de estómago (723,027 defunciones), cáncer colorectal

(693,881 defunciones) y cáncer de mama (521,817 defunciones) (GLOBOCAN, 2012).

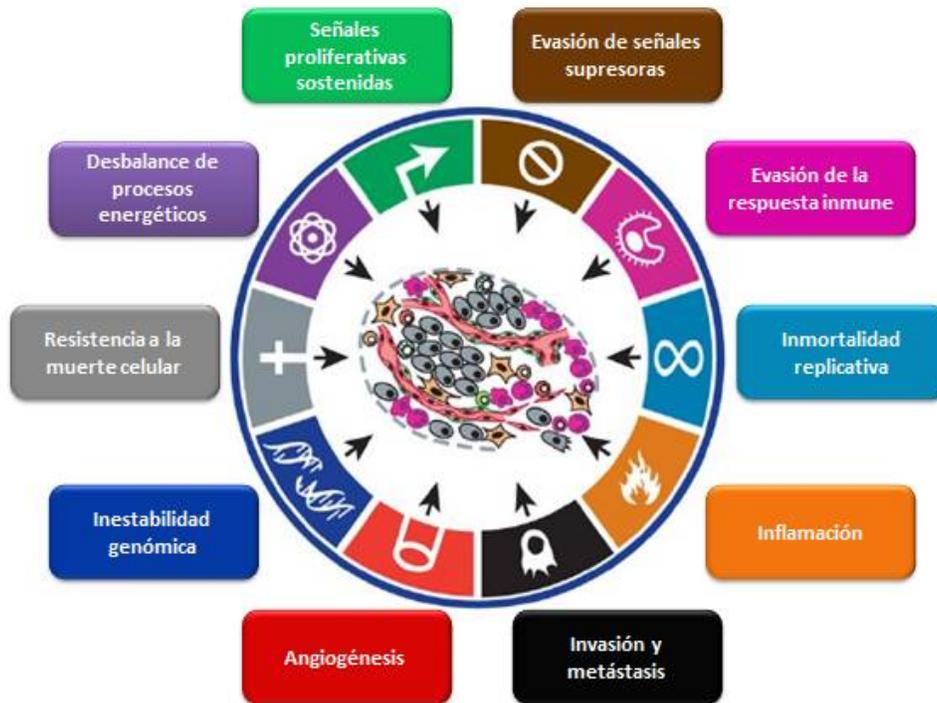


Figura 1. Características diacríticas de las células cancerosas (Tomado y modificado de Hanahan and Weinberg, 2011)

Cáncer de mama (CaMa)

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial, tan solo en 2012 se diagnosticaron cerca de 1.67 millones de casos nuevos (GLOBOCAN, 2012). Esta enfermedad constituye la primera causa de muerte por neoplasia en la mujer, tanto a nivel mundial como en México. En el caso de México de 1955 a 2005, la tasa de mortalidad por cáncer cervico-uterino era mayor que la de cáncer de mama, sin embargo, a partir del 2006 el riesgo de morir por cáncer de mama excedió al número de decesos causados por cáncer cervico-uterino y para ese mismo año, el cáncer de mama se

convirtió en la segunda causa de muerte más común en México, entre las mujeres de 30 a 54 años y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años, solo por detrás de la diabetes y las cardiopatías (Knaul *et al.*, 2009).

En 2011 la mortalidad por cáncer de mama presentó variaciones importantes por entidad federativa: diez estados, particularmente los ubicados en el norte del país, así como Guadalajara, Monterrey y la Ciudad de México, concentraron cerca del 50% de las muertes por esta enfermedad. Dichos estados con mayor índice de mortalidad, corresponden a los que tienen un mejor desarrollo económico y social, lo cual puede tener un sub-diagnóstico de esta enfermedad en zonas rurales (Figura 2).

La detección tardía sigue siendo una de las principales problemáticas en México, en contraste con la situación en Estados Unidos, donde aproximadamente 60% de los tumores mamarios son diagnosticados en etapas tempranas.

En México, la cifra se estima menor al 10% para detección de etapas tempranas, mientras que entre el 40 y 50% de los casos se presentan en etapas tardías, y dichos valores no han disminuido desde principio de los años noventa. Estas cifras, en parte se deben a la baja penetración que en nuestro país tiene el uso de la mastografía, el examen clínico y el autoexamen, particularmente entre la población de escasos recursos y zonas rurales. De acuerdo con el Programa de Acción del Cáncer de Mama 2007-2012, la cobertura de detección por mastografías en mujeres de 50 a 69 años fue de apenas el 8.5% en 2007 (Torres –Mejía, 2011).

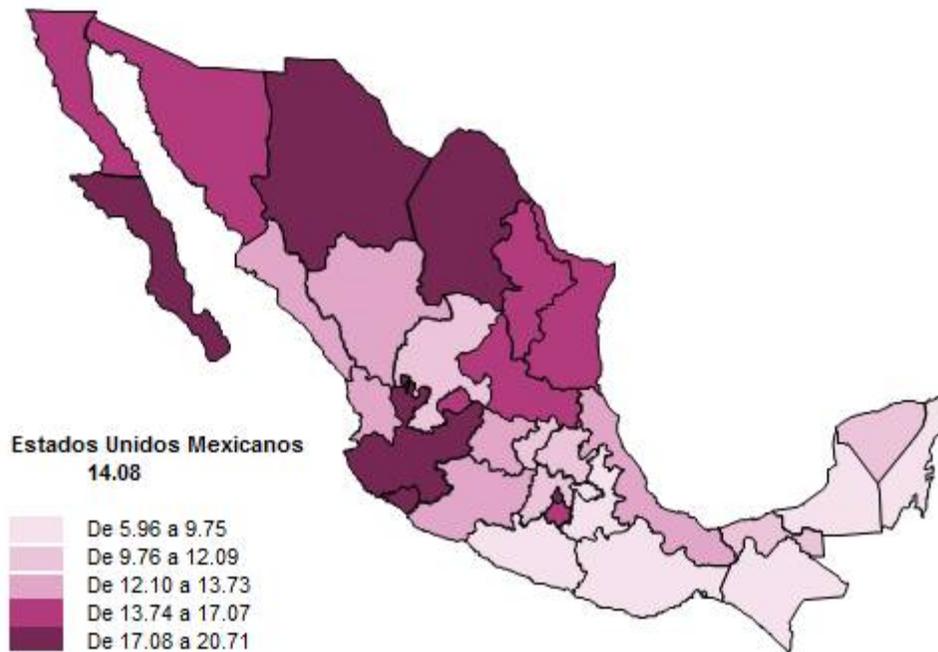


Figura 2. Tasa de mortalidad observada por cada 100,000 mujeres de 20 años o más, por entidad federativa (INEGI, 2013)

I. Clasificación clínica

El cáncer de mama se clasifica, dependiendo de la severidad de la enfermedad, en cuatro estadios (Cancer, 2014).

a) Estadio 0

Se emplea para designar células anormales que no poseen un carácter invasivo. Se divide en:

- Carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS).- Alteración con células anormales en los lobulillos de la mama.
- Carcinoma ductal *in situ* (DCIS).- Es una afección no invasiva en la que se encuentran células anormales en el revestimiento de los conductos de

la mama. En algunos casos, el DCIS puede volverse invasivo y diseminarse sino se trata (Figura 3).

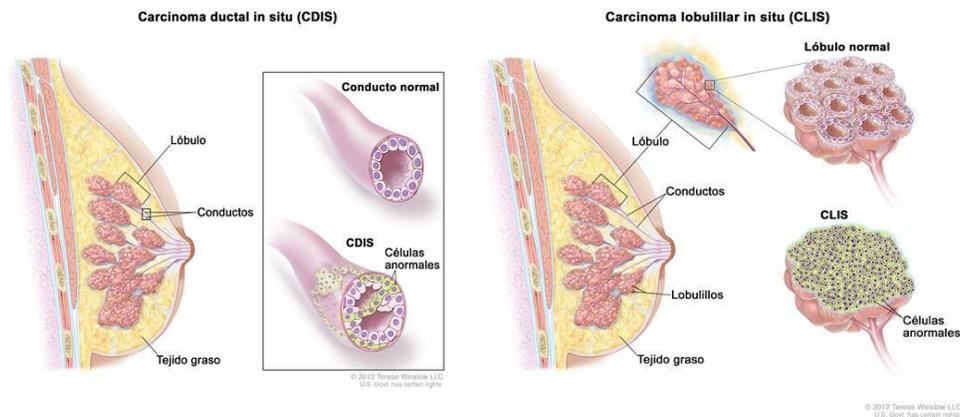


Figura 3. Diagramas de Estadio 0 de cáncer de mama. Carcinoma ductal *in situ* y Carcinoma lobulillar *in situ* (Cancer, 2014).

b) Estadio I

Es una etapa clínica inicial de cáncer y se subdivide en dos:

- Estadio IA.- Tumor de 2 cm o menos y sin diseminación fuera de la mama
- Estadio IB.- Presentan pequeños grupos de células cancerosas (mayores de 0.2 milímetros, pero no mayores de 2 milímetros) en los ganglios linfáticos y no se encuentra un tumor en la mama, o el tumor mide dos centímetros o menos (Figura 4).

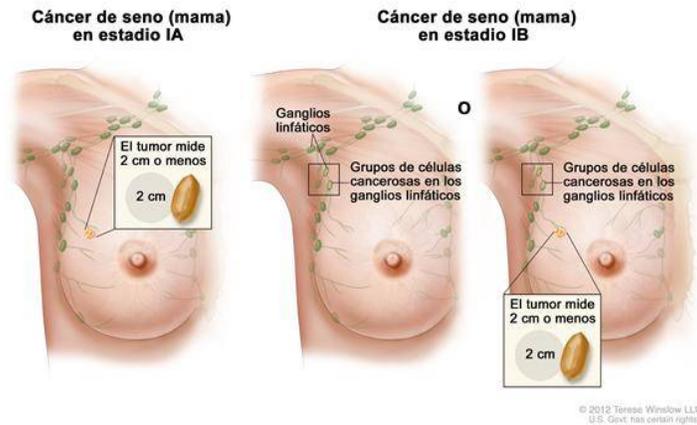


Figura 4. Diagrama de Estadio IA y Estadio IB de cáncer de mama (Cancer, 2014).

c) Estadio II

Se divide en Estadio IIA y IIB

- Estadio IIA.
 - No se encuentra tumor en la mama, o el tumor mide 2 centímetros o menos.
 - El tumor (mide más de 2 milímetros) se encuentra entre 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos del esternón.
 - El tumor puede medir entre 2 y 5 centímetros y no se diseminó hasta los ganglios linfáticos (Figura 5).

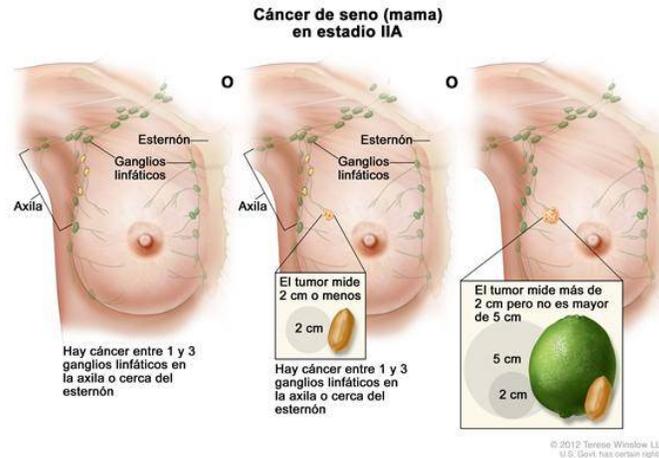


Figura 5. Diagrama de Estadio IIA de cáncer de mama (Cancer, 2014).

- Estadio IIB
 - El tumor mide entre 2 y 5 cm, se encuentran grupos pequeños de células con cáncer en los ganglios linfáticos.
 - Mide entre 2 y 5 cm. El cáncer se ha diseminado entre 1 y 3 ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
 - Mide más de cinco centímetros, pero no se ha diseminado hacia los ganglios linfáticos (Figura 6).

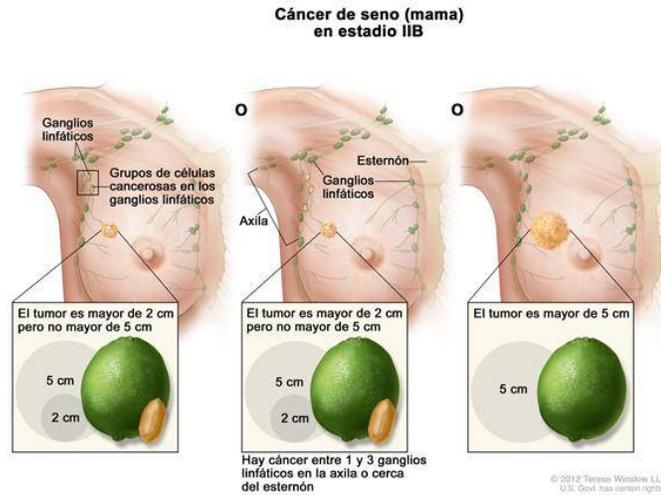


Figura 6. Diagrama de Estadio IIB de cáncer de mama (Cancer, 2014).

d) Estadio III

Se subdivide en tres estadios:

- Estadio IIIA
 - El tumor puede ser de cualquier tamaño y se encuentra diseminado en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón.
 - El tumor mide más de cinco centímetros y se encuentran pequeños racimos de células cancerosas en los ganglios linfáticos.
 - El tumor mide más de cinco centímetros y se ha diseminado en uno a tres ganglios linfáticos axilares o a ganglios linfáticos cerca del esternón (Figura 7).

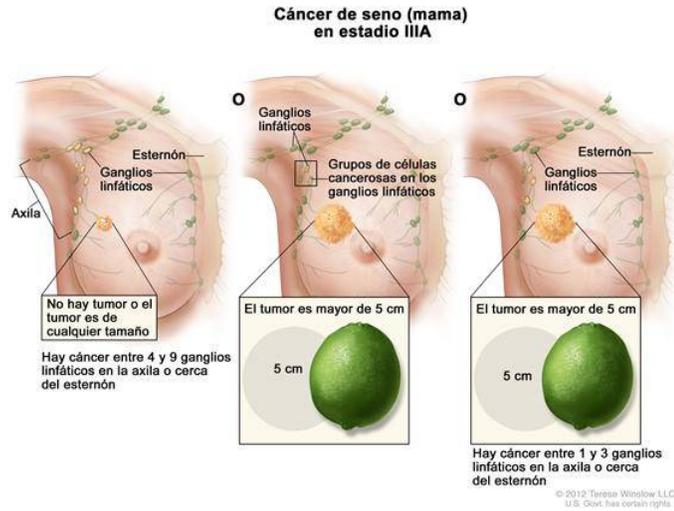


Figura 7. Diagrama de Estadio IIIA de cáncer de mama (Cancer, 2014).

