



“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO”

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

“miRNAoma de Esferoides Multicelulares de Cáncer de Mama”

TESIS DE DOCTORADO

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Presenta:

EDNA AYERIM MANDUJANO TINOCO

Tutor: Vilma Araceli Maldonado Lagunas

Comité Tutor: Osbaldo Rensedis Antonio

Gonzalo Castillo Rojas

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, CDMX, Octubre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Vilma Maldonado quien me brindó todo su apoyo para llevar a buen término mis estudios en el Doctorado, pero que además siempre estuvo para darme sabios consejos sobre la toma de decisiones importantes en este camino. Cada día de todos estos años, ella mostró entusiasmo e interés por mi crecimiento no sólo profesional sino también personal y nunca dudó en recibirme con una sonrisa, a pesar de que no siempre le llevara buenas noticias. Ella me enseñó que el Doctorado no es para sufrirse sino para disfrutarse. Por eso GRACIAS.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas, por los cursos y todas las herramientas académicas y apoyos económicos que me brindó para mi desarrollo profesional.

Al CONACyT (Número de becario 269132) que me mantuvo económicamente durante estos cinco años.

Al INMEGEN por las instalaciones y a los encargados de todas sus unidades de alta tecnología, sin las que no hubiera sido posible la realización de diversos experimentos.

A los Doctores Gonzalo Castillo y Osbaldo Resendis por su disposición a ayudarme en la resolución de problemas y por todos los comentarios y críticas que me ayudaron siempre a mejorar.

A la bióloga Anita Vega Miranda por su paciencia al enseñarme a hacer qRT-PCR, al Dr. Víctor Manuel Dávila Borja por estar siempre a la disposición de prestarme su cámara de hipoxia, al Dr. Edgar Krötzsch Gómez y la M. en C. Rosa María Salgado Curiel por el interés y el apoyo que me brindaron durante el diseño, ejecución y discusión de los últimos experimentos necesarios para publicar.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS

Esta Tesis de Doctorado está dedicada a la vida misma, porque en ella he aprendido y disfrutado de todos los caminos y encrucijadas por los que me ha llevado a recorrer. Es indudable que durante estos cinco años no sólo he conocido un poquito de lo que significa hacer investigación, sino que en el camino he descubierto lo fuerte y lo débil que puedo llegar a ser ante las circunstancias más sorprendidas de la vida.

Y una de mis mayores fortalezas en la vida nace del amor que recibo a diario de mi pequeña gran familia: mi mamá Angélica Tinoco y mi papá Joaquín Mandujano, quienes (muy a su pesar) me han permitido independizarme, crecer, tropezarme, equivocarme y volverme a equivocar, pero haciéndome saber que su mano y el apoyo de todo su ser estará ahí siempre que piense que no puedo volver a levantarme. No hay palabras que pueda yo expresar para hacerles saber el orgullo y la alegría que me da de decir "Ellos son mis papás". Gracias por los regaños y por todos los apapachos que siempre me llegan en el momento más oportuno.

Y después viene todo el cariño, el apoyo, los consejos, la compañía, los aprendizajes, los regaños, las porras y los desvelos de todos aquellos seres con los que he cruzado mi camino, quienes me han tenido paciencia y me han colmado de comprensión y alegría en los momentos en los que sentía que mi voluntad no me alcanzaba para continuar. A todos ustedes gracias.

A ti, alma viajera, hombre libre. Gracias por ser mi raíz en la Tierra.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Cáncer	4
1.2 Generalidades sobre el cáncer de mama	6
1.3 microRNAs, biogénesis y rol biológico en cáncer de mama.	8
1.4 El modelo de los esferoides tumorales multicelulares (MCTS).	23
1.5 Análisis de expresión de microRNAs en esferoides tumorales multicelulares.	27
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÒTESIS	33
2.1 Hipòtesis	33
2.2 Objetivo general	33
2.3 Objetivos particulares	33
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	34
3.1 Cultivo celular en monocapa	34
3.2 Cultivo de MCF-7 MCTS	34
3.3 Análisis inmunohistoquímico de los MCTS.	35
3.4 Ensayo de formación de colonias en agar suave.....	35
3.5 Extracción de RNA y análisis del perfil de expresión de miRNAs.	35
3.6 Análisis de expresión de miRNAs por qRT-PCR.	36
3.7 Análisis de expresión de mRNAs por qRT-PCR.....	36
3.8 Análisis bioinformático.	36
3.9 Inhibición y sobreexpresión de microRNAs.	36
3.10 Western Blot.....	37

3.11 Generación de hipoxia e hipoglucemia.....	37
3.12 Ensayos de migración.....	37
3.13 Ensayos de resistencia a privación de SFB	38
3.14 Ensayo de degradación de gelatina.	38
3.15 Ensayos de proliferación celular.....	39
3.16 Ensayos de ciclo celular y apoptosis.	39
3.17 Separación de subpoblaciones celulares del MCTS por citometría de flujo.	39
3.18 Separación de subpoblaciones celulares del MCTS por microdissección.	40
3.19 Análisis del valor clínico-predictivo de los microRNAs desregulados en los MCTS.	41
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	42
4.1 Crecimiento y caracterización de los esferoides multicelulares tumorales (MCTS) de la línea celular MCF-7.	42
4.2 Perfil de expresión de microRNAs en MCTS- MCF-7 de 20 días de cultivo.	47
4.3 Procesos biológicos asociados con los cambios en la expresión de microRNAs en MCTS- MCF-7 de 20 días de cultivo.....	53
4.4 Expresión de B-Raf en MCTS- MCF-7 de 20 días de cultivo.	61
4.5 Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p durante el crecimiento de MCTS- MCF-7 y bajo condiciones de hipoxia e hipoglucemia.	63
4.6 Regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p células MCF-7 en monocapa.....	67
4.7 Efectos de la regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p sobre las capacidades de migración e invasión de células MCF-7.....	68
4.8 Efectos de la regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p sobre la resistencia a la privación de suero de células MCF-7.	71
4.9 Efectos de la regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p sobre la proliferación y la apoptosis de células MCF-7.....	73
4.10 Análisis de la expresión de miR-221 y miR-187 en las subpoblaciones celulares de los MCTSs.	74
4.11 Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.....	77
4.12 Papel predictivo de los microRNAs desregulados en muestras de pacientes con cáncer de mama.....	78
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	83

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	91
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS.....	92
REFERENCIAS.....	93
APÉNDICE I	99

RESUMEN

Antecedentes. Los esferoides multicelulares tumorales desarrollan subpoblaciones celulares y un microambiente heterogéneo, por lo que constituyen un modelo tridimensional de cáncer con características intermedias entre los cultivos bidimensionales *in vitro* y los modelos animales *in vivo*. Los esferoides multicelulares tumorales también adquieren características de agresividad tumoral asociados a cambios en la expresión de RNAs codificantes y no codificantes. Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificante con funciones biológicas importantes en el desarrollo de cáncer de mama sin embargo, su expresión ha sido escasamente estudiada en modelos tridimensionales.

Métodos. Evaluamos el perfil de expresión de microRNAs en MCTS de la línea de cáncer mamario MCF-7 mediante análisis de microarreglos. Los datos de expresión obtenidos se utilizaron para predecir, mediante herramientas bioinformáticas, las funciones moleculares y celulares asociadas a los cambios en el miRNAoma. Además, estudiamos la función biológica de dos microRNAs desregulados (miR-221-3p y miR-187-3p) mediante ensayos funcionales. Finalmente, exploramos la relevancia clínica de los miRNAs desregulados en nuestro modelo utilizando bases de datos de pacientes con cáncer de mama.

Resultados. Un grupo de 33 microRNAs se expresa diferencialmente en los esferoides multicelulares de MCF-7. Dichos cambios están estrechamente relacionados con procesos de crecimiento, proliferación y desarrollo celular. miRNA-221-3p y miR-187-3p participan en la regulación de la migración e invasión, la sensibilidad a la privación de factores de crecimiento, en el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación. Un panel de 5 miRNAs, incluyendo miR-187-3p, mostró un alto valor predictivo para discriminar entre grupos de pacientes con cáncer de mama de bajo y alto riesgo.

ABSTRACT

Background. Because Multicellular Tumor Spheroids develop a heterogeneous microenvironment and different cell populations, they constitute a cancer model with intermediate complexity when compared with *in vitro* bi-dimensional cultures and *in vivo* tumors. Multicellular Tumor Spheroids also acquire tumor aggressiveness features as a byproduct of coding and non-coding RNA transcription modulation such as microRNAs.

Methods. Utilizing microarray analyses, we evaluated the microRNA expression profile in MCF-7 breast cancer cells cultured as Multicellular Tumor Spheroids. The expression data were used to predict associated cellular and molecular functions using different software tools. The biological importance of two dysregulated miRNAs (miR-221-3p and miR-187-3p) was studied using functional assays. Finally, the clinical relevance of these dysregulated miRNAs was explored using previously reported data.

Results. Thirty-three dysregulated microRNAs were found in MCF-7 Multicellular Tumor Spheroids. The changes in miRNA expression were closely linked with growth, proliferation, and cell development. Two miRNAs, miRNA-221-3p and miR-187-3p, were implicated in the regulation of migration/invasion capacities, sensitivity to the deprivation of growth factors, cell cycle phase regulation, and cell death. A panel of five miRNAs, including miR-187-3p, showed a potential predictive value for discriminating between low- and high-risk groups of breast cancer patients.

ABREVIATURAS

MCTS – Esferoides Multicelulares Tumorales (del inglés Multicellular tumor spheroids)

SFB – Suero Fetal Bovino

CaMa – Cáncer de Mama

CSCs – Células troncales de cáncer (del inglés Cancer stem cells)

EMT – Fenotipo de transición epitelio-mesénquima (del inglés Epithelial-mesenchymal transition)

miRNAs – microRNAs

IPA – Ingenuity Pathway Analysis

mRNAs – RNAs mensajeros

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer.

El cáncer es uno de los principales problemas en materia de salud pública a nivel mundial. En el 2012, la agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC, Internacional Agency for Research on Cancer) estimó que, en todo el mundo, la incidencia de enfermedades tumorales fue de cerca de 17,000 casos por cada 100,000 habitantes con una mortalidad de alrededor de 8,202 decesos ¹. Por lo anterior, desde hace años el cáncer se ha convertido en uno de los principales objetos de estudio para la comunidad científica y médica.

El cáncer es una enfermedad crónica con variadas manifestaciones clínicas, que dependen del tejido a partir del cual se origina el tumor, del tipo de célula parental, del microambiente tumoral, y del trasfondo genético y ambiental de cada individuo. Dicha enfermedad es resultado de un proceso (carcinogénesis) de evolución larga en donde una o un grupo de células normales se convierte en células malignas al adquirir ciertas características esenciales o “hallmarks”.

Las características esenciales o Hallmarks del cáncer se definen como las capacidades funcionales que las células cancerosas adquieren para sobrevivir, proliferar y diseminarse ². En 2011 Hanahan y Weinberg describieron que, para la adquisición de estas características, es crucial la participación de dos mecanismos habilitadores que son: a) la inestabilidad genómica, que se refiere a las mutaciones o aberraciones cromosómicas que ocurren durante la transformación de una célula normal a una tumoral y b) la inflamación crónica, que genera un microambiente rico en especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citocinas y quimiocinas y que a su vez inducen inestabilidad genómica ³.

Las ocho características descritas por Hanahan y Weinberg como esenciales para el proceso tumorigénico se resumen en la Tabla 1 ^{2,3}.

Tabla 1. Características esenciales del cáncer.

Característica Esencial	Descripción	Ejemplos
I. Proliferación autosuficiente y sostenida	<ul style="list-style-type: none"> • Producción autónoma de señales de crecimiento. • Activación constitutiva de vías de señalización autócrinas y parácrinas. 	<ul style="list-style-type: none"> • EGF, FGF • B-Raf, MAPK, Akt/PKB, k-Ras, c-Src, PTEN, mTOR.
II. Evasión a supresores de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivación de supresores tumorales • Resistencia a la inhibición por contacto 	<ul style="list-style-type: none"> • RB, TP53, TGFβ • LKB1, NF2
III. Resistencia a la Muerte celular	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada expresión de reguladores antiapoptóticos y señales de supervivencia • Disminución de factores proapoptóticos 	<ul style="list-style-type: none"> • BCL-2, XIAP, IGF1/2 • Bax, Bim, PUMA
IV. Inmortalidad Replicativa	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la inducción de senescencia y crisis celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • h-TERT
v. Angiogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • Generación activa de nuevos vasos sanguíneos 	<ul style="list-style-type: none"> • VEGF, TSP-1
VI. Invasión y Metástasis	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de la expresión de moléculas de adhesión celular • Activación de factores de transcripción que inducen el fenotipo de transición epitelio-mesénquima • Capacidad invasiva 	<ul style="list-style-type: none"> • E-caderina, vimentina, N-caderina • Snail, Slug, Twist, Zeb1/2 • Metaloproteasas de matriz
VII. Reprogramación del Metabolismo Energético	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementado flujo glucolítico aerobio 	<ul style="list-style-type: none"> • GLUT1, HK, HIF-1α, c-Myc.
VIII. Evasión a la respuesta inmune	<ul style="list-style-type: none"> • Secreción de factores inmunosupresores 	<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β

1.2 Generalidades sobre el cáncer de mama.

A nivel mundial, el cáncer de mama (CaMa) representa la quinta causa de muerte por cáncer (522,000 muertes/año) y es el tipo de neoplasia más común en la población femenina, con más casos diagnosticados en países en desarrollo (833,000 casos/año vs. 794,000 casos/año en países desarrollados). En México, es el tipo de tumor de mayor incidencia (20,444 de cada 100,000 habitantes) y la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina ^{4,5}.

El CaMa inicia con la hiperproliferación del epitelio ductal (cáncer ductal) o glandular (cáncer lobulillar) mamario, que después progresa a carcinomas in situ, carcinomas invasivos y finalmente carcinomas que hacen metástasis generalmente a nodos linfáticos, hueso, hígado, pulmón y sistema nervioso central ⁶ (Figura 1). Cuando la enfermedad es diagnosticada en etapas tempranas, la línea de tratamiento utilizada (cirugía-radioterapia-quimioterapia) generalmente resulta en altas tasas de recuperación. Sin embargo, la enfermedad en etapas metastásicas se trata en base a la multiterapia y cirugía en los órganos afectados, pero la mayoría de los casos se consideran de mal pronóstico ^{1,7}.

A pesar de que la etiología del CaMa no se conoce por completo, diversos grupos de investigación han demostrado que la acumulación de mutaciones en 2 tipos de genes es determinante para el desarrollo de la enfermedad. Algunos ejemplos de estos genes se enlistan a continuación ⁸:

- 1) Proto-oncogenes y oncogenes: Los proto-oncogenes son genes que en condiciones normales controlan la división celular, cuando ciertas mutaciones modifican esta función se convierten en oncogenes, que permiten la proliferación celular descontrolada característica del cáncer. Los proto-oncogenes más estudiados en el CaMa son: HER-

2 (de las siglas en inglés Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), c-Myc y Ciclina D.

- 2) Supresores Tumorales: Son genes que en condiciones normales detienen el ciclo celular para detectar y en su caso reparar daños en el DNA, que de no ser corregidos significan una señal para inducir la muerte celular, cuando estos genes presentan mutaciones las células afectadas pierden dicha habilidad. En el CaMa, los supresores tumorales con más variaciones genéticas son p53, BCRA1 y BCRA2, cuyas mutaciones además representan un factor de riesgo con componente hereditario que incrementa en un 50-70% la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

Debido a la alta heterogeneidad molecular y las diversas respuestas a la terapia que presentan las pacientes con CaMa, la clasificación en subgrupos clínicos ha sido de particular importancia para la toma de decisiones terapéuticas. En este sentido, estudios de expresión génica mediante diversas tecnologías realizados en muestras de tumores mamarios provenientes de pacientes de diferentes etnias, han permitido definir 5 subgrupos moleculares de CaMa (Tabla 2), que se clasifican en dos grandes grupos ⁹.

- 1) Tumores que expresan receptores hormonales (estrógeno-ER⁺ y progesterona PR⁺), corresponden al 70% de los casos, son de buen pronóstico, responden a tratamientos hormonales y se dividen en: 1a) Tipo luminal A y 1b) Tipo luminal B.
- 2) Tumores negativos a receptores hormonales que se caracterizan por ser muy heterogéneos y por tener mal pronóstico y alto grado de recurrencia, se dividen en: 2a) HER2 positivos, 2b) Basales y 2c) con bajos niveles en claudinas.

A pesar de que los programas de prevención y las nuevas estrategias de tratamiento han logrado disminuir significativamente la incidencia y la muerte provocada por el CaMa, el

escenario sobre su biología molecular aún está incompleto. Por ejemplo, diversos grupos de investigación aún se encuentran investigando a) Quién y cuándo se debe prevenir, b) Métodos de detección más sensibles, más precisos y menos invasivos, c) Cómo predecir la progresión y la agresividad del tumor en cada paciente, d) Cómo diseñar tratamientos específicos y personalizados y e) Cómo prevenir la resistencia a la terapia. Por lo anterior, los estudios de investigación básica que ayuden a completar este complejo panorama son primordiales para la mejor comprensión, estudio y tratamiento de dicha enfermedad.

1.3 microRNAs, biogénesis y rol biológico en cáncer de mama.

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas no codificantes de RNA (19-24 nucleótidos) de una sola cadena ¹⁰. A partir del descubrimiento de los dos primeros miRNAs en *Caenorhabditis elegans*, lin-4 y let-7, diversas estrategias han sido utilizadas para identificar genes de miRNAs. La mayoría de las secuencias de miRNAs son conservadas entre especies cercanas o tienen homólogos en especies distantes. Por ejemplo, una tercera parte de los miRNAs reportados para *C. elegans* tiene homólogos en humanos, lo que sugiere que sus funciones se conservan a través de los linajes evolutivos. Hasta ahora se reportan cerca de 2,500 miRNAs en humanos, sin embargo, un estudio reciente estima que esta cifra puede incrementar hasta las 5,588 secuencias ¹¹.

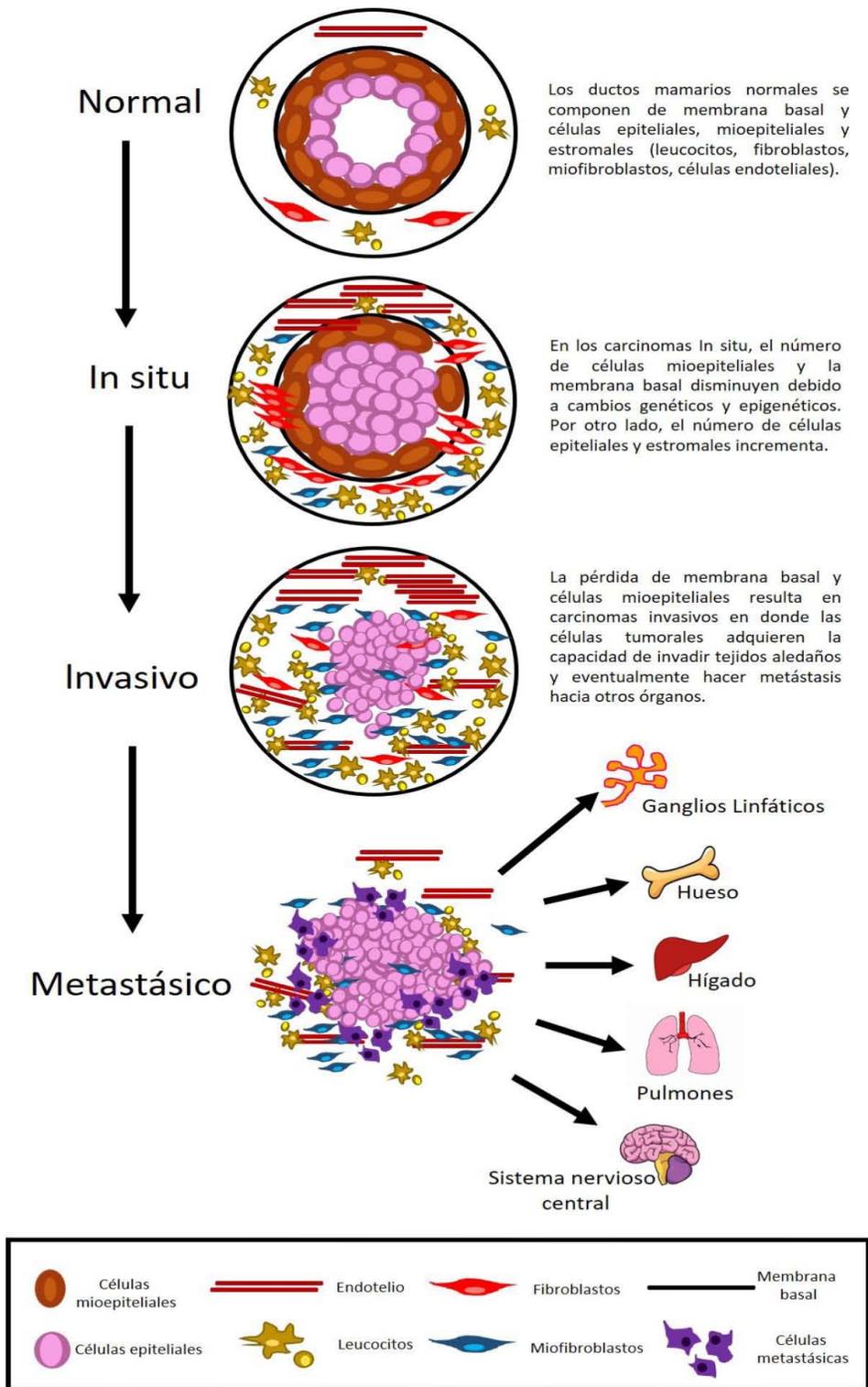


Figura 1. Modelo que explica la progresión del Cáncer de Mama. (Modificado de ⁶)

Tabla 2. Subtipos moleculares del Cáncer de Mama (Modificado de ^{12,13})

Grupo	Subgrupo	Expresión de Biomarcadores	Pronóstico	Características Adicionales
Positivos a Receptores Hormonales	Luminal A	[ER+,PR+] HER2-Ki67-	Bueno	Alta expresión de genes de adhesión
	Luminal B	[ER+,PR+] HER2-Ki67+	Intermedio	Alta expresión de genes de adhesión,y TP53-
		[ER+,PR+] HER2+Ki67+	Malo	
Negativos a Receptores Hormonales	Sobreexpresión de HER2	ER-PR-HER2+	Malo	Alta expresión de genes de adhesión, TP53-
	Triple Negativo Basal	ER-PR-HER2-, marcadores basales+	Malo	BRCA1-, TP53-, elevado CDKN2A
	Triple Negativo bajo en Claudinas	ER-PR-HER2-, Claudina- marcadores de EMT+, Marcadores de células progenitoras+	Muy malo	Baja expresión de genes de adhesión.

Nota: Marcadores basales se refiere a: Vimentina, P-cadherina, TP-63; marcadores de EMT se refiere a: SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2, ZEB1/2.; marcadores de células progenitoras se refiere a: CD44, CD24, EpCAM, CD10, CD49, CD29, ALDH1A1.

En humanos, los genes de miRNAs se localizan en todos los cromosomas excepto el cromosoma Y. Cerca del 50% de ellos se encuentran agrupados y se transcriben como transcritos primarios policistrónicos, por lo que pueden estar funcionalmente relacionados y regular al mismo blanco o a blancos diferentes pero implicados en una misma vía de señalización. El 61% de los genes de miRNAs se localizan en regiones intrónicas de genes codificantes para proteínas, el 18% en regiones intrónicas de genes no codificantes para proteína y el 21% en exones de genes no codificantes para proteína ^{10,14}.

Biogénesis canónica de los microRNAs.

A pesar de que al principio se pensaba que el proceso de síntesis de un nuevo miRNA era relativamente sencillo, cuando éste empezó a caracterizarse en animales se encontró que es un proceso complejo y altamente regulado que involucra eventos iniciales en el núcleo y la maduración final que tiene lugar en el citoplasma.

En general, los genes de miRNAs se transcriben por la RNA Polimerasa II, aunque existen algunos ejemplos de transcripción mediados por la RNA Polimerasa III ¹⁵. Los transcritos generados, conocidos como **pri-miRNAs** (80-100 nucleótidos), se procesan igual que los mRNAs estando sujetos a “splicing” alternativo, poliadenilación en el extremo 3´ y la adición de una caperuza o casquete (CAP) en el extremo 5´.

Los pri-miRNAs tienen una estructura característica de tallo-asa que en el núcleo es reconocida por el complejo microprocesador Drosha constituido por: Drosha, DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) y diversos coactivadores (i.e. las RNA helicasas p68/DDX5 y p72/DDX17; SMAD-R, hnRNP1). La actividad RNAsa III/endonucleasa de Drosha genera un transcrito con estructura en horquilla (hairpin) de aproximadamente 70 nucleótidos conocido como **pre-miRNA** ó precursor de mRNAs. El complejo microprocesador Drosha es

regulado por la propia actividad de Drosha, que puede cortar a DGCR8 desestabilizando de esta manera al complejo, siendo un mecanismo que controla la producción de miRNAs ¹⁶.

Los pre-miRNAs son exportados del núcleo al citosol por el complejo exportina-5/Ran-GTP. En el citosol, los pre-miRNAs se asocian con otro complejo procesador conocido como RISC (del inglés RNA-induced silencing complex) que está constituido por: Dicer (enzima RNAsa III), TRBP (TAR RNA-binding protein), Ago2 (Proteína Argonauta 2) y proteínas adicionales como FMRP (del inglés fragile-X-mental-retardation protein), GW182 (marcador de cuerpo-p) y RCK/p54 (activador de de-CAP5). La actividad de este complejo libera a una molécula de RNA de doble cadena (constituida por las cadenas miR-5p y miR-3p) que mide aproximadamente 22 nucleótidos ¹⁶.

Inicialmente se pensaba que, de esta molécula de doble cadena únicamente la hebra guía (que es termodinámicamente menos estable) permanecía en el complejo de silenciamiento miRISC para ejercer su función regulatoria, mientras que la hebra pasajera se enviaba a degradación. Sin embargo, hoy se sabe que ambas hebras pueden ser funcionales al ser asociadas con diferentes tipos de proteínas Ago (Ago1,3 y 4/EiF2C) junto con AGO2 que es la única con actividad de RNAsa H. ^{17,18}.

En la Figura 2 presento un esquema general del proceso canónico de síntesis de miRNAs. Cabe mencionar que adicionalmente, se han descrito mecanismos alternos también conocidos como biogénesis no canónica, los cuales no son explicados en esta tesis.

