



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE LOS mRNAs BLANCO DEL microRNA-137 EN LA
LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CERVANTES AYALA ANDREA VIRIDIANA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA, INMEGEN

DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1128/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente


Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **4 de octubre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **CERVANTES AYALA ANDREA VIRIDIANA** con número de cuenta **312547637** con la tesis titulada "**IDENTIFICACIÓN DE LOS mRNAs BLANCO DEL microRNA-137 EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231**", realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN
Vocal: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Secretario: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 24 de noviembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar, me gustaría agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto de maestría.

También, un agradecimiento a CONACYT por el apoyo económico (No. 918020) brindado para poder llevar a cabo esta investigación.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores por dirigir este proyecto y haber confiado en él desde el inicio. Gracias por el tiempo y conocimiento compartido conmigo en esta etapa; por la disponibilidad, la paciencia y todo lo que aportó para mi formación.

También agradezco a las Dras

Dra. Silvia Jiménez Morales

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Muchas gracias por su interés, por todas las aportaciones y comentarios realizados durante el desarrollo de este proyecto, así como por el tiempo dedicado a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres, Maricela y Roberto, por la paciencia, el amor, la confianza y el apoyo que me han brindado siempre, por creer que puedo lograr todo lo que me pasa por la mente. A mi hermano, Roberto, por siempre aconsejarme aún sabiendo que de todas formas haré lo que yo quiero, y por ser el mejor hermano para mí.

A mis amigas, Fernanda y Betsabé, no sé que hubiera sido de mí en esta pandemia sin su apoyo, sus palabras, su empatía. Muchas gracias por todo lo que han hecho por mí, que es mucho aunque no se los diga todo el tiempo. Las quiero mucho y he aprendido mucho con ustedes. A ti amix, Brandon, por tanto apoyo y cariño, estamos juntos en todo esto de sobrevivir a la vida adulta, hemos armado un grado equipo. Daniel, gracias por quererme, por hacerme reír cuando estoy triste, por estar orgullo de mí aunque a veces ni yo lo esté y por toda la ternura con la que me has acompañado hasta ahora. También agradezco a lo mejor que me dejó la clase de cáncer del posgrado, Sel, Yan y Vai, espero que sigamos compartiendo muchas anécdotas juntas, gracias por tantas risas y motivación para completar este trabajo, y el posgrado en general.

Last but not least, I wanna thank me...

Por haber continuado a pesar de los días malos, de la frustración y la fatiga emocional. Este es un pequeño recordatorio para la Andy del futuro de que todo pasa, tanto lo bueno como lo malo, no te concentres solo en el resultado, trata de apreciar todo el proceso. Al final todo ha valido la pena.

¡Nunca más una ciencia sin nosotras!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Clasificación molecular del cáncer de mama: subtipo Claudin-low	6
1.2 Línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231	9
1.3 BIK en la línea celular de cáncer de mama M-231	11
1.4 microRNAs	13
1.4.1 Regulación de RNAs no codificantes por miRNAs	16
1.5 Ubicación genómica y biogénesis de los microRNAs	17
1.6 Importancia de los microRNAs en la regulación génica	19
1.7 El miRNA 137	24
1.8 El miR-137 en cáncer	26
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General	30
5.2 Objetivos Particulares	30
6. METODOLOGÍA	31

6.1 Cultivo Celular	31
6.2 Transfección del RNA de interferencia (siRNA)-específico para BIK .	31
6.4 PCR en tiempo real (qPCR), para la detección de mRNAs	32
6.4.1 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	32
6.4.2 Amplificación de los mRNAs	33
6.5 PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de miRNAs	34
6.5.1 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	34
6.5.2 Amplificación de los miRNAs maduros	34
6.6 Ensayo MirTrap	35
6.6.1 Diseño y acoplamiento de los miRNAs “mimic” 1303 y 137	35
6.6.2 Transfección del miRNA mimic y de los plásmidos	37
6.6.3 Determinación de la eficiencia de transfección	38
6.6.4 Inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA	38
6.6.5 Extracción de RNA	39
6.7 Análisis de microarreglos de expresión (HTA 2.0)	39
6.8 Análisis bioinformático	40
6.9 Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Cultivo de la línea celular M231	41
7.2 Interferencia de BIK	42
7.2.1 Determinación de la expresión del mRNA BIK	42
7.2.2 Determinación de la expresión del miR-137	44
7.3 Ensayo miRTrap	45
7.3.1 Expresión del miR-1303	45