- Estadio IIIB
 - El tumor puede tener cualquier tamaño y se ha diseminado hasta la pared torácica o piel de la mama produciendo inflamación, alcanzando hasta 9 ganglios linfáticos axilares (Figura 8).

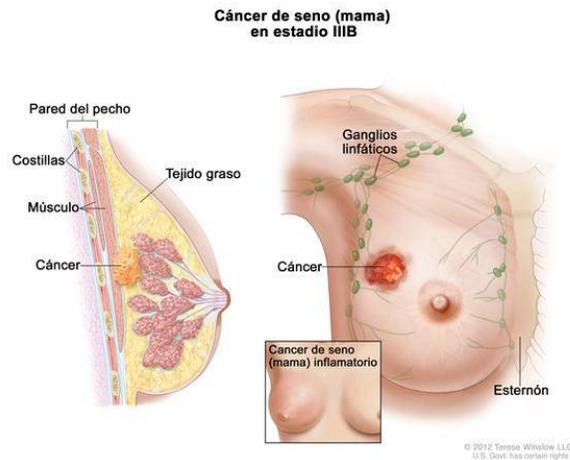


Figura 8. Diagrama de Estadio IIIB de cáncer de mama (Cancer, 2014).

- Estadio IIIC

- El tumor puede tener cualquier tamaño. Además se pudo producir cáncer de mama inflamatorio y haberse diseminado a 10 o más ganglios axilares y cerca del esternón o ganglios cercanos a la clavícula (Figura 9).

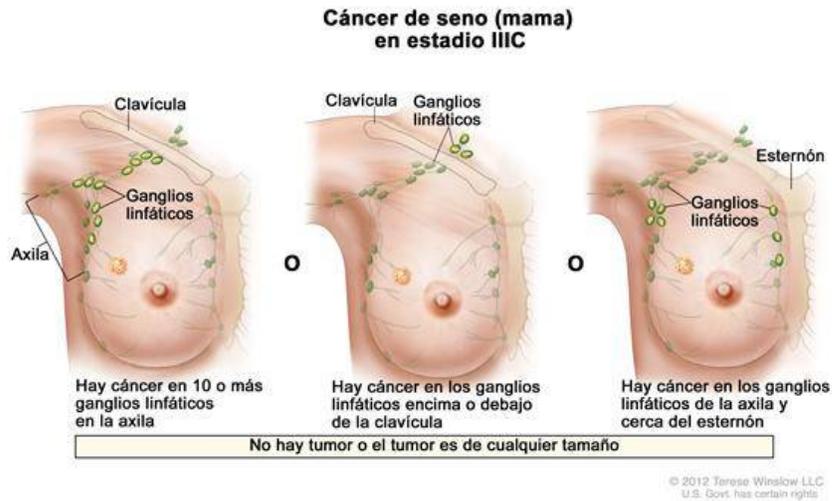


Figura 9. Diagrama de Estadio IIIC de cáncer de mama (Cancer, 2014).

e) Estadio IV

En este estadio, el cáncer presenta metástasis (Figura 10).

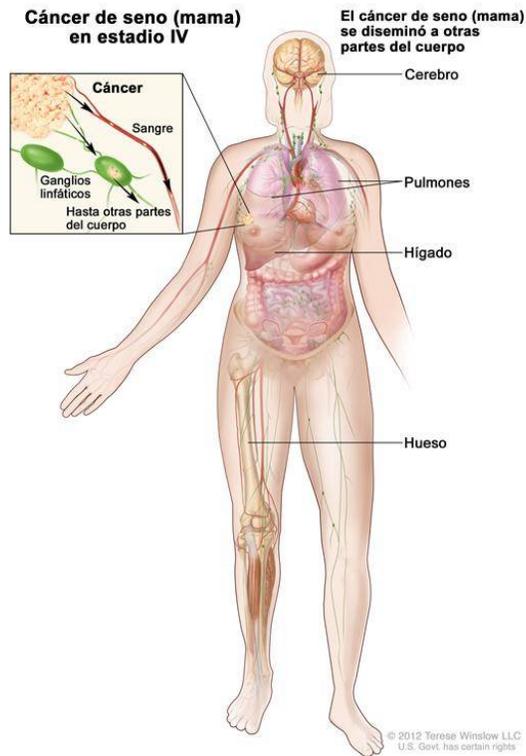


Figura 10. Diagrama del estadio IV de cáncer de mama (Cancer, 2014).

II. Clasificación Molecular

Durante muchas décadas el sistema de clasificación de cáncer de mama estuvo basado únicamente en su descripción histopatológica, sin embargo este tipo de clasificación mostró un impacto limitado en la toma de decisiones terapéuticas, debido a la subjetividad de los criterios tomados al momento de caracterizar cada entidad tumoral.

No fue sino hasta la década pasada, que gracias al proyecto de genoma humano y a los estudios de expresión génica basada en microarreglos, que se observó que el cáncer de mama es un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen características moleculares distintas. De esta forma Perou *et al.* (2000) identificaron inicialmente 4 subtipos: basal,

Her2, luminal y parecido al normal, los cuales mostraron patrones de expresión diferentes. Así mismo, estudios posteriores trajeron como consecuencia la subdivisión de los tumores luminales en luminal A y B (Guiu *et al.*, 2012).

La estratificación actual del cáncer de mama, definida por el perfil de expresión génica obtenida por microarreglos, por sus siglas en inglés, (GEP) y el consenso de expertos en cáncer de mama de St. Gallen en 2011, se basa en parámetros clínicos como: grado histológico, presencia de metástasis a ganglios linfáticos e invasión linfovascular. Así como, por parámetros moleculares como: la expresión de receptores de estrógeno y progesterona, la evaluación del estado de HER2 y el nivel de expresión de la proteína Ki-67 (Tabla 1) (Guiu *et al.*, 2012).

Tabla 1. Modificada de Guiu *et al.* (2012). Subtipos moleculares de cáncer de mama.

Subtipos (GEP)	Clasificación basada en IHC (St. Gallen)	Acuerdo IHC/GEP
Luminal A	'Luminal A' ER y/o PR positivo HER2 negativo Ki-67<14%	73%-100%
Luminal B	'Luminal B'(HER2 negativo) ER y/o PR positivo HER2 negativo Ki-67≥14% 'Luminal B'(HER2 positivo) ER y/o PR positivo Cualquier % de Ki-67 HER2 sobreexpresado	73%-100%
HER2- enriquecido	'HER2 positivo (no luminal)' HER2 sobreexpresado ER y PR ausente	41%-69%
Basal-like	'Triple negativo' ER y PR ausente HER2 negativo	80%

III. Factores de Riesgo

Hasta el momento son múltiples los factores que se han asociado con un incremento o disminución en el riesgo de padecer esta enfermedad. De esta manera, el riesgo de sufrir cáncer de mama se incrementa con la edad, especialmente a partir de los 40 años, y es una enfermedad principalmente de mujeres, alrededor de 100 veces más común en mujeres, debido probablemente a los niveles de estrógenos y progesterona, las cuales promueven el crecimiento celular de las glándulas mamarias (Torres-Mejía, 2011).

Además del género, la raza y etnicidad se ven implicadas en el aumento o disminución del riesgo. De manera general, las mujeres caucásicas presentan una mayor predisposición a desarrollar cáncer de mama, mientras las mujeres de ancestría africana mueren más frecuentemente por esta neoplasia. Por su parte, la población asiática, hispana y Amerindios presentan el menor riesgo de padecer y morir por esta enfermedad (Cáncer, 2014).

Asimismo, una edad de menarca temprana (antes de los 12 años), así como, de menopausia tardía (después de los 55 años) se relaciona con un incremento en el riesgo debido a la presencia de un mayor número de ciclos ovulatorios durante la vida de la mujer, ya que a mayor número de ciclos ovulatorios es mayor la exposición hormonal. Del mismo modo los anticonceptivos basados en terapia hormonal aumentan el riesgo de cáncer en un 2.3% por cada año de uso. Por otra parte, la ausencia de lactancia y paridad se asocia con un incremento al riesgo, al igual que un embarazo a término después de los 35 años. Además una mayor densidad mamaria también aumenta el riesgo, mientras que

otros factores como: el realizar actividad física, así como un peso y dieta saludables se asocian a una disminución en el riesgo (Figura 11) (Torres-Mejía, 2011).



Figura 11. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de mama

El antecedente familiar de cáncer de mama también se ha asociado con un incremento en el riesgo de esta enfermedad de hasta un 80% en mujeres afectadas por este tumor. Si la paciente presenta un familiar de primer grado (madre, hermana o hija), el riesgo se duplica, mientras que si son dos los familiares afectados, el riesgo se triplica. El riesgo se

incrementa cuando el familiar presentó la enfermedad siendo joven y cuando el cáncer es bilateral (Cancer, 2014).

Todo cáncer tiene un componente genético, aunque sólo un 0,1-10%, dependiendo del cáncer, es hereditario. En el caso del cáncer de mama, alrededor del 5-10% es hereditario, es decir, sólo una pequeña proporción es consecuencia de uno o más genes mutados, heredados de los progenitores, mientras que el 95% restante se produce de forma esporádica (Torrades, 2003).

Existen mutaciones en genes específicos que se asocian con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, p.ej. BRCA1 y BRCA2, genes supresores de tumor más frecuentemente mutados en este tipo de cáncer, incrementando el riesgo en 55-65% y 45% de padecer cáncer de mama respectivamente. Además, las mutaciones en estos genes también se asocian al riesgo de padecer cáncer de ovario. También se han encontrado otros alelos de alta penetrancia, pero baja frecuencia (no se encuentran frecuentemente mutados) 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 (Rivera, 2012).

MicroRNAs

Otro factor genético que se ha asociado al desarrollo del cáncer es la expresión específica o modulación en los niveles de microRNAs (miRNAs), los cuales son pequeñas moléculas de RNA no codificante encargadas de regular la expresión génica sobre el mRNA codificante. Estas moléculas fueron descubiertas a inicios de los años noventa por el equipo del Dr. Ambros, al estudiar los estadios del desarrollo embrionario del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Lee, *et al.*, 1993). Basándose en investigaciones anteriores donde se observó que el RNA mensajero de lin-14 era regulado por lin-4 a nivel post-transcripcional, Lee y colaboradores. (1993) obtuvieron la secuencia de lin-4 encontrando que esta transcribía dos RNAs pequeños no codificantes los cuales eran parcialmente complementarios a algunos sitios conservados en la región 3' UTR de lin-14, esto sugería un nuevo mecanismo de silenciamiento traduccional, en el cual un RNA inhibía a un mRNA al unirse a su región 3' UTR.

A pesar de esto, debido a que en ese momento no existía una explicación fehaciente de cómo un mRNA era regulado naturalmente por un RNA anti sentido, se propuso que ese tipo de regulación era particular del nemátodo. Sin embargo, ese mismo año se identificó el primer gen blanco de un miRNA (Wightman *et al.*, 1993) y siete años después se identificó otro RNA regulador en *C. elegans*, let-7, el cual codifica un RNA de 21 nucleótidos y se encarga de controlar la última etapa de desarrollo del nematodo, e igual que lin-4, let-7 es complementario a la región 3' UTR de lin-41 y lin-57 e inhibe su

traducción (Reinhart *et al.*, 2000; Abrahante *et al.*, 2003). Estos tres descubrimientos permitieron la identificación de un nuevo mecanismo de regulación postranscripcional.

Subsecuentemente se identificaron a los homólogos de lin-4 y let-7, lin-28 y lin-41, respectivamente en varios vertebrados, entre ellos, ratones y el humano, lo cual indicó un mecanismo evolutivamente conservado (Guo *et al.*, 2006; Lancman *et al.*, 2005).

I. Biogénesis y función de miRNAs

De acuerdo con la mirBase hasta el momento se han descrito 1,881 secuencias precursoras y 2,588 miRNAs maduros en humanos (mirBase, 2014). Asimismo, hasta el 2008 cerca del 40% de las secuencias de miRNAs, descritas hasta ese año, se encuentran agrupadas en clusters (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Dichas moléculas son transcritas, independientemente si es de manera individual o en clústers, por una polimerasa tipo II como transcritos largos >1Kb denominados pri-miRNA, los cuales pueden contener más de un miRNA maduro en su secuencia. Además, poseen una estructura de tallo-burbuja la cual les permite ser reconocidas posteriormente por las enzimas encargadas de su procesamiento. Una vez sintetizados, los pri-miRNAs son cortados dentro del núcleo por DROSHA y DGCR8, para generar un producto de alrededor de 70 pb o pre-miRNA. Los pre-miRNAs son exportados por medio del complejo XPO5/RAN al citoplasma, donde son cortados nuevamente, en este caso por DICER/TRPB para obtener un miRNA dúplex maduro de aproximadamente 19-22 pb, donde los primeros 5 a 6 nucleótidos constituyen

la región semilla del miRNA (Figura 12) (Ying *et al.*, 2008, Filipowics *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2010).

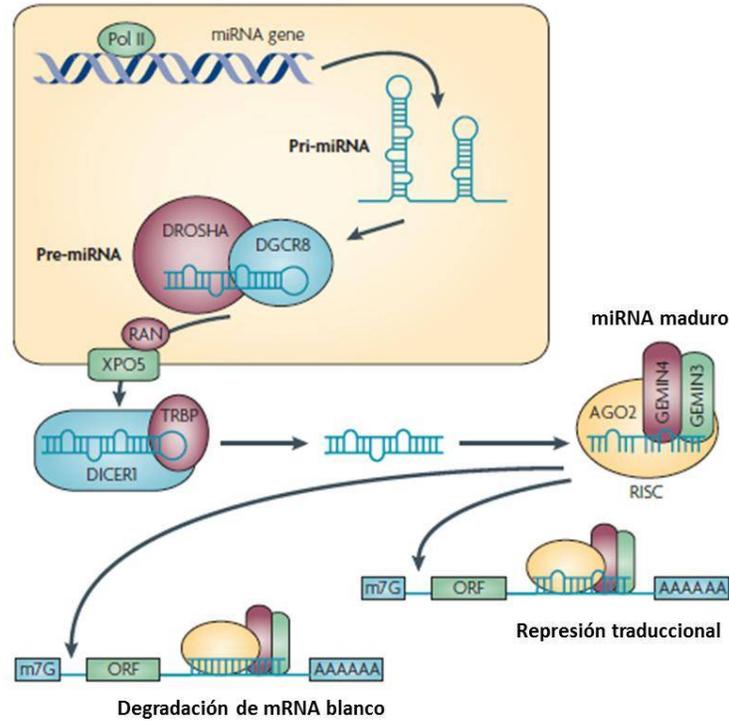


Figura 12. Biogénesis de miRNAs (Tomado y modificado de Ryan *et al.*, 2010)

Una vez obtenido el miRNA maduro, la cadena líder o guía es seleccionada por las proteínas argonautas, (en general la cadena con el extremo 5', localizada en la región menos estable termodinámicamente, es la elegida), y es cargada en el complejo de silenciamiento RISC. Por su parte, la cadena complementaria o cadena "estrella" normalmente es degradada, sin embargo en algunas patologías esto no ocurre y es funcional, al ser cargada en el complejo RISC (Filipowics *et al.*, 2005; Jazdzewski *et al.*, 2009).