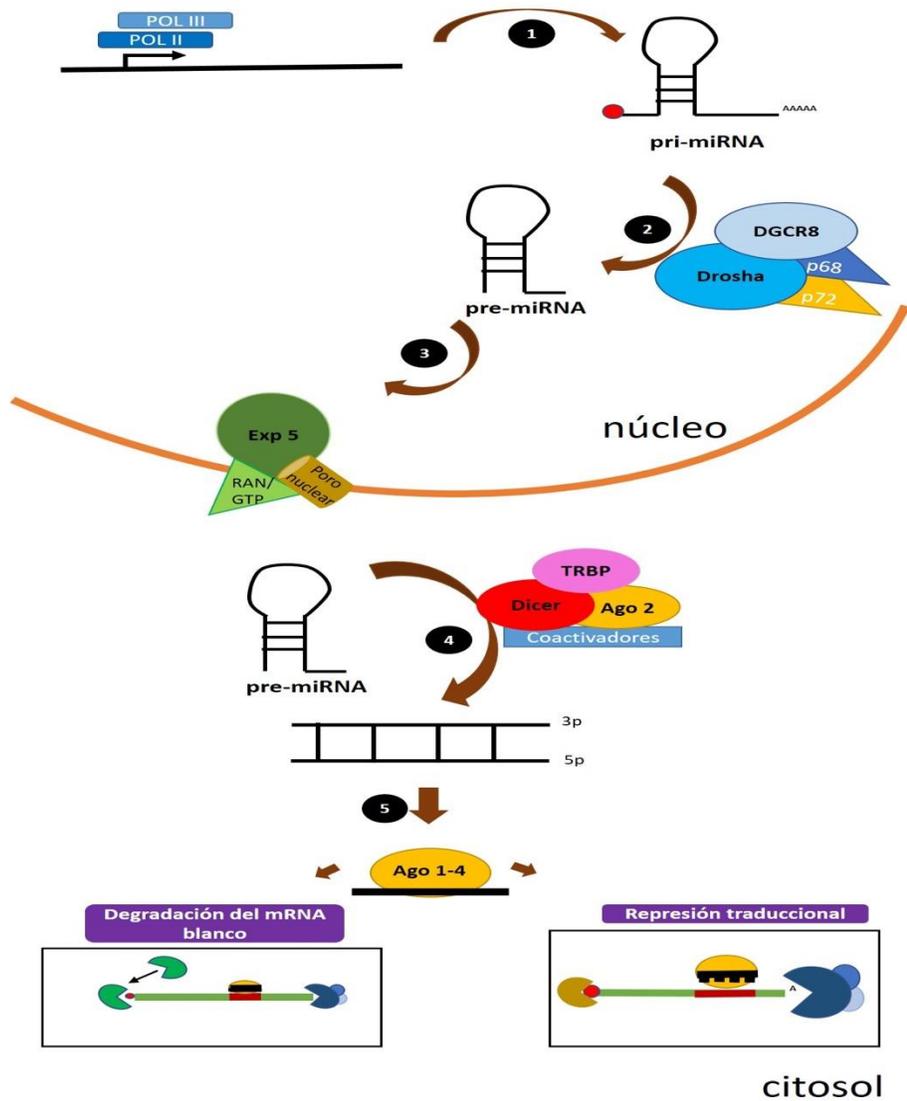


Figura 2. Biogénesis canónica de un miRNA.

1. Los genes de miRNAs se transcriben por la RNA Polimerasa II generalmente. Los transcritos generados se conocen como pri-miRNAs, (80-100 nucleótidos). 2. Los pri-miRNAs son reconocidos por el complejo microprocesador Drosha, que genera un transcrito de 70 nucleótidos llamado pre-miRNA. 3. Los pre-miRNAs se exportan al citosol por el complejo Exportina/RAN-GTP. 4. El complejo RISC se asocia a los pre-miRNAs y genera una molécula de RNA de doble cadena que mide 10-22 nucleótidos. 5. Una de las cadenas se mantiene en el complejo para llevar a cabo su función regulatoria sobre sus mRNAs blanco.

Regulación mediada por miRNAs

La manera en que los miRNAs reconocen a sus RNAs mensajeros (mRNAs) blanco es mediante complementariedad de bases entre dos regiones: la región semilla del miRNA, que son 2-8 nucleótidos en la región 5' del miRNA maduro y la región blanco del mRNA que puede localizarse en el 3'UTR, el 5'UTR y/o la región codificante (CDS) del mensajero ¹⁴. Un solo miRNA puede unirse a diferentes regiones de su mensajero blanco y también diferentes miRNAs pueden regular al mismo tiempo a un solo mRNA ^{16,19}, como se esquematiza en la Figura 3.

Además, mediante análisis bioinformáticos que predicen blancos de miRNAs al identificar secuencias complementarias a las regiones semillas de los miRNAs, se sabe que un solo miRNA puede regular a múltiples blancos, por lo que se estima que una tercera parte de los genes codificantes están bajo el control de estas pequeñas moléculas reguladoras, que tienen influencia en múltiples vías de señalización regulando procesos biológicos importantes como la diferenciación celular, el crecimiento y proliferación, la muerte celular y las vías metabólicas ¹⁶.

Los miRNAs inhiben la función de sus mRNAs blanco, el mecanismo mediante el cual ocurre esta regulación depende de cómo sea la complementariedad de bases entre la región semilla del miRNA y la región blanco del mRNA. Si la complementariedad es perfecta los mensajeros pierden estabilidad y se envían a degradación, pero si la complementariedad es imperfecta, como ocurre en la mayoría de los casos, los miRNAs disminuyen la expresión de su blanco al afectar el proceso de traducción ²⁰

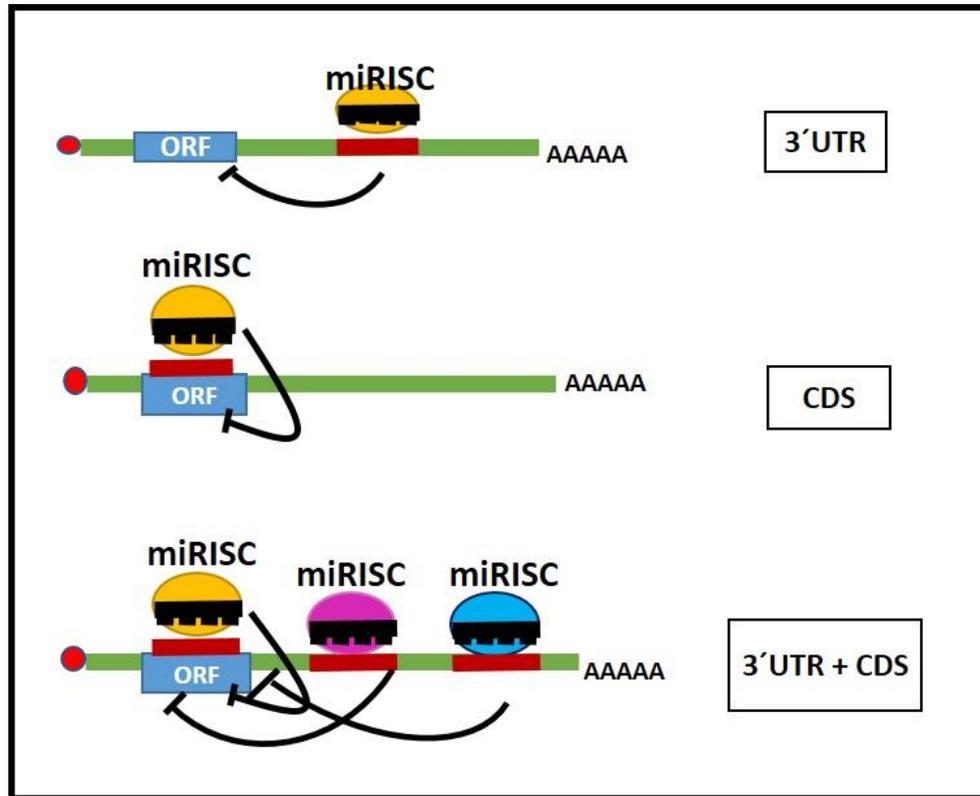


Figura 3. Sitios de reconocimiento entre miRNAs y mRNAs. (Modificado de ¹⁶)

La mayoría de los miRNAs reconocen a sus blancos por complementariedad de bases con regiones cercanas al 3'UTR de los mRNAs, sin embargo, existen ejemplos de regiones de reconocimiento de miRNAs que se localizan en las regiones codificantes (CDS) y en regiones cercanas al 5'UTR del mRNA blanco. Además, múltiples miRNAs pueden actuar sobre un mismo mensajero blanco.

La degradación del mRNA ocurre mediante la actividad endonucleasa de Ago2 y el reclutamiento de factores y enzimas necesarias para promover la deadenilación y el “decapping” del mRNA para su posterior degradación. Como se observa en la Figura 4A, el proceso de deadenilación requiere de la interacción entre las proteínas GW182, PABP (del inglés Poly (A)-binding protein), el complejo de deadenilación CCR4-NOT1 y el complejo miRISC. Después de este proceso, la caperuza 5´del mRNA es removida por el complejo de “decapping” DCP1/DCP2 ²⁰.

La represión traduccional mediada por miRNAs puede ocurrir en las tres etapas del proceso de traducción: iniciación, elongación y terminación, esto depende de las proteínas asociadas a AGO2 en el complejo miRISC. Como se esquematiza en la Figura 4B, durante la etapa de iniciación el complejo miRISC evita la circularización del mRNA e inhibe la formación del complejo ribosomal 80s. En las etapas post-iniciación, miRISC promueve cambios en la velocidad de elongación, una disociación ribosomal prematura y genera una terminación temprana guiando a la degradación cotraduccional de la proteína naciente ^{21,22}.

Recientemente se han descrito miRNAs que pueden actuar en el núcleo uniéndose a regiones promotoras de genes y promoviendo su activación transcripcional. Por ejemplo, miR-373 se asocia a regiones promotoras de los genes E-caderina y CSDC2 (del inglés cold shock domain-containing protein C2) resultando en un incremento en sus niveles de mRNA y proteína. Esta actividad de miR-373 es específica de ciertos tipos celulares, en células de próstata PC-3 modifica la expresión de ambos genes, pero en células de colon HCT-116 sólo induce la expresión de CSDC2 pero no la de E-caderina lo que indica que para que este miRNA actúe como activador transcripcional requiere de cofactores adicionales o de cambios epigenéticos en la cromatina como la metilación o acetilación ¹⁶. Otros miRNAs como let-7i,

miR-138, miR-92a y miR-181 pueden activar la transcripción de genes al interactuar con promotores tipo TATA ²³.

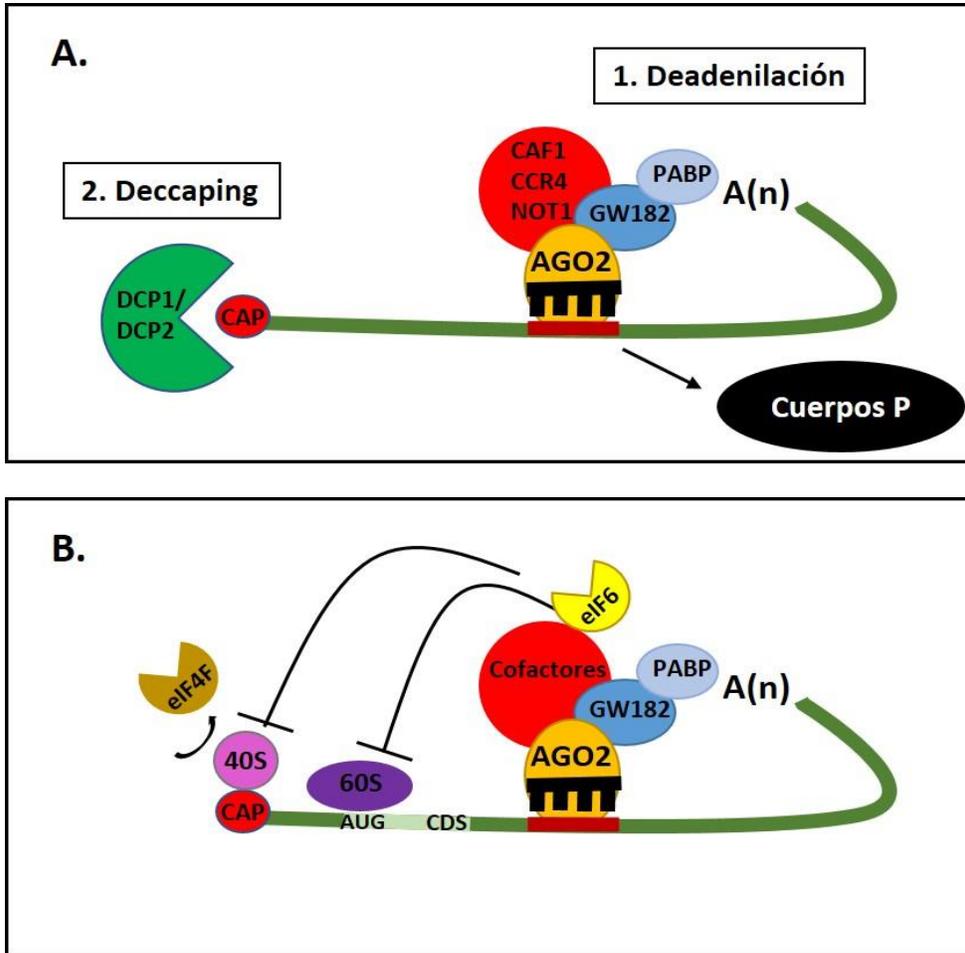


Figura 4. Mecanismos de regulación negativa mediada por miRNAs. (Modificado de ²⁰)

A. Degradación del mRNA. Primero ocurre la deadenilación mediada por la interacción entre miRISC, el complejo CCR4-NOT1 y la proteína PABP. Posteriormente, el complejo DCP1-DCP2 remueve el CAP 5', con estas señales los mRNAs se envían a los cuerpos P para su degradación. B La etapa de iniciación del proceso traduccional se inhibe cuando miRISC compete con eIF4F y evita el reconocimiento del CAP 5', necesario para el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, además la asociación de miRISC con la proteína eIF6 inhibe el reclutamiento de la subunidad ribosomal 60S evitando así el ensamblaje ribosomal necesario para la síntesis de proteínas.

microRNAs en Cáncer de Mama.

Cambios en la expresión de los miRNAs están estrechamente asociados con el desarrollo de distintas patologías. Hasta ahora, los estudios los han relacionado con enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, neurodegenerativas y principalmente con el desarrollo de cáncer ¹⁷.

Por su implicación en el proceso tumorigénico, grupos de genes de miRNAs han sido clasificados como oncogenes (oncomiRs) o como supresores tumorales. Los primeros, se encuentran en regiones cromosómicas que sufren amplificaciones que resultan en una elevada expresión del oncomiR, algunos ejemplos son miR-10b, miR-21 y miR-155. La actividad oncogénica de estos miRNAs ocurre al inhibir la expresión de genes supresores tumorales y activar, indirectamente, la expresión de factores oncogénicos ²⁴.

Por otro lado, los genes de miRNAs supresores se encuentran en regiones genómicas frágiles que sufren deleciones o mutaciones que derivan en una baja expresión del miRNA, por ejemplo, miR-125b, miR-200 y miR-31. Una baja expresión de estos miRNAs resulta en una elevada expresión de factores oncogénicos ²⁴.

En 2005 se reportó por primera vez un cambio en la expresión de miRNAs en CaMa, en donde los niveles de expresión de miR-125b y miR-145 (supresores tumorales) se encontraron disminuidos y los niveles de expresión de miR-10b, miR-21 y miR-155 (oncomiRs) sobreexpresados vs tejido normal ²⁵. Desde entonces, diversos grupos de investigación han reportado que, en CaMa, estas moléculas se asocian con la adquisición de prácticamente todas las características esenciales del cáncer (hallmarks) descritas previamente. En la Tabla 3 y la Figura 5 muestro algunos ejemplos de estos miRNAs y su participación en el proceso tumorigénico durante las etapas de iniciación, promoción y progresión en este tipo de cáncer.

Tabla 3. miRNAs implicados en la adquisición de características tumorales en cáncer de mama. (Mandujano-Tinoco. Revisión no publicada)

Característica tumoral	miRNA	Expresión en CaMa	Función	mRNA blanco	Ref.
Señales de proliferación. Evasión a supresores de crecimiento. Resistencia a muerte celular.	miR-191/425	↑	Resistencia a la privación de hormonas en células ERα ⁺ .	EGR1	26
	miR-221/222	↑	Regulación de la transición G1/S. Regulación post-transcripcional de señales de crecimiento.	SOCS1 CDKN1B STAT5A P27Kip	27, 28, 29
	miR-497	↓	Inhibición del crecimiento celular y arresto del ciclo celular en G1.	Ciclina E1 Bcl-w	30
	miR-26b miR-107	↓	Regulación del ciclo celular y formación de colonias.	CDK8	31
	miR-26a	↓	Regulación del ciclo celular y apoptosis.	MCL-1	32
Invasión y metastasis.	miR-221/222	↑ ó ↓ dependiendo del subtipo	Adquisición del fenotipo EMT e invasivo.	ADIPOR1 TRPS1 B-Integrina ADAM-17	28, 33, 34
	miR-29	↑	Adquisición del fenotipo EMT.	NIM	35
	miR-30c	↑	Induce migración e invasion.	NOV/CCN3	36
	miR-143/145	↓	Sobreexpresión de receptores asociados con metástasis.	ERBB3	37
	miR-27a	↑	Diferenciación de células stem a células endoteliales a través de la activación de VEGF.	ZBTB10	38

Angiogénesis	miR-542-3p	↑ ó ↓ dependiendo del subtipo	miRNA antiangiogénico	Ang2's	39
	miR-200	↑ Luminal ↓ Basal	miRNA antiangiogénico en fenotipo luminal.	IL8 CXCL1	40
	miR-155	↑	Disminución de supresores tumoraes.	VHL	41
Inmortalidad replicativa	miR-138-5p miR-133a miR-9-5p let-7g	↓	Regulación de la expresión de la telomerasa.	h-TERT	42
	miR-155	↑	Incremento en el consumo de glucosa y la producción de lactato. Sobreexpresión de HKII.	C/EBPβ	43
Metabolismo energético	miR-378*	↑	Disminución de los niveles de mRNAs de diferentes enzimas del ciclo de krebs.	ERRγ GABPA	44
	miR-210	↑	Disminuye la actividad del complejo respiratoio mitocondrial I.	ISCU	45
	miR-373 miR-10b	↑	Media la respuesta inmune en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	MiCB	46, 47
Inestabilidad genómica y mutaciones	miR-155 miR-182 miR-193b miR-1255b	↑	Defectos en los sistemas de reparación de DNA y de control de ciclo celular.	TERF1 BRCA1	48
Inflamación sostenida	miR-146b	↓	Activación sostenida de las STAT.	NFKB	49

Además, diversos estudios han demostrado que el uso de miRNAs como biomarcadores pronóstico y/o de clasificación representa ciertas ventajas ya que: 1) pueden ser detectados mediante técnicas no invasivas en muestras de suero, sangre o leche materna, 2) son resistentes a la degradación y pueden preservarse hasta 10 años en muestras de tejido de pacientes, 3) pueden ser detectadas en sangre en etapas muy tempranas de la enfermedad y 4) el proceso de aislamiento y detección es fácil y rápido ^{50,51}.

En este contexto, diversos grupos de investigación han propuesto firmas de miRNAs capaces de discriminar entre grupos de pacientes sanos y grupos de pacientes con CaMa en las primeras etapas o bien grupos de pacientes en diferentes etapas de agresividad. Un ejemplo de estas firmas de miRNAs es: sobreexpresión de miR-18a, miR-133a, miR-155 y disminución de miR-145, miR-365 y miR-143 ²⁴.

Asimismo, ciertos perfiles de expresión de miRNAs han sido propuestos como una herramienta de clasificación del CaMa en los distintos subgrupos moleculares. Algunos ejemplos de estos miRNAs son let-7c, miR-10a y let-7f (subtipo luminal A); miR-18a, miR-135b, miR-93 y miR-155 (subtipo basal); miR-142-3p y miR-150 (subtipo Her2+) ²⁴.

Finalmente, los miRNAs también son moléculas atractivas para el diseño de terapias dirigidas contra el CaMa ya que pueden: 1) antagonizar, por complementariedad, el efecto de la sobreexpresión de miRNAs oncogénicos y evitar que interactúen con sus mRNAs blanco, o bien 2) disminuir el efecto de miRNAs cuyos mRNAs blanco son supresores tumorales ^{50,52}. Sin embargo, se requieren más estudios que evalúen los efectos adversos que conllevaría el uso de este tipo de terapias sobre la fisiología celular y más aún sobre la fisiología de un organismo entero.

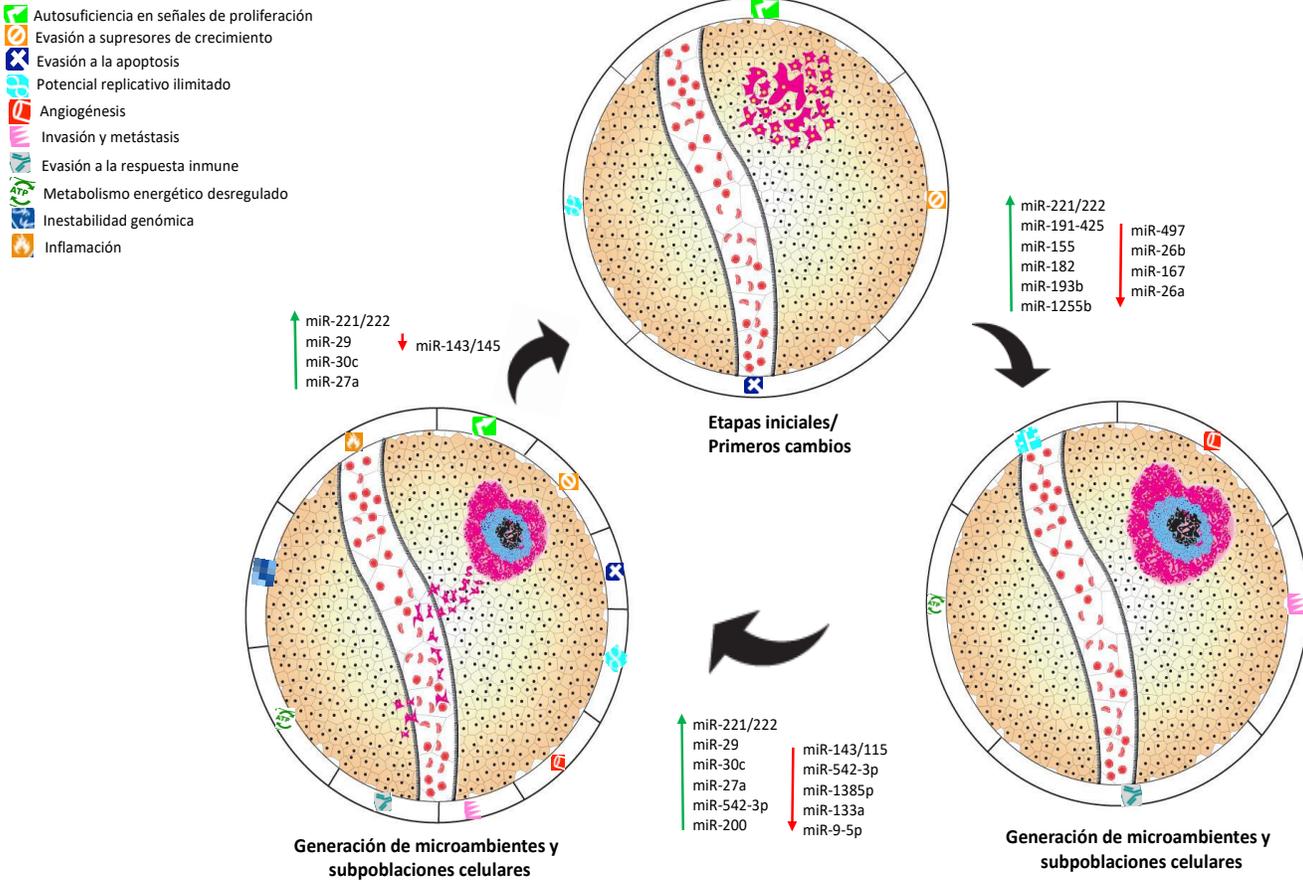


Figura 5. Expresión de miRNAs durante el proceso tumorigénico en CaMa y su participación en la adquisición de las características tumorales. (Mandujano-Tinoco. Revisión no publicada).

1.4 El modelo de los esferoides tumorales multicelulares (MCTS).

En 1970 Sutherland ⁵³ y colaboradores desarrollaron, utilizando células tumorales humanas, el modelo *in vitro* de los esferoides tumorales multicelulares (MCTS por sus siglas en inglés) para evaluar la capacidad de penetración de fármacos antineoplásicos. Los MCTS representan un modelo de mayor complejidad que los cultivos bidimensionales ya que poseen características histomorfológicas, bioquímicas, funcionales y microambientales que mimetizan los estados iniciales de formación de un tumor sólido *in vivo* no vascularizado.

Los MCTS son agregados de células tumorales que adquieren una configuración espacial tridimensional (3D) que se caracterizan por presentar una morfología esférica bien definida y por la capacidad de mantenerse como cultivos en suspensión. La organización espacial de los esferoides se basa en la generación de uniones estrechas, comunicantes y desmosomas entre las células, E-caderina y un aumento de matriz extracelular ⁵⁴.

El principio básico de generación de MCTS se basa en que las fuerzas de adhesión célula-célula sean mayores que las fuerzas de adhesión célula-superficie, para ello la técnica de cultivo más empleada es la del "líquido sobrelapante", en la que las células se siembran con medio tradicional suplementado con bajos porcentajes de Suero Fetal Bovino (SFB) en placas de cultivo cubiertas con una superficie antiadherente como agar, agarosa, polyHEMA o en placas de poliestireno que tiene propiedades de muy baja adhesión. Para mantener las condiciones de no adhesión y promover la formación de una estructura esférica los cultivos se incuban en condiciones de agitación orbital suave (Figura 6) ^{55,56}.