7.3.2 Transfección del miR-1303 y del Vector MirTrap Control	47
7.3.3 Transfección del miR-1303 mimic y del vector MirTrap	50
7.3.4 Inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA: miR-1303	53
7.3.5 Expresión del miR-137	53
7.3.6 Transfección del miR-137 mimic y el vector MirTrap	55
7.3.7 Inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA: miR-137	59
7.4 Arreglos de Genoma Humano HTA2.0	59
7.4.1 Análisis bioinformático de los datos del arreglo de expresión	60
7.4.2 Exploración de los datos	60
7.4.3 Normalización de los datos	62
7.4.4 Identificación de los mRNAs blanco del miR-137 y el miR-1303	65
7.4.5 Análisis de enriquecimiento de vías con GO (Ontología génica) del miR- 137 y el miR-1303	77
7.4.6 Análisis de enriquecimiento de vías con KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) del miR-137 y el miR-1303	79
8. DISCUSIÓN	82
9. CONCLUSIONES	89
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
11. ANEXOS	98
ANEXO 1. Ensayo MirTrap	98
ANEXO 2. Evaluación de la eficiencia de transfección	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de calor de 60 genes diferencialmente expresados entre los subtipos moleculares de cáncer de mama	8
Figura 2. Fenotipo fusiforme de las células M231.....	10
Figura 3. Clasificación de los miembros de la familia BCL-2.....	11
Figura 4. Clasificación de los RNAs no codificantes (ncRNAs).....	14
Figura 5. Distribución de las interacciones entre miRNAs y diferentes especies de RNA	16
Figura 6. Biogénesis canónica de los microRNAs.....	18
Figura 7. Interacción canónica miRNA-mRNA.....	20
Figura 8. Regulación post-transcripcional mediada por microRNAs.....	22
Figura 9. Localización genómica del <i>MIR-137</i>	25
Figura 10. Secuencia del miR-137 mimic diseñado para el ensayo MirTrap	36
Figura 11. Fenotipo fusiforme de las células M231.....	41
Figura 12. Extracción de RNA total de las células M231.....	43
Figura 13. Expresión de BIK en las células M231, después de la interferencia con el siRNA-BIK	43
Figura 14. Expresión del miR-137 en células M231, después de la interferencia con el siRNA-BIK.....	44
Figura 15. Extracción de RNA total de las células M231.....	45
Figura 16. Expresión del miR-1303 en líneas celulares de CaM MCF-7 y M231	46
Figura 17. Acoplamiento de las hebras 5' y 3' del miR-1303.....	47
Figura 18. Visualización de las células M231 durante la transfección del vector MirTrap y el vector Control.....	48
Figura 19. Imágenes de fluorescencia de las células M231 (20X) después de la transfección del vector Control	49

Figura 20. Visualización de las células M231 durante la transfección del miR-1303 y el vector MirTrap	51
Figura 21. Viabilidad de las células M231 luego de la transfección del miR-1303 y el vector MirTrap	52
Figura 22. Expresión del miR-137 en líneas celulares de CaM MCF7 y M231.....	54
Figura 23. Acoplamiento de las hebras 5' y 3' del miR-137	56
Figura 24. Visualización de las células M231 durante la transfección del miR-137 y el vector MirTrap	57
Figura 25. Viabilidad de las células M231 luego de la transfección del miR-137 y el vector MirTrap	58
Figura 26. Distribución de los datos de intensidad de las sondas hibridadas en los arreglos HTA 2.0	61
Figura 27. Distribución normalizada de los datos de intensidad de las sondas hibridadas en los arreglos HTA 2.0	63
Figura 28. Análisis de componentes principales de los datos del miR-1303 y el miR-137	64
Figura 29. Mapas de calor y gráficos de nube de los RNAs blanco de los miRs 137 y 1303	69
Figura 30. Análisis de enriquecimiento de vías con GO	78
Figura 31. Esquema representativo de algunos blancos del miR-137 involucrados en la carcinogénesis	82
Figura 32. Esquema general de algunos elementos de la red de regulación del miR-137 en la línea M231	88
Figura 33. Esquema general del fundamento del ensayo MirTrap.	98
Figura 34. Vector pMirTrap Control	99
Figura 35. Vector pMirTrap	99
Figura 36. Imágenes de fluorescencia de las células M231 después de la transfección del vector Control	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama	6
Tabla 2. Características de las diferentes líneas celulares de tipo MDA-MB.....	9
Tabla 3. Marcadores expresados por la línea M231.....	10
Tabla 4. Interacción de BIK con miRNAs específicos.....	13
Tabla 5. Vías no canónicas de biogénesis de los miRNAs.....	19
Tabla 6. Mezcla de reacción para los complejos de transfección del siRNA.	31
Tabla 7. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para mRNAs	33
Tabla 8. Mezcla de reacción para la qPCR de mRNAs	33
Tabla 9. Secuencia de los oligos utilizados para la qPCR	34
Tabla 10. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para miRNAs	34
Tabla 11. Mezcla de reacción para la qPCR de miRNAs	35
Tabla 12. Mezcla de reacción para los complejos de transfección del ensayo MirTrap	37
Tabla 13. Concentración de RNA después de la transfección del siRNA-BIK.....	42
Tabla 14. Concentración de RNA extraído de las células M231.....	45
Tabla 15. Concentración de RNA: ensayo MirTrap para el miR-1303.....	53
Tabla 16. Concentración de RNA: ensayo MirTrap para el miR-137	59
Tabla 17. Lista de los blancos identificados para el miR-137.....	70
Tabla 18. Lista de los blancos identificados para el miR-1303.....	74
Tabla 19. Análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los mRNAs blanco del miR-137	79
Tabla 20. Análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los mRNAs blanco del miR-1303	80