Después de la formación de un complejo RISC activo o “miRISC”, este se encarga de reprimir la traducción de sus mensajeros blanco mediante su unión a la región 3' UTR de estos, y de acuerdo al grado de complementariedad que exista entre el complejo miRISC y el mRNA se pueden llevar a cabo la represión traduccional o la degradación del mRNA (Le Quesne & Caldas, 2010).

La degradación del mRNA se presenta cuando la complementariedad entre éste y el complejo miRISC es perfecta, dicho efecto solo se ha visto en plantas, por su parte en animales, la complementariedad es perfecta solo en la región semilla, mientras que en el resto de la secuencia se presenta un alineamiento incompleto, lo cual provoca la represión de la traducción y no la degradación del mensajero. Ambos mecanismos se llevan a cabo en los cuerpos P, sin embargo existe evidencia que sugiere que aquellos mensajeros que solo han sido reprimidos traduccionalmente pueden ser almacenados en estos cuerpos y ser liberados para su traducción en condiciones de estrés celular (Jakymiw *et al.*, 2007; Kulkarni *et al.*, 2010).

II. miRNAs y cáncer de mama

La proliferación y apoptosis celular son procesos celulares finamente regulados para mantener la homeostasis tisular, ya que de lo contrario puede haber una proliferación descontrolada, rompiendo dicha homeostasis y resultando, frecuentemente, en el desarrollo de cáncer (Staton & Giraldez, 2008). La mayoría de la investigación en cáncer,

se ha enfocado en el estudio de proteínas, oncogenes y genes supresores de tumor, sin embargo durante los últimos años, esta tendencia se ha modificado y se ha prestado atención a los miRNAs (O'Donnell & Mendell, 2007).

En diversos trabajos se ha demostrado que una desregulación en la expresión de miRNAs está asociada con el desarrollo de cáncer de mama. Las primeras evidencias fueron obtenidas por Iorio y colaboradores (2005), quienes realizaron el perfil de expresión de miRNAs de carcinomas mamarios, encontrando que 29 miRNAs se expresaban en tumores y no en controles, y de estos, 15 presentaban un patrón totalmente diferente entre ambos tejidos, donde miR-21 y miR-155 se encontraban en niveles altos, mientras que miR-10b, miR-125b y miR-145 se encontraban subexpresados (Iorio, *et al.*, 2005).

De la misma forma, se ha reportado la participación de miRNAs en las diferentes etapas de cáncer de mama: iniciación, promoción y progresión. Algunos miRNAs han sido relacionados con los procesos de apoptosis o regulación del ciclo celular, otros en la regulación de la transición epitelio-mesénquima (EMT) o en metástasis (Trimboli *et al.*, 2008; Vincent-Salomon *et al.*, 2003). Por ejemplo en otros tipos de cáncer, se ha encontrado a let-7 (quien se encarga de regular a RAS, gen involucrado en el proceso de proliferación celular) subexpresado en muestras de cáncer de pulmón y altos niveles de RAS (Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Al contrario, miR-21 se encuentra sobreexpresado en glioblastomas al inhibir a varios genes involucrados en las vías de inducción de apoptosis, como la vía de las caspasas (Chan *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha observado que miR-9-3 se encuentra a la baja en tumores mamarios con alta invasión vascular o presencia de nodos linfáticos, sugiriendo, que la subexpresión de este miRNA es inducida durante la progresión de la enfermedad, en particular durante la adquisición del potencial metastásico (Iorio *et al.*, 2005).

De esta manera, en la actualidad a los miRNAs involucrados en un proceso carcinogénico se denominan "Oncomirs", pudiendo desempeñar un rol como oncogenes o supresores de tumor (Esquela-Kerscher & Slack, 2006) (Figura 13). Además, se ha reportado que cerca del 50 % de los genes de miRNA humanos, registrados hasta el momento, se encuentran en sitios frágiles o zonas del genoma asociadas a cáncer (Ryan *et al.*, 2010).

III. miRNAs y SNPs

Se estima que el código genético de la población humana, es idéntica en un 99%, mientras que el 1% restante corresponde a la variabilidad del mismo, de la cual, la mayor parte es debida a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). De acuerdo con los datos del Consorcio del Proyecto de Genoma Humano, hasta el 2012 se habían identificado 38 millones de SNPs (1000 Genomes Project Consortium, 2012) presentándose en promedio, cada 100 a 300 pares de bases (dbSNP, 2014). Si bien muchos SNPs no tienen una función aparente, estudios epidemiológicos han establecido un enlace entre estas variaciones genéticas, interacciones ambientales y el riesgo al desarrollo de cáncer (Ryan *et al.*, 2010).

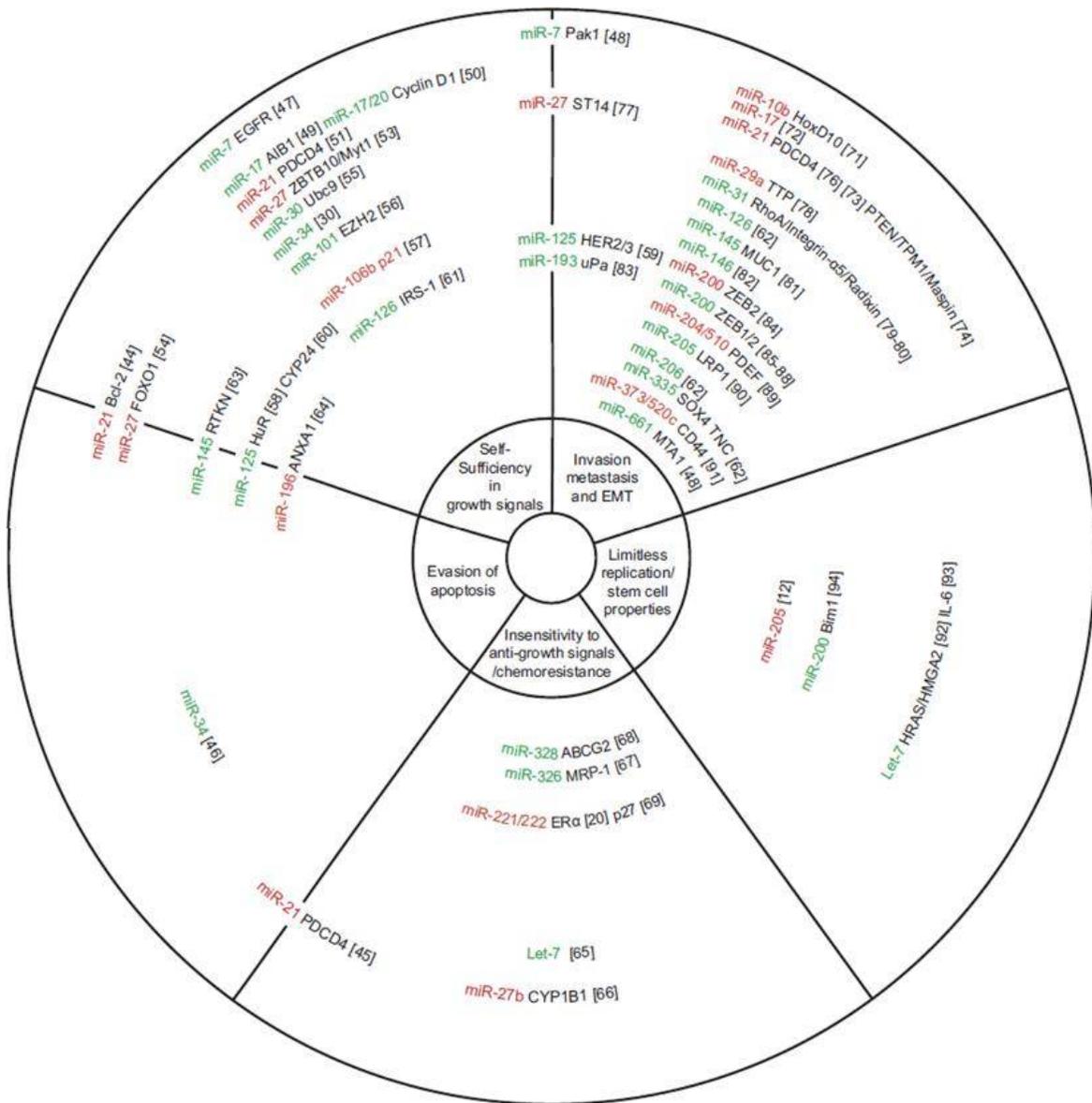


Figura 13. miRNAs asociados a algunas de las características biológicas del cáncer. miRNAs en rojo: miRNAs asociados con una actividad tumoral, miRNAs en verde: miRNAs asociados con una actividad supresora de tumor. Genes blanco en negro corroborados experimentalmente (Modificado de Le Quesne & Caldas, 2010).

Tradicionalmente, un SNP está definido en base a su frecuencia, de tal forma que un SNP es una variación genética que se encuentra presente en al menos el 1% de la población, mientras que aquellas variantes encontrada en menos del 1% de la población y con consecuencias evidentes se considera una mutación.

Cabe señalar además que un SNP no conduce a alguna enfermedad como tal, sino que solo brinda una susceptibilidad a dicha patología. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que una fracción considerable de SNP, afecta las propiedades intrínsecas y la función de proteínas. Además, a pesar de que el efecto de un SNP individual es pequeño, el efecto funcional de la combinación de varios SNPs puede ser significativo y contribuir al incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama. Dicha interacción puede conocerse en base a dos modelos de predicción de la interacción entre SNPs el modelo sinérgico o aditivo y el modelo no aditivo (Onay *et al.*, 2006; Curk *et al.*, 2011). Ambos modelos, como indican sus nombres, calculan la probabilidad de que exista o no una interacción entre dos o más SNPs relevantes para la enfermedad.

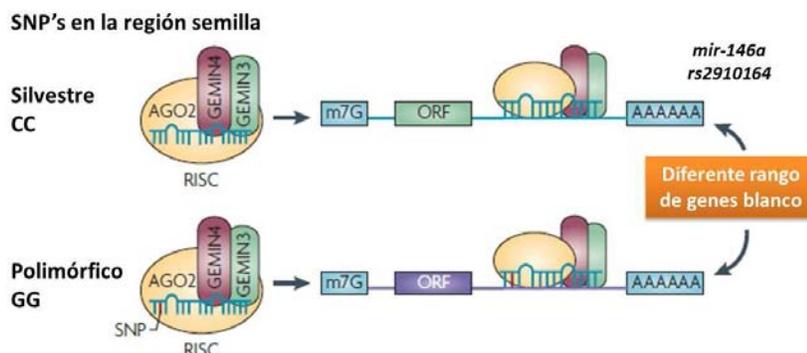
A pesar de la evidencia existente acerca de la relación entre miRNAs y el desarrollo de cáncer, poco se sabe acerca de los mecanismos que llevan a la sub-expresión o sobre-expresión de los miRNAs en tejido o glándula mamaria con cáncer. Recientemente, se ha descrito que los SNPs presentes en los genes de miRNAs (miR-SNPs) podrían constituir un factor de predisposición a desarrollar y/o promover cáncer, ya que pueden afectar la función de los miRNAs al modular su transcripción, procesamiento y maduración. Dichas

consecuencias dependen del sitio en el cual se encuentre el polimorfismo. Estos pueden estar presentes en la secuencia de los miRNAs, en las regiones blanco de estos o en los genes de la biosíntesis de miRNAs.

a. SNPs en los genes del miRNA

La presencia de SNPs en las regiones codificantes de miRNAs son raros y más aún en la región semilla de los mismos (Figura 14), sin embargo en caso de estar presente, pueden afectar su función de tres maneras: a través de la transcripción del transcrito primario, a través del procesamiento de los precursores y a través de la alteración en la interacción miRNA-mRNA.

Por ejemplo, el polimorfismo rs11614913 en el pre-mir-196a-2 se ha asociado con un incremento al riesgo a desarrollar cáncer de mama en población china, mientras que la variante rs2910164 en miR-146a, se relacionó con el desarrollo de cáncer de mama a una edad más temprana (Hoffman *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009) (Figura 14). Al contrario el SNP rs895819 confiere una reducción en el riesgo de padecer esta neoplasia (Yang *et al.*, 2009).



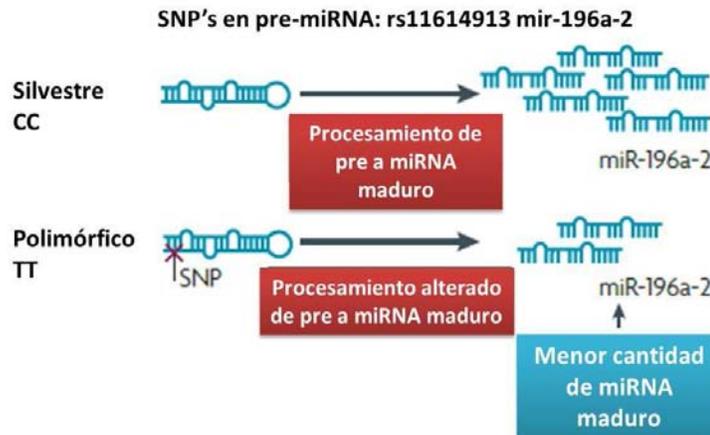


Figura 14. Representación de SNPs en región semilla de un miRNA maduro y en la secuencia de un pre-miRNA (Tomado y modificado de Ryan *et al.*, 2010)

b. SNPs en los genes de sitios blanco de miRNAs

El potencial de un SNP para afectar el fenotipo, ha sido comprobado gracias a la infinidad de enfermedades que se han asociado con ellos. De manera similar a lo que ocurre cuando se presenta un polimorfismo en la región semilla de un miRNA, un SNP en la región 3' UTR de unión, genera un nuevo sitio de unión para miRNAs que en condiciones normales no regularían a dicho mensajero, o bien, destruye el sitio de unión para el o los miRNAs encargados de su regulación (Figura 15). Se ha calculado hasta el 2010, que de 120,000 SNPs reportados en regiones 3' UTR, alrededor del 17% eliminan sitios de unión, mientras que 8.6% crean nuevos sitios de unión (Ryan *et al.*, 2010).