Dependiendo de la línea celular, los MCTS pueden crecer hasta los 5 mm de diámetro. En MCTS con diámetros $\geq 400 \mu\text{m}$ se desarrolla una característica muy importante de este modelo que es la heterogeneidad celular (Tabla 4) la cual está estrechamente asociada a la

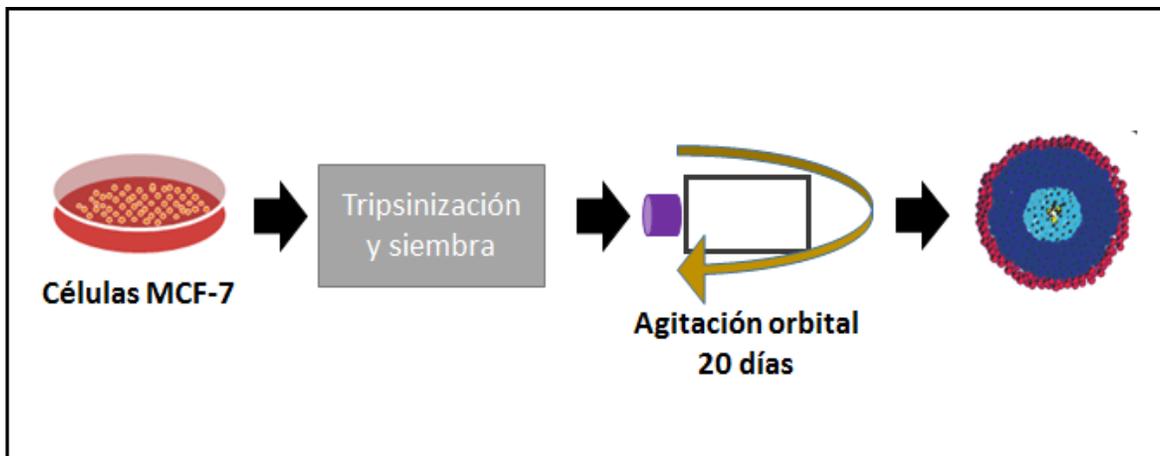


Figura 6. Generación de MCTS mediante una técnica modificada del “líquido sobrelapante”.

generación de gradientes de nutrientes y oxígeno (Tabla 4) que son decrecientes hacia el interior del esferoide, de esta manera el modelo de los MCTS simula a las poblaciones tumorales más cercanas a los vasos sanguíneos (normóxicas) y a las más alejadas de ellos (hipóxicas), como se esquematiza en la Figura 7 ⁵⁶.

Cabe mencionar que a pesar de que los tumores presentan una activa generación de vasos sanguíneos *de novo*, estos vasos son caóticos y frágiles por lo que la irrigación sanguínea no es suficiente para todas las células de un tumor en crecimiento y es por ello que en tumores *in vivo* se reportan zonas de hipoxia ($pO_2 < 7 \text{ mmHg}$ ò $< 100 \text{ Mm O}_2$) ⁵⁷ e hipoglucemia ($< 5 \text{ mM}$ de glucosa) ⁵⁸. Está ampliamente reportado que la hipoxia promueve modificaciones en la expresión génica por lo que se le asocia con la adquisición de fenotipos de mayor agresividad tumoral ⁵⁷, por ejemplo, aquellos relacionados con la generación de poblaciones celulares quiescentes que presentan multiresistencia adquirida a fármacos ó células troncales capaces de regenerar un tumor ⁵⁹.

Debido a que el desarrollo de subpoblaciones celulares y gradientes de oxígeno y nutrientes se ha relacionado estrechamente con la adquisición de características de mayor agresividad tumoral, el modelo de los MCTS se ha utilizado ampliamente para el estudio de

las uniones célula-célula, la quimioresistencia adquirida, procesos de metástasis y fenotipo de transición epitelio-mesénquima (EMT), fenotipo quiescente, fenotipo troncal, metabolismo energético entre otros. Todos estos procesos han presentado respuestas diferentes en los esferoides cuando se compara con las mismas células, pero cultivadas en monocapa ⁶⁰. Así, mediante análisis de expresión génica, miRNAs y perfiles metabólicos de agregados tumorales 3D se ha demostrado que estos presentan un genotipo significativamente más parecido a los tumores *in vivo* que los modelos bidimensionales ⁶¹.

Además, la dinámica de crecimiento de los MCTS reproduce la de los tumores sólidos *in vivo*, que se caracteriza por una fase inicial de crecimiento exponencial seguida por un periodo de crecimiento lento asociado a una baja tasa de proliferación y necrosis, finalmente se presenta una fase de meseta en donde los esferoides mantienen su estructura y tamaño hasta que las masas celulares comienzan a disgregarse y/o morir ⁶⁰.

Tabla 4. Heterogeneidad celular y microambiental generada en MCTS.

Subpoblaciones celulares	Distancia de la periferia (µm)	Volumen que ocupa (%)	Condiciones microambientales			Características	Ref .
			O ₂ (µM)	pH	Glucosa (µmol/g)		
Externa/ Proliferativa	0-50	5-10	100	7.3	>21	-Positividad al marcador de proliferación Ki67 -Alta capacidad metastásica.	
Intermedia/ Quiescente	≥150	25-45	13-80	7.1	12-21	-Positividad al marcador de quiescencia p27 -Tendencia a diferenciarse. -Baja capacidad metabólica. Estabilización de HIF1-α	53, 62, 63
Centro necrótico	≥400	50-70	1-7.5	6.9	<12	-Células en proceso de necrosis.	

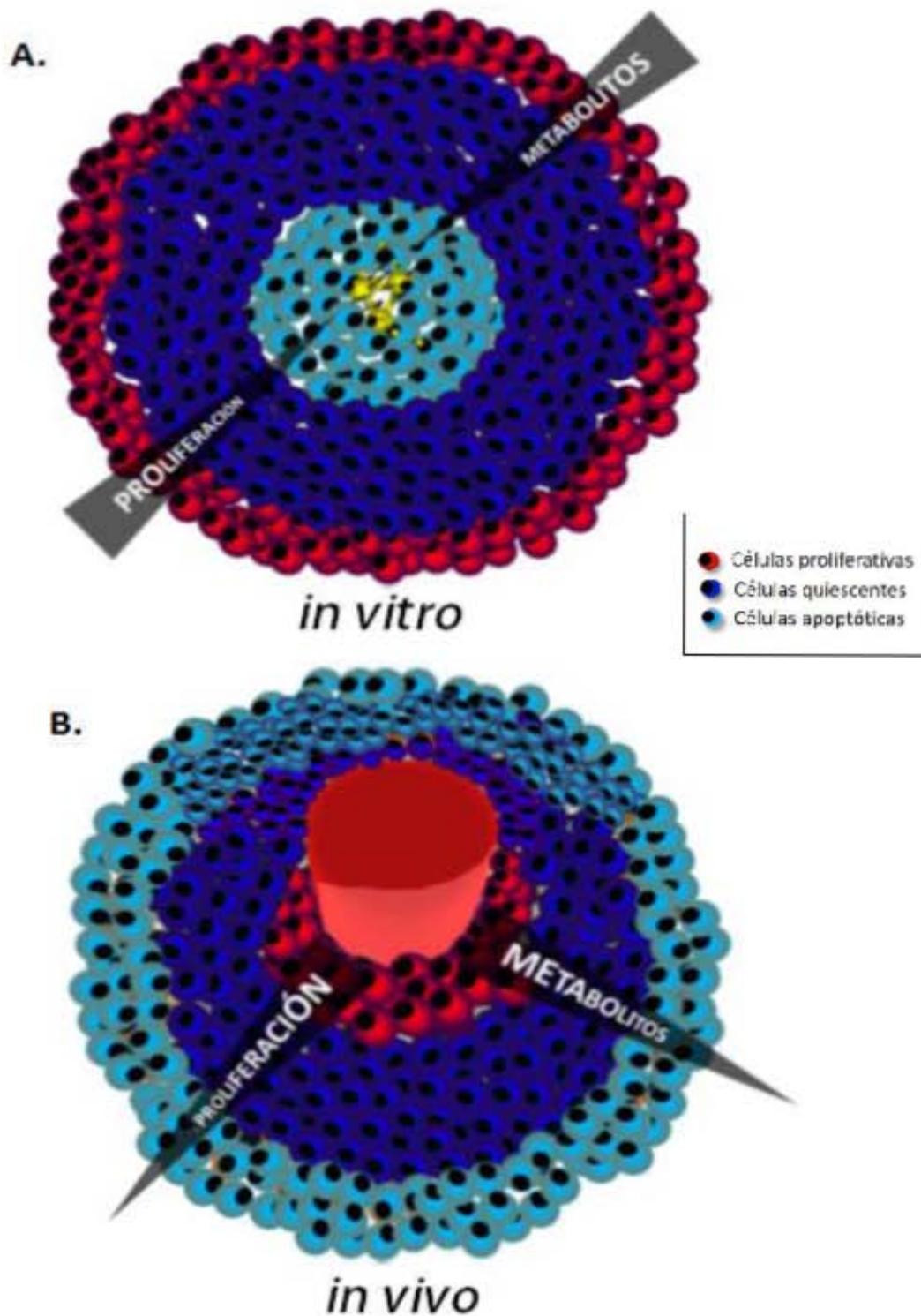


Figura 7. A) Modelo de un MCTS de tiempos largos de cultivo y B) Simulación de las características que mimetiza un MCTS en un tumor *in vivo*.

De esta manera, la biología de los MCTS nos permite indagar en las brechas o “gaps” que existen entre los estudios sobre cáncer que se realizan en cultivos bidimensionales o en monocapa y aquellos que se escalan a modelos animales. Los MCTS representan una buena herramienta para estudiar los procesos moleculares que se modifican con la heterogeneidad celular/microambiental, esta característica finalmente es un reto para el diseño de estrategias terapéuticas exitosas en el tratamiento del cáncer.

Finalmente, es importante mencionar que a pesar de las ventajas que confiere el trabajar con los MCTS, éstos no dejan de ser un modelo *in vitro* que presenta distintas limitaciones y no es posible con ellos recrear todas las características que presenta un tumor *in vivo*. En la Tabla 5 muestro una comparación de las características que desarrollan los cultivos tumorales 2D, 3D y los tumores *in vivo*.

1.5 Análisis de expresión de microRNAs en esferoides tumorales multicelulares.

Hasta la fecha, existen tres estudios que analizan la expresión de miRNAs en cultivos tridimensionales de células tumorales mamarias. En dichos estudios utilizaron pasajes seriales de células cultivadas en forma de esferoides como herramienta para enriquecer a la población de células troncales (CSCs) y estudiar por tanto procesos moleculares (incluidos los miRNAs) implicados en la adquisición del fenotipo de troncalidad.

En uno de estos trabajos, se reportó que 17 miRNAs (Tabla 6) modifican significativamente sus niveles de expresión en células provenientes de muestras de pacientes con carcinomas mamarios ductales infiltrantes cuando se cultivan de manera 3D y los porcentajes de CSCs son elevados en comparación con células de las mismas muestras

Tabla 5. Características que presentan los modelos bidimensionales (2D monocultivo), los MCTS (3D monocultivo) y los tumores *in vivo*.

Característica	2D monocultivo	3D MCTS monocultivo	Tumores <i>in vivo</i>	Ref.
Contacto intercelular	Células adheridas a un sustrato artificial y en contacto con otras células únicamente en la periferia	Estructura tridimensional que permite interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular	Estructura multidimensional dinámica que permite interacciones entre células de diferentes estirpes.	64
Microambiente	Uniforme: carece de gradientes de oxígeno, nutrientes y desechos celulares.	Gradientes bidireccionales de oxígeno, nutrientes y desechos celulares.	Gradientes dinámicos de oxígeno y nutrientes debido a la generación de nueva vasculatura.	65
Poblaciones celulares tumorales.	Homogénea: células con una tasa de proliferación rápida.	Heterogénea: Células con tasa lenta de proliferación, células quiescentes y células apoptóticas.	Altamente heterogénea: La proporción de células proliferativas, quiescentes y apoptóticas es dinámica. Además, existen poblaciones heterogéneas en mutaciones y aberraciones epigenéticas.	66
Infiltración de células no tumorales	Carecen	Carecen	Células mesenquimales asociadas al tumor: fibroblastos, macrófagos, adipocitos, células endoteliales.	67
Crecimiento	Exponencial Tiempos cortos de cultivo	Dinámico avascular Fase de crecimiento lento – fase exponencial—meseta—muerte	Dinámico Avascular – Dinámico Vascular	68
Composición de la Matriz Extracelular	Fibronectina Ácido hialurónico	Fibronectina, laminina, Colágena I, III, IV, Ácido hialurónico, Sulfato de condroitina	Fibronectina, laminina, colágena I, III, IV, fibrilina, fibulina, elastina, vitronectina, Ácido hialurónico, Sulfato de condroitina, enzimas remodeladoras (MMP´s y catepsinas), proteínas	69,70

					matricelulares (Tenascina C, osteopontina, periostina, trombospodina)		
Interacciones intercelulares	Autócrina	Autócrina y Paracrina entre poblaciones tumorales.	Autócrina y Paracrina entre poblaciones tumorales y entre tumor-mesénquima			64	
Vías de señalización	Activación constitutiva de AKT/mTOR/S6K Mayor plasticidad en vías de señalización	La actividad de la vía de AKT/mTOR/S6K disminuye en zonas internas del esferoide. Menor plasticidad en vías de señalización	La actividad de la vía de AKT/mTOR/S6K disminuye en zonas distantes a la vasculatura.			71	
Ejemplos de expresión génica	- PTEN FGF	+ IL8 CXCL1 VEGF	--- PTEN FGF NIL	+++ AKT, VEGF, VGFR, EGFR, IL8, ERK, LKB1, pAKT, MMP9, CXCL1	--- PTEN NIL LKB1	+++ AKT, VEGF, VGFR, EGFR, IL8, ERK, pAKT, MMP9, CXCL1	61

cultivadas en condiciones adherentes. Mediante análisis computacionales, en este estudio encontraron que 47 mRNAs blanco de los miRNAs miR-145-5p y miR-543-5p están implicados en las cascadas de señalización de TGF β , MAPK y Wnt, sugiriendo que los cambios en la expresión de miRNAs están asociados a la adquisición del fenotipo de troncalidad de las células tumorales ⁷².

En el mismo año, 2012, el grupo de Gutilla publicó que en un modelo 3D de MCF-7 enriquecido de CSCs mediante pasajes seriales, 12 miRNAs asociados con la adquisición del

fenotipo de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Tabla 6) modificaron su expresión. Además, en este reporte se encontró que inhibir particularmente la función de miR-221-5p resulta en una reexpresión del receptor de estrógenos ER α cuya pérdida se asocia con el fenotipo EMT ⁷³.

Finalmente, en 2016 se realizó un análisis del transcriptoma de miRNAs en esferoides de MCF-7 enriquecidos con CSCs, en donde se encontraron 134 miRNAs (top ten Tabla 6) diferencialmente expresados en comparación con las células parentales, de los cuales 25 se sobreexpresan y 109 disminuyen su expresión. Mediante análisis de ontología, este grupo encontró que los cambios encontrados pueden estar asociados con la regulación de vías de señalización implicadas en procesos de autorenovación y quimioresistencia en las células MCF-7 cultivadas de esta manera ⁷⁴.

Sin embargo, hasta ahora no existen reportes de perfiles de expresión de miRNAs en esferoides de tiempos largos de cultivo, en donde se desarrollan características de heterogeneidad celular y microambiental que están asociadas con agresividad tumoral, como se ha descrito previamente. En este sentido, en nuestro grupo de investigación se han realizado análisis de secuenciación masiva de esferoides de 20 días de cultivo de la línea celular MCF-7. Los resultados han demostrado que modificaciones importantes en los niveles de expresión de 633 mRNAs y 458 largos no codificantes (lnc-RNAs) pueden estar implicados en la adquisición de diversas características tumorales en los MCTS. Además, en estos análisis se encontraron cambios en siete precursores de miRNAs, lo que sugiere que el cultivo tridimensional puede inducir también cambios en la expresión de miRNAs ^{75,76}.

Desafortunadamente, la técnica de extracción de RNA que se utilizó para los estudios antes mencionados no permitía precipitar RNAs pequeños, por lo que en el presente trabajo

analizamos la expresión de miRNAs en MCTS de MCF-7 de 20 días de cultivo mediante la técnica de microarreglos. Una vez que identificamos los cambios en la expresión de miRNAs entre MCTS y cultivos en monocapa, estudiamos las vías moleculares asociadas a dichos cambios. Además, analizamos más detalladamente los posibles roles biológicos de dos miRNAs, miR-221-3p y miR-187-3p, encontrando que su desregulación participa de manera importante en la adquisición del fenotipo quiescente, modificando las capacidades de migración/invasión de las células y la resistencia a privación de factores de crecimiento. Finalmente, el valor clínico-predictivo de estos miRNAs se analizó utilizando diferentes bases de datos de expresión de miRNAs en pacientes con CaMa.

Tabla 6. Cambios de expresión de microRNAs en células tumorales mamarias cultivadas de manera 3D.

Modelo 3D	microRNAs	Expresión	Funciones asociadas	Ref.
Mamosferas de células provenientes de 3 pacientes con carcinoma mamario ductal infiltrante.	miR-671-5p, miR-663-5p, miR-146a-5p, miR-1224-5p, miR-630-5p.	↑	Posiblemente con la adquisición del fenotipo de troncalidad.	72
	miR-335-3p, miR-143-5p, miR-140-5p, miR-335-5p, miR-143-3p, miR-140-3p, miR-145-3p, miR-181a-2-3p, miR-145-5p, miR-1-5p, miR-543-5p, miR-24-1-3p.	↓		
Mamosferas de MCF-7 de 5 semanas enriquecidas de CSCs mediante 5 pasajes seriales de 5 días.	miR-100-5p, miR-125b-5p, miR-130a-5p, miR-138-5p, miR-142-5p, miR-146a-5p, miR-222-5p, miR-29a-5p, miR-29b-5p.	↑	Inducción del fenotipo EMT y expresión del receptor de estrógenos Era.	73
	miR-200c-5p, miR-203-5p, miR-205-5p.	↓		
Esferoides de MCF-7 de 4 días de cultivo.	miR-4492-5p, miR-410-5p, miR-4532-5p, miR-381-5p, miR-127-5p, miR-411-5p, miR-1246-5p, miR-409-5p, miR-493-5p, miR-4508-5p.	↑	Vías de señalización que regulan la capacidad y quimioresistencia de las CSCs.	74
	miR-4448-3p, miR-221-5p, miR-27b-5p, miR-125b-1-5p, miR-760-5p, miR-1296-5p, miR-301a-5p, miR-365a-5p, miR-30c-1-5p, let-7-f-1-5p	↓		

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis

El crecimiento tridimensional y la heterogeneidad celular/microambiental de los MCTS de cáncer mamario induce cambios en la expresión de miRNAs (miRNAoma) como un mecanismo molecular asociado a la generación de distintos fenotipos celulares.

2.2 Objetivo general

Analizar los cambios de expresión de miRNAs en MCTS de la línea celular de cáncer mamario MCF-7 y establecer su asociación con la generación de distintos fenotipos celulares.

2.3 Objetivos particulares

1. Generar el cultivo de MCTS de MCF-7.
2. Caracterizar morfológicamente a los MCTS de MCF-7.
3. Determinar el patrón de expresión de miRNAs de células MCF-7 en monocapa y MCTS de MCF-7.
4. Realizar análisis computacionales para conocer las vías moleculares en las que participan los cambios en la expresión de miRNAs en los MCTS de MCF-7.
5. Estudiar el rol biológico de alguno miRNAs desregulados en los MCTS de MCF-7.
6. Establecer el potencial clínico-predictivo de los miRNAs desregulados en los MCTS de MCF-7.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Cultivo celular en monocapa. Las células humanas provenientes de carcinomas mamarios MCF-7, T47D and ZR75 fueron cultivadas en medio RPMI-1640, que contiene 25 mM glucosa, 2 mM L-glutamina y 1 mM piruvato de sodio, suplementado con 5-10% de suero fetal bovino (SFB). Las células MDA-MB-361, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HS-578T, MDA-MB-453 y SKBR3 se cultivaron en medio DMEM, que contiene 25 mM glucosa, 4 mM L-glutamina y 1 mM piruvato de sodio, suplementado con 10% de SFB. Las condiciones de incubación fueron 37° C/5% CO₂/ 95% aire.

3.2 Cultivo de MCF-7 MCTS. Los esferoides de la línea celular MCF-7 se crecieron utilizando una técnica modificada del “líquido sobrelapante”⁵⁵. Después del tercer pase de cultivo en monocapa, las células se tripsinizaron (0.025% Tripsina/ EDTA 1mM/PBS1x) durante 7 minutos a 37°C y se centrifugaron a 1200 rpm/5 minutos. Se sembraron 2x10⁶ células en frascos de 12.5 cm² para cultivos en suspensión en 4 ml de medio Leibovitz’s L-15 suplementado con 5% de SFB. Los cultivos se incubaron en condiciones de 37° C y agitación orbital suave de 59 rpm durante 20 días. Para remover detritos celulares y MCTS disgregados se realizó cambio de medio cada tercer día de cultivo. Para evaluar el tamaño de los MCTS, se tomaron muestras a distintos tiempos de cultivo (4, 8, 12, 16, 20 y 28 días) y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Una vez fijados, los dos diámetros ortogonales de aproximadamente 40 MCTS se midieron utilizando un microscopio invertido AXIO Scope A1 y el software AxioVision versión 4.8.2.0. El volumen de los MCTS se determinó utilizando la fórmula $v = (4/3\pi) r^3$.

3.3 Análisis inmunohistoquímico de los MCTS. Aproximadamente 40-60 MCTS de día 20 de cultivo fueron fijados con paraformaldehído al 4%, lavados con PBS 1X y embebidos en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes finos (2-5 μm) de los bloques. Para visualizar la estructura general de los MCTS se realizó una tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Para los análisis de marcadores de proliferación, quiescencia e hipoxia, los cortes se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en albúmina utilizando las siguientes diluciones: anti-Ki67 1:200; anti-p27Kip1 1:100 y anti-HIF1- α 1:100. La unión de estos anticuerpos fue visualizada con la técnica clásica del complejo avidina-biotina-peroxidasa.

3.4 Ensayo de formación de colonias en agar suave. Para evaluar la resistencia a cisplatino (CP) de MCF-7 MCTS de distintos días de cultivo (5, 10, 15, 20), los MCTS se incubaron con 3 ml de acutasa a 37°C/45 minutos/agitación orbital suave. Las células disgregadas se sembraron en frascos de cultivo en condiciones de 37° C/5% CO₂/ 95% aire. Después de 24 horas, los cultivos provenientes de los MCTS y células en monocapa (control) se trataron con 6 μM de CP durante 24 hrs. La tumorigenicidad *in vitro* se evaluó mediante el ensayo de formación de colonias. Para ello, 1×10^4 células se resuspendieron en agar 0.3% suplementado con medio y se sembraron sobre una superficie de agar 1% en placas de cultivo de 6 pozos. Las células se incubaron en condiciones de 37° C/5% CO₂ / 95% aire durante 4 semanas, posteriormente las colonias formadas se tiñeron con cristal violeta 0.01% y se contaron.

3.5 Extracción de RNA y análisis del perfil de expresión de miRNAs. El RNA total y los miRNAs fueron extraídos de cultivos de MCF-7 en monocapa y de MCF-7 MCTS de día 20, utilizando TRIzol y glucógeno libre de RNAsas como agente co-precipitante. Para el análisis de expresión de miRNAs se utilizó el microarreglo GeneChip® miRNA 2.0 de Affymetrix. Los datos del microarreglo se analizaron con el software Partek genomic suite.

3.6 Análisis de expresión de miRNAs por qRT-PCR. La transcripción reversa se realizó con 10 nanogramos de RNA utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription de Life technologies. Para la detección de los miRNAs se utilizaron las siguientes sondas Taqman: hsa-miR-187-3p (001193), hsa-miR-127-3p (000452), hsa-miR-10a-5p (000387), hsa-miR-221-3p (000524), hsa-miR-31-5p (002279) y has-miR-1290-5p (002863) (Life technologies, Carlsbad, California, USA). Los datos obtenidos de réplicas experimentales se normalizaron con la expresión de RNU48, que se utilizó como el control endógeno. Los valores de Ct se utilizaron para calcular el Δ Ct. Para calcular los cambios relativos en la expresión de miRNAs se utilizó el método del $2^{-\Delta\Delta}$ Ct. La expresión diferencial de un miRNA se definió en base a un valor de $p < 0.05$.

3.7 Análisis de expresión de mRNAs por qRT-PCR. La transcripción reversa se realizó con 1000 nanogramos de RNA con el kit Maxima first strand cDNA synthesis de Thermo Scientific. La amplificación del cDNA y su cuantificación se realizó utilizando el kit SYBR Green /Rox de Fermentas.

3.8 Análisis bioinformático. Para tener un panorama general de las vías de señalización más afectadas por los cambios de expresión en miRNAs y mRNAs, los datos de expresión de miRNAs y mRNAs se analizaron de manera conjunta o independiente en el software IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Asimismo, para predecir posibles vías celulares “blanco” de los miRNAs se utilizó el software miRTarVis.

3.9 Inhibición y sobreexpresión de microRNAs. Para las transfecciones transitorias se sembraron 1.6×10^5 células en placas de cultivo de 24 pozos y se incubaron en condiciones de $37^\circ \text{C} / 5\% \text{CO}_2 / 95\% \text{aire}$ toda la noche para permitir su adherencia. Las células se transfectaron utilizando el kit Xfect siRNA transfection de Clontech con 45 nM del Pre-miRNA

sintético para miR 187-3p ó del Anti-miRNA sintético para miR-221-3p durante 20 horas, posteriormente se incubaron con medio RPMI suplementado con 5%SFB durante 4 horas antes de cada experimento. Como controles negativos se utilizaron el antimiR #1 marcado con Cy3 y el premiR#1 marcado con Cy3 de Ambion.

3.10 Western Blot. La técnica de Western blot se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 8-12% en condiciones desnaturalizantes. Las diluciones utilizadas en la incubación con los anticuerpos fueron las siguientes: anti B-Raf 1:1000 (ab109688 Abcam; Cambridge, USA), anti Cyp1B1 1:1000 (sc-32882 Santa Cruz Biotechnology, USA), anti GAPDH 1:1000 (sc-25778 Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti lamin B1 1:1500 (ab16048 Abcam; Cambridge, USA).

3.11 Generación de hipoxia e hipoglucemia. Los cultivos en monocapa de células MCF-7 a una confluencia de 70-80% se incubaron durante 24 horas en una cámara de hipoxia, 13.7 Cu.Ft.388l de Shel Lab en condiciones de 95% N₂/5% CO₂/37°C para dar una concentración aproximada de 1% de O₂ atmosférico a la altura de la Ciudad de México (2,240 msnm) o con medio RPMI suplementado con 5% SFB y 2.5 mM de glucosa en condiciones de 37° C/5% CO₂/ 95% aire. Posteriormente, las células fueron colectadas y procesadas para la extracción de RNA.