ABREVIATURAS

AURKA	Aurora cinasa A
BAK	Antagonista 1 de BCL-2
BAX	Proteína X asociada a BCL-2, reguladora de la apoptosis
BCL-2	Proteína reguladora de la apoptosis BCL2
BH	Dominios de homología BCL-2
BIK	Proteína de muerte que interacciona con BCL-2
CaM	Cáncer de mama
CCR4	Receptor de quimiocina con motivo C-C 4
CCND1	Ciclina D1
CDH1	Caderina e
CD24	Molécula CD24
CD44	Molécula CD44
CD49	Molécula CD49
CL	<i>Claudin-low</i> (bajo en claudinas)
CLDN	Claudinas
CTSK	Catepsina K
CYC	Citocromo C
DBLOH	Proteína mitocondrial Diablo de unión a IAP
DDX6	Helicasa dead-box 6
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eIF4E2	Factor 2 de inicio de la traducción eucarionte
eIF6	Factor 6 de inicio de la traducción eucariota
EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial
ER	Receptor de estrógenos
ERBB2	Receptor erb-B2 tirosina-cinasa 2
ESRRA	Receptor alfa relacionado con estrógenos
EZH2	Potenciador de Zeste, subunidad 2 del complejo represor de Polycomb 2
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos
GATA3	Proteína de unión a GATA 3

GBM	Glioblastoma multiforme
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
HMEC	Células epiteliales mamarias humanas
HOTAIR	Transcrito antisentido de Hox
KLF12	Factor parecido a Kruppel 12
KRT8	Queratina 8
KRT18	Queratina 18
LINES	Elementos nucleares dispersos largos
LTR	Repeticiones terminales largas
MALAT	Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis
miRNA	microRNAs
MITF	Factor de transcripción inductor de melanocitos
MKI67	Marcador de proliferación Ki-67
MRE	Elementos de respuesta a miRNAs
MYC	Proto-oncogen MYC, factor de transcripción BHLH
M231	Línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231
NCOA3	Coactivador 3 del receptor nuclear
ncRNAs	RNAs no codificantes
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
PABPC	Proteína citoplasmática de unión poli (A)
PAQR3	Miembro 3 de la familia de receptores de progesterona y adipocina
PIK3CA	Subunidad catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
PLAC8	Proteína asociada a la placenta 8
POLR3D	Subunidad D de la RNA polimerasa III
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
REST	Factor de transcripción silenciador de RE1
rRNA	RNA ribosomal
SINES	Elementos nucleares dispersos cortos
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SNAI1	Represor transcripcional de la familia Snail

TEM	Transición epitelio-mesénquima
TLR	Receptor tipo Toll
TNRC6	Adaptador 6 que contiene repetición de trinucleótidos
TP53	Proteína Tumoral p53
tRNA	RNA de transferencia
TWIST	Factor de transcripción de la familia TWIST BHLH
VIM	Vimentina
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
XIAP	Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X
XRN1	Exoribonucleasa 1 5'-3'

RESUMEN

La proteína pro-apoptótica BIK, ha sido descrita como supresor tumoral en varios tipos de cáncer, sin embargo en cáncer de mama, esta proteína se encuentra a la alta comportándose como un oncogen. BIK se localiza en el núcleo de las células de cáncer de mama triple negativo “*claudin-low*” MDA-MB-231 (M231), en donde potencialmente regula la expresión de múltiples miRNAs, entre ellos el miR-137. Al igual que BIK, existe evidencia de la acción dual del miR-137, como supresor de genes y como oncogen, dependiendo el tipo celular. Por tanto, el objetivo de este trabajo es identificar los mRNAs blanco del miR-137 en la línea M231, para dilucidar su participación en la malignidad (migración e invasión) de estas células.