Sin embargo, no basta la presencia de un SNP, para considerarlo funcional, debe demostrarse que está asociado con la enfermedad, que el miRNA como su blanco son

expresados por el tejido afectado y que los cambios alélicos deben tener como consecuencia una unión diferencial del miRNA y por consiguiente afectar la expresión de su gen blanco (Ryan *et al.*, 2010).

Por ejemplo, se ha reportado que el polimorfismo rs1434536 localizado en la región 3' UTR del gen BMPR1B altera la interacción entre miR-125b y BMPR1B y por tanto su regulación, lo cual señala a esta regulación alelo-específica por parte de miR-125b como la responsable del incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama (Saetrom *et al.*, 2009).

Así mismo se ha reportado que el polimorfismo rs2747648 de la región 3' UTR del gen del receptor de estrógeno (ESR1) está asociado con la reducción del riesgo de padecer cáncer de mama, debido a que cuando está presente el alelo C (alelo mayor), induce la unión de miR-453 a ESR1 y por lo tanto disminuye la expresión de este (Tchatchou *et al.*, 2009).

Además existe evidencia de que otro SNP (rs93410170) en este mismo receptor promueve la unión de miR-206 disminuyendo también los niveles de expresión de ESR1, por esto se ha propuesto que los hispanos presentan una menor incidencia de esta neoplasia con respecto a población Europea debido a una mayor prevalencia del alelo T (Adams *et al.*, 2007).

Aunado a esto, varios grupos de investigación han mostrado que los miRNAs no solo son capaces de unirse a las regiones 3' UTR, sino también, aunque en menor proporción, a regiones 5' UTR (Sunkar *et al.*, 2004) y a regiones codificantes (Tay *et al.*, 2008). Por ejemplo, miR-10a se une a la región 5' UTR del mRNA que codifica para

proteínas ribosomales incrementando su traducción (Andersson *et al.*, 2008), mientras que miR-148 regula la expresión del mRNA de la proteína DNMT3B a través de su unión a sitios conservados dentro de la secuencia codificante de la proteína (Duursma *et al.*, 2008). Estos trabajos sugieren que la búsqueda de miRNAs que regulan a genes de susceptibilidad a enfermedades debe de ser ampliada incluyendo tanto a las regiones 5' UTR como a regiones codificantes.

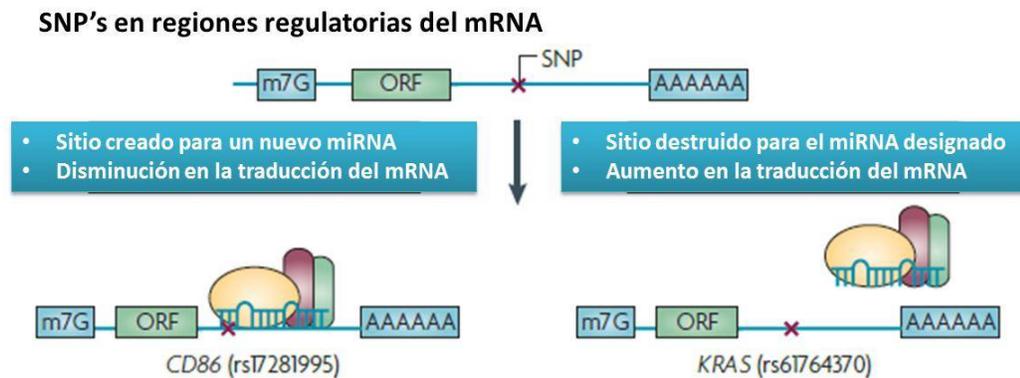


Figura 15. Representación de SNPs en las regiones blanco de miRNAs (Tomado y modificado de Ryan *et al.*, 2010)

c. SNPs en la maquinaria de procesamiento

Datos recientes sugieren que los polimorfismos pueden presentarse además, en las proteínas de la maquinaria del procesamiento de los miRNAs, y que estos pueden estar relacionados con el riesgo de padecer cáncer, así como la respuesta a fármacos (Figura 16) (Ryan *et al.*, 2010).

Por ejemplo, bajos niveles de DROSHA, se han asociado con una baja supervivencia, sin embargo la presencia de SNPs en esta enzima y su pareja DGCR8 no predispone al portador a padecer cáncer (Ye *et al.*, 2008). En contraste el complejo XPO5/RAN (encargado de la exportación nuclear) se ha asociado con el riesgo de padecer cáncer debido al polimorfismo rs14035 presente en RAN, el cual de acuerdo a las bases de datos, se encuentra en el sitio de unión de miR-575 lo cual altera su función, además de crear un sitio de unión para miR-182 (Ryan *et al.*, 2010).

Por otra parte, el polimorfismo rs3742330 presente en la región 3' UTR de DICER se ha asociado con un incremento en el riesgo de lesiones orales pre-malignas en individuos con leucoplasia y eritroplasia (Clague *et al.*, 2009). Mientras que en TRBP (TAR RNA binding Protein, por sus siglas en inglés) se han identificado dos corrimientos del marco de lectura, los cuales resultan en codones de paro prematuros, por lo que la proteína se subexpresa, además de afectar la expresión de DICER y por tanto una disminución en la producción de miRNAs, lo cual se asocia con altos niveles de proliferación celular (Melo *et al.*, 2009).

Así mismo, los componentes del complejo RISC también presentan variantes asociadas a cáncer. Por ejemplo, la variante rs197412 de la proteína GEMIN3 se ha asociado con un bajo riesgo de presentar lesiones orales pre-malignas, en contraste el polimorfismo rs197414 se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de esofaríngeo y de vejiga (Yang *et al.*, 2008). Mientras que los polimorfismos rs2740348 y rs7813 de la proteína GEMIN4, se han asociado con un factor protector a padecer carcinoma renal (Horikawa *et al.*, 2008).

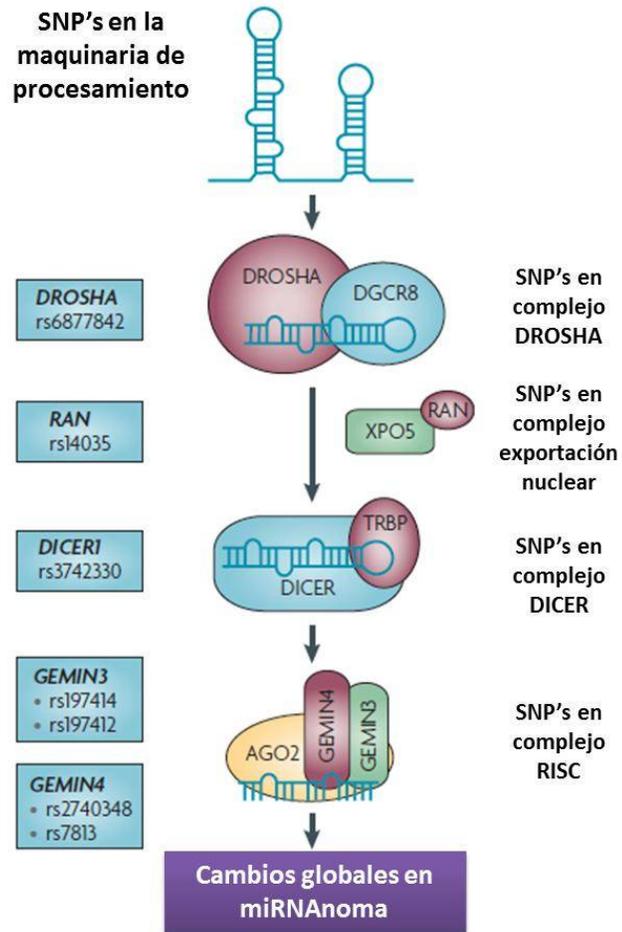


Figura 16. Representación de SNPs en la maquinaria de procesamiento de miRNAs (Tomado y modificado de Ryan *et al.*, 2010)

4. JUSTIFICACIÓN

En 2011, los principales tumores malignos detectados en la población mexicana (principalmente en estados industrializados) fueron: cervico-uterino y próstata (21.9%), de mama (18.9%) y de estómago y colorectal (18%) (INEGI, 2013). Entre los varones, la principal causa de morbilidad es por tumores malignos de estómago y colorectal (24%); en tejido linfático, de los órganos hematopoyéticos (19%) y de próstata (18%) (INEGI, 2013). Si bien el cáncer de mama no se ubica entre los principales para los varones, su incidencia es del 2%.

Mientras en las mujeres, la morbilidad por neoplasias es más alta debido principalmente al cáncer de mama (30%), seguido por el cáncer cervico-uterino (24%) y de estómago y colorectal (14%) (INEGI, 2013).

Por otra parte, el nivel de expresión de miRNAs y su unión con su secuencia blanco pueden estar afectados por SNPs. Algunos de estos cambios se han asociado con la tumorigenicidad en cáncer de mama en mujeres de diferentes países, sin embargo en pacientes Mexicanas no se han explorado estos cambios.

Por tanto, gracias a la identificación de marcadores moleculares genéticos de susceptibilidad como los SNPs, la caracterización genética y la interacción de dichos genes con el ambiente, puede ser posible reducir la mortalidad provocada por el cáncer, a través de diagnósticos oportunos y terapia personalizada.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar variantes genéticas de tipo SNPs relacionados con el desarrollo de cáncer de mama en 6 miRNAs y 3 sitios blancos en pacientes mexicanas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar en pacientes mexicanas SNPs en mir27a.
2. Identificar en líneas celulares SNPs en mir27a y analizar si hay correlación con su nivel de expresión y fenotipo tumoral.
3. Identificar polimorfismos en 5 miRNAs (miRNA 499, miR196, miRNA146a, miRNA125b, miRNA12 en pacientes mexicanas).
4. Identificar polimorfismos en tres regiones UTR del mRNA que unen miRNAs (SET8, ESR1, BMPR1B) en pacientes mexicanas.

6. ANTECEDENTES

Recientemente, en un grupo piloto de pacientes mexicanas se encontraron 9 variantes genéticas tipo SNP distribuidas en 6 miRNAS y 3 regiones 3'UTR relacionadas con la predisposición a cáncer de mama en otras poblaciones. Así mismo de estas 9 variantes aparentemente tres no se encuentran reportadas en la literatura (Méndez, 2014).

Como se mencionó, existen varias publicaciones en otras poblaciones donde se ha encontrado que varios SNPs en miRNAs o sitios blanco de estos, están asociados a cáncer de mama, en la tabla 2 se mencionan los más relevantes.

Tabla 2. SNPs localizados en miRNAs o regiones 3'UTR reportados en diferentes poblaciones como asociados a cáncer de mama

Autores (Año)	miRNA/ mRNA	Observaciones	Población	Casos/ Controles
Hu <i>et al.</i> (2008)	miR-196a2 miR-499	Los fenotipos hsa-mir-196a2 rs11614913:T-C y hsa-mir-499 rs3746444:A-G, están asociados a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama	Asiática	1029/1129
Shen <i>et al.</i> (2008)	miR-146	Pacientes con la variante rs2910164, producen grandes cantidades de miR-146 y las predisponen a desarrollar cáncer familiar de mama y ovario a una edad más temprana.	Caucásica Afroamericana	42/82
Tchatchou <i>et al.</i> (2008)	miR-453 3' UTR ESR1	La variante rs2747648 en el receptor de estrógeno (ESR1) reduce la unión de miR-453, en contraste con la "wild type", induciendo una mayor producción de la proteína ESR1 lo que incrementa el riesgo a padecer cáncer de mama.	Caucásica	1223/1495
Saetrom <i>et al.</i> (2009)	miR-125b 3' UTR BMRP1	La variante rs1434536 en la región 3' UTR del gen BMRP1, es regulada diferencialmente por miR-125b, lo cual conduce al desarrollo de cáncer de mama	Caucásica	459/1142

Hoffman <i>et al.</i> (2009)	miR-196a-2	miRNA 196a-2 tiene un rol oncogénico ya que esta asociado a un decremento en el riesgo de padecer cáncer de mama, al hipermetilar las islas CpG de su promotor.	Caucásica	441/479
Li <i>et al.</i> (2009)	miR-125a	Variante de miR-125 (T>G)a está asociada con el desarrollo de cáncer de mama al subexpresarse algunos de sus genes blanco como ERBB2 y ERBB3.	Caucásica	72/869
Song <i>et al.</i> (2009)	miR-502 3' UTR SET8	La presencia de un SNP en el sitio de unión de miR-502 a SET8 modula la expresión de este último y contribuye al desarrollo de cáncer de mama a una edad más temprana.	Asiática	1110/1097
Yang <i>et al.</i> (2009)	miR-27a	SNP rs895819, localizado en la parte terminal del loop del pre-miRNA-27a, mostraba un efecto protector a desarrollar cáncer de mama en comparación con el "wild type"	Caucásica	1217/1422
Méndez (2012)	miR-27a miR-125a 3' UTR BMRP1 miR-146 miR-196a-2 miR-499 3' UTR ER 3' UTR SET8	Se identificaron nueve SNPs así como tres variantes no reportadas distribuidas en 6 miRNAs y 3' UTR.	Hispana	30/30

7. METODOLOGÍA

- **Obtención de muestras biológicas**

Se obtuvieron 100 muestras de DNA de tejido tumoral de mama proporcionadas por el Dr. Javier Torres, Jefe de la Unidad de Infectómica y Parasitología del Hospital de Pediatría, Centro Medico SXXI. Dichas muestras pertenecen a mujeres mexicanas, es decir mujeres con al menos tres generaciones previas residiendo en el país, con una edad igual o mayor a 45 años, y un diagnóstico clínico de cáncer de mama esporádico en cualquier estadio.

Como control se utilizaron 100 muestras de sangre periférica de mujeres sanas proporcionadas por la Dra. Lourdes Basurto y la Dra. Sara Vega, de la Unidad de Investigación Médica en Endocrinología del Hospital de Especialidades de Centro Médico SXXI. Todas las muestras pertenecen a mujeres mexicanas con una edad mayor o igual a 45 años y sin diagnóstico o antecedentes de cáncer de mama.