3.12 Ensayos de migración. Células MCF-7 fueron transfectadas con el premiR, antimiR o ambos (cotransfección) como se ha descrito previamente. Para analizar el efecto de la transfección sobre la capacidad de migración de las células, éstas fueron incubadas toda la noche con medio RPMI sin SFB. Posteriormente, se sembraron 35,000 células en insertos con membrana de policarbonato de poro de 8µm en medio RPMI sin SFB que fueron colocados en placas de cultivo de 6.5 mm en medio RPMI suplementado con 15%SFB como quimio atrayente. Después de 24 horas de incubación en condiciones de 37° C/5% CO₂/ 95% aire,

las células que migraron fueron fijadas con paraformaldehído 4% y teñidas con cristal violeta 0.01% para su conteo.

3.13 Ensayos de resistencia a privación de SFB. Células en monocapa MCF-7 transfectadas como se ha descrito previamente, fueron incubadas con medio RPMI sin SFB durante 5 y 7 días en condiciones de 37° C/5% CO₂/ 95% aire en cajas de 24 pozos. Para su mantenimiento se realizó cambio de medio cada tercer día de cultivo. Como control se usaron células MCF-7 crecidas en medio RPMI suplementado con 5% SFB, 1% SFB y 0.1% SFB. Para determinar la viabilidad celular, se realizó el ensayo de MTS (CellTiter 96 AQueous Assay, Promega). Brevemente, la solución MTS/PMS se preparó en una dilución 2000:100 y de la mezcla se utilizaron 60 µl/pozo para cada condición. Las placas se incubaron durante hora y media en condiciones de 37° C/5% CO₂/ 95% aire cubiertas de la luz, posteriormente se transfirieron 100 µl (con 6 réplicas técnicas) provenientes de cada condición a placas de 96 y se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de ELISA.

3.14 Ensayo de degradación de gelatina. Células MCF-7 fueron transfectadas como se ha descrito previamente. Posteriormente, se sembraron 140,000 células de cada condición en cubreobjetos previamente recubiertos con 80 µl de gelatina fluorescente (FITC). Para determinar su capacidad de degradar la gelatina se incubaron durante 8 horas en condiciones de 37° C/5% CO₂/ 95% aire. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con tritón 100X 0.3%/90 segundos, fijadas con paraformaldehído 4%/15 minutos, neutralizadas con NH₄Cl 50 mM/10 minutos y teñidas con AlexaFluor-faloidina. Para la cuantificación de la degradación de gelatina se tomaron fotografías de cada condición en un microscopio Axio Imager M1 con el objetivo 40X, el índice de degradación se definió en base al área total de

degradación, que se midió utilizando el software Image J 1.42q, dividida entre el número total de células marcadas con faloidina.

3.15 Ensayos de proliferación celular. Células MCF-7 fueron transfectadas como se ha descrito previamente. Posteriormente, se sembraron 100,000 células de cada condición en placas de cultivo de 35 mm en medio RPMI suplementado con 5% SFB en condiciones de 37°C/5% CO₂/ 95% aire. Para determinar el tiempo de duplicación celular, las células viables de cada condición se contaron a las 24, 48 y 72 horas.

3.16 Ensayos de ciclo celular y apoptosis. Células MCF-7 fueron transfectadas como se ha descrito previamente. 48 horas después de la transfección, las fases del ciclo celular y el porcentaje de células apoptóticas se determinaron de manera paralela con el kit APO-BrdU TUNEL Assay kit. Brevemente, se fijaron 2x10⁶ células de cada condición con paraformaldehído 1% durante 15 minutos en hielo y se permeabilizaron con etanol 70% (v/v) durante 45 minutos a -20°C. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron con la solución que contiene la enzima TdT y el BrdUTP durante 60 minutos a 37°C. Las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo anti-BrdU marcado con Alexa Fluor 488 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se incubaron con la solución que contiene yoduro de propidio/RNasa A durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células teñidas se analizaron por citometría de flujo (FACS) en un citómetro Attune (Applied Biosystems, California, USA) registrando por lo menos 20000 eventos por muestra. Se realizó un “gate” para eliminar agregados y detritos celulares.

3.17 Separación de subpoblaciones celulares del MCTS por citometría de flujo.

Los MCTSs de día 20 se disgregaron como se ha descrito en secciones anteriores. Posteriormente, se fijaron 2x10⁶ células con PFA 4% durante diez minutos a temperatura

ambiente y se permeabilizaron con metanol frío a una concentración final del 90% durante treinta minutos en hielo. La tinción con el anticuerpo se realizó incubando las células en PBS con NaCl 2M y BSA 0.5% (buffer de bloqueo) durante diez minutos para mantener la integridad del RNA. La tinción con los anticuerpos primarios conjugados Ki-67 (Alexa® 488, 11882S, cell signaling technology, USA) y p27Kip1 (PE, 12184S, cell signaling technology, USA) se realizó durante una hora a temperatura ambiente en el buffer de bloqueo. Para la separación de las poblaciones celulares se utilizó un Citómetro FACS Aria. Las células se colectaron en PBS con NaCl 4M y 1% BSA para evitar la degradación del RNA. Finalmente, el RNA se extrajo utilizando el kit miRNeasy FFPE siguiendo las instrucciones del proveedor. Para todas las muestras, se utilizaron 240 µl de buffer PKD con el fin de evitar interferencia de remanentes de los buffers altos en sales que fueron previamente utilizados.

3.18 Separación de subpoblaciones celulares del MCTS por microdissección.

Los MCTSs de día 20 se lavaron en PBS, se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos y se embebieron en parafina. De los bloques obtenidos, se realizaron cortes de 10 micras que fueron montados en portaobjetos y después desparafinizados. Para separar las poblaciones celulares externas Ki67+ y las internas p27+, únicamente se microdissectaron cortes de esferoides con diámetros de 350-420 µm. Para la microdissección, estos cortes fueron seccionados de manera circular a una distancia de 45-50 µm de la periferia con un microdisector láser (P.A.L.M. Microlaser. Carl Zeiss MicroImaging. Bernreid, Germany, GmbH). Las condiciones utilizadas para el corte con el láser fueron las siguientes: Velocidad de 20, Energía de 68 y Foco de 83. Después del corte, las poblaciones externas e internas de 122 esferoides microdisectados se recolectaron manualmente, y el material obtenido se colectó en 500 µl de RNAlater. Finalmente, el RNA se extrajo utilizando el kit miRNeasy FFPE siguiendo las instrucciones del proveedor. Para todas las muestras, se utilizaron 240 µl de

buffer PKD con el fin de evitar interferencia de remanentes de los buffers altos en sales que fueron previamente utilizados.

3.19 Análisis del valor clínico-predictivo de los microRNAs desregulados en los MCTS.

Para evaluar el valor predictivo de los miRNAs cuya expresión se modificó en los MCTS de día 20 de cultivo utilizamos el software Survmicro (<http://guanlab.ccmb.med.umich.edu/mirmine/single.php?mirna=hsa-miR-187-3p&tissue=breast>). Survmicro utiliza los datos de expresión de miRNAs de 8 bases clínicas (miRmine human miRNA expression database) a nivel mundial y calcula el valor pronóstico que tienen firmas de miRNAs para predecir el desenlace clínico de pacientes con CaMa según análisis multivariados de índices de sobrevida.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Crecimiento y caracterización de los esferoides multicelulares tumorales (MCTS) de la línea celular MCF-7.

Las células MCF-7 se crecieron en 3D durante 20 días, tiempo en el cual los esferoides tumorales alcanzan un tamaño que propicia la formación de un microambiente con características semejantes a las que existen en los tumores sólidos, como son la heterogeneidad celular y los gradientes de nutrientes y oxígeno. En la Figura 8A se observa que los MCTS de MCF-7 presentan una fase de crecimiento lento en los primeros ocho días de cultivo, seguida por una fase exponencial en donde alcanzan su máximo crecimiento ($452 \pm 27 \mu\text{m}$ en diámetro y $4.9 \pm 0.8 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ en volumen) al día 20. Después de los 20 días se presenta una meseta de crecimiento, esta cinética de crecimiento se ha descrito anteriormente con esta línea celular y otras líneas celulares de diversos tipos de cáncer ⁷⁷.

Mediante ensayos de inmunohistoquímica realizados en cortes de esferoides de día 20 de cultivo corroboramos que los MCTS en esta etapa de crecimiento están constituidos por tres poblaciones celulares: 1) Externa positiva al marcador de proliferación Ki67 ($78 \pm 7\%$ vs. $39 \pm 25\%$ capas internas), 2) Interna positiva al marcador de quiescencia p27Kip1 ($66 \pm 15\%$ vs. $23 \pm 13\%$ capas externas) y al marcador de hipoxia HIF-1 α , preferencialmente observado en esta población ($68 \pm 19\%$ vs. $21 \pm 12\%$ capas externas) y 3) Centro hipóxico/necrótico que se observó con la tinción de hematoxilina/eosina (Figura 8B). Es importante mencionar que, para la obtención de estos resultados el conteo de positividad para cada marcador se realizó únicamente en los cortes con diámetros de 350-420 μm , ya que en cortes con diámetros menores se observa una alta positividad al marcador Ki67 sugiriendo que corresponden a

cortes superficiales del esferoide. En los cortes seleccionados, las capas externas e internas del esferoide se delimitaron de manera circular a una distancia de 45-50 μm de la periferia. Esta distancia se definió en función de la morfología celular observada con la tinción de hematoxilina/eosina y la tinción de Ki67, que delimita muy bien a una fracción proliferativa. Los porcentajes reportados se obtuvieron en base al conteo de las células totales y las células positivas en cada capa celular.

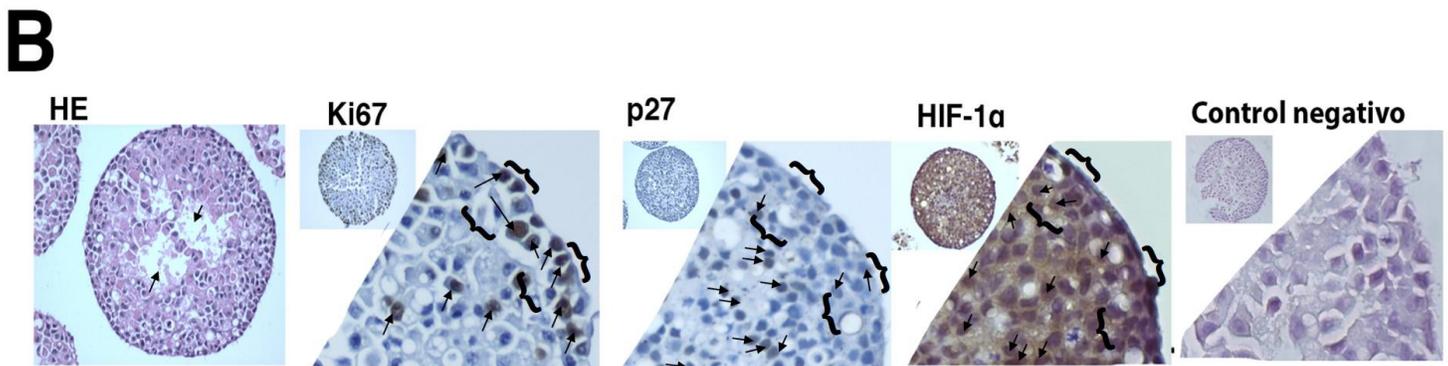
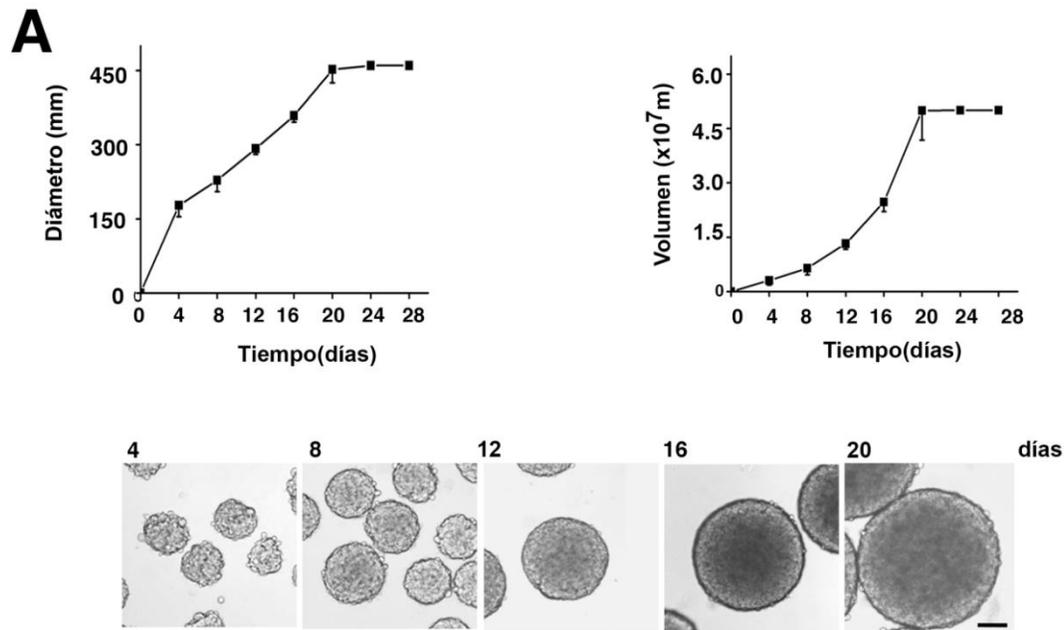


Figura 8. Curva de crecimiento de los MCTS de MCF-7.

A) Las gráficas muestran la cinética de crecimiento de los MCTS determinada a los 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de cultivo en diámetro (izquierda) y volumen (derecha) \pm D.E, $n = 3$, 40 esferoides cada uno. Las microfotografías (panel inferior) muestran la estructura de los MCTS en diferentes tiempos de cultivo, barra = 100 μ m. B) Imágenes representativas de cortes de MCTS de 20 días con diámetros >350 μ m teñidos con H&E e inmunohistoquímicas de Ki67, p27Kip1 y HIF-1 α . Los corchetes representan la delimitación de las capas externas e internas y las flechas las células positivas a cada marcador.

Como parte de la caracterización de nuestro modelo decidimos evaluar dos características tumorigénicas que las células tumorales adquieren cuando se crecen en cultivos tridimensionales, que son la quimioresistencia y la capacidad de migración de las células. Como se observa en la Figura 9A, los ensayos de crecimiento clonogénico mostraron que las células provenientes de los MCTS de 20 días son más resistentes al tratamiento con CP en comparación con las células provenientes de MCTS a otros tiempos de cultivo (5, 10 y 15 días) y con células en monocapa.

Así también, la Figura 9B muestra que las células provenientes de los MCTS de 20 días migran 2.6 veces más que las células en monocapa (133 ± 26 MCTS 20-días vs. 52 ± 25 monocapa).

Cabe aclarar que los cultivos en monocapa utilizados como control no se crecieron durante veinte días, debido a que el tiempo de duplicación de la línea celular MCF-7 es de 32-37 horas, lo que implicaba la realización de varias tripsinizaciones para mantener a los cultivos durante un periodo de 20 días. Por lo anterior, estos cultivos siempre se usaron a confluencias del 80% y con el mismo pase con el cual se inició el cultivo tridimensional.

Todos estos resultados sugieren que los MCTS de la línea celular MCF-7 de 20 días de cultivo son un modelo con características microambientales que confieren mayor agresividad tumoral y heterogeneidad de poblaciones celulares, lo que permiten mimetizar los primeros estadios de desarrollo de un tumor sólido (por las semejanzas que se muestran en la Tabla 5). Por lo anterior, el análisis de expresión de miRNAs se realizó en MCTS crecidos durante 20 días.

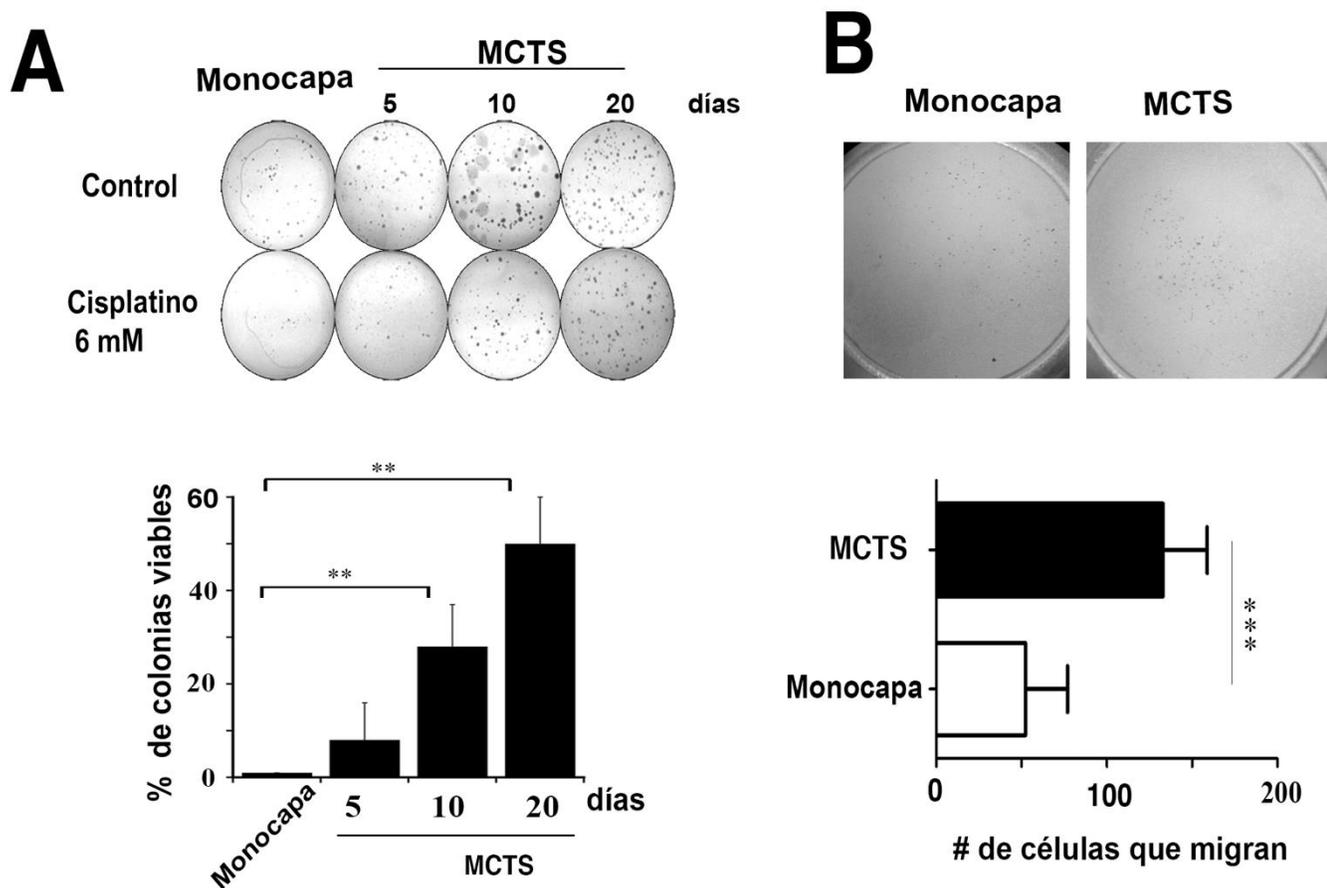


Figura 9. Caracterización de los MCTS de MCF-7.

A) Ensayos de clonogenicidad para la evaluación de la quimioresistencia de células provenientes de MCTS de diferentes días de cultivo y células en monocapa. Las células se expusieron a 6 μ M de CP durante 24 horas. B) Ensayos de migración de células provenientes de MCTS de diferentes días de cultivo y células en monocapa. Los datos representan el promedio \pm D.E, n = 3, **p \leq 0.01 para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas.

4.2 Perfil de expresión de microRNAs en MCTS- MCF-7 de 20 días de cultivo.

Para obtener más conocimiento sobre la biología de los MCTS, mediante ensayos de microarreglos, analizamos los cambios en la expresión global de miRNAs entre los cultivos de MCF-7 en monocapa y las mismas células crecidas de manera tridimensional. En este estudio, decidimos utilizar como control a los cultivos 2D ya que una de las variables importantes en el modelo del MCTS es la tridimensionalidad. Datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio con el análisis de secuenciación masiva del transcriptoma de MCTSs de tiempos cortos de cultivo (6 días), en los cuales aún no se establecen gradientes de hipoxia pero si hay un cambio en las uniones célula-célula, muestran cambios significativos en los niveles de expresión de numerosos RNAs (codificantes y no codificantes) ⁷⁵, por lo cual no se podrían usar como control. Así, comparar los MCTS de día 20 con los cultivos en monocapa nos permite incluir a las variables: uniones celulares, heterogeneidad celular y microambiente como factores importantes que generan cambios en la expresión de mRNAs y RNAs no codificantes.

Como resultado del análisis de microarreglos, identificamos un grupo de 33 miRNAs cuya expresión ($FC \geq 1.5$, $p \leq 0.05$) es diferencial en los MCTS. Dentro de este grupo, 18 miRNAs se encuentran sobreexpresados y 15 disminuidos. En la Figura 10 se muestra un “Heatmap” de los datos obtenidos en el microarreglo, los cuadros en rojo indican un aumento en la expresión y el color verde indica una disminución en los niveles de los miRNAs, la intensidad de los colores es proporcional al aumento encontrado en cada caso. Los principales miRNAs (“top-ten”) desregulados se muestran en la Figura 11, interesantemente encontramos que todos han sido asociados con CaMa.

El siguiente paso fue validar mediante otra técnica los cambios de expresión encontrados con el microarreglo, esta validación se realizó mediante la técnica de qRT-PCR. Para elegir los miRNAs a validar se definieron los siguientes criterios de selección: la tasa de cambio (a la alta o a la baja), el valor estadístico de significancia (valor p), el número de funciones celulares y procesos tumorigénicos asociados a cada miRNA según las predicciones de IPA y la participación reportada para cada miRNA en cáncer de mama. A cada criterio se asignaron arbitrariamente puntajes que finalmente dieron una sumatoria. Se seleccionaron los miRNAs con puntajes más altos y un microRNA de cada puntaje bajo (Tabla 7). Seis de los 9 miRNAs analizados mostraron el mismo cambio de expresión que el observado en los microarreglos, validando así en general el análisis realizado por microarreglos. Como se puede observar en la Figura 12 los miR-221-3p y mir-31-5p disminuyen en los MCTS, mientras que miR-187-3p, miR-127-3p, miR-10a-5p y miR-1290 incrementan. Los cambios de miR130a-3p, 148a-3p y 184 presentaron una tendencia al cambio en el mismo sentido al encontrado con el análisis de microarreglos, pero no resultaron estadísticamente significativos (Datos no mostrados).



Figura 10. Perfil de expresión de miRNAs en los MCTS de MCF-7.

El “Heat map” de los datos de miRNAs obtenidos mediante análisis de microarreglos muestra un perfil de expresión particular para los MCTS de MCF-7 de 20 días de cultivo (tres columnas derechas) vs. los cultivos en monocapa (tres columnas izquierdas). Cada columna representa una n biológica distinta. El color verde indica disminución y el rojo incremento, según la escala que se muestra en la parte inferior

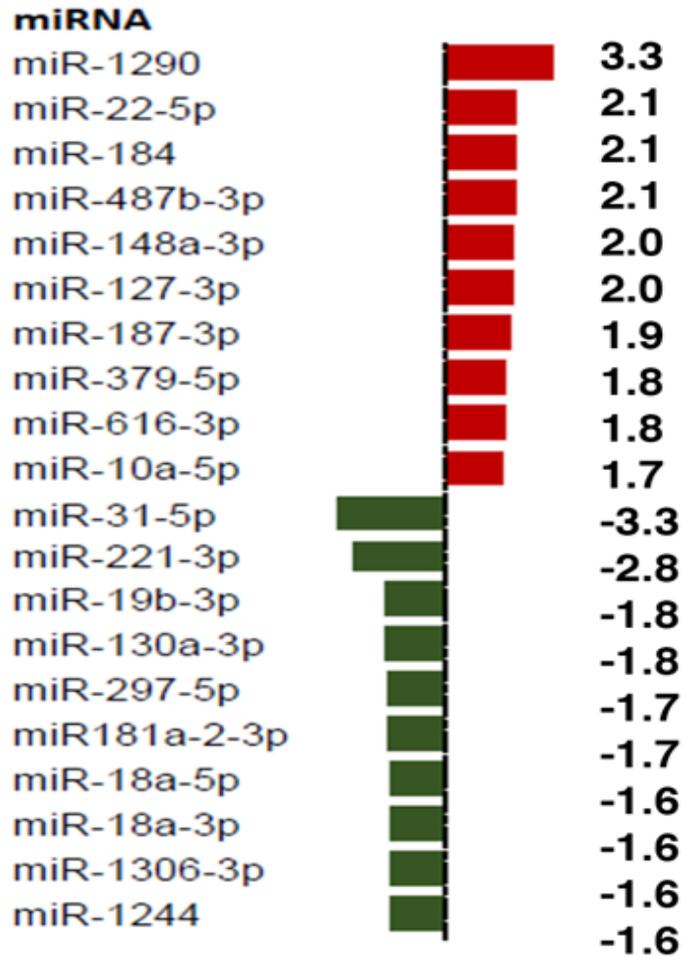


Figura 11. “Top ten” de los miRNAs desregulados en los MCTS de MCF-7.