En primer lugar, se transfectó un siRNA-BIK para disminuir los niveles de mRNA BIK y observar el efecto de esta disminución sobre los niveles de expresión del miR-137. Después se realizó un ensayo MirTrap para capturar *in vivo* los blancos moleculares del miR-137 en las células M231.

Los resultados de la interferencia de BIK mostraron un restablecimiento de la expresión del miR-137, en contraste con las células no transfectadas y con la línea celular no neoplásica HMEC (1.57 ± 0.21 , 0.53 ± 0.097 y 1 ± 0.01 , respectivamente). En el ensayo MirTrap se identificaron, mediante un análisis bioinformático, 139 blancos moleculares para el miR-137, de los cuales 109 corresponden a mRNAs, y el resto a otros RNAs no codificantes (ncRNAs) como ribosimales (rRNAs), largos con codificantes (lncRNAs), pequeños nucleolares (snoRNAs) y miRNAs. Un análisis posterior de enriquecimiento de vías, mostró que los mRNAs blanco del miR-137 participan en vías biológicas relacionadas con la migración e invasión, así

como en otros procesos tales como proliferación, apoptosis, transición epitelio mesénquima, quimiorresistencia y metástasis. Por tanto los datos aquí obtenidos indican un papel importante del miR-137, y de BIK, en la regulación de la malignidad de las células M231.

ABSTRACT

The pro-apoptotic protein BIK has been described as a tumor suppressor in several types of cancer, however, in breast cancer, this protein is found acting as an oncogene. BIK is located in the nucleus of the triple-negative MDA-MB-231 (M231) breast cancer cells, where it potentially regulates the expression of multiple miRNAs, including miR-137. Like BIK, there is evidence of the dual action of miR-137, as a tumor suppressor gene and as an oncogene, depending on the cell type. Therefore, the aim of this work is to identify the targets of the miR-137 in the M231 line, to elucidate their involvement in the malignancy (migration and invasion) of these cells.

First, a siRNA-BIK was transfected to decrease mRNA-BIK levels and observe the effect of this on miR-137 expression. Then a MirTrap assay was performed to capture *in vivo* molecular targets of miR-137 in M231 cells.

The BIK interference results showed a restoration of miR-137 expression, in contrast, to control cells and the non-neoplastic HMEC cell line (1.57 ± 0.21 , 0.53 ± 0.097 , and 1 ± 0.01 , respectively). From the MirTrap assay, 139 molecular targets for miR-137 were identified by bioinformatics analysis, of which 109 correspond to mRNAs, and the rest to other non-coding RNAs (ncRNAs) such as ribosomal (rRNAs), long non-coding (lncRNAs), small nucleolar (snoRNAs) and miRNAs. Further analysis showed that miR-137 targets are involved in biological pathways related to migration and invasion, as well as in other processes such as proliferation, apoptosis, epithelial-mesenchymal transition, chemoresistance and metastasis. Therefore, the data obtained here are consistent with an important role of miR-137 and BIK, in the regulation of M231 cell malignancy.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaM) es una de las enfermedades con más incidencia en el mundo y en particular en México; siendo la tercera causa de mortalidad en mujeres mexicanas, después de las enfermedades cardiovasculares y de la diabetes (1). El CaM es una enfermedad y se presenta en diferentes subtipos, con diferentes características tanto clínicas como moleculares. La clasificación se basa en subtipos histológicos (carcinoma ductal o carcinoma lobular) que pueden ser *in situ* o invasivos, expresión diferencial de receptores hormonales y diferente inmunogenicidad de los tumores. Además también difieren en las firmas mutacionales, en las cuales, los genes mutados y/o amplificados con mayor frecuencia son Proteína tumoral p53 (*TP53*): 41%, Subunidad catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa (*PIK3CA*): 30%, Proto-oncogen MYC, factor de transcripción BHLH (*MYC*): 20%, Homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*): 16%, Ciclina D1 (*CCND1*): 16%, Receptor erb-B2 tirosina-cinasa 2 (*ERBB2*): 13%, Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR1*): 11% y Proteína de unión a GATA 3 (*GATA3*): 10% (2). Así mismo, pueden encontrarse distintas marcas epigenéticas tales como hipometilación global y marcas de histonas que cambian la estructura de la cromatina para reprimir la expresión génica (2).