- **Evaluación de la concentración y pureza del ADN**

La cuantificación de la concentración y pureza de las muestras se realizó empleando el equipo nanodrop. Se colocó 1 μl de muestra y se observó un pico de absorbancia (260 nm), que corresponde a la concentración de material genético ($\text{ng}/\mu\text{l}$) y en cuanto a la pureza, esta corresponde al cociente 260/280, siendo la óptima de 1.8 para el DNA.

Por otra parte, la integridad de las muestras se observó por medio de corrimientos electroforéticos en geles de agarosa preparados al 1% en amortiguador TBE 1x. En los

pozos se colocaron 2 µl de muestra producto de la extracción con 2 µl de SYBR Gold y 2 µl de buffer de muestra. La electroforesis se realizó durante 1 hora, aplicando una corriente de 90 volts y 40-50 mA con el propósito de obtener una separación apropiada. Después de la electroforesis el gel se observó a través de un transiluminador de UV para verificar que el corrimiento fue adecuado (Sambrook *et al.*, 1989).

- **Diseño de iniciadores y PCR punto final**

Se diseñaron un par de iniciadores para el miR-196a-2 y la región 3'UTR de BMPR1B, así como el oligonucleótido forward de miR-499 y el reverse de miR-196a-2-ii. Este diseño se llevó a cabo con el programa primer3, posteriormente se obtuvo la secuencia de cada miRNA de la miRBase, NCBI y ENSEMBL, donde se ubicaron las secuencias de los primer diseñados y se verificó que correspondieran ambas secuencias, para finalmente realizar un BLAST y verificar la especificidad de los oligonucleótidos para la región de estudio. En cuanto a los oligonucleótidos de los demás miRNAs y regiones 3'UTR estos fueron tomados de la literatura.

Posteriormente, se realizó una reacción de PCR punto final empleando las muestras de DNA para amplificar la región donde se encuentra el polimorfismo correspondiente a cada miRNA o región 3' UTR. Las condiciones de amplificación para cada miRNA fueron tomadas de la literatura (Hoffman *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Tchatchou *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Méndez, 2012).

- **Purificación y secuenciación de productos de PCR**

Una vez obtenidos los amplicones para cada gen blanco, tanto miRNA como región 3'UTR, estos fueron verificados por medio de electroforesis en gel de agarosa. Una vez confirmada una correcta amplificación, los amplicones fueron purificados por medio de las columnas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, con el fin de eliminar cualquier remanente de la reacción de PCR.

La concentración y calidad de los productos purificados se determinó por medio del equipo nanodrop y electroforesis en gel de agarosa al 3%.

Las muestras fueron secuenciadas en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por medio de electroforesis capilar en el equipo 3130xl Genetic analyzer de 16 capilares (Applied Biosystems).

- **Presencia de SNPs en el clúster mir23a-mir27a-mir24-2 en líneas celulares de mama**

Por otra parte, se realizó un screening de diferentes líneas celulares, dos líneas celulares tumorales MCF-7 (adenocarcinoma, receptor positivo para RE) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma, receptor negativo) y dos líneas inmortalizadas no tumorales MCF10A (células epiteliales de mama) y HMEC (células mamarias epiteliales) con el fin de evaluar si existen polimorfismos propios de las células en el cluster mir23a-mir27a-mir24-2 y así poder especular sobre un posible efecto aditivo entre SNPs. Para esto, se extrajo DNA y

RNA de las diferentes líneas celulares por medio de los métodos de fenol-cloroformo y Trizol, respectivamente, y de acuerdo a los protocolos establecidos previamente (Sambrook, *et al.* 1989; Chomczynski, 1993). Dicho DNA se empleó en una PCR en punto final, todas las reacciones fueron llevadas a cabo de acuerdo a las condiciones establecidas previamente.

- **Expresión Relativa de miR-27a en líneas celulares de mama**

Así mismo, se realizaron ensayos de RT-PCR mediante el kit miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) para cuantificar la expresión relativa de miR-27a en las cuatro líneas celulares ya mencionadas. Para esto se sintetizó cDNA a partir del RNA extraído previamente empleando el kit miScript® II RT Kit (Qiagen). Se realizaron tres replicas independientes por duplicado en cada línea celular. Se empleó la amplificación del RNA nuclear pequeño, RNU6 (Qiagen) como miRNA endógeno nuclear. La expresión relativa de miR-27a fue calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

8. RESULTADOS

- **Muestras experimentales.**

Se colectaron 100 muestras de DNA de sangre periférica de mujeres mexicanas sanas sin diagnóstico de cáncer, así como tampoco antecedentes familiares de cáncer de mama. Además se obtuvieron 100 muestras de DNA de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama. Tanto muestras control como tumorales pertenecen a mujeres con una edad igual o mayor a 45 años, provenientes de tres hospitales del área metropolitana de la Ciudad de México, el Hospital de Oncología de Centro Médico Siglo XXI, el Instituto Nacional de Cancerología y la Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

- **Determinación de la integridad y concentración de DNA.**

De las muestras de DNA control, cuantificamos la concentración e integridad de 13 muestras tomadas al azar, mediante un muestreo aleatorio simple (Figura 17, Tabla 3), para corroborar que su almacenamiento previo fue adecuado y se encontraban en condiciones de experimentación. De esta manera se observó que se encontraban integras y presentaban una concentración promedio de 25 ng/ μ l. Por otra parte, a las muestras tumorales no se les realizó corrimiento electroforético, debido a la cantidad reducida de muestra que nos fue proporcionada. Así mismo el resto de las muestras, tanto tumorales como control, fueron cuantificadas (Anexo I)

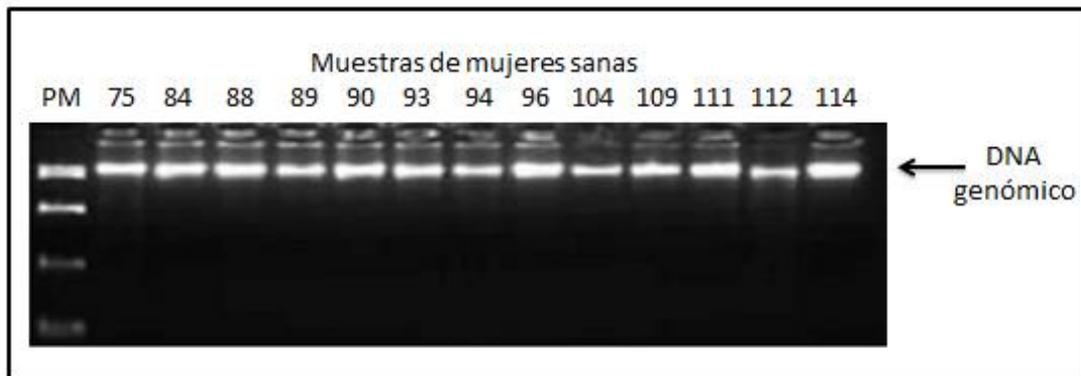


Figura 17. Muestras de DNA de mujeres mexicanas sanas. PM 100 pb.

Tabla 3. Cuantificación de 13 muestras control tomadas al azar.

Muestra	Concentración (ng/μl)	$\lambda=260/280$
75	27.4	1.9
84	30.4	2.02
88	34.2	1.92
89	27.1	1.94
90	23.4	2.01
93	28	1.96
94	26.3	1.92
96	38.1	1.91
104	17.6	1.98
109	24.6	1.99
111	33.2	1.91
112	25.9	1.97
114	27	2.1

- **Amplificación de regiones específicas de miRNAs**

Una vez diseñados los primers y establecidas las condiciones de amplificación para cada uno de los miRNAs y sitios blanco objetos de nuestro estudio (Tablas 4, 5, 6 y 7), se realizó una reacción de PCR en punto final, en gradiente de temperatura con el cual se amplificaron, las regiones de interés, sin embargo debido a resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo, donde se observaron SNPs no reportados en la literatura en las secuencias de miR-27a y miR-196a-2-ii, se amplificaron las 9 regiones de interés en 60 y 46 muestras control y tumorales, respectivamente, mientras que de las 40 y 54 restantes solo se amplificaron las regiones correspondientes a miR27a y miR196a-2-ii (Figura 18).

Tabla 4. Iniciadores empleados para amplificar 5 miRNAs y 2 sitios blanco, relacionados a cáncer de mama. * En el caso de mir196a-2-ii se diseñó solo el reverse, mientras que para mir499, solo el primer forward.

miRNA/ 3'UTR	Iniciadores	Referencia
mir27a	5' ATCACATTGCCAGGGATTTC 3' 5' ACCCCTGTTCTGCTGAACT 3'	Pre-miR-27a loop (Yang, <i>et al.</i> 2009)
mir125a	5' AATGTCTCTGTGCCTATCTCCATCT 3' 5' AACCTCACCTGTGACCCTG 3'	miR maduro (Li, <i>et al.</i> 2009)
mir146a	5' CCGATGTGTATCCTCAGCTTTG 3' 5' GCCTGAGACTCTGCCTTCTG 3'	Pre-miR-146a (Shen, <i>et al.</i> 2008)
mir196a-2-ii	5' CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA 3' 5' CGAAAACCGACTGATGTAACCTCAG 3'	miR maduro* (Hoffman, <i>et al.</i> 2008)
mir499	5' GATGTTTAACTCCTCTCCACGTGAAC 3' 5' CAAAGTCTTCACTTCCCTGCCA 3'	miR maduro* (Hu, <i>et al.</i> 2009)
ESR1	5' CCACAGTAGACAAAATAGCACTAATCCA 3'	3'UTR ER

	5' TCCTTTTCAGGCATAATCTTTGCTACA 3'	(Tchatchou, <i>et al.</i> 2009)
SET8	5' GGCCTCACGACGGTGCTAC 3'	3'UTR SET8
	5' GTTCCCCAGGAGGATGCTTAC 3'	(Song, <i>et al.</i> 2009)

Tabla 5. Iniciadores diseñados para amplificar un miRNA y una región blanco

miRNA / 3'UTR	Iniciadores
BMPR1B	5' GTGGGCAGAGCAAAAAGACAT 3' 5' CGGTTTCTCCGTCCTACAAA 3'
mir-196a-2	5'GGGGCTGAATTTCTTCCTTC 3' 5'GGAGGGTAGGAGTGGGAGAG 3'

Tabla 6. Condiciones de amplificación para PCR en punto final

Proceso	Temperatura (°C)	Duración
Desnaturalización previa	95	10 min
Desnaturalización	95	1 min
Alineación	58 - 68	1 min
Extensión	72	1.15 min
Extensión final	72	10 min
Conservación	4	-----

Tabla 7. Temperatura promedio (T_m) de los iniciadores empleados en este trabajo, así como el tamaño esperado de cada amplicon.

miRNA	T_m (°C)	Producto de PCR
miR-27a	60.5	331 pb
miR-125a	60	132 pb
miR-125b---BMPR1B	60	168 pb
miR-146a	61	192 pb
miR-196a-2	60	110 pb
miR-196a-2 (ii)	66	149 pb
miR-499	63.5	146 pb
miR-453---ESR1	64	93 pb
miR-502---SET8	63	308 pb

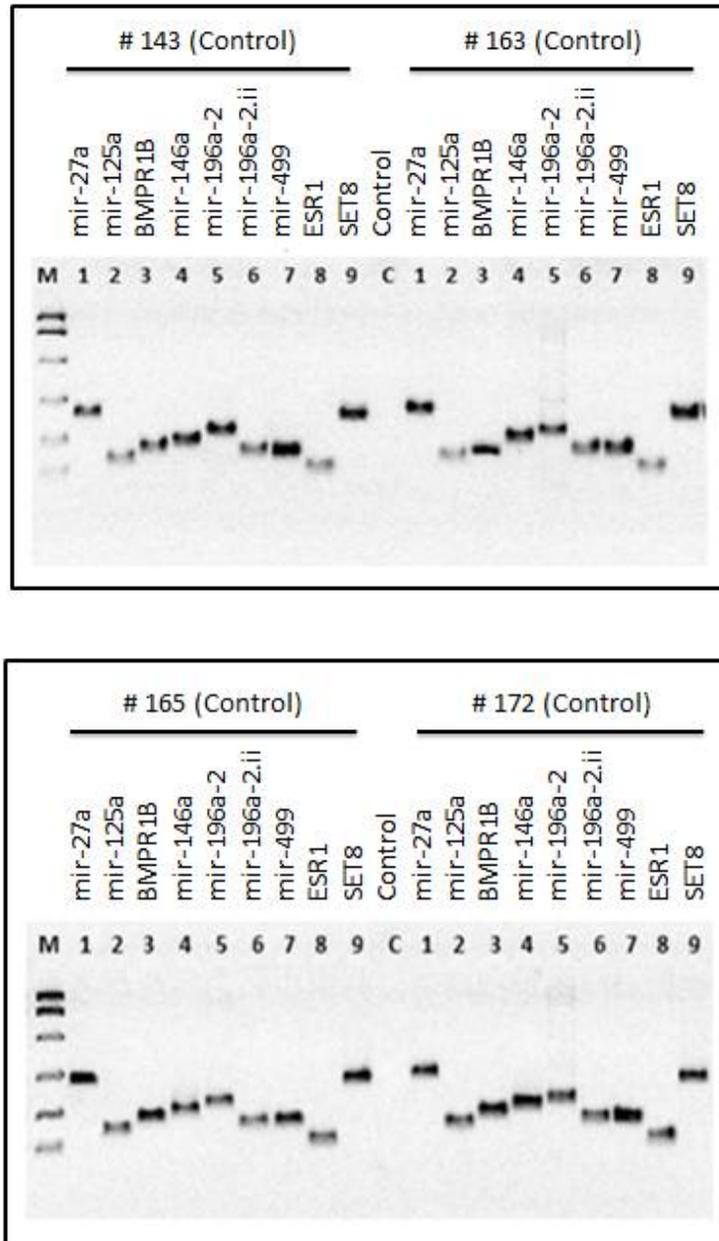


Figura 18. Patrón de los 6 miRNAs y 3 regiones UTR estudiados, de las muestras 143, 163, 165 y 172 en gel de agarosa al 1%. Control = control negativo de reacción. M = Marcador de peso molecular de 100 pb.

- **Purificación de productos de PCR.**

Una vez obtenidos los amplicones para cada muestra, estos se purificaron con el fin de eliminar remanentes de los elementos de la PCR y de esta manera obtener un producto con la calidad necesaria para su secuenciación (Figura 19 y 20). Dicho procedimiento se realizó únicamente en los productos correspondientes a mir-27a y mir-196a-2-ii, debido a los resultados obtenidos en el estudio piloto descrito anteriormente.