En la gráfica se muestran las veces de cambio de los 10 microRNAs más sobreexpresados y disminuidos en los MCTS de MCF-7 de día 20 de cultivo vs. los cultivos en monocapa

Tabla 7. Criterios de inclusión utilizados para la selección de miRNAs validados por qRT-PCR. 0-3 p son los puntos asignados y Σ la sumatoria. Los miRNAs validados se muestran en negritas.

miRNA	Tasa de Cambio >2.4 – 3p 1.9-2.3 – 2p 1.5-1.8 – 1p	Valor P < 0.01 – 2p < 0.05 – 1p ≥ 0.05 – 0p	Funciones Celulares Asociadas (IPA) 4 – 3p 3 – 2p 2 – 1p 1 – 0p	Procesos Tumorales Asociados (IPA) 3-3p 2-2p 1-1p	Vías de Señalización Asociadas (IPA) 4-4p 3-3p 2-2p 1-1p	Cáncer de Mama 1-si 2-no	Σ
221-3p	3	2	2	3	2	1	13
130a-3p	1	2	3	2	2	1	11
31-5p	3	2	1	3	0	1	10
10a-5p	1	2	1	3	1	1	9
148a-3p	2	2	2	1	1	1	9
1290-5p	3	2	0	0	1	1	6
19b-3p	1	1	1	0	2	1	6
187-3p	2	1	0	0	1	1	5
18a-3p	1	2	0	0	1	1	5
616-3p	1	2	0	0	1	1	5
487b-3p	2	1	0	0	1	1	5
22-5p	2	2	0	0	0	1	5
127-3p	2	1	0	0	0	1	4
184	2	1	0	0	0	1	4
379-5p	1	1	0	0	0	1	3
18a-5p	1	0	0	0	1	1	3
1306-3p	1	1	0	0	0	1	3
181a-2-3p	1	0	0	0	0	1	2
297-5p	1	0	0	0	0	1	2
1244-5p	1	0	0	0	0	1	2

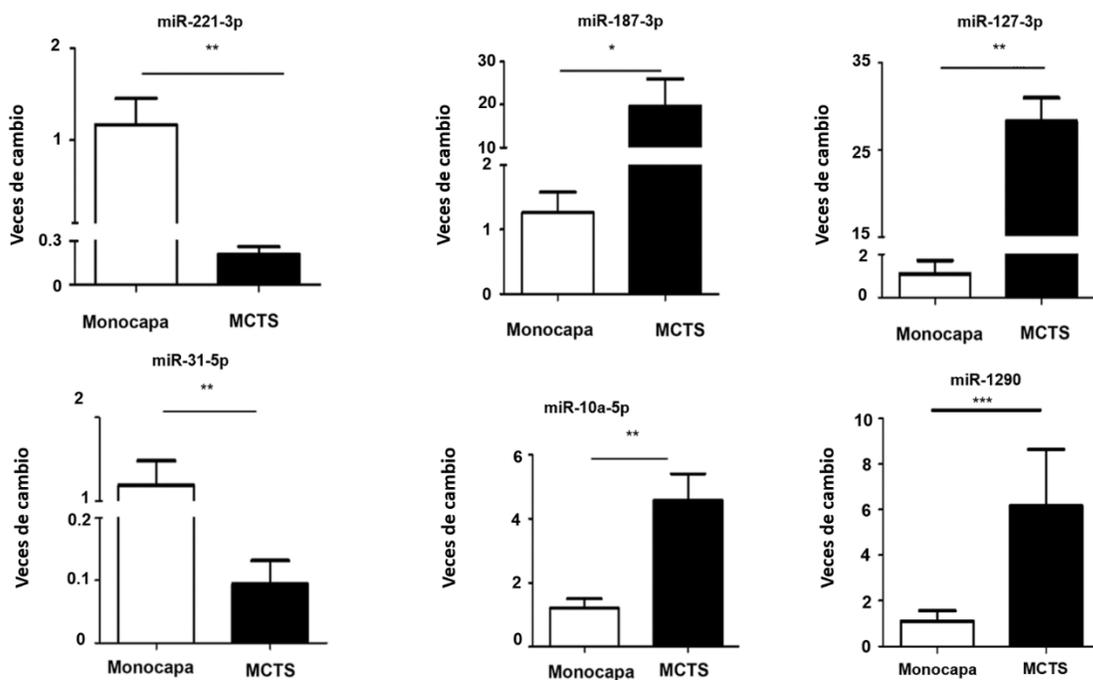


Figura 12. Validación de los datos de expresión de miRNAs mediante qRT-PCR.

Niveles de expresión de miR-221-3p, miR-187-3p, miR-127-3p, miR-31-5p, miR-10a-5p y miR-1290 en los MCTS de MCF-7 de día 20 de cultivo vs. monocapa, determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, $*p \leq 0.05$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas

4.3 Procesos biológicos asociados con los cambios en la expresión de microRNAs en MCTS- MCF-7 de 20 días de cultivo.

Con el objetivo de saber qué procesos biológicos están asociados con los miRNAs desregulados en los MCTS-MCF-7 se realizó un análisis con el programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis). IPA es una plataforma bioinformática diseñada para hacer análisis integrales de datos biológicos, que permiten interpretar y generar hipótesis sobre modelos moleculares, procesos biológicos o enfermedades afectado(a)s por cambios en la expresión de proteínas, mensajeros y/o RNAs no codificantes de manera integral. Al realizar este análisis encontramos, de manera interesante, que diez de los miRNAs desregulados de la lista “Top-ten” (miRs: 130a-3p, 205-3p, 221-3p, 19b-3p, 18a-5p, 31-5p, 10a-5p, 1285-3p, 616-3p, 148a-3p) se involucran en la regulación de los siguientes procesos biológicos: Desarrollo celular (10 miRNAs de los que 6 disminuyen y 4 incrementan) proliferación y crecimiento (10 miRNAs de los que 6 disminuyen y 4 incrementan), señalización célula-célula (2 miRNAs que disminuyen), morfología celular (1 miRNA que disminuye) y mantenimiento celular (1 miRNA que disminuye) (Figura 13A).

Además, el análisis de IPA mostró que los mismos diez miRNAs regulan, de manera indirecta, tres características tumorigénicas: la proliferación celular y las capacidades de migración e invasión (Figura 13B). Las predicciones indican que los cambios en la expresión de estos miRNAs dirigen a la inhibición de la proliferación celular, sin embargo, para el caso de los procesos de migración e invasión no existen datos suficientes para saber si la modificación es hacia la alta o a la baja.

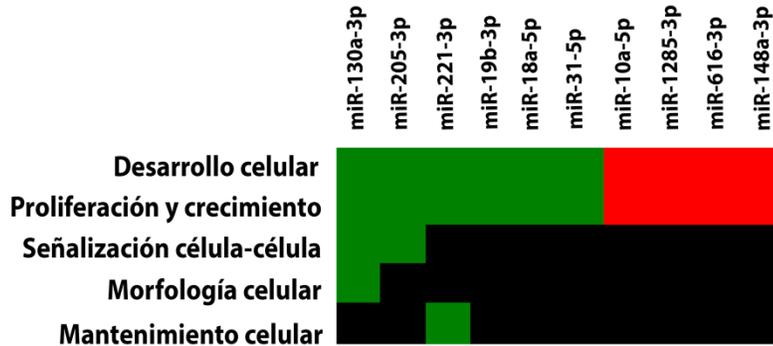
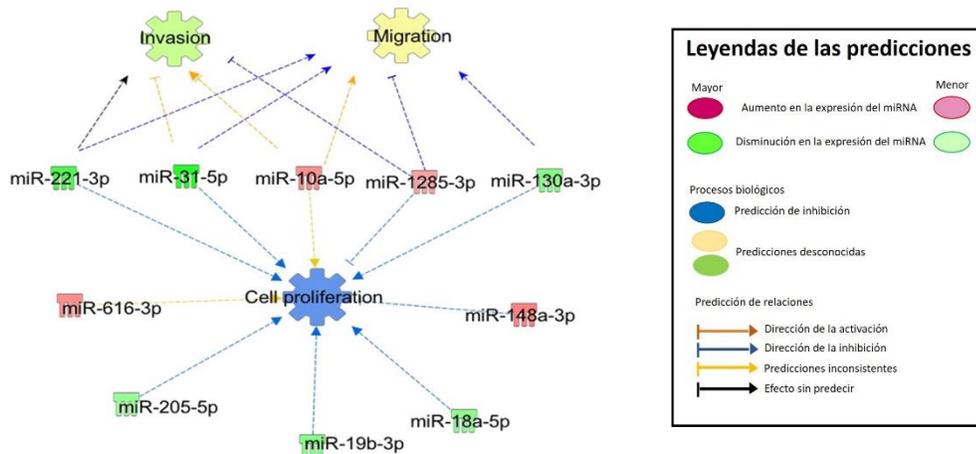
A**B**

Figura 13. Predicción de procesos biológicos afectados por los cambios en la expresión de miRNAs en los MCTS de MCF-7.

A) “Heat map” de los 5 procesos biológicos afectados en los MCTS de MCF-7 de día 20. Para cada proceso se muestran los miRNAs involucrados. El verde significa disminución, el rojo sobreexpresión y el negro que el miRNA no está asociado con ese proceso. B) Características tumorigénicas asociadas con los cambios en el miRNAoma de los MCTS de MCF-7 de día 20.

Cuando analizamos las vías de señalización afectadas por la alteración combinada en la expresión de miRNAs y mRNAs en los MCTS-MCF-7 de día 20 (datos previos obtenidos de experimentos de secuenciación masiva)⁷⁶, encontramos que diversos miRNAs entre ellos miR-221-3p, que disminuye, y miR-187-3p, que incrementa, están asociados a vías de señalización dependientes de TP73, TP63, TP53, Ago2 y B-Raf, que tienen roles biológicos importantes al participar en procesos de muerte/sobrevivida, organización celular y respuesta inflamatoria (Figura 14, Tabla 8 y Tabla 8.1). B-Raf regula de manera indirecta la expresión de los precursores miR-221 y miR-187 repercutiendo directamente en cambios en los niveles de las formas maduras: miR-221-3p y miR-187-3p. Para el caso de TP53, éste regula de manera directa la expresión de miR-221-3p. Por lo anterior, decidimos analizar en más detalle a los miR-221-3p y miR-187-3p.

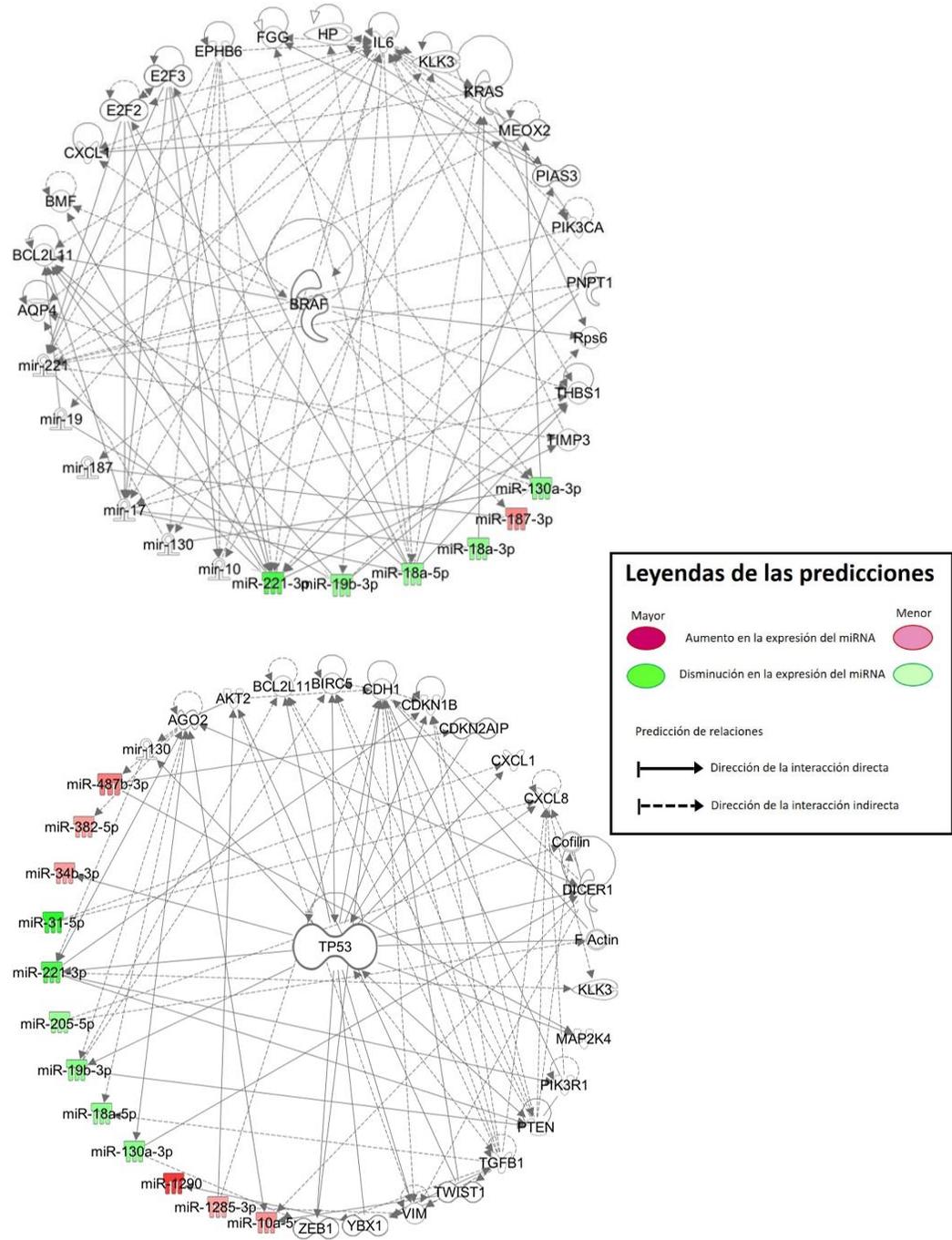


Figura 14. Las vías de señalización reguladas por B-Raf y p-53 son dos de las principales afectadas por los cambios en la expresión de miRNAs en los MCTS de MCF-7 de día 20

Tabla 8. Principales vías de señalización reguladas en los MCTS de MCF-7 de día 20. Predicción realizada en IPA utilizando los datos de expresión de miRNAs y mRNAs.

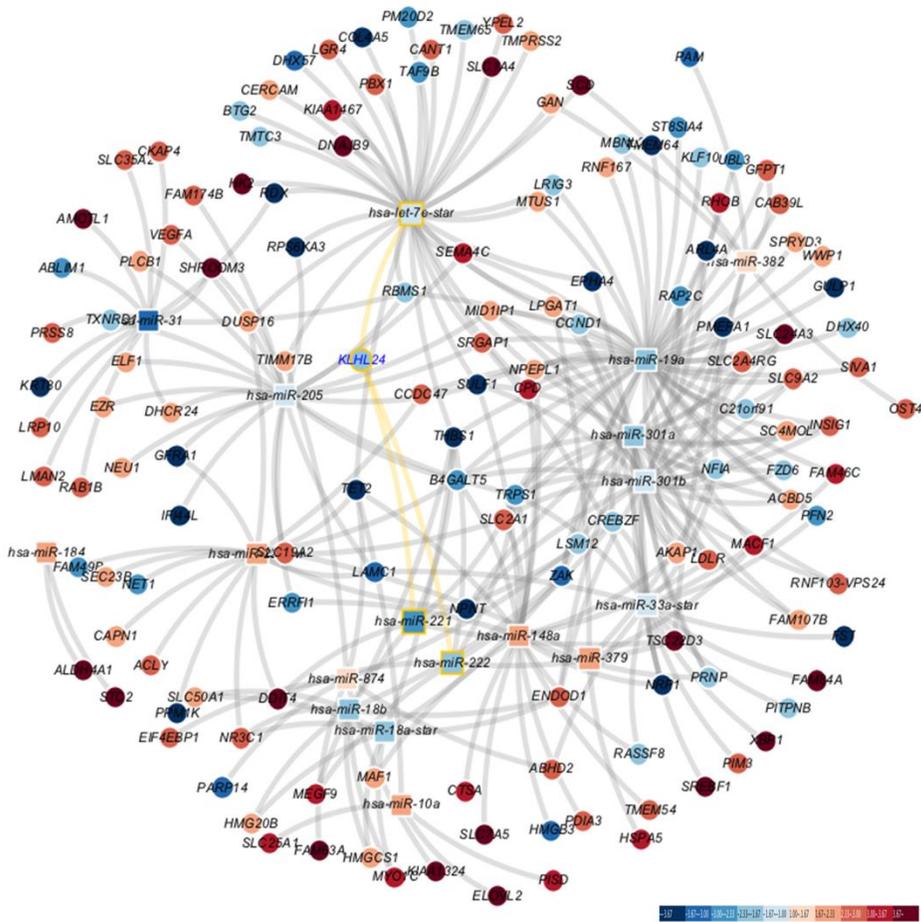
FUNCIONES	VÍAS	miRNAs IMPLICADOS	
		SOBREEXPRESIÓN	DISMINUCIÓN
Muerte celular y supervivencia.	TP73		
	TP63	miR-1290 miR-148a-3p	
Desarrollo celular.	TP53	miR-34b-3p	miR-19b-3p
Ensamblaje y organización celular.	AGO2	miR-10a-5p miR-382-5p miR-487b-3p	miR-130a-3p miR-221-3p
Respuesta inflamatoria	BRAF	miR-187-3p miR-874-3p	miR130a-3p miR-19b-3p miR-221-3p miR-18a-3p miR-18a-5p

Tabla 8.1 Otras vías de señalización reguladas en los MCTS de MCF-7 de día 20. Predicción realizada en IPA utilizando los datos de expresión de miRNAs y mRNAs.

Funciones	Vías	miRNAs implicados
Compromiso celular Mantenimiento y función celular Desarrollo celular	TRIB3	miR-205-5p
Morfología celular	TCR	miR-1285-3p
Metabolismo de carbohidratos	MEK	miR-18a-5p
Movimiento celular Proliferación y crecimiento celular Desarrollo celular	HNRNPA2B1	miR-616-3p
Organización celular Ciclo celular Muerte celular y sobrevivencia.	SMARCA4	miR-31-5p

Asimismo, realizamos un análisis de la co-regulación de redes mRNA-miRNAs con otro programa bioinformático: miRTarvis, herramienta computacional que permite predecir blancos de miRNAs a partir de datos de expresión de mRNAs y miRNAs obtenidos experimentalmente. Encontramos 14 nodos de co-regulación entre los que destacan, por el alto número de mRNAs asociados, los nodos de let-7a, miRNA-19a, miRNA-31, miR-301 y miR-221-3p. Para el caso de miR-221-3p, un miRNA que disminuyó en el modelo 3D, hay 4 blancos directos: MEGF9 (Multiple EGF like domains 9), DDIT4 (DNA damage-inducible transcript 4), TSC22D3 (Glucocorticoid-induced Leucine Zipper Protein) y SCL2A1 (Solute carrier family 2 member 1). Y tres blancos indirectos: TRPS1 (Transcriptional Represor GATA binding 1), THBS1 (Thrombospondin 1) y CREBZF (CREB/ATF BZIP Transcription Factor) (Figura 15). Los RNAs mensajeros sugeridos por miRTarvis como blancos putativos directos o indirectos de miR-221-3p han sido reportados como reguladores importantes de procesos como la proliferación y la muerte celular ^{78,79 80,81}, aunque no para todos ha sido demostrada su participación durante la progresión del cáncer de mama y sería interesante analizarlos en trabajos posteriores. En la Tabla del apéndice 1 muestro que estas predicciones de nodos de interacción miRNA-mRNA se generan en función de evidencia experimental reportada y de algoritmos que se basan en la secuencia de ambas moléculas.

Finalmente, el análisis de miRTarvis también muestra que existen nodos muy interesantes de mRNAs mensajeros que son regulados por múltiples miRNAs (Figura 15).



miR-221

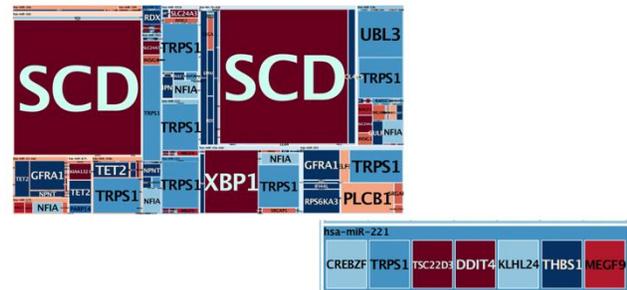


Figura 15. Posible co-regulación entre miRNAs y mRNAs en los MCTS de MCF-7 de día 20.

El nodo de miR-221 está asociado con diversos mRNAs desregulados en los MCTS. Para mRNAs y miRNAs, los tonos rojos indican sobreexpresión y los azules disminución. La intensidad del cambio está representada por la saturación del color, el más oscuro representa el cambio mayor.

4.4 Expresión de B-Raf en MCTS- MCF-7 de 20 días de cultivo.

Hasta este momento, los cambios observados en la expresión de miRNAs sugieren que hay una regulación de la proliferación celular en los esferoides. B-Raf es una proteína oncogénica involucrada en el control de la proliferación celular de melanomas y hepatocarcinomas, pero de la que poco se sabe en cáncer de mama ⁸². Ya que el modelaje de IPA nos mostró que la vía de señalización dependiente de B-Raf es una de las más alteradas por los cambios en la expresión de miRNAs, analizamos la expresión de esta proteína en nuestro modelo de MCTS.

Como se observa en la Figura 16A, existe un ligero cambio en el contenido de proteína total de B-Raf en los MCTS (vs. monocapa), que no llega a ser significativo. Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico mostró que B-Raf se expresa preferencialmente en las capas externas-proliferativas de los MCTS ($72 \pm 4\%$ vs. $38 \pm 8\%$ capas internas-quiescentes) (Figura 16B). El conteo de células positivas a B-Raf se realizó únicamente en los cortes con diámetros de 350-420 μm delimitando las capas externas e internas del esferoide, como se describió en la sección 4.1.

Es interesante que la expresión de 4 mRNAs que participan en esta vía de señalización se encuentran desregulados en el cultivo 3D: BIRC3 (Apoptosis inhibitor 2) y CDH1 (E-cadherina) incrementan, mientras que THBS1 y CCND1 (Cyclin D1) disminuyen (Figura 16C). Debido a que la extracción de mRNA se realizó en esferoides completos, desconocemos cómo es la expresión de estos mensajeros en las subpoblaciones celulares que conforman al esferoide, Los niveles altos de CDH1, que es un regulador negativo de B-Raf, podrían estar disminuyendo la expresión de B-Raf y uno de sus blancos, CCND1, en las capas quiescentes. En el laboratorio seguimos trabajando en la comprobación experimental de estos resultados.

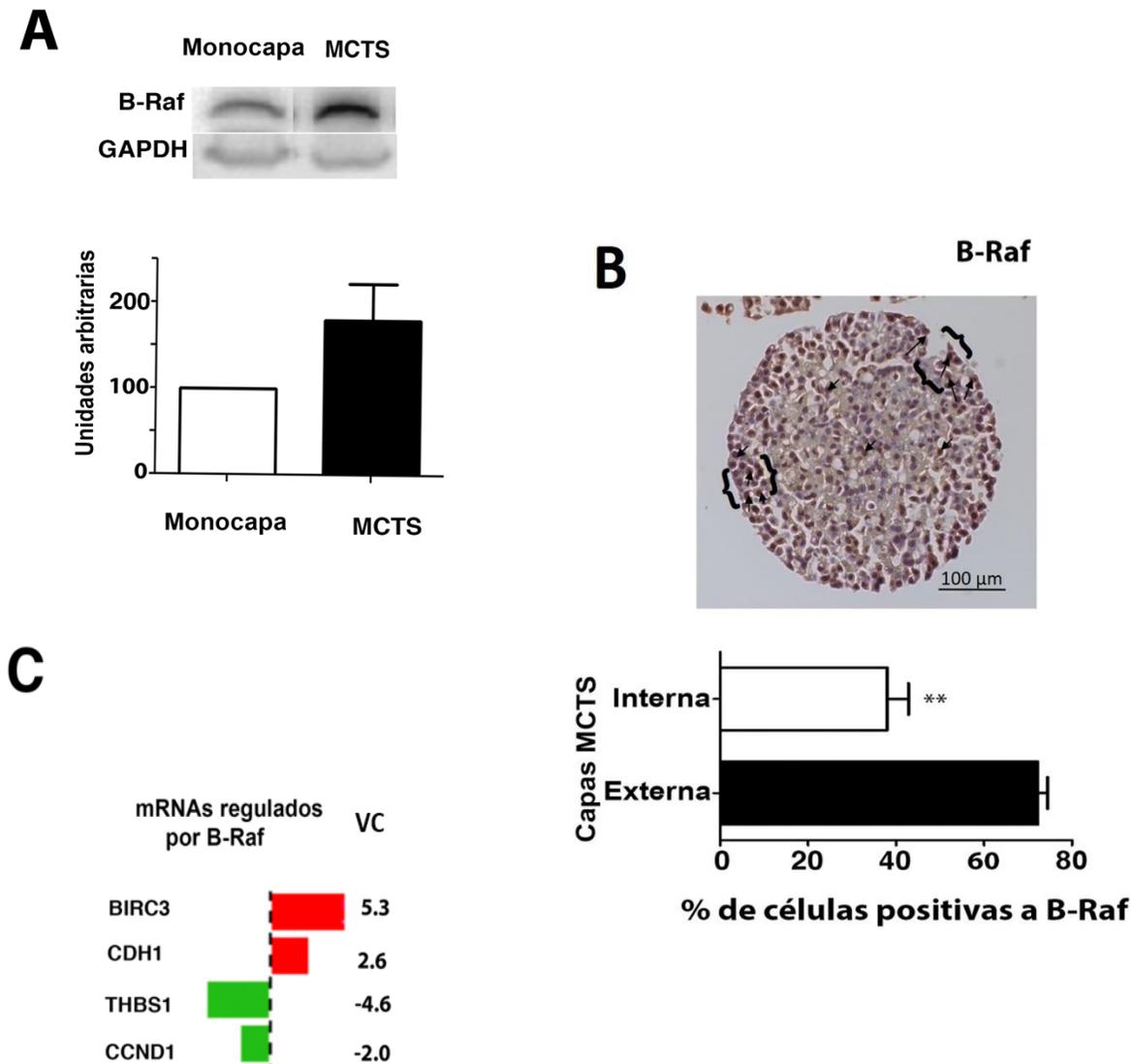


Figura 16. Expresión de B-Raf en MCTS de MCF-7.

A) Expresión de la proteína B-Raf en MCTS de MCF-7 de día 20 de cultivo vs. células en monocapa. GAPDH se utilizó como control de carga. B) Imagen representativa de inmunohistoquímicas de B-Raf en MCTS de 20 días (arriba). Los corchetes representan la delimitación de las capas externas e internas y las flechas las células positivas a B-Raf. Abajo se muestra la cuantificación de células positivas a B-Raf en las capas celulares externas e internas, C) Cambios en los niveles de mRNAs involucrados en la vía de señalización de B-Raf en los MCTS de día 20. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, $**p \leq 0.01$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas.

4.5 Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p durante el crecimiento de MCTS- MCF-7 y bajo condiciones de hipoxia e hipoglucemia.

Como se comentó anteriormente, decidimos profundizar en el análisis de dos miRNAs: el miR-221-3p y miR-187-3p por estar asociados a la vía de B-Raf, proteína que participa de manera muy activa en la regulación de los procesos de proliferación y muerte celular, migración e invasión. Los cambios obtenidos en los niveles de los dos miRNAs se validaron por qRT-PCR.

Primero analizamos la expresión de los miRNAs durante el crecimiento de los esferoides a diferentes tiempos. En la Figura 17 se observa que la expresión de miR-221-3p disminuye desde los primeros días de crecimiento en 3D cuando se compara con los niveles que se presentan en cultivo 2D (confluencia >80%), estos niveles bajos se mantienen hasta el día 20 de cultivo 3D. En tiempos cortos del crecimiento de cultivos 3D no se han formado los gradientes de oxígeno ni nutrientes, por lo cual este resultado indica que factores que permiten la adquisición de la tridimensionalidad como son las uniones célula-célula pueden estar involucrados en cambios de expresión de este microRNA en estas etapas de crecimiento. En contraste, miR-187-3p muestra una expresión baja en el cultivo 2D (confluencia >80%) y en los primeros tiempos del crecimiento 3D, pero a los 20 días de crecimiento se sobreexpresa de manera considerable. Para este microRNA, la adquisición de la estructura 3D no es suficiente para inducir algún cambio en su expresión.

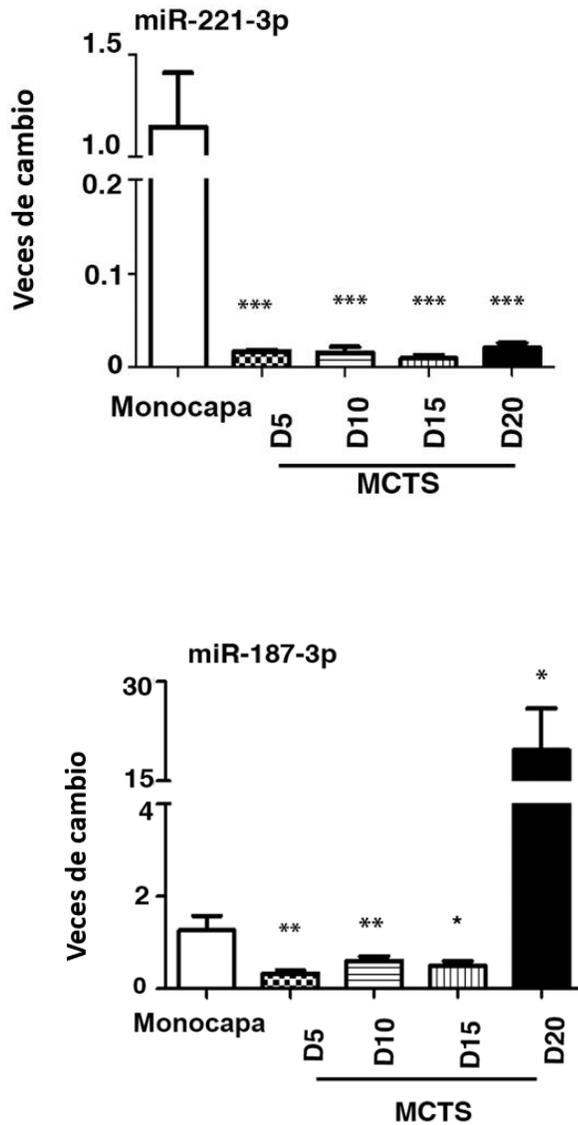


Figura 17. Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p en MCTS de MCF-7.

Los niveles de expresión de miR-221-3p y miR-187-3p se determinaron mediante qRT-PCR en MCTS de MCF-7 de 5, 10, 15 y 20 días de cultivo vs. células en monocapa. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas.

Posteriormente, analizamos si la expresión de los miRNAs se modifica ante dos condiciones microambientales (hipoxia e hipoglucemia) que se generan en los esferoides de estadios avanzados. Para ello utilizamos células MCF-7 cultivadas en monocapa (confluencia >80%) y expuestas a condiciones hipóxicas (1% O₂ durante 24 horas) e hipoglucémicas (5 mM de glucosa durante 24 horas). Ambas condiciones indujeron una disminución en la expresión de miR-221, lo que indica que este miRNA es muy sensible a los cambios microambientales; mientras que la expresión de miR-187-3p no se modificó por ninguno de estos estímulos, lo que nos hace pensar que este microRNA tiene una regulación muy fina mediada posiblemente por mecanismos epigenéticos como la metilación (Figura 18).

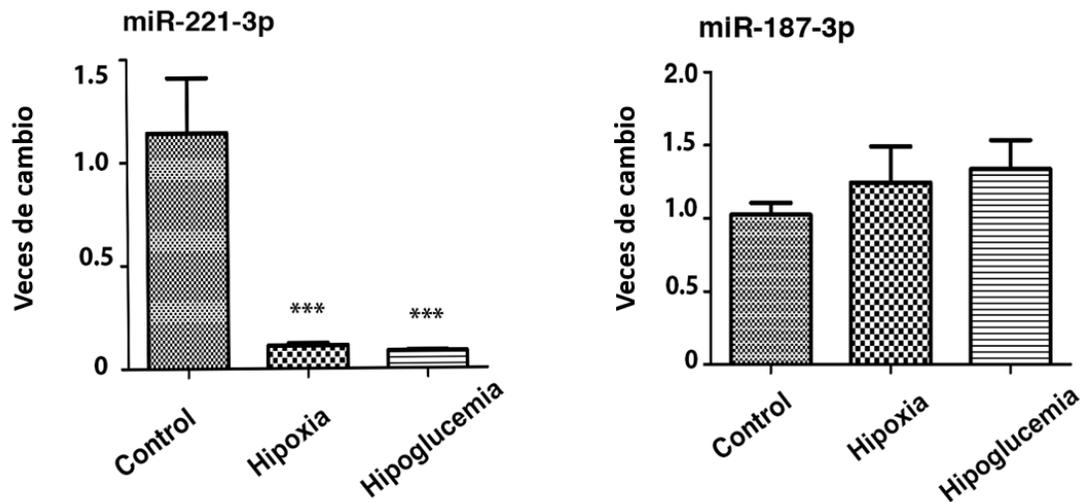


Figura 18. Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p en condiciones de hipoxia e hipoglucemia.

Los niveles de expresión de miR-221-3p y miR-187-3p se determinaron mediante qRT-PCR en células de MCF-7 cultivadas en monocapa y expuestas a 1% O₂ (hipoxia) ó 5 mM de glucosa (hipoglucemia) vs. células MCF-7 en monocapa expuestas a 5% O₂ (normoxia) ó 25 mM de glucosa (normoglucemia). Los datos representan el promedio \pm D.E, n = 3, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas.

4.6 Regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p células MCF-7 en monocapa.

Para validar experimentalmente algunas de las predicciones de IPA sobre los efectos en los procesos de proliferación, migración e invasión generados por el perfil de expresión de miRNAs en los MCTS, intentamos mimetizar los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs: miR-221-3p y miR-187-3p, en el cultivo en monocapa. Los cultivos bidimensionales se utilizaron para corroborar si el cambio en los miRNAs es capaz por él mismo (eliminando todas las variables de la tridimensionalidad) de producir fenotipos celulares semejantes a los encontrados en el esferoide. Para ello, transfectamos transitoriamente células MCF-7 cultivadas en monocapa con los oligonucleótidos sintéticos antimir-221-3p y/o premiR-187-3p.

Es importante mencionar también que hacer transfecciones uniformes en los esferoides es complicado ya que la penetración de los polímeros de transfección es diferencial en las distintas subpoblaciones del esferoide. Hasta ahora se han utilizado polimeros PEGilados como método de transfección en cultivos 3D, desafortunadamente éstos no son eficientes para esferas que superan los 300 µm de diámetro. Para responder preguntas futuras, sería interesante generar un sistema de expresión inducible y/o probar con nanopartículas liposomales, pensando por ejemplo en proponer estrategias terapéuticas alternativas en donde se pueda modificar la expresión de ciertos miRNAs en áreas específicas y de manera dirigida ⁸³.

La transfección de los cultivos se realizó como se mencionó en la sección de material y métodos. La inhibición de la actividad de miR-221-3p se corroboró evaluando los niveles de expresión de mRNA y proteína de dos blancos (Cyp1B1 y Cyp7a1) reportados del miRNA, seleccionados al azar, estos incrementan significativamente a las 24 y 48 horas posteriores a

la transfección (Figura 19A). Por su parte, la administración ectópica del precursor de miR-187-3p resultó en un incremento de 42 veces en los niveles de expresión de su forma madura, comparado con las células transfectadas con el control negativo (Figura 19B).

4.7 Efectos de la regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p sobre las capacidades de migración e invasión de células MCF-7.

Una vez corroborada la eficiencia de inhibición o sobreexpresión de los miRNAs 221-3p y 187-3p, respectivamente, evaluamos qué efecto tienen estos cambios sobre las capacidades de migración e invasión de las células MCF-7.

Los ensayos de migración mostraron que la inhibición de la actividad de miR-221-3p resulta en una disminución en la capacidad migratoria de las células, como había sido predicho por IPA. Este efecto se potencia cuando la expresión de ambos miRNAs (diminución de miR-221-3p y sobreexpresión de miR-187-3p) se modifica al mismo tiempo (Figura 20A). Además, la inhibición de miR-221-3p promovió una disminución en la capacidad de las células MCF-7 para degradar gelatina, lo que indica que su capacidad de invadir también se ve afectada por los cambios en la expresión de este miRNA.

En la Figura 9B, mostré que las células provenientes de esferoides de 20 días migran más que las células en monocapa, sin embargo, está reportado que este potencial migratorio es característico de las poblaciones celulares externas-proliferativas que constituyen al esferoide ⁸⁴, lo que nos hace pensar que este fenómeno particular en el que miR-221-3p disminuye afectando esta capacidad migratoria ocurre en las poblaciones que entran en estado de quiescencia. Más adelante presento resultados que pueden apoyar esta idea.

A

Cyp1B1 5' CACAGAAUUAACUAACAUGUAGCU 3'
 hsa-miR-221 3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA 5' 7 mer

Cyp7a1 5' UUAUCACUGNAAAAAUGUAGCU 3'
 hsa-miR-221 3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA 5' 8 mer

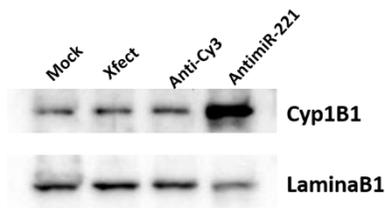
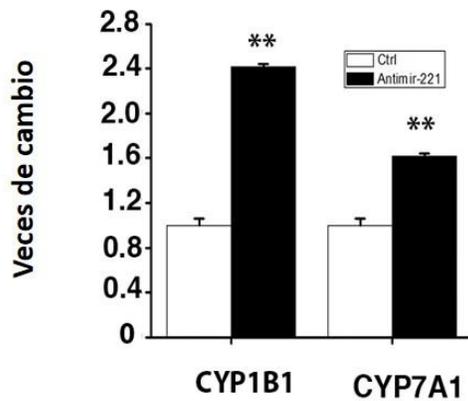
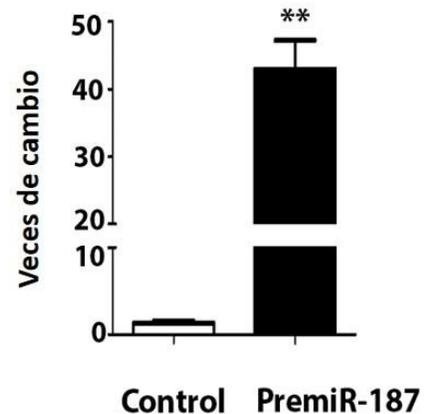
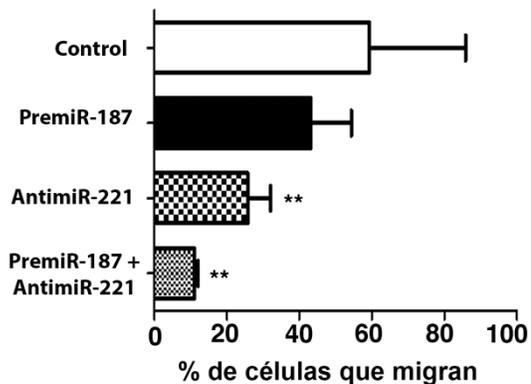
**B**

Figura 19. Validación de la inhibición de la actividad de miR-221-3p y de la sobreexpresión de miR-187-3p en células MCF-7 en monocapa.

A) Región semilla de dos mRNAs blanco de miR-221 seleccionados al azar: Cyp1B1 y Cyp7a1 (arriba), niveles de mRNA de Cyp1B1 y Cyp7a1 (en medio) y niveles de proteína de Cyp1B1 (abajo) en células de MCF-7 48 horas después de haber sido transfectadas con el AntimiR-221-3p. TBP y Lamina B1 se utilizaron como normalizadores para la expresión de mRNAs y proteína, respectivamente B) Niveles de expresión de miR-187-3p en células MCF-7 después de su transfección transitoria con el PremiR-187. Los datos representan el promedio \pm D.E, n = 3, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas.

A



B

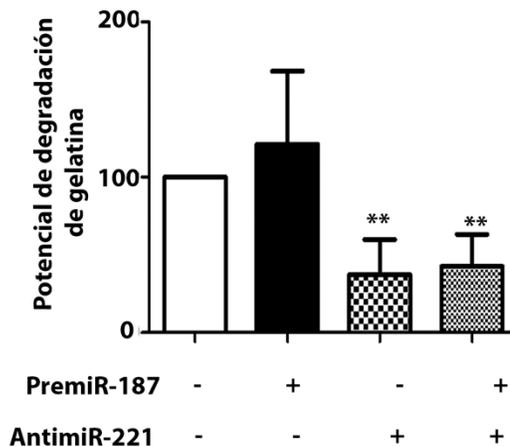


Figura 20. Efectos de la inhibición de miR-221-3p y la sobreexpresión de miR-187-3p sobre las capacidades de migración e invasión de células MCF-7.

A) Capacidad de migración de células MCF-7 transfectadas transitoriamente con el AntimiR-221, el PremiR-187 o Ambos vs. Células MCF-7 transfectadas con el control negativo. B) Potencial de degradación de gelatina de células MCF-7 transfectadas transitoriamente con el AntimiR-221, el PremiR-187 o Ambos vs. Células MCF-7 transfectadas con el control negativo. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $*** p \leq 0.001$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas y una ANOVA de una vía con la prueba p de Bonferroni.

Por su parte, la sobreexpresión de miR-187-3p no modifica la capacidad de degradar ni de migrar de las células MCF-7 (Figura 20B).

4.8 Efectos de la regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p sobre la resistencia a la privación de suero de células MCF-7.

Para analizar si los cambios en la expresión de los miRNAs 221-3p y 187-3p pueden influir sobre la resistencia celular a la privación de factores de crecimiento, cultivamos las células transfectadas de MCF-7 monocapa en medio sin SFB y evaluamos su viabilidad a los 5 y 7 días después de generado el estrés. Encontramos que a los 7 días de privación de SFB, tanto la disminución de miR-221-3p como la sobreexpresión de miR-187-3p inducen una reducción significativa en la viabilidad de las células MCF-7. Esta disminución se observa desde el día 5 de privación de SFB cuando las células se cotransfectan con ambos antimiR-221-3p y premiR-187-3p, como era de esperarse este efecto es mayor a los 7 días de cultivo (Figura 21). Estos resultados apoyan la idea de que los fenómenos observados ante la modificación de estos dos miRNAs específicamente, ocurren en la subpoblación quiescente del esferoide, en donde los nutrientes empiezan a ser escasos, como ocurre en regiones tumorales lejanas a la irrigación sanguínea. Probablemente estos miRNAs están involucrados inclusive en la generación de este fenotipo celular. En secciones posteriores nuestro resultados que validan esta idea.

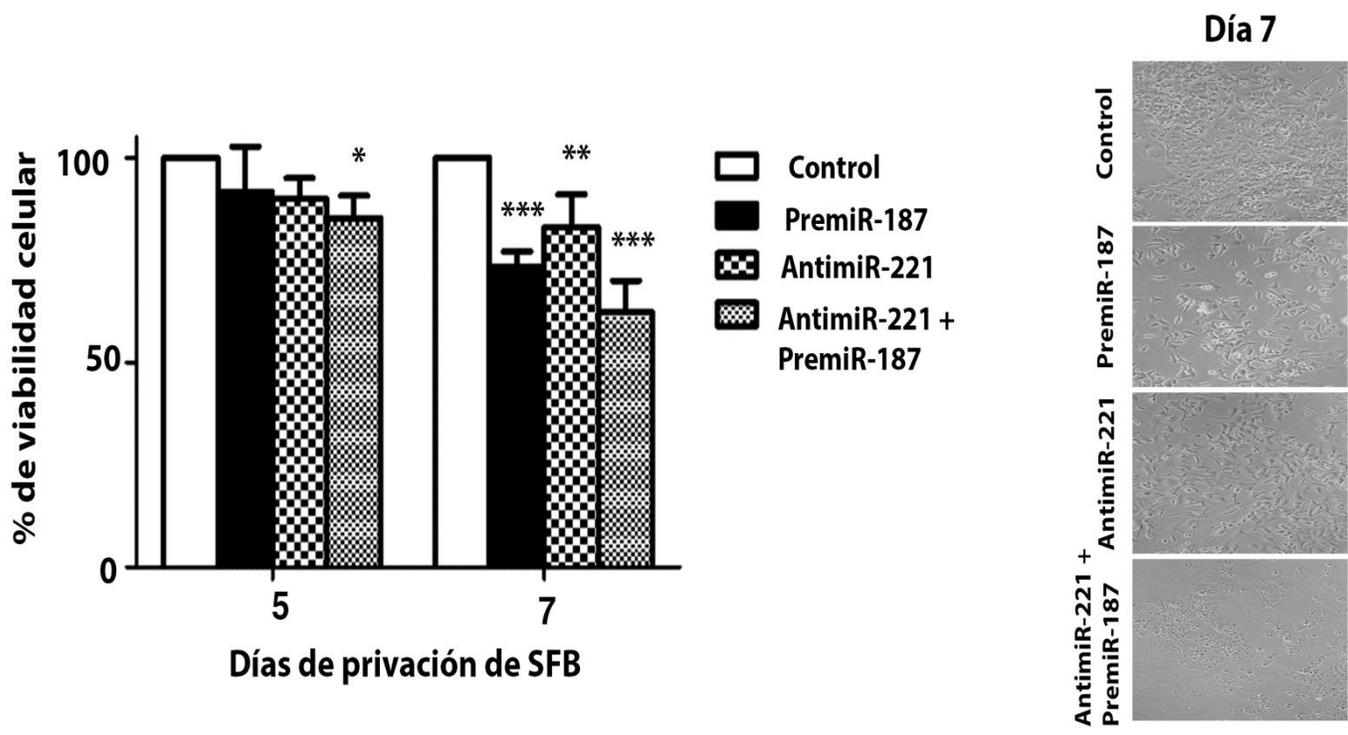


Figura 21. Efectos de la inhibición de miR-221-3p y la sobreexpresión de miR-187-3p sobre la resistencia a la privación de factores de crecimiento de células MCF-7.

La viabilidad celular se evaluó en células MCF-7 en monocapa transfectadas transitoriamente con el AntimiR-221, el PremiR-187 o Ambos vs. Células MCF-7 transfectadas con el control negativo y expuestas a la privación de SFB durante 5 y 7 días de cultivo. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas y una ANOVA de una vía con la prueba p de Bonferroni.

4.9 Efectos de la regulación ectópica de miR-221-3p y miR-187-3p sobre la proliferación y la apoptosis de células MCF-7.

De acuerdo a las predicciones de IPA, la capacidad de proliferación y sensibilidad a apoptosis se vieron afectadas en cultivos 3D, por lo cual decidimos analizar el papel de miR-221-3p y miR-187-3p, sobre estos procesos celulares. La Figura 22A muestra que la transfección de células MCF7 con el premiR-187 induce un arresto en la fase G1 del ciclo celular, lo que se refleja en un incremento en el tiempo de duplicación y en la reducción del número de células vivas a las 48 h post-transfección, en comparación con las células transfectadas con el control negativo (Figura 22C). Por su parte, la transfección con el anti-miR-221 resulta en un incremento significativo en el número de células apoptóticas (Figura 22B) concordando con una disminución en el número de células viables y un incremento en el tiempo de duplicación a las 48 horas post-transfección (Figura 22C).

De manera interesante, la cotransfección de ambos, anti-miR-221-3p y premiR-187-3p, produce cambios más fuertes en el número de células viables y el tiempo de duplicación, posiblemente debido al efecto del arresto en G1 que promueve miR-187-3p y la inducción a apoptosis por miR-221-3p (Figura 22). Estos datos apoyan la idea que se ha venido exponiendo de que ambos miRNAs están particularmente involucrados en la generación de un fenotipo quiescente en los esferoides de 20 días.

4.10 Análisis de la expresión de miR-221 y miR-187 en las subpoblaciones celulares de los MCTSs.

Con la finalidad de evaluar si la expresión de miR-221 y miR-187 es diferencial en las subpoblaciones celulares que conforman a los esferoides de día 20, separamos dichas poblaciones mediante dos aproximaciones experimentales: con citometría de flujo en donde las células fueron aisladas según su tinción con los marcadores Ki67 y p27 (Figura 23A, derecha) y con microdissección láser en donde se disectaron las poblaciones externas e internas del esferoide (Figura 23B, derecha). Posteriormente, los niveles de expresión de los miRNAs se evaluaron mediante qRT-PCR en cada población. Como se observa en la Figura 23A (izquierda), los niveles de miR-187 son apenas detectables en la población proliferativa Ki67+, mientras que las células quiescentes p27+, las células de transición a quiescencia Ki67+/p27+ y las células apoptóticas/necróticas Ki67-/p27- presentan altos niveles de expresión de este miRNA. Este mismo resultado se confirmó con la microdissección láser (Figura 23B, izquierda), en donde se encontró una expresión disminuida de miR-187 en las capas externas del esferoide. En cuanto a miR-221, no encontramos diferencias significativas en sus niveles de expresión en las poblaciones celulares aisladas mediante las dos técnicas. (Figura 23A y B, medio).

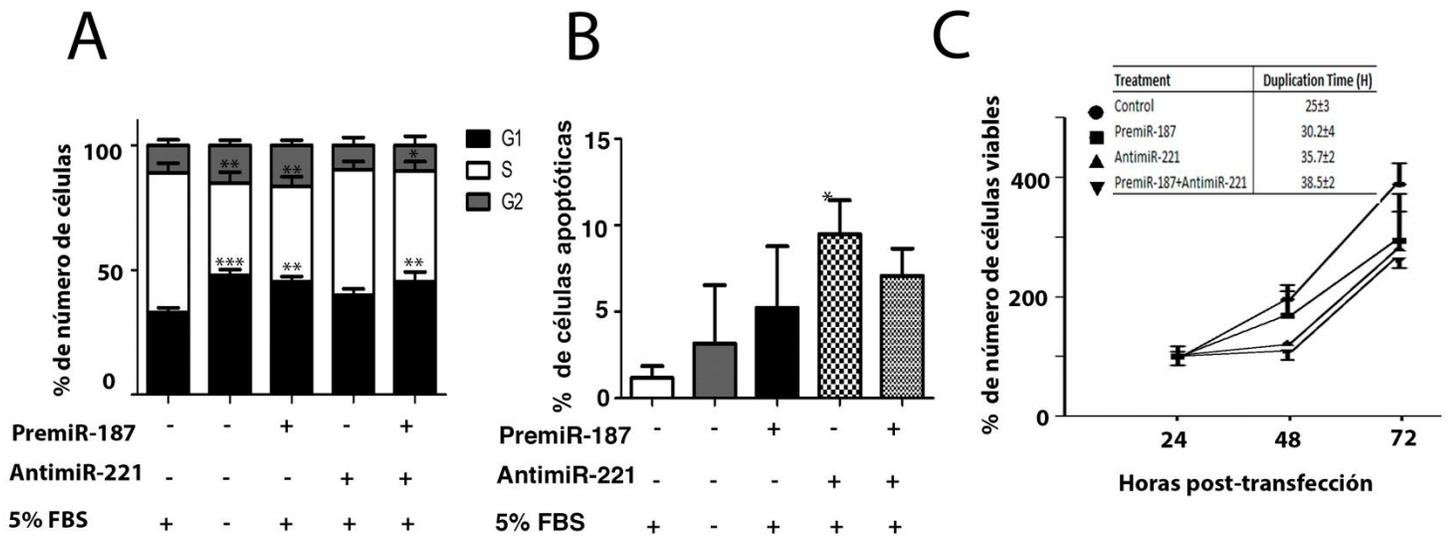


Figura 22. Efectos de la inhibición de miR-221-3p y la sobreexpresión de miR-187-3p sobre el ciclo celular, la proliferación y la apoptosis de células MCF-7.

A) El ciclo celular y B) la apoptosis se determinó en células MCF-7 48 horas después de la transfección transitoria con el AntimiR-221, el PremiR-187 o Ambos vs. Células MCF-7 transfectadas con el control negativo. C) El índice de proliferación se determinó a las 24, 48 y 72 horas después de la transfección, los tiempos de duplicación se calcularon para cada condición. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas y una ANOVA de una vía con la prueba p de Bonferroni para A, B y C.

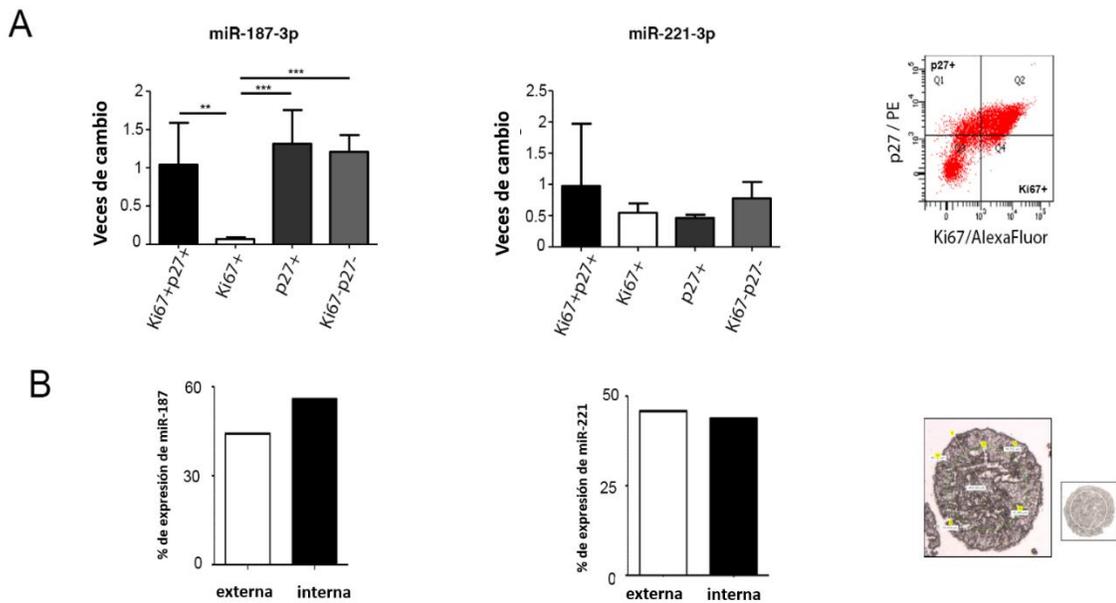


Figura 23. Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p en subpoblaciones celulares de MCTs de día 20.