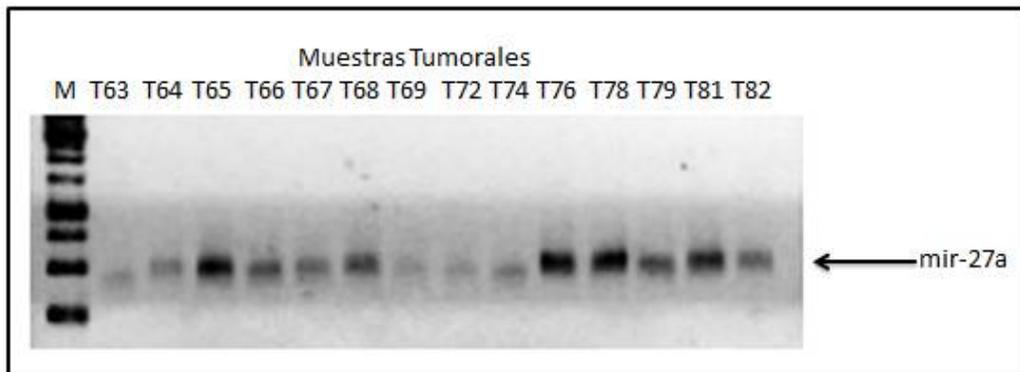


Figura 19. Purificados de DNA de mir27a de diferentes muestras tumorales, en gel de agarosa al 1%. M = Marcador de peso molecular de 100 pb.

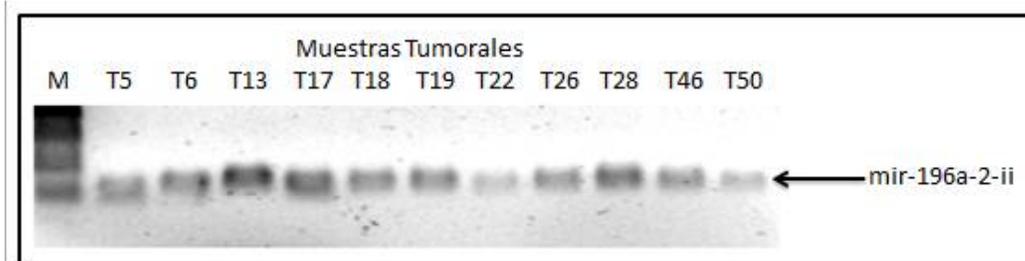


Figura 20. Purificados de DNA de mir196a-2-ii de diferentes muestras tumorales, en gel de agarosa al 1%. M = Marcador de peso molecular de 100 pb.

- **Análisis de la secuenciación de las regiones amplificadas.**

Una vez purificados los miRNAs 27a y mir196a-2-ii de cada muestra, estos fueron secuenciados mediante el equipo Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems), en solo un sentido de la hebra de DNA (5'-3'). Posteriormente, las secuencias obtenidas, tanto controles como problema, se compararon con secuencias reportadas para dichos miRNAs en la base de datos NCBI, mediante la herramienta BLAST, con el fin de corroborar la identidad de nuestros productos de PCR (Figura 21).

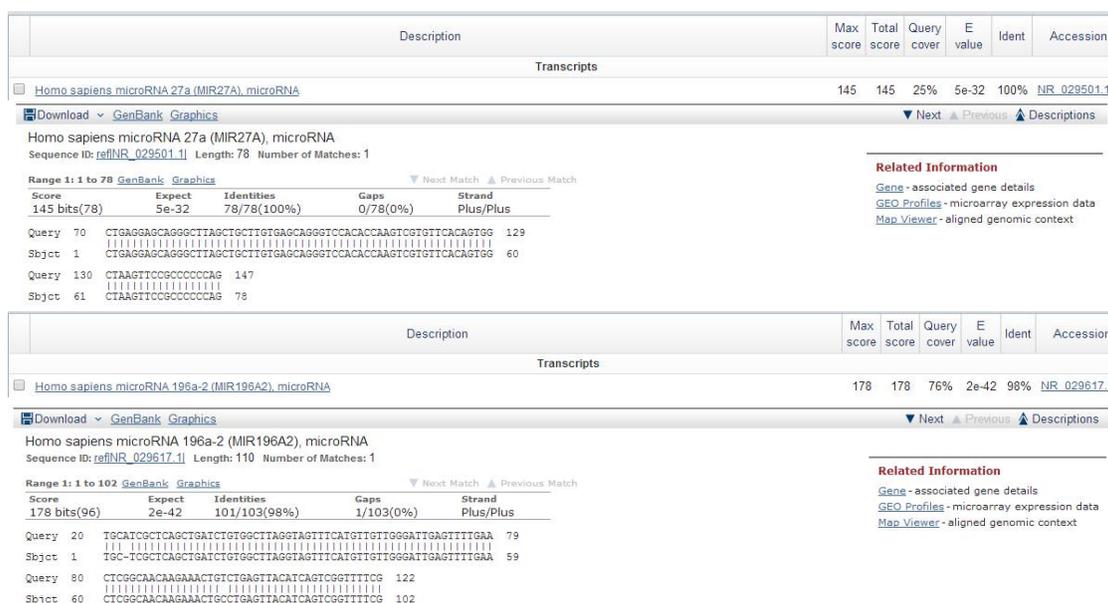


Figura 21. Analisis de identidad del producto obtenido por PCR de los miRNA's miR27a y miR196a-2-ii.

Fueron secuenciadas 68 muestras control y 51 muestras tumorales, además pudimos identificar el polimorfismo A>G rs 895819 en el pre-miR-27a en 32 muestras control (47.05%) (Figura 22) y 31 muestras tumorales (60.78%) (Figuras 23 y 24, Tabla 8). Así mismo, no se encontraron las variantes T265A y T300A, en las muestras analizadas.

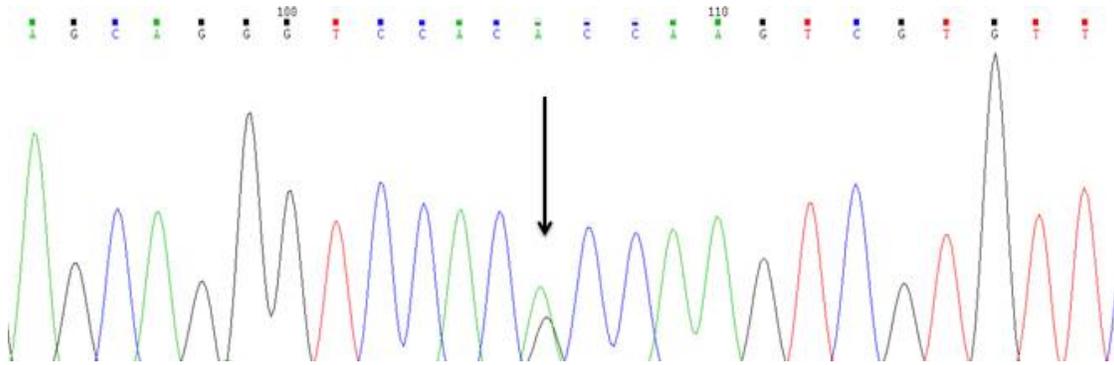


Figura 22. Electroferograma de la muestra control 60, donde se señala la presencia del polimorfismo A>G rs 895819.

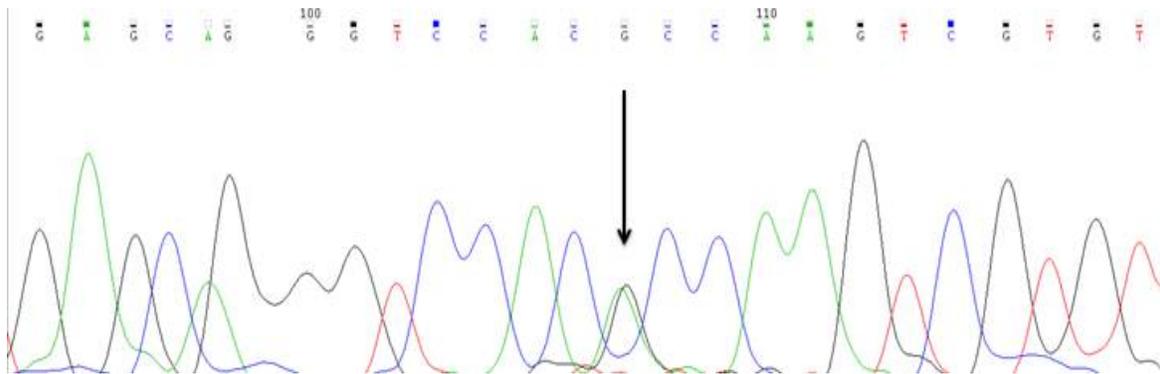


Figura 23. Electroferograma de la muestra tumoral 60, donde se señala la presencia del polimorfismo A>G rs 895819.

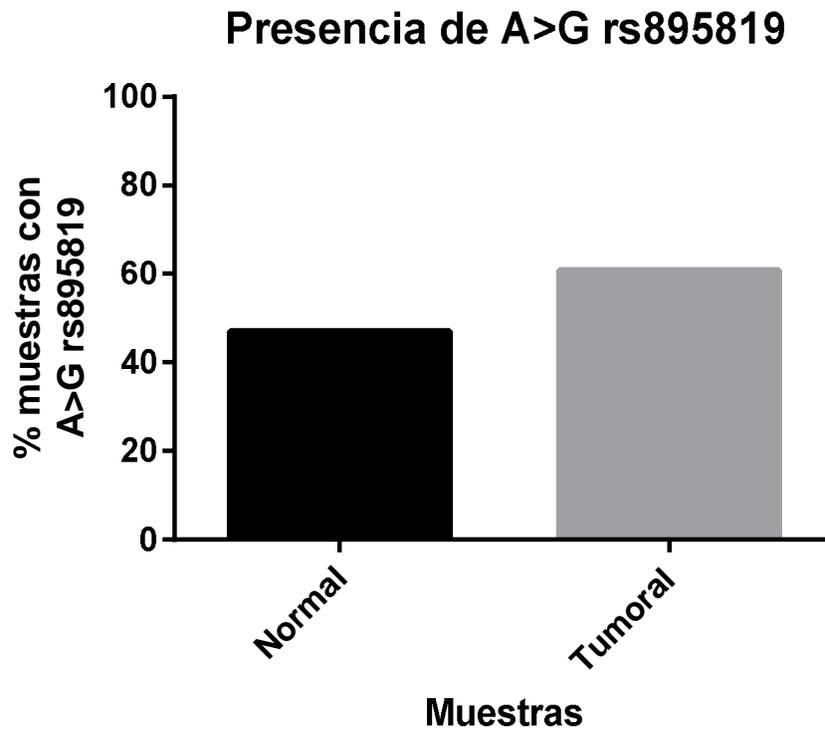


Figura 24. Porcentaje de muestras con el SNP A>G rs 895819 en muestras de mujeres mexicanas.

Tabla 8. SNPs encontrados en la secuencia de miR-27a en muestras tumorales y control. T265A y T300A corresponden a cambio de una timina por una adenina en las posiciones 265 y 300 de nuestro amplicon.

	mir27a			Total (n)
	A>Grs895819	T265A	T300A	
Controles	32 muestras (47.05%)	0	0	68
Tumorales	31 muestras (60.8%)	0	0	51

Para mir196A-2-ii solo se secuenciaron 10 muestras control y 11 muestras tumorales y no se identificó el alelo menor, sin embargo cabe señalar lo reducida de la muestra (Figura 25).

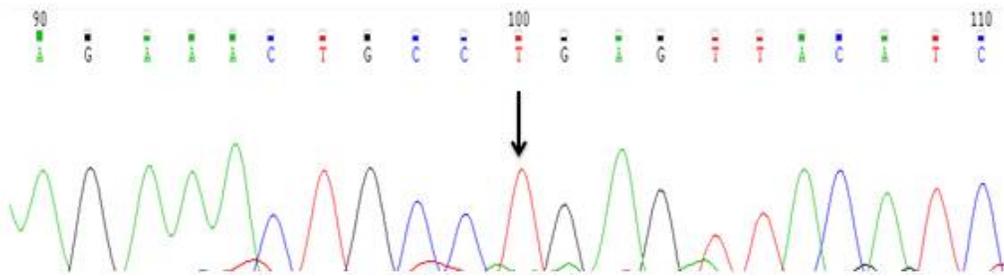


Figura 25. Electroferograma de la muestra control 2722, donde se observa que no hay cambio alguno.

- **Análisis del clúster mir23a-mir27a-mir24-2 en líneas celulares de mama.**

Al analizar el clúster en dos líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 y dos líneas inmortalizadas no tumorales MCF10A y HMEC se encontró la variante rs895819 solamente en la línea MCF10A (Figura 26).

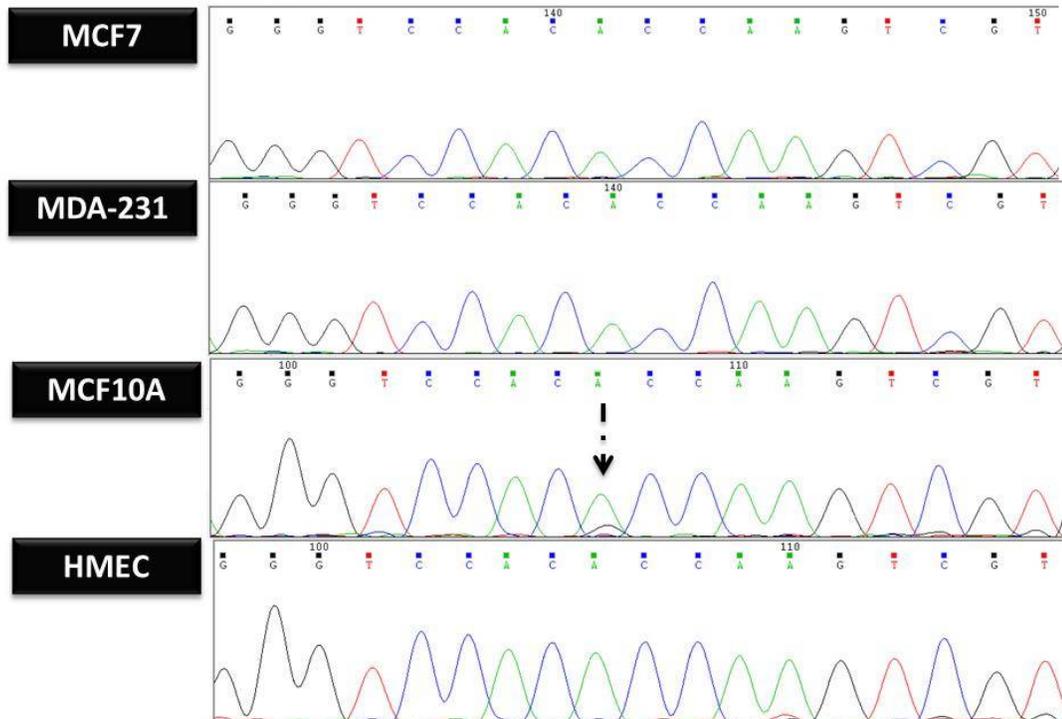


Figura 26. Electroferogramas de la secuencia parcial del pre-mir-27a de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231, MCF10A y HMEC. La flecha señala el SNP A>G rs895819

- **Expresión Relativa de miR-27a en líneas celulares de mama.**

Al realizar el análisis de expresión de miR-27a, observamos que los niveles son menores en ambas líneas tumorales (MCF-7 y MDA-MB-231) comparadas con líneas celulares no neoplásicas (HMEC y MCF10A), sin embargo es importante señalar que dicho cambio no depende del genotipo del miRNA (Figura 27).

9. DISCUSION

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos, altamente conservados, los cuales se encargan de regular la expresión génica mediante su unión a las regiones 3' UTRs, 5' UTRs e inclusive regiones codificantes de su mRNA blanco, impidiendo su traducción o degradándolos, esto de acuerdo al grado de complementareidad que presenten (Pasquinelli, 2012; Ryan *et al.*, 2010).

A la fecha se han descrito 1,881 pre-miRNAs y 2,588 miRNAs (mirBase, 2014) y se ha calculado que cerca de la mitad del transcriptoma se encuentra bajo la regulación de miRNAs, por lo tanto se hace evidente la importancia de estos reguladores para mantener la homeostasis celular y asimismo, no es de sorprender que su disrupción contribuya al desarrollo de diversas enfermedades como lo son problemas cardiacos, neurológicos y cáncer, entre muchos otros (Pasquinelli, 2012).

En 2011 Hanahan y Weinberg realizaron una revisión acerca de los rasgos o "hallmarks" propios e indispensables para que una célula se transforme y adquiera las características de una célula tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). Además, en cada uno de dichos procesos se puede observar la intervención de miRNAs, de tal forma que a la fecha se han analizado diversos tipos de cáncer observando que el perfil de expresión de diferentes miRNAs (tanto precursores, como maduros) difiere con respecto al perfil presente en células sanas del mismo tejido, así como entre las distintas neoplasias (Calin & Croce, 2006). De esta manera, se han podido clasificar como OncomiRs o supresores de tumor, aunque dependiendo del rol que desempeñen, el tejido en el que se expresen, así como el

microambiente en el cual se encuentren, dichos miRNAs pueden desempeñar ambos roles (Ryan *et al.*, 2010).

En el caso concreto del cáncer de mama poco se sabe acerca de los mecanismos que llevan a la sub-expresión o sobre-expresión de miRNAs. Recientemente, se ha encontrado que los SNPs presentes en los genes de miRNAs (miR-SNPs) podrían constituir la predisposición a desarrollar cáncer, ya que pueden afectar la función de los miRNAs al modular la transcripción, procesamiento y maduración del pri-miRNA y pre-miRNA, ó la interacción miRNA-mRNA (Ryan *et al.*, 2010).

En el caso de pre-mir27a encontramos el polimorfismo A>G rs895819, en el 47.05% de las muestras control y 60.8 % en muestras tumorales. Este SNP localizado en el asa terminal del precursor de mir27a ha sido asociado con una disminución en el riesgo de padecer cáncer debido a que afecta el procesamiento y la maduración de dicho precursor (Yang *et al.*, 2009).

Yang R, en 2009, encontró en un estudio de cohorte de cáncer familiar de mama con 1,217 muestras alemanas y 1,422 muestras de pacientes no alemanes, que el alelo rs895819 fue menos frecuente en controles (OR=0.88). La estratificación por edad señaló que el efecto protector se presentó solo en mujeres menores de 50 años, sugiriendo un posible efecto relacionado con los niveles hormonales en las pacientes (Yang *et al.*2009). Otro estudio en 2012 realizado por Catucci y colaboradores, reportó que en un grupo de 1,025 muestras de cáncer de mama y 1,593 muestras control de pacientes italianas no existió asociación entre el SNP rs 895819 y el riesgo de padecer cáncer de mama(Catucci

et al. 2012). Rong-Pan en el 2014, realizó un metanálisis de 17 estudios abarcando 7,813 casos y 9,602 muestras tumorales y reportaron que no hay asociación entre rs 895819 y el cáncer de mama en muestras asiáticas (Rong-Pan *et al.* 2014).

En nuestro estudio encontramos un mayor porcentaje del polimorfismo en muestras de cáncer que en muestras control, si bien, el tamaño de muestra de nuestro estudio es pequeño comparado con otros estudios internacionales. Las discrepancia encontradas en los estudios de rs895819 puede deberse principalmente a dos cuestiones, al tamaño de muestra usado en los estudios y a los parámetros que se utilicen para establecer los cohortes y análisis de resultados, por ejemplo edad, bilateralidad del cáncer de mama, etc.

Los miRNAs son transcritos por la RNA Pol II ya sea como productos individuales, o como un grupo de miRNAs agrupados en clúster, es decir, como un solo transcrito policistronico (Lovat *et al.*, 2011; Tanzer & Stadler, 2004). En el caso de miR27a, este se encuentra en el clúster 23a-27a-24-2, el cual se expresa como un solo pri-miRNA de 2.1kb y posteriormente, es escindido en los 3 miRNAs que lo componen (Chhabra *et al.*, 2010).

Debido a este arreglo y al diseño de nuestros primers, al obtener las secuencias de nuestros amplicones correspondientes a miR27a, nos permitió obtener también la secuencia de miR24-2 donde observamos un cambio de una T por una A, en la posición 247 de nuestro producto de PCR en algunas muestras (datos no mostrados), sin embargo al re-secuenciar las muestras para confirmar la presencia de este cambio no lo detectamos, por lo que concluimos que dicho cambio fue un falso positivo producido por algún artefacto al momento de secuenciar.

Cuando se analizó la presencia de la variante rs 895819 en 2 líneas celulares tumorales y 2 líneas inmortalizadas no tumorales, solo se encontró el polimorfismo en la línea MCF10A, la cual es una línea no tumorigénica pero inmortalizada. En la línea MCF7, MDA-MB-231 y HMEC no se encontró este SNP. Estos resultados dan pauta para realizar estudios futuros en las implicaciones biológicas que tiene esta variante, ya que se puede sobre-expresar la variante en las líneas celulares y analizar sus efectos en el fenotipo tumoral.

Así mismo nos indicaría al llevar acabo los ensayos de transfección, que el resultado observado sería en respuesta al polimorfismo exógeno, además de descartar un posible efecto aditivo entre SNPs. Por su parte, MCF10A si presenta el alelo polimórfico (G), en cuyo caso sería necesario realizar una normalización de los valores de fluorescencia obtenidos, con el fin de excluir de nuestros resultados el efecto del polimorfismo endógeno. A la fecha no existe reporte alguno acerca de la presencia o ausencia de SNPs en este clúster en las líneas celulares empleadas en este trabajo, por lo que sería importante comparar su comportamiento con respecto a un control que posea algunos SNPs de interés, como rs895819, por medio de ensayos de validación *in vitro* y así poder redondear los datos obtenidos

Para realizar los ensayos *in vitro* de unión de miR27a a su blanco, es necesario elegir el modelo indicado, en nuestro caso evaluamos los niveles de expresión de miR27a en 4 diferentes líneas celulares, MDA-MB-231, MCF7, MCF10A y HMEC, con el fin de elegir a aquella que presentara el menor nivel de expresión y así minimizar el efecto del miRNA endógeno de la células.

De esta forma encontramos que las líneas MDA-MB-231 y MCF7 son las que presentan una menor expresión, esto concuerda con lo reportado por Mertens-Talcott et al., quienes en 2007 mostraron a MDA-MB-231, como la línea con menor expresión de este miRNA. Sin embargo, a diferencia de su trabajo, nuestros datos muestran que no hay diferencia significativa entre MDA-MB-231 y MCF7, además los autores no mencionan el dato numérico de la expresión, mientras que en nuestro caso ambas líneas presentan una sub-expresión de miR27a de aproximadamente 100 veces menos. Dicha discrepancia entre nuestros datos y los ya reportados, puede deberse a una pérdida de la identidad genética de la línea empleada con respecto a la original debido al número de pases realizados (Graham *et al.*, 1986). A pesar de eso como se puede observar los datos muestran a MDA-MB-231 como una posible candidata para llevar a cabo los ensayos *in vitro*.

Así mismo, se ha reportado que los blancos de miRNAs poseen un umbral de expresión, abajo del cual el mRNA es silenciado efectivamente, mientras que al encontrarse por encima de este, puede saturar a los miRNAs disponibles y no ser reprimido correctamente (Mukherji et al., 2011). Por tanto, sería interesante evaluar de manera experimental el efecto del SNP rs895819 en los niveles de miR27a y el umbral de expresión de algunos de sus blancos, ZBTB10 (Mertens-Talcott *et al.*, 2007), FOXO1 (Gutilla *et al.*, 2009), etc., para finalmente poder relacionar el mínimo nivel de expresión de miR27a con el umbral límite de su diana.

También se logró secuenciar 10 muestras control y 10 de cáncer del producto de mir196a-2-ii, en este grupo no detectamos cambios, si bien resta terminar de secuenciar el grupo de muestras amplificadas para este polimorfismo y los otros 4 miRNAs y regiones blanco.

Es importante señalar que el efecto que tiene un solo SNP es insignificante para manifestarse en el fenotipo, se requiere de la interacción de varios de ellos (efecto aditivo) para poder observarlo (Onay, *et al.* 2006) y segundo como sabemos el cáncer es una entidad compleja y multifactorial, la cual no solo depende de factores genéticos, sino también de factores epigenéticos para poder desarrollarse (Torrades, 2003).

10. CONCLUSIONES

- ❖ Se identificó la presencia del polimorfismo A>G rs895819 en la región de pre-miR27a en 32 muestras control (35.55%) y 31 muestras tumorales (60.78%) y en la línea celular no neoplásica MCF10A.
- ❖ Se observó menor expresión de miR-27a en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.
- ❖ No se encontraron variantes de SNPs en las líneas celulares MCF7, MDA-231 y HMEC, en contraste de MCF10A con el SNP rs895819

PERSPECTIVAS

1. Aumentar el número de pacientes por análisis de SNP para miR-27a.
2. Profundizar en la función biológica de miR27a en las líneas celulares.
3. Secuenciar todos los productos amplificados propuestos y realizar un análisis integral de SNPs sobre los 6 miRNAs y 3 regiones UTR en los grupos de estudios en correlación, con datos clínicos de los pacientes.

11. LITERATURA CITADA

1. Abrahante J., A. Daul, M. Li, M. Volk, J. Tennessen, E. Miller and A. Rougvié. 2003. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by MicroRNAs. *Developmental Cell*. 4(5):625-637.
2. Adams B.D., H. Furneaux and B.A. White. 2007. The microribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Molecular Endocrinology*. 21:1132–1147.
3. American Cancer Society. [En línea] [Fecha de consulta: 15 de junio de 2014]. Disponible en: <http://www.cancer.org>
4. Andersson M., A. Stahlberg, Y. Arvidsson, A. Olofsson, H. Semb, G. Stenman, O. Nilsson and P. Aman. 2008. The multifunctional FUS, EWS and TAS15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *Bio Med Central Cell Biology*. 9:37.
5. Bai R-P., Y. Weng, L.L Su, M-J Jing, Z-P Xu, L-Q Lu and G-D Chen. (2014). Association of a Pre-miR-27a a polymorphism with cancer risk: an updated meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15(23):10107-10114.
6. Calin G.A and C.M Croce. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 6:857-866.
7. Catucci I., P. Vaerderio, S. Pizzamiglio, L. Bernard, V. Dall'olio, D. Sardella, F. Ravagnani, L. Gallastri, M. Barile, B. Peissel, D. Zaffaroni, S. Manoukian, P.

- Radice and P. Peterlongo. (2012). The SNP rs895819 in miR-27a is not associated with familial Breast cancer risk in Italians. *Breast Cancer Research Treatment*. 133:805-807.
8. Chan J., A. Krichevsky and K. Kosik. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor human glioblastoma cells. *Cancer Research*. 65(14):6029-6033.
 9. Chhabra R., R. Dubey and N. Saini. 2010. Cooperative and individualistic functions of the microRNA's in the miR-23a-27a-24-2 cluster and it's implication in human disease. *Molecular Cancer*. 9(232):1-16.
 10. Chomczynski, P (1993). A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15:532-537
 11. Clague J., S. Lippman, H. Yang, M. Hildebrandt, Y. Ye, J. Lee and X. Wu. 2009. Genetic variations in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Molecular Carcinogenesis*. 49(2):183-189.
 12. Curk T., G. Rot and B. Zupan. 2011. SNPsyn: detection and exploration of SNP-SNP interactions. *Nucleic Acid Research*. 39:444-449.
 13. Data Base of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). [En línea]. Supported by: Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: October 16, 2014. Build 142). [Fecha de consulta: 27 de abril de 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 14. Duursma A., M. Keede, M. Schrier, C. Le Sage and R. Agami. 2008. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. 14:872-877.

15. Esquela-Kerscher A. and F. Slack. 2006. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6:259-269
16. Ferlay J., I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo , D. Parkin, D. Forman and F. Bray. GLOBOCAN v1.0. [En línea]. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France. Supported by: International Agency for Research on Cancer. [Fecha de consulta: 12 de junio de 2014]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
17. Filipowicz W., L. Jaskiewicz, F. Kolb and R. Pillai. 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNA's and miRNA's. *Current Opinion in Structural Biology*. 15:331-341.
18. Graham K., J. Trent, K. Osborne, C. McGrath, M. Minden and R. Buick. 1986. The use of restriction fragment polymorphisms to identify the cell line MCF7. *Breast Cancer Research and treatment*. 8:29-34.
19. Griffiths-Jones S., H.S. Saini, S. Van Dongen and A.J. Enright. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*. 36:154-158.
20. Guio S., S. Michiels, F. Andre, J. Cortes, C. Denkert, A. Di Leo, B. Hennesy, T. Sorlie, C. Sotiriou, N. Turner, M. Vijver, G. Viale, S. Loi and J. Reis-Filho. 2012. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working group statement. *Annals of Oncology*. 23:2997-3006.
21. Guo Y., Y. Chen, H. Ito, A. Watanabe, X. Ge, T. Kodama and H. Aburatani. 2006. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene*. 384:51-61.