A) Expresión de miR-187-3p (izquierda) y miR-221-3p (medio) por qRT-PCR en las subpoblaciones celulares aisladas mediante citometría de flujo utilizando a los marcadores Ki67 y p27 (derecha). La población doble positiva a ambos marcadores se utilizó para normalizar. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, $**p \leq 0.01$, $*** p \leq 0.001$ para una ANOVA de una vía con la prueba p de Bonferroni. B. Porcentaje de expresión de miR-187-3p (izquierda) y mir-221-3p (medio) por qRT-PCR en las poblaciones externas e internas de esferoides aisladas mediante microdissección láser. Los datos representan el promedio de expresión de un pool de RNA obtenido de 122 esferoides microdisectados.

4.11 Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.

Para conocer si la expresión de miR-221-3p y miR-187-3p pueden estar asociados con los subgrupos moleculares reportados para CaMa, determinamos los niveles de expresión de ambos miRNAs en 9 líneas celulares de CaMa. La Figura 24 muestra que una elevada expresión de miR-221 es característica de las líneas celulares triple negativo, entre ellas la línea MDA-MB-231, que no tiene capacidad para formar esferoides es la que tiene mayor expresión de este miRNA. Para el caso de miR-187-3p no encontramos alguna relación entre su expresión y algún grupo molecular de CaMa.

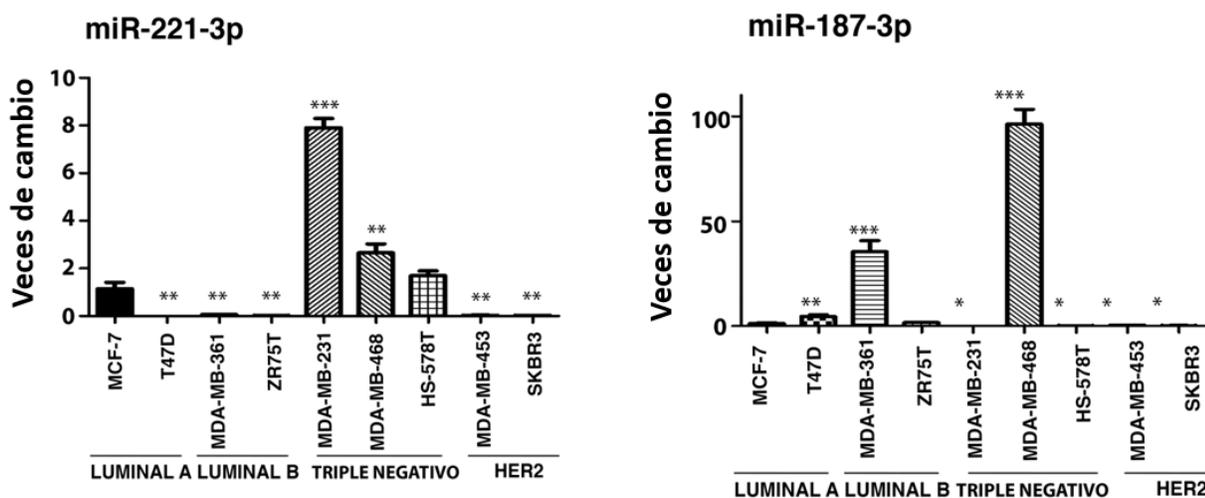


Figura 24. Expresión de miR-221-3p y miR-187-3p en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. La expresión de miR-221-3p y miR-187-3p se determinó en 9 líneas celulares correspondientes a los 4 subgrupos moleculares de CaMa mediante qRT-PCR. La línea celular MCF-7 se utilizó para normalizar los datos. Los datos representan el promedio \pm D.E, $n = 3$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ para una prueba t de Student de dos colas de muestras no pareadas y una ANOVA de una vía con la prueba p de Bonferroni.

4.12 Papel predictivo de los microRNAs desregulados en muestras de pacientes con cáncer de mama.

Finalmente, para determinar el valor clínico del perfil de expresión de miRNAs en nuestro modelo de MCTS utilizamos el programa SurvMicro, éste programa compara la expresión de nuestros miRNAs con ocho diferentes bases de datos (generadas a partir de datos masivos de secuenciación o microarreglos) de pacientes con CaMa. Según estas bases de datos, la mayoría de los miRNAs que reportamos en este trabajo modifican sus niveles de expresión (a la alta o a la baja) en las muestras de CaMa cuando se comparan con tejido normal. En la Tabla 9 se muestra (en negro) cuales de los 33 miRNAs desregulados en nuestros esferoides también se han reportado en pacientes y en qué bases de datos. Por ejemplo, cambios en la expresión de miR-187 (vs. tejido normal) se encuentran en las ocho bases de datos, mientras que miR-221-3p se reporta sólo en siete de ellas. Los niveles de expresión para cada miRNA se tienen que ir analizando de manera individual en cada base de datos.

Utilizando la base de datos más grande, con 528 pacientes, encontramos que 22 de los 33 miRNAs desregulados en los MCTS muestran potencial predictivo ($p = 0.00002$) para discriminar entre grupos de pacientes de alto y bajo riesgo, en términos de la tasa de supervivencia libre de enfermedad (Figura 25A). Con la intención de proponer una firma “pronóstico” de miRNAs, determinamos el número mínimo de miRNAs necesarios para mantener este valor predictivo. Como se observa en la Figura 25B, 8 (miR-10a, -379, -127, -487b, -616, -187, -148a, -184), 6 (miR-10a, -379, -127, -187, -148a, -184) y 5 (miR-10a, -379, -187, -127, -148a) miRNAs resultaron útiles como firma.

Para nuestra sorpresa, en cuatro bases de datos distintas, una elevada expresión de miR-187-3p (que se sobreexpresa en el esferoide) se relaciona con los grupos de pacientes de alto riesgo, según la tasa de supervivencia libre de enfermedad (Figura 25C).

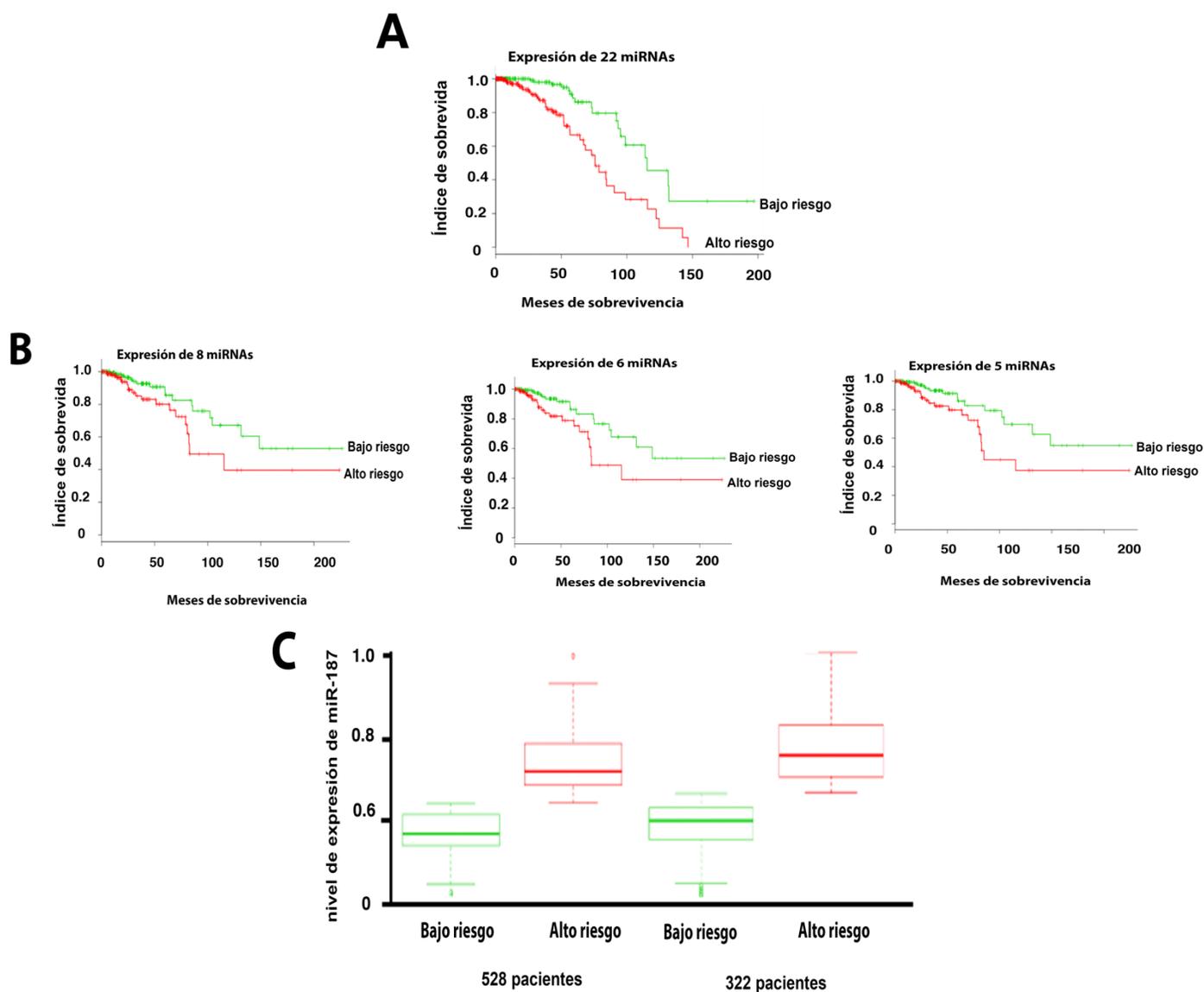


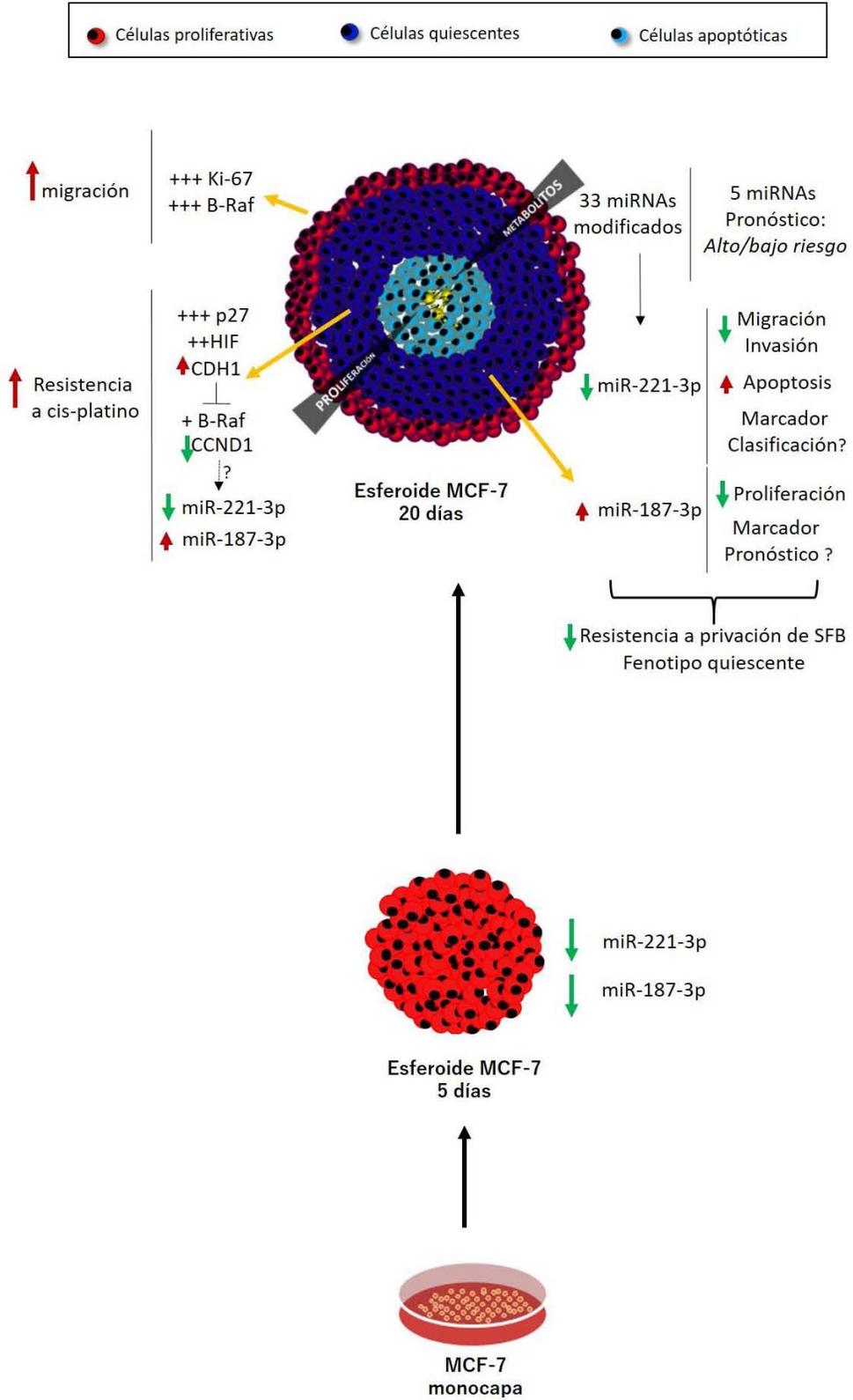
Figura 25. Valor predictivo del perfil de expresión de miRNAs de MCTS de MCF-7 de día 20 de cultivo.

A) En la base de datos con muestras de 528 pacientes, la expresión de 22 miRNAs reportados en el modelo de MCTS de MCF-7 de día 20 tienen un alto potencial ($p=0.00002$) para discriminar entre grupos de pacientes con CaMa de alto y bajo riesgo, según la tasa de supervivencia libre de enfermedad. B) Grupos de 8 ($p= 0.02$), 6 ($p= 0.01$) y 5 ($p= 0.008$) miRNAs mantienen este valor predictivo. C. Una elevada expresión de miR-187 se asocia con grupos de pacientes con CaMa de alto riesgo, en la figura se muestran la gráficas representativas para dos cohortes de pacientes: 528 ($p=9.2e^{-77}$) y 322 ($p=3.7e^{-121}$).

Tabla 9. Perfil de expresión de miRNAs de MCTS de MCF-7 de día 20 representado en ocho bases de datos de pacientes con CaMa. En negro se muestran los miRNAs cuyos niveles de expresión se modifican en las bases de datos de pacientes, en blanco los microRNAs que no están reportados.

	BASES DE DATOS (cohortes de pacientes)							
	528	322	210	99	60	51	47	40
miR-1290								
sa-miR-22-star								
sa-miR-184								
sa-miR-487b								
sa-miR-148a								
sa-miR-127-3p								
sa-miR-187								
sa-miR-379								
sa-miR-616								
sa-miR-10a								
sa-miR-885-5p								
sa-miR-34b								
sa-miR-874								
sa-miR-664-star								
sa-miR-382								
sa-miR-656								
sa-miR-1285								
sa-miR-219-1-3p								
sa-miR-33a-								
sa-miR-301b								
sa-miR-205								
sa-let-7e								
sa-miR-1244								
sa-miR-1306								
sa-miR-18a								
sa-miR-18b								
sa-miR-181a-2-star								
sa-miR-222								
sa-miR-297								
sa-miR-301 ^a								
sa-miR-19 ^a								
sa-miR-221								
sa-miR-31								

RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS



CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Los cultivos celulares tradicionales 2D o en monocapa han sido ampliamente utilizados para el estudio de mecanismos moleculares y celulares implicados en el proceso tumorigénico. Desafortunadamente, estos cultivos bidimensionales no reflejan ciertas características microambientales que se generan en los tumores sólidos (i.e heterogeneidad celular y gradientes de oxígeno/nutrientes) y que se asocian a la adquisición de fenotipos celulares de mayor agresividad tumoral. Los MCTS son cultivos tridimensionales *in vitro* con características importantes para el estudio de la progresión tumoral debido a la generación de gradientes de nutrientes/oxígeno y subpoblaciones celulares.

Por sus características, los MCTS representan un modelo de complejidad intermedia entre los cultivos 2D *in vitro* y los tumores sólidos *in vivo*, y debido a que sus patrones de expresión génica y vías de señalización son más parecidos a los encontrados en muestras de tumores provenientes de pacientes (como se muestra en la Tabla 5), son también un modelo más adecuado para el estudio de expresión de RNAs no codificantes. A pesar de ello, los MCTS no dejan de ser un modelo experimental que no recrea por completo la biología de un tumor *in vivo* (Ver Tabla 5).

En el presente trabajo, utilizamos MCTSs de la línea celular de cáncer mamario MCF-7 de 20 días de cultivo. Estos esferoides presentan una cinética de crecimiento parecida a la de tumores avasculares *in vivo*, como ha sido demostrado por diferentes grupos de investigación ^{85,86}. Además, están constituidos por subpoblaciones de células proliferativas (capas externas) y quiescentes (capas internas), áreas hipóxicas y la evidencia de muerte celular al centro del esferoide, como ha sido previamente reportado ^{87,88}. La heterogeneidad

de poblaciones celulares ha sido evidenciada en diferentes tipos de cáncer en sus primeras etapas de desarrollo, por ejemplo, en melanomas, cáncer de colon y cáncer de mama ⁸⁹.

Las células derivadas de los MCTSs-MCF-7 muestran características de mayor agresividad tumoral como son la quimioresistencia adquirida al CP y una mayor capacidad para migrar que las células provenientes de los cultivos en monocapa. Resultados similares se han observado en esferoides de cáncer de pulmón, colon y páncreas ^{90,91,92}, en donde se ha reportado por ejemplo, que cambios en la expresión de E-caderina, N caderina, podoplanina y α SMA, respecto a los cultivos 2D, son responsables de la adquisición de un fenotipo migratorio ⁹³ que además está conferido a las células externas-proliferativas de los esferoides ⁸⁴. En cuanto a la resistencia a fármacos, se ha comprobado que la multiresistencia que adquieren los esferoides se debe a múltiples factores como: los gradientes de penetración del fármaco, la generación de poblaciones quiescentes, la hipoxia, el enriquecimiento de células stem y las propiedades anti-apoptóticas que adquieren algunas poblaciones celulares

94

Una vez caracterizado nuestro modelo, analizamos si el crecimiento tridimensional y el desarrollo de las características microambientales previamente mencionadas inducen cambios en la expresión de miRNAs de las células que constituyen al esferoide, en comparación con la expresión de células cultivadas de manera bidimensional. Encontramos que un grupo de 33 miRNAs, incluyendo miR-221 y miR-187, se encuentra diferencialmente expresado (18 sobreexpresados y 15 disminuidos) en las células provenientes de los MCTSs y está asociado a la regulación de procesos tumorigénicos como la proliferación celular y las capacidades de migración e invasión en CaMa.

Existen tres estudios previos de análisis de expresión de miRNAs (mediante microarreglos ó secuenciación masiva) en esferoides de CaMa. Estos estudios utilizan a los MCTSs únicamente como una herramienta para enriquecer a la población de células stem (CSCs), mediante pases seriales de células provenientes de esferoides cultivados durante 5-10 días. En estas condiciones, sus resultados demuestran que diversos miRNAs (incluyendo miR-205-5p, miR-221-5p y miR-222-5p) tienen implicaciones importantes en el mantenimiento de las células stem y su capacidad de auto renovación, así como en la inducción del fenotipo de transición epitelio-mesénquima (EMT) y la quimioresistencia ^{72,73,74}. Sin embargo, el perfil de expresión de miRNAs en MCTS de estadios avanzados no ha sido estudiado.

Nuestro análisis integral de la expresión de miRNAs y mRNAs en los MCTSs de MCF-7 mostró que miR-221-3p representa un nodo importante de coregulación con los mRNAs de TRPS1 y MEGF9. TRPS1 (trichorhinophalangeal syndrome-1 gene) codifica para un represor transcripcional de genes regulados por los factores GATA, que participa en el control de la diferenciación y proliferación celular. Bajos niveles de TRPS1 afectan la progresión del ciclo celular en la línea MCF-7 y está reportado como un blanco directo de miR-221 ^{95,96,97}. En nuestro modelo, en donde existe evidencia de arresto celular en ciertas poblaciones, la expresión del mRNA de TRPS1 disminuye (vs. monocapa) sin embargo, miR-221-3p también disminuye, las predicciones por IPA sugieren que la regulación mediada por el miRNA en este caso no es directa y que su disminución ocurre a través de la inhibición de otro mensajero blanco que es SCL2A1, sin embargo, hasta ahora no existe evidencia experimental que valide estas predicciones. Por su parte, MEGF9 (multiple EGF like domains 9) participa en la progresión tumoral al ser un regulador negativo de NF-kB y según análisis bioinformáticos se le considera como un blanco putativo de miR-221 ^{98,99}. En CaMa, bajos niveles de MEGF9 se reportan asociados con una elevada capacidad migratoria y sobrevivencia celular ¹⁰⁰, mientras

que altos niveles de expresión de este gen inducen a vías de muerte celular ¹⁰¹. Los esferoides de MCF-7 presentaron altos niveles de MEGF9 correspondiendo con una baja expresión de miR-221-3p, lo que sugiere que la regulación de este mensajero podría estar involucrada con la inducción de señales que lleven al arresto celular y/o a la apoptosis. Estos dos ejemplos de regulación nos indican que los cambios de expresión de mensajeros y miRNAs en los esferoides pueden estar fuertemente asociados con la adquisición de los fenotipos quiescentes y apoptóticos característicos de las poblaciones celulares internas que conforman a los esferoides.

Las vías de señalización de B-Raf y p53 también resultaron estar fuertemente asociadas a los miRNAs desregulados en los MCTSs. Particularmente, B-Raf se expresa preferencialmente en las poblaciones externas-proliferativas de los MCTSs. B-Raf participa en la activación de la vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK, regulando positivamente la proliferación y diferenciación celular ^{102,87}. Se ha reportado que B-Raf puede ser regulado por miRNAs como: miR-378-5p, miR-221-5p y -3p, miR-222-5p, miR-146b.5p, miR-181-5p y miR-187-5p en carcinomas de colon, melanoma y tiroides ^{103,104,105}. De manera similar, cambios en la expresión de B-Raf pueden promover cambios en la expresión de miRNAs ¹⁰⁶, como lo sugiere la predicción de IPA en donde los precursores miR-221 y miR-187 son regulados de manera directa por esta proteína. En los esferoides encontramos altos niveles de expresión de un regulador negativo (CDH1) de B-Raf ¹⁰⁷, si esta expresión representa mayoritariamente a las poblaciones internas, podría entonces ser un mecanismo por el que B-Raf disminuya su expresión en estas capas celulares, induciendo una disminución por ejemplo en la expresión de ciclinas (i.e CCDN1) ¹⁰⁸ y participando por lo tanto en vías de proliferación y arresto celular. Falta evaluar si una baja expresión de B-Raf induce bajos niveles de miR-221-3p y una sobreexpresión de miR-187-3p, según lo observado en los esferoides, para proponerlo como

un mecanismo celular de inducción de quiescencia mediado por miRNAs en esferoide multicelulares.

Particularmente, la expresión de miR-221-3p disminuye en los esferoides desde sus primeros días de cultivo, contrario a la sobreexpresión que se reporta en cultivos 2D de distintos tipos de cáncer cuando se compara con tejido normal. En este sentido, nuestros resultados coinciden con la disminución de 57 veces en el nivel de expresión de este miRNA que se reportó en células provenientes de esferoides de MCF-7 enriquecidos con CSCs ⁷⁴, lo que sugiere que la tridimensionalidad puede significar una característica importante en la regulación de miR-221-3p. Asimismo, la generación de hipoxia e hipoglucemia en las células MCF-7 resultó en un decremento en la expresión de miR-221-3p. Existe solo un estudio que reporta que la hipoxia (1% O₂) induce la sobreexpresión de este miRNA en células de pulmón, desafortunadamente no existen reportes que demuestren el mismo efecto en líneas celulares de CaMa.

Además, cuando analizamos la expresión de miR-221-3p en las diferentes poblaciones celulares que conforman a los esferoides de día 20 no encontramos diferencias en sus niveles de expresión, lo que sugiere que además de la hipoxia y la hipoglucemia, miR-221-3p podría estar siendo regulado por cambios en las uniones intercelulares, lo que explicaría la regulación negativa en su expresión desde los primeros días de crecimiento de los MCTSs.

Por otro lado, miR-187-3p se sobreexpresa exclusivamente en los MCTSs al día 20 de cultivo, y su expresión está inhibida en las células proliferativas del esferoide, en donde encontramos una incrementada expresión de p53 y B-Raf. Además, la expresión de este microRNA no se ve modificada con la hipoxia o la hipoglucemia, lo que deja la posibilidad de que miR-187-3p esté siendo regulado por mecanismos epigenéticos y/o microambientales, como las

concentraciones de TNF, asociados a las subpoblaciones p27 positivas y a las células necróticas/apoptóticas.

Altos niveles de expresión de este microRNA en el suero de pacientes con CaMa han sido asociados con un mal pronóstico. La hipoxia y la hipoglucemia no modifican su expresión, sugiriendo que miR-187-3p es una característica muy particular de los MCTSs de día 20. En este contexto, un reporte demostró que la expresión de miR-187 no se modifica en células de riñón expuestas a condiciones de hipoxia crónica, lo que apoya nuestros resultados ¹⁰⁹.

La inhibición de la actividad de miR-221-3p reduce la capacidad migratoria y el potencial de degradación de las células MCF-7. Estos resultados son consistentes con estudios que reportan que la sobreexpresión de miR-221-3p promueve la adquisición de un fenotipo EMT/invasivo, debido a que tiene como blancos a diversos reguladores maestros como PTEN, ADIPOR1 y TRPS1 ^{110,111}. Por otro lado, la expresión ectópica de miR-187-3p incrementa el potencial de degradación de las células, concordando con datos publicados por Mulrane et al ¹¹². Interesantemente, este efecto es contrarrestado cuando el antimir-221 y el premiR-187 son transfectados al mismo tiempo en las células MCF-7. Estos resultados remarcan la importancia y necesidad de realizar estudios que consideren el papel biológico de las interacciones de miRNAs, como ocurre en un sistema biológico ¹¹³.

La sobreexpresión de miR-187-3p, la inhibición de miR-221-3p y la cotransfección en células MCF-7 resulta en una reducción en el número de células y un incremento en el tiempo de duplicación de las mismas. Estos eventos se asocian estrechamente al arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por el premiR-187 y a la apoptosis inducida por el antimir-221. Además, la contransfección de los miRNAs promueve la muerte celular en condiciones de privación de SFB. Estos resultados son consistentes con Medina et al ¹¹³, quienes reportaron

que miR-221-3p es un regulador del ciclo celular y de muerte celular en células de glioblastoma, otro reporte demuestra que la sobreexpresión de miR-187-3p induce la apoptosis de células de linfoma B ¹¹⁴.