22. Gutilla I.K and B.A White. 2009. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96 and miR-182 in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 284(35):23204-23216.
23. Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144:646-674.
24. Hoffman A.E., T. Zheng, C. Yi, D. Leaderer, J. Weidhaas, F. Slack, Y. Zhang, T. Paranjape and Y. Zhu. 2009. MicroRNA miR-196-2 and Breast Cancer: A Genetic Epigenetic Association Study and Functional Analysis. *Cancer Research*. 69(14): 5970-5977.
25. Horikawa Y., C. Wood, H. Yang, Y. Ye, J. Gu, J. Lin, T. Habuchi and X. Wu. 2008. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Prevention and Susceptibility*. 14(23):7956-7962.
26. Hu Z., J. Liang, Z. Wang, T. Tian, X. Zhou, J. Chen, R. Miao, Y. Wang, X. Wang and H. Shen. 2009. Common Genetic Variants in Pre-MicroRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Human Mutation*. 30(1):79-84.
27. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. [En línea] [Fecha de consulta: 29 de mayo de 2014]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>
28. Iorio M., M. Ferracin, C. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. Calin, P. Querzoli, M. Negrini and C. Croce. 2005.

- MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*. 65(16):7065-7070.
29. Jakymiw A., K. Pauley, S. Li, K. Ikeda, S. Lian, T. Eystathion, M. Satoh, M. Fritzler and E. Chan. 2007. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *Journal of Cell Science*. 120:1317-1323.
30. Jazdzewski K., S. Liyanarachchi, M. Swierniak, J. Pachucki, M. Ringel, B. Jarzab and A. De la Chapelle. 2009. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(5):1502-1505.
31. Knaul M.F., G. Nigenda, R. Lozandro, H. Arreola-Ornelas, A. Langer y J. Frenk. 2009. Cancer de mama en Mexico, una prioridad apremiante. *Salud Pública Mexico*. 51:S335-S344.
32. Kozomora A. and S. Griffiths-Jones. miRBase. [En línea]. Supported by Faculty of Life Sciences at the University of Manchester and previously by the Wellcome Trust Sanger Institute. [Fecha de consulta: 21 de febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.mirbase.org>
33. Kulkarni M., S. Ozgur and G. Stoecklin. 2010. Ontrack with P-bodies. *Biochemical Society Transactions*. 38:242-251.
34. Lancman J., N. Caruccio, B. Harfe, A. Pasquinella, J. Schageman, A. Pertsemidid and J. Fallon. 2005. Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development. *Developmental Dynamic*. 234:948-960.

35. Le Quesne J. and C. Caldas. 2010. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology*. 1-12.
36. Lee R., R. Feinbaum and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5):843-854.
37. Li W., R. Duan, F. Kooy, S.L. Sherman, W. Zhou and P. Jin. 2009. Germline mutation of microRNA-125 is associated with breast cancer. *Journal of Medical Genetics*. 46: 358-360.
38. Livak K and T. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 25:402-408.
39. Lovat F., N. Valeri and C.M. Croce. 2011. MicroRNAs in the pathogenesis of cancer. *Seminars in Oncology*. (38)6:724-733.
40. Melo S., S. Ropero, C. Moutinho, L. Aaltonen, H. Yamamoto, G. Calin, S. Rossi, A. Fernández, F. Carneiro, C. Oliveira, B. Ferreira, C. Liu, A. Villanueva, G. Capella, S. Schwartz Jr, R. Shiekhattar and M. Esteller. 2009. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature*. 41:365-370.
41. Méndez G.S. 2012. Variantes genéticas en miRNAs y mRNAs como factores de predisposición a cáncer de mama. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.
42. Mertens-Talcott S, S. Chintharlapalli, X. Li and S. Safe. 2007. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription

- factors and the G₂-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Research*. 67(22):11001-11011.
43. Mukherji S, M.S Ebert, G.X Zheng, J.S Tsang, P.A Sharp and A. Van Oudenaarden. (2011). MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nature Genetics*. 43:854–859.
44. O'Donnell K.A. and J.T Mendell. Dysregulation of microRNAs in human malignancy. En: *MicroRNAs: From basic science to disease biology*. 1st ed. Cambridge University Press, New York, USA. Appasani, K. 2007, pp 344-357.
45. Onay V., L. Briollais, J. Knight, E. Shi, Y. Wang, S. Wells, H. Li, I. Rajendram, I. Andrulis and H. Ozelik. 2006. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. *Bio Med Central Cancer*. 6:114.
46. Pasquinelli A. 2012. MicroRNA's and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*. 13:271-282.
47. Perou C., T. Serlie, M. Eisen, M. Rijn, S. Jeffrey, C. Rees, J. Pollack, D. Ross, H. Johnsen, L. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. Zhu, P. Lonning, A. Borresen-Dale, P. Brown and D. Botstein. 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Letters to Nature*. 406:747-752.
48. Reinhart B., F. Slack, J. Slack, M. Basson, A. Pasquinelli, J. Bettinger, A. Rougvie, H. Horvitz and G. Ruvkun. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates development timing en *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-906
49. Rivera G.X. 2012. Perfiles de expresión de miRNA's en la línea de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 y su relación con la expresión del gen

proapoptotico BIK/NKB. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

50. Ryan B.M., A. Robles and C. Harris. 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews*. 10:289-402.
51. Sambrook K.J., yE.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. New York. *Cold Spring Harbor*.
52. Saetrom P., J. Biesinger, S. Li, D. Smith, L. Thomas, K. Majzoub, G. Rivas, J. Alluin, J. Rossi, T. Krontiris, J. Weitzel, M. Daly, A. Benson, J. Kirkwood, P. O'Dwyer, R. Sutphen, J. Stewart, D. Johnson and G. Larson. 2009. A risk variant in a miR-125b binding site in BMPR1B is associated with breast cancer pathogenesis. *Cancer Research*. 69:7459-7465.
53. Shen J., C. Ambrosone and H. Zhao. 2009. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *International Journal of Cancer*. 124:1178-1182.
54. Shen J., C. Ambrosone, R. Di Cioccio, K. Odunsi, S. Lele and H. Zhao. 2008. A functional polymorphism in the miR-146 gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*. 29(10):1963-1966.
55. Song F., H. Zheng, B. Liu, S. Wei, H. Dai, L. Zhang, G.A. Calin, X. Hao, Q. Wei, W. Zhang and K. Chen. 2009. A miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the SET8 gene is associated with early age of breast cancer onset. *Clinical Cancer Research*. 15: 6292-6300.

56. Staton A. and A. Giraldez. 2008. MicroRNA's in development and disease. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020863.
57. Sunkar R. and J. Zhu. 2004. Novel and Stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:2001-2019.
58. Tanzer A. and P.F. Stadler. 2004. Molecular evolution of a MicroRNA cluster. *Journal of Molecular Biology*. 339:327-335.
59. Tay Y., J. Zhang, A. Thomson, B. Lim and I. Rigoutsos. 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 455:1124-1128.
60. Tchatchou S., A. Junk, K. Hemminki, C. Sutter, B. Wappenschmidt, P. Bungert, B. Weber, D. Niederacher, N. Arnold, R. Varon-Mateeva, N. Ditsch, A. Meindl, R. Schmutzler, C. Bartram and B. Burwinkel. 2009. A variant affecting a putative miRNA target site in estrogen receptor (ESR) 1 is associated with breast cancer risk in premenopausal women. *Carcinogenesis*. 30(1):59-64.
61. The 1000 Genomes Project Consortium. 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 491:56-65.
62. Torrades S. 2003. El origen genético del cáncer de mama. *Genética*. 22(6): 108-112.
63. Torres-Mejía G., F.M. Knaul, C. Ortega-Olvera, L. Magaña-Valladares, S. Uscanga-Sánchez y E. Lazcano-Ponce. 2011. Detección temprana y manejo integral de cáncer de mama. Manual dirigido para personal de medicina y

enfermería del primer nivel de atención. 1ra ed. Instituto Nacional de Salud Publica. ISBN 978-607-511-013-4

64. Trimboli A.J., K. Fukino, A. de Bruin, G. Wei, L. Shen, S. Tanner, N. Creasap, T. Rosol, M. Robinson, C. Eng, M. Ostrowski and G. Leone. 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Research*. 68: 937-945.
65. Vincent-Salomon A. and J.P.Thiery. 2003. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Research*. 5: 101-106.
66. Wang X. [En línea]. Department of Radioation Oncology. Supported by Washington University School of Medicine, St. Louis, USA. [Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2014]. Disponible en: <http://mirdb.org/miRDB/index.html>
67. Wightman B., I. Ha and G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75(5):855-862.
68. Yang H., C. Dinney, Y. Ye, Y. Zhu, B. Grossman and X. Wu. 2008. Evaluation of genetic variants in MicroRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Research*. 68(7):2530-2537.
69. Yang R., B. Schlehe, K. Hemminki, C. Sutter, P. Bungert, B. Wappenschmidt, J. Volkmann, R. Varon, B. Weber, D. Niederacher, N. Arnold, A. Meindl, C. Bartram, R. Schmutzler and B. Burwinkel. 2009. A genetic variant in the pre-miR-

27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*. 121:693-702.

70. Ye Y., K. Wang, J. Giu, H. Yang, J. Lin, J. Ajani and X. Wu. 2008. Genetic variations in MicroRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prevent Research*. 1:460-469.

71. Ying S-Y., J.D Miller and S-L Li. 2008. Non-coding RNAs-development of man-made vector-based intronic microRNAs (miRNAs). En K. Appasani (Ed.), V. Ambros and S. Altman. *MicroRNAs: From basic science to disease biology*. pp. 580. New York, USA: Cambridge University Press.

ANEXO

Quantificación de la concentración y pureza de las 200 muestras (100 controles y 100 tumorales) de DNA de mujeres mexicanas

Muestras Control	Concentración (ng/ μ l)	$\lambda=260/280$
1	21.1	2.1
2	23.7	2.2
4	25.1	2.1
5	20.6	2.1
6	21	1.9
7	23	1.9
8	14.5	2.2
9	27.3	2
10	10	2.8
13	19.6	2.2
14	8	2.5
20	22.4	1.9
21	9.1	1.9
22	10.1	2.1
23	22.3	2.1
25	31.2	1.9

26	23.9	2
27	36.6	2
28	31.7	1.8
29	27.9	1.8
30	25.1	2.1
31	17.4	2.1
32	29.1	1.8
36	32.2	1.8
37	26	2.3
38	27.1	1.9
40	32.4	1.9
43	22.8	1.9
44	10.5	2.4
46	36.4	1.9
48	30	1.9
49	15.2	2.2
51	17.9	2
53	21.7	1.8
54	24.1	2.1
56	28.3	2
57	30.6	1.8

60	40.3	1.9
61	27.2	1.9
64	14.8	1.8
65	26.4	1.9
66	41.3	1.8
72	21.7	1.9
74	31.8	1.8
75	27.4	1.9
77	26.9	2
78	39.3	1.8
79	37.2	2
80	40.1	1.8
84	30.4	2
85	43.6	1.9
86	49	1.8
88	34.2	1.9
89	27.1	1.9
90	23.4	2
91	33.1	1.8
92	34.2	1.8
93	28	1.9

94	26.3	1.9
96	38.1	1.9
97	39.2	1.8
100	40.4	1.9
101	34.8	1.8
103	31.7	2
104	17.6	1.9
109	24.6	1.9
111	33.2	1.9
112	25.9	1.9
113	24.2	1.8
114	27	2.1
115	36.7	1.9
116	36.4	1.8
117	42.9	1.8
118	27	1.9
119	23.8	1.8
120	28.6	1.9
121	44.4	1.8
123	21.7	1.9
124	28.8	2

129	28.7	2
130	45.1	1.9
131	25.3	1.9
132	37.5	1.9
134	43.9	1.8
138	24.7	1.9
140	37.6	1.9
143	22.5	2.1
163	21.2	2
165	33.5	1.8
172	29.2	1.9
174	49	1.8
175	33.7	1.9
177	60.5	1.8
178	63.7	1.9
180	32.8	1.9
183	45.8	1.9
185	39.1	1.9
4733	13.4	1.9
1876	15	2
3822	12.3	2

Muestras Tumorales	Concentración (ng/μl)	λ=260/280
5	139.74	1.8
6	153.32	2
9	122.58	1.8
11	145.7	1.9
13	146.19	1.8
16	156.71	1.8
17	172.61	1.9
18	144.37	1.8
19	191.5	1.9
22	137.27	1.9
25	35.65	1.8
26	258.35	1.8
28	294.29	1.8
29	218.88	1.8
30	150.43	1.9
31	121.26	1.8
34	116.14	1.8

46	216.85	1.9
50	182.58	1.9
53	146	1.8
54	152.31	1.9
57	170.29	1.9
58	149.07	1.9
59	151.72	1.9
60	168.42	1.8
61	188.03	1.9
62	160.2	1.9
63	145.21	1.9
64	169.19	1.9
65	167.3	1.9
66	188.98	1.8
67	141.34	1.9
68	137	1.9
69	155.64	1.9
72	238.9	1.9
74	225.27	1.9
76	242.46	1.9
78	265.04	1.9

79	249.96	1.9
81	208.14	1.9
82	249.57	1.9
85	226.41	1.9
86	250.98	1.9
87	212.75	1.9
91	244.17	1.9
92	245.39	1.9
93	221.47	1.9
95	248.17	1.9
97	113.33	1.8
102	92.8	1.9
103	119.72	1.9
109	113.25	1.9
111	185.98	1.8
112	147.75	1.9
119	151.56	1.9
120	174.04	1.9
127	233.01	1.8
128	230.93	1.9
129	231.26	1.9

130	223.5	1.9
131	188.5	1.9
137	108	1.8
140	237.08	1.9
141	199.38	1.9
142	179.29	1.9
143	233.26	1.9
144	214.9	1.9
145	202.56	1.9
146	234.33	1.9
147	40.93	1.8
148	43.8	1.9
149	100.7	1.9
150	20.1	1.9
151	12	2
152	6	2.1
153	13	1.8
154	36	1.8
155	50	1.9
156	112	1.9
157	28.9	1.9

158	102.8	1.8
159	132.1	1.9
160	89.3	1.9
161	117.6	1.9
162	110.2	2
163	100.4	2.2
164	50.7	2.1
165	21	1.9
166	41	1.9
167	7	2.2
168	9.1	2
169	10	2.1
170	27.1	1.8
171	47.6	1.8
172	20.3	1.9
173	22	1.9
174	36.1	1.8
175	47.3	1.8
176	90	1.8
177	39.4	1.8