En conjunto, los resultados de ciclo celular, las curvas de proliferación y los resultados de respuesta a la privación de suero, así como la expresión particular de cada miRNA en zonas específicas del esferoide, sugieren que, en nuestro modelo tridimensional de cáncer mamario, los niveles de expresión de los miRNAs miR-221-3p y miR-187-3p están estrechamente relacionados con la generación de poblaciones quiescentes. Estas poblaciones quiescentes representan a más del 50% de la población total de los MCTS y constituyen nichos tumorales más agresivos, ya que a pesar de que se encuentran en arresto celular y sus capacidades de migrar no son como las de las células proliferativas ⁸⁴, algunos grupos han propuesto que son las células quiescentes las que confieren resistencia terapéutica a diversos fármacos antineoplásicos, sobre todo aquellos que son dependientes del ciclo celular ⁵⁹, además es en estas poblaciones en donde las células stem se encuentran en dormancia pero protegidas y listas para reactivar su metabolismo para cuando las condiciones microambientales lo permitan ¹¹⁵, manteniendo así la sobrevivencia del tumor y provocando reincidencia de la enfermedad en los pacientes que ya han sido dados de alta. En este sentido, el uso de modelos *in vivo* ayudaría a determinar la contribución de ambos miRNAs en la progresión y/o establecimiento de las primeras etapas de crecimiento de un tumor primario y/ o metastásico.

Finalmente, cuando medimos los niveles de expresión de miR-221 y miR-187 en diferentes líneas celulares de CaMa, encontramos que la sobreexpresión de miR-221 es características de las líneas triple negativo. Estos datos son consistentes con la regulación

negativa que ejerce el receptor de estrógenos (ER) sobre miR-221 ¹¹⁶. Por lo anterior, miR-221 podría tener valor clínico al servir como marcador de clasificación o de selección de terapias, como ya ha sido propuesto para diversos miRNAs ¹¹⁷. En contraste, la expresión de miR-187 no está asociada con algún grupo de CaMa en particular.

Por su parte, el análisis de la expresión de miRNAs en bases de datos de pacientes con CaMa mostró que 5 de los 33 miRNAs cuya expresión se modifica en nuestro modelo 3D, tienen potencial clínico como marcadores predictivos para discriminar entre grupos de pacientes con alto o bajo riesgo de progresión de la enfermedad. Dentro de ellos, miR-187 mostró tener, por él mismo, un alto valor predictivo. De manera interesante, un estudio reciente reportó altos niveles de expresión de miR-187 en muestras de suero de un grupo pequeño de pacientes con CaMa en comparación con los niveles encontrados en muestras de suero de donadores sanos ¹¹⁸. Sin embargo, se necesitan estudios más exhaustivos para explorar el potencial clínico de este microRNA como un marcador predictivo no invasivo de CaMa.

El cáncer es un fenómeno complejo de difícil estudio, debido a la capacidad que tienen las células de responder a diferentes estímulos. En este sentido, utilizar modelos que incluyan diversas variables experimentales nos confiere ventajas para entender de manera más integral la biología de los tumores, sin embargo, estos no dejan de ser modelos que no logran recrear la intrincada red de señalización que opera en las células tumorales *in vivo*. Este estudio representa una visión integrativa de los patrones de expresión de miRNAs en un modelo de esferoides multicelulares derivados de una línea tumoral mamaria que genera ciertas características reportadas en tumores *in vivo* como son la heterogeneidad celular y los gradientes de nutrientes/oxígeno. ¿Por qué? y ¿para qué? se expresan específicamente estos miRNAs son respuestas casi imposibles de responder, ya que biológicamente estas moléculas

están actuando en conjunto, en momentos específicos y en una constante interacción con muchas otras moléculas y mecanismos reguladores que operan en el esferoide, como en un tumor *in vivo*. Este trabajo nos da solo un ejemplo de que cambios en la expresión de solo dos miRNAs tiene efectos a nivel biológico, para dar pie a imaginarnos que ocurre cuando un grupo de 33 miRNAs se modifican y que además en la realidad biológica no están actuando solos. Los estudios reduccionistas nos permiten explicar mecanismos, pero los estudios integrativos son muy importantes porque nos dan una idea de la complejidad a la que no estamos enfrentando y además nos ofrecen alternativas de estudio que en un futuro podrían tener aplicaciones ventajosas para el avance médico que finalmente repercute en la salud de las personas afectadas por esta enfermedad.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

El análisis del miRNAoma de MCTS MCF-7 de día 20 de cultivo reveló que: 1) Cuando las células MCF-7 se crecen de manera tridimensional en un modelo que desarrolla heterogeneidad celular/microambiental muestran un patrón de expresión diferencial de 33 miRNAs, respecto a las células cultivadas bidimensionalmente; 2) Este grupo de miRNAs participa en la regulación de vías de señalización implicadas en el crecimiento, proliferación, metástasis e invasión de las células tumorales; 3) Un grupo de mRNAs desregulados en el modelo se coregulan con estos miRNAs, y algunos de ellos están involucrados en procesos de proliferación; 4) las vías de señalización dependientes de p53 y B-Raf son dos de las vías más reguladas por el miRNAoma de los MCTS, ambas proteínas se expresan

preferencialmente en la capa celular externa de los MCTS; 5) Cambios en la expresión de dos miRNAs asociados a B-Raf, miR-221-3p y miR-187-3p, participan en la modulación de las capacidades de migración e invasión, así como en procesos de proliferación y resistencia a la privación de factores de crecimiento, lo que sugiere que los cambios del miRNAoma observados en los MCTS pueden estar fuertemente relacionados con el desarrollo del fenotipo quiescente, que es una característica importante en estadios agresivos del CaMa; 6) Altos niveles de expresión de miR-221 es característica de líneas celulares con fenotipo triple negativo y 7) miR-187 junto con otros cuatro micro-RNAs desregulados en nuestro modelo pueden servir como una herramienta predictiva para discriminar entre grupos de pacientes con CaMa de alto y bajo riesgo.

CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS

1. Análisis de la expresión de miR-10a, miR-379, miR-187, miR -127 y miR-48a en suero de pacientes con CaMa para confirmar el valor de estos miRNAs como biomarcadores predictivos no invasivos.
2. Estudio y descripción del mecanismo molecular de regulación entre B-raf y los miRNAs miR-221-3p y miR-187-3p.
3. Uso de herramientas bioinformáticas que generen modelos de interacciones biológicas entre mRNAs, lnc-RNAs y miRNAs. Esto generará un panorama más integral de la biología de los esferoides multicelulares mamarios.

REFERENCIAS

- 1 <http://globocan.iarc.fr>. International Agency for Research on Cancer.
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 3 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 4 Ferlay, J. *et al.* Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase GLOBOCAN (2012).
- 5 Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-2917, doi:10.1002/ijc.25516 (2010).
- 6 Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* **117**, 3155-3163, doi:10.1172/JCI33295 (2007).
- 7 Breast Cancer Treatment (PDQ®). *PDQ Adult Treatment Editorial Board*.
- 8 Parsa, Y. *et al.* A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. *Electron Physician* **8**, 2416-2424, doi:10.19082/2416 (2016).
- 9 Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* **24 Suppl 2**, S26-35, doi:10.1016/j.breast.2015.07.008 (2015).
- 10 Kim, V. N. & Nam, J. W. Genomics of microRNA. *Trends Genet* **22**, 165-173, doi:10.1016/j.tig.2006.01.003 (2006).
- 11 Londin, E. *et al.* Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E1106-1115, doi:10.1073/pnas.1420955112 (2015).
- 12 Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* **5**, 2929-2943 (2015).
- 13 Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer* **7**, 1281-1294, doi:10.7150/jca.13141 (2016).
- 14 Lee, H. J. Exceptional stories of microRNAs. *Exp Biol Med (Maywood)* **238**, 339-343, doi:10.1258/ebm.2012.012251 (2013).
- 15 Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1097-1101, doi:10.1038/nsmb1167 (2006).
- 16 Breving, K. & Esquela-Kerscher, A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1316-1329, doi:10.1016/j.biocel.2009.09.016 (2010).
- 17 Almeida, M. I., Reis, R. M. & Calin, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res* **717**, 1-8, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009 (2011).
- 18 Yang, J. S. *et al.* Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* **17**, 312-326, doi:10.1261/rna.2537911 (2011).
- 19 Lee, I. *et al.* New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* **19**, 1175-1183, doi:10.1101/gr.089367.108 (2009).
- 20 Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**, 351-379, doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103 (2010).
- 21 Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-1934, doi:10.1126/science.1149460 (2007).
- 22 Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. & Kazemzadeh-Bavili, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* **2014**, 970607, doi:10.1155/2014/970607 (2014).
- 23 Zhang, Y. *et al.* Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA* **20**, 1878-1889, doi:10.1261/rna.045633.114 (2014).

- 24 van Schooneveld, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res* **17**, 21, doi:10.1186/s13058-015-0526-y (2015).
- 25 Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* **65**, 7065-7070, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783 (2005).
- 26 Di Leva, G. *et al.* Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet* **9**, e1003311, doi:10.1371/journal.pgen.1003311 (2013).
- 27 Li, Y. *et al.* miR-221/222 promotes S-phase entry and cellular migration in control of basal-like breast cancer. *Molecules* **19**, 7122-7137, doi:10.3390/molecules19067122 (2014).
- 28 Dentelli, P. *et al.* miR-221/222 control luminal breast cancer tumor progression by regulating different targets. *Cell Cycle* **13**, 1811-1826, doi:10.4161/cc.28758 (2014).
- 29 Nassirpour, R., Mehta, P. P., Baxi, S. M. & Yin, M. J. miR-221 promotes tumorigenesis in human triple negative breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e62170, doi:10.1371/journal.pone.0062170 (2013).
- 30 Shen, L. *et al.* miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Exp Ther Med* **3**, 475-480, doi:10.3892/etm.2011.428 (2012).
- 31 Li, X. Y. *et al.* MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer. *Int J Clin Exp Med* **7**, 32-40 (2014).
- 32 Gao, J. *et al.* MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1. *PLoS One* **8**, e65138, doi:10.1371/journal.pone.0065138 (2013).
- 33 Stinson, S. *et al.* TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal* **4**, ra41, doi:10.1126/scisignal.2001538 (2011).
- 34 Hwang, M. S. *et al.* miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS One* **8**, e66502, doi:10.1371/journal.pone.0066502 (2013).
- 35 Rostas, J. W., 3rd *et al.* microRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Mol Cancer* **13**, 200, doi:10.1186/1476-4598-13-200 (2014).
- 36 Dobson, J. R. *et al.* hsa-mir-30c promotes the invasive phenotype of metastatic breast cancer cells by targeting NOV/CCN3. *Cancer Cell Int* **14**, 73, doi:10.1186/s12935-014-0073-0 (2014).
- 37 Yan, X. *et al.* miR-143 and miR-145 synergistically regulate ERBB3 to suppress cell proliferation and invasion in breast cancer. *Mol Cancer* **13**, 220, doi:10.1186/1476-4598-13-220 (2014).
- 38 Tang, W. *et al.* miR-27a regulates endothelial differentiation of breast cancer stem like cells. *Oncogene* **33**, 2629-2638, doi:10.1038/onc.2013.214 (2014).
- 39 He, T. *et al.* MicroRNA-542-3p inhibits tumour angiogenesis by targeting angiopoietin-2. *J Pathol* **232**, 499-508, doi:10.1002/path.4324 (2014).
- 40 Pecot, C. V. *et al.* Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat Commun* **4**, 2427, doi:10.1038/ncomms3427 (2013).
- 41 Kong, W. *et al.* MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem* **285**, 17869-17879, doi:10.1074/jbc.M110.101055 (2010).
- 42 Hrdlickova, R., Nehyba, J., Bargmann, W. & Bose, H. R., Jr. Multiple tumor suppressor microRNAs regulate telomerase and TCF7, an important transcriptional regulator of the Wnt pathway. *PLoS One* **9**, e86990, doi:10.1371/journal.pone.0086990 (2014).
- 43 Jiang, S. *et al.* A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells. *EMBO J* **31**, 1985-1998, doi:10.1038/emboj.2012.45 (2012).
- 44 Eichner, L. J. *et al.* miR-378(*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1beta/ERRgamma transcriptional pathway. *Cell Metab* **12**, 352-361, doi:10.1016/j.cmet.2010.09.002 (2010).

- 45 Favaro, E. *et al.* MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS One* **5**, e10345, doi:10.1371/journal.pone.0010345 (2010).
- 46 Elias, S. & Mandelboim, O. Battle of the midgets: innate microRNA networking. *RNA Biol* **9**, 792-798, doi:10.4161/rna.19717 (2012).
- 47 Tsukerman, P. *et al.* MiR-10b downregulates the stress-induced cell surface molecule MICB, a critical ligand for cancer cell recognition by natural killer cells. *Cancer Res* **72**, 5463-5472, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2671 (2012).
- 48 Vincent, K., Pichler, M., Lee, G. W. & Ling, H. MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int J Mol Sci* **15**, 14475-14491, doi:10.3390/ijms150814475 (2014).
- 49 Xiang, M. *et al.* STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF-kappaB to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Sci Signal* **7**, ra11, doi:10.1126/scisignal.2004497 (2014).
- 50 Christodoulatos, G. S. & Dalamaga, M. Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis? *World J Clin Oncol* **5**, 71-81, doi:10.5306/wjco.v5.i2.71 (2014).
- 51 Andorfer, C. A., Necela, B. M., Thompson, E. A. & Perez, E. A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends Mol Med* **17**, 313-319, doi:10.1016/j.molmed.2011.01.006 (2011).
- 52 Shah, N. R. & Chen, H. MicroRNAs in pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis and treatment. *World J Clin Oncol* **5**, 48-60, doi:10.5306/wjco.v5.i2.48 (2014).
- 53 Sutherland, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**, 177-184 (1988).
- 54 Djordjevic, B. & Lange, C. S. Cell-cell interactions in spheroids maintained in suspension. *Acta Oncol* **45**, 412-420, doi:10.1080/02841860500520743 (2006).
- 55 Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O. & Ladman, A. J. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* **37**, 3639-3643 (1977).
- 56 Weiswald, L. B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17**, 1-15, doi:10.1016/j.neo.2014.12.004 (2015).
- 57 Vaupel, P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* **13 Suppl 3**, 21-26, doi:10.1634/theoncologist.13-S3-21 (2008).
- 58 Hirayama, A. *et al.* Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* **69**, 4918-4925, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4806 (2009).
- 59 Borst, P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? *Open Biol* **2**, 120066, doi:10.1098/rsob.120066 (2012).
- 60 Baker, B. M. & Chen, C. S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* **125**, 3015-3024, doi:10.1242/jcs.079509 (2012).
- 61 Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E. & Solomon, F. D. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* **230**, 16-26, doi:10.1002/jcp.24683 (2015).
- 62 Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. *Cancer Res* **40**, 3956-3965 (1980).
- 63 Kunz-Schughart, L. A. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int* **23**, 157-161, doi:10.1006/cbir.1999.0384 (1999).
- 64 Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci* **16**, 5517-5527, doi:10.3390/ijms16035517 (2015).
- 65 Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J. W. & Rylander, M. N. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials* **32**, 7905-7912, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.001 (2011).

- 66 Sundstrom, A., Bar-Sagi, D. & Mishra, B. Simulating Heterogeneous Tumor Cell Populations. *PLoS One* **11**, e0168984, doi:10.1371/journal.pone.0168984 (2016).
- 67 Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* **18**, 84, doi:10.1186/s13058-016-0740-2 (2016).
- 68 Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M. & Krek, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev* **69-70**, 29-41, doi:10.1016/j.addr.2014.03.001 (2014).
- 69 Glimelius, B., Norling, B., Nederman, T. & Carlsson, J. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS* **96**, 433-444 (1988).
- 70 Insua-Rodriguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* **97**, 41-55, doi:10.1016/j.addr.2015.12.017 (2016).
- 71 Riedl, A. *et al.* Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci* **130**, 203-218, doi:10.1242/jcs.188102 (2017).
- 72 Feifei, N. *et al.* MicroRNA expression analysis of mammospheres cultured from human breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* **138**, 1937-1944, doi:10.1007/s00432-012-1272-5 (2012).
- 73 Guttilla, I. K. *et al.* Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the estrogen receptor by microRNAs. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 75-85, doi:10.1007/s10549-011-1534-y (2012).
- 74 Boo, L. *et al.* MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line. *Int J Biol Sci* **12**, 427-445, doi:10.7150/ijbs.12777 (2016).
- 75 Pacheco-Marin, R. *et al.* Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids. *Sci Rep* **6**, 23373, doi:10.1038/srep23373 (2016).
- 76 Muñoz-Galindo L, M.-Z. J., Pacheco-Marin R, Vazquez-Santillan K, Jimenez-Hernandez L.E, Martinez-Ruiz G, Mandujano-Tinoco E, Federico Avila-Moreno, Maldonado V. Dynamic expression of long non-coding RNAs during multicellular tumor spheroid growth. XXXXXXXX (2016).
- 77 Conger, A. D. & Ziskin, M. C. Growth of mammalian multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* **43**, 556-560 (1983).
- 78 Wu, L. *et al.* A central role for TRPS1 in the control of cell cycle and cancer development. *Oncotarget* **5**, 7677-7690, doi:10.18632/oncotarget.2291 (2014).
- 79 Su, A., He, S., Tian, B., Hu, W. & Zhang, Z. MicroRNA-221 mediates the effects of PDGF-BB on migration, proliferation, and the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PLoS One* **8**, e71309, doi:10.1371/journal.pone.0071309 (2013).
- 80 Pineau, P. *et al.* miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 264-269, doi:10.1073/pnas.0907904107 (2010).
- 81 Feliciano, A. *et al.* miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2-alpha, CCNJ, and MEGF9. *PLoS One* **8**, e76247, doi:10.1371/journal.pone.0076247 (2013).
- 82 Pratilas, C. A., Xing, F. & Solit, D. B. Targeting oncogenic BRAF in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* **355**, 83-98, doi:10.1007/82_2011_162 (2012).
- 83 Han, M. *et al.* Transfection study using multicellular tumor spheroids for screening non-viral polymeric gene vectors with low cytotoxicity and high transfection efficiencies. *J Control Release* **121**, 38-48, doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.012 (2007).
- 84 Gallardo-Perez, J. C., Rivero-Segura, N. A., Marin-Hernandez, A., Moreno-Sanchez, R. & Rodriguez-Enriquez, S. GPI/AMF inhibition blocks the development of the metastatic phenotype of mature multicellular tumor spheroids. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1043-1053, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.013 (2014).

- 85 Wallace, D. I. & Guo, X. Properties of tumor spheroid growth exhibited by simple mathematical models. *Front Oncol* **3**, 51, doi:10.3389/fonc.2013.00051 (2013).
- 86 Durand, R. E. Multicell spheroids as a model for cell kinetic studies. *Cell Tissue Kinet* **23**, 141-159 (1990).
- 87 Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M. B. & Dwarakanath, B. S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med* **4**, 12, doi:10.1186/1479-5876-4-12 (2006).
- 88 McMahan, K. M. *et al.* Characterization of changes in the proteome in different regions of 3D multicell tumor spheroids. *J Proteome Res* **11**, 2863-2875, doi:10.1021/pr2012472 (2012).
- 89 Nicolini, C. A., Linden, W. A., Zietz, S. & Wu, C. T. Identification of non-proliferating cells in melanoma B16 tumour. *Nature* **270**, 607-609 (1977).
- 90 Desoize, B. & Jardillier, J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* **36**, 193-207 (2000).
- 91 Galateanu, B. *et al.* Impact of multicellular tumor spheroids as an in vivo like tumor model on anticancer drug response. *Int J Oncol* **48**, 2295-2302, doi:10.3892/ijo.2016.3467 (2016).
- 92 Lee, S. H. *et al.* Colorectal cancer-derived tumor spheroids retain the characteristics of original tumors. *Cancer Lett* **367**, 34-42, doi:10.1016/j.canlet.2015.06.024 (2015).
- 93 Gagliano, N. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma: Characterization in a 3D-cell culture model. *World J Gastroenterol* **22**, 4466-4483, doi:10.3748/wjg.v22.i18.4466 (2016).
- 94 Imamura, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* **33**, 1837-1843, doi:10.3892/or.2015.3767 (2015).
- 95 Chen, J. Q. *et al.* Prognostic value of the trichorhinophalangeal syndrome-1 (TRPS-1), a GATA family transcription factor, in early-stage breast cancer. *Ann Oncol* **24**, 2534-2542, doi:10.1093/annonc/mdt190 (2013).
- 96 Shah, M. Y. & Calin, G. A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer. *Genome Med* **3**, 56, doi:10.1186/gm272 (2011).
- 97 Bao, Y., Zhong, Z. X., Cui, G., Guo, L. & Wang, Z. F. [Roles of trichorhinophalangeal syndrome-1 gene in normal breast development and breast cancer]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **35**, 121-124, doi:10.3881/j.issn.1000-503X.2013.01.023 (2013).
- 98 Brandt-Bohne, U., Keene, D. R., White, F. A. & Koch, M. MEGF9: a novel transmembrane protein with a strong and developmentally regulated expression in the nervous system. *Biochem J* **401**, 447-457, doi:10.1042/BJ20060691 (2007).
- 99 He, X. X. *et al.* Bioinformatics analysis identifies miR-221 as a core regulator in hepatocellular carcinoma and its silencing suppresses tumor properties. *Oncol Rep* **32**, 1200-1210, doi:10.3892/or.2014.3306 (2014).
- 100 Hayashi, M. *et al.* Clinical significance of CYLD downregulation in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **143**, 447-457, doi:10.1007/s10549-013-2824-3 (2014).
- 101 Li, D. *et al.* Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 7672-7680 (2014).
- 102 Mandujano-Tinoco, E. A., Gallardo-Perez, J. C., Marin-Hernandez, A., Moreno-Sanchez, R. & Rodriguez-Enriquez, S. Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 541-551, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.11.013 (2013).
- 103 Wang, Z. *et al.* MicroRNA-378-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by targeting BRAF. *Cancer Cell Int* **15**, 40, doi:10.1186/s12935-015-0192-2 (2015).
- 104 Wang, Y. L. *et al.* Study of PIK3CA, BRAF, and KRAS mutations in breast carcinomas among Chinese women in Qinghai. *Genet Mol Res* **14**, 14840-14846, doi:10.4238/2015.November.18.49 (2015).
- 105 Hemmatzadeh, M., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F., Asghari, F. & Yousefi, M. The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother* **78**, 129-139, doi:10.1016/j.biopha.2016.01.026 (2016).

106 Choi, Y. W. *et al.* MicroRNA Expression Signatures Associated With BRAF-Mutated Versus KRAS-Mutated
Colorectal Cancers. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3321, doi:10.1097/MD.0000000000003321 (2016).

107 Kim, S. A. *et al.* Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and
lymph node metastasis. *Br J Cancer* **114**, 199-206, doi:10.1038/bjc.2015.347 (2016).

108 Pfister, S. *et al.* BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-
grade astrocytomas. *J Clin Invest* **118**, 1739-1749, doi:10.1172/JCI33656 (2008).

109 He, X. *et al.* delta-Opioid receptor activation modified microRNA expression in the rat kidney under
prolonged hypoxia. *PLoS One* **8**, e61080, doi:10.1371/journal.pone.0061080 (2013).

110 Ye, X. *et al.* MiR-221 promotes trastuzumab-resistance and metastasis in HER2-positive breast cancers
by targeting PTEN. *BMB Rep* **47**, 268-273 (2014).

111 Falkenberg, N. *et al.* MiR-221/-222 differentiate prognostic groups in advanced breast cancers and
influence cell invasion. *Br J Cancer* **109**, 2714-2723, doi:10.1038/bjc.2013.625 (2013).

112 Mulrane, L. *et al.* miR-187 is an independent prognostic factor in breast cancer and confers increased
invasive potential in vitro. *Clin Cancer Res* **18**, 6702-6713, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1420 (2012).

113 Medina, R. *et al.* MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res*
68, 2773-2780, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6754 (2008).

114 Huang, F., Jin, Y. & Wei, Y. MicroRNA-187 induces diffuse large B-cell lymphoma cell apoptosis via
targeting BCL6. *Oncol Lett* **11**, 2845-2850, doi:10.3892/ol.2016.4313 (2016).

115 Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M. C. & Zeniou, M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity
as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int* **2016**, 1740936, doi:10.1155/2016/1740936
(2016).

116 Di Leva, G. *et al.* MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J*
Natl Cancer Inst **102**, 706-721, doi:10.1093/jnci/djq102 (2010).

117 Luqmani, Y. A. & Alam-Eldin, N. Overcoming Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: New
Approaches to a Nagging Problem. *Med Princ Pract* **25 Suppl 2**, 28-40, doi:10.1159/000444451 (2016).

118 Zhu, J. *et al.* Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Front*
Genet **5**, 149, doi:10.3389/fgene.2014.00149 (2014).

119 Galardi, S. *et al.* miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate
carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* **282**, 23716-23724, doi:10.1074/jbc.M701805200
(2007).

120 Sehgal, M. *et al.* IFN-alpha-Induced Downregulation of miR-221 in Dendritic Cells: Implications for HCV
Pathogenesis and Treatment. *J Interferon Cytokine Res* **35**, 698-709, doi:10.1089/jir.2014.0211 (2015).

121 Meerson, A. *et al.* Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism
downstream of leptin and TNF-alpha. *Diabetologia* **56**, 1971-1979, doi:10.1007/s00125-013-2950-9
(2013).

122 Dogar, A. M., Semplicio, G., Guennewig, B. & Hall, J. Multiple microRNAs derived from chemically
synthesized precursors regulate thrombospondin 1 expression. *Nucleic Acid Ther* **24**, 149-159,
doi:10.1089/nat.2013.0467 (2014).

APÉNDICE I

Tabla. El nodo de interacción miR-221-3p – mRNA´s sugerido por miRTarvis, se modela a partir de evidencia experimental reportada y de información del algoritmo TargetScan.

	PREDICCIÓN	EVIDENCIA EXPERIMENTAL
CREBZF		Hepatocarcinoma ⁸⁰
TRPS1		Cáncer de mama ⁹⁶
		Cáncer de mama ³³
		Cáncer de Páncreas ⁷⁹
		Cáncer de Próstata ¹¹⁹
TSC22D3	Posición 1250-1256 – 3'UTR (TargetScan)	
DDIT4		Hepatocarcinoma ^{80,99}
		Células Dendríticas ¹²⁰
KLHL24	Posición 5091-5097 – 3'UTR (TargetScan)	
THBS1		Adipocitos ¹²¹
		Cáncer cervicouterino ¹²²
MEGF9	Posición 736-743 – 3'UTR	