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre el CaM deriva de estudios *in vitro*, realizados en diversas líneas celulares, que sirven como modelos para proporcionar información acerca de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a esta enfermedad (3). La línea celular de CaM, MDA-MB-231 (M231), se caracteriza por tener una gran capacidad invasiva y metastásica, y presenta

marcadores moleculares tanto epiteliales (*Caderina E* y *EpCAM*) como mesenquimales (*Caderina N* y *Snail*) (4), que se relacionan con la transición epitelio-mesénquima (TEM). En el 2018, un estudio realizado en nuestro laboratorio demostró que la proteína proapoptótica BIK se une al genoma de las células M231, en regiones donde se localizan tanto secuencias codificantes como no codificantes, incluyendo regiones donde se localizan varios microRNAs (miRNAs), entre ellos el miRNA-137 (5).

Los miRNAs son un grupo conservado de RNAs pequeños no codificantes (ncRNAs, del inglés: *non-coding RNAs*) de cadena sencilla, que actúan como reguladores de la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional (6,7). Cada miRNA puede regular post-transcripcionalmente alrededor de 100-150 mRNAs (6), por lo que ejercen una función importante en la regulación génica. También se ha demostrado que regulan a nivel transcripcional, reclutando maquinaria de activación o represión a los promotores de algunos genes (7,8). Asimismo, en el 2016 se demostró la existencia de miRNAs con una longitud de 80-100 nucleótidos (nt), los cuales regulan mRNAs a nivel postranscripcional (como los miRNAs de tamaño convencional de 18-24 nt) así como la disponibilidad de las proteínas Argonauta (AGO) (9,10). Además, existe evidencia de que los miRNAs regulan no solo a mRNA sino también a lncRNAs, regulándolos de forma negativa (11,12).

La expresión del *miR-137* está desregulada en varios tipos de cáncer, entre ellos el CaM (13,14). Además, hay evidencia de que este miRNA actúa como supresor de tumores en otros tipos de cáncer (gástrico, pulmón, osteosarcoma) y

como oncogen en cáncer de vejiga, por lo que en este trabajo se busca identificar a los mRNAs blanco de este miRNA en la línea celular M231.

1.1 Clasificación molecular del cáncer de mama: subtipo *Claudin-low*

Molecularmente, el CaM se clasifica en cinco subtipos; esto de acuerdo con la expresión de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y del factor del crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (Tabla 1) (15).

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama

Clasificación	Inmunoperfil	Otras características
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	MKI67: expresión relativa baja, a menudo sensible a la quimioterapia.
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	MKI67: expresión relativa alta. Respuesta variable a la quimioterapia.
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	MKI67: expresión relativa alta. Reactivo a la quimioterapia.
Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	EGFR ⁺ . MKI67: expresión relativa alta; frecuentemente sensible a la quimioterapia.
Claudin-low	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MKI67: expresión relativa baja. Caderina E, claudinas 3, 4 y 7 a la baja; respuesta intermedia a la quimioterapia.

ER: Receptor de estrógeno. PR: Receptor de progesterona. HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. MKI67: Marcador de proliferación Ki-67. EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Aproximadamente el 8% de los tumores de mama invasivos se clasifican dentro del subtipo molecular *claudin-low* (CL) (16). Este subtipo se caracteriza por la expresión relativamente baja de genes que codifican para proteínas de adhesión celular, entre ellos los genes *CDH1* (Caderina E) y *CLDN3/4/7* (Claudinas 3, 4 y 7) (16,17). La CDH1 es una proteína dependiente de calcio, que participa en las uniones célula-célula (4), mientras que las CLDN son proteínas involucradas en uniones epiteliales estrechas (18). Además, los tumores CL presentan rasgos moleculares asociados a células troncales mamarias: $CD44^+/CD24^{-low}$ y $CD49f^+/EpCAM$ (molécula de adhesión celular epitelial) $^{-low}$ (17).

En el 2017, un análisis de expresión arrojó 60 genes diferencialmente expresados en el subtipo CL, en comparación con tejidos normales y con los demás subtipos de CaM (Figura 1) (16). Entre estos genes identificados en microarreglos, se encontraron a la baja los relacionados con diferenciación epitelial (*CD24*, *KRT8* [Queratina 8] y *KRT18* [Queratina 18]) y a la alta los relacionados con la transición epitelio mesénquima (TEM) (*CTSK* [Catepsina K] y *PLAC8* [Proteína asociada a la placenta 8]) (16). Esto muestra que este subtipo presenta rasgos moleculares característicos que permiten distinguir a los tumores CL del resto de los tumores de CaM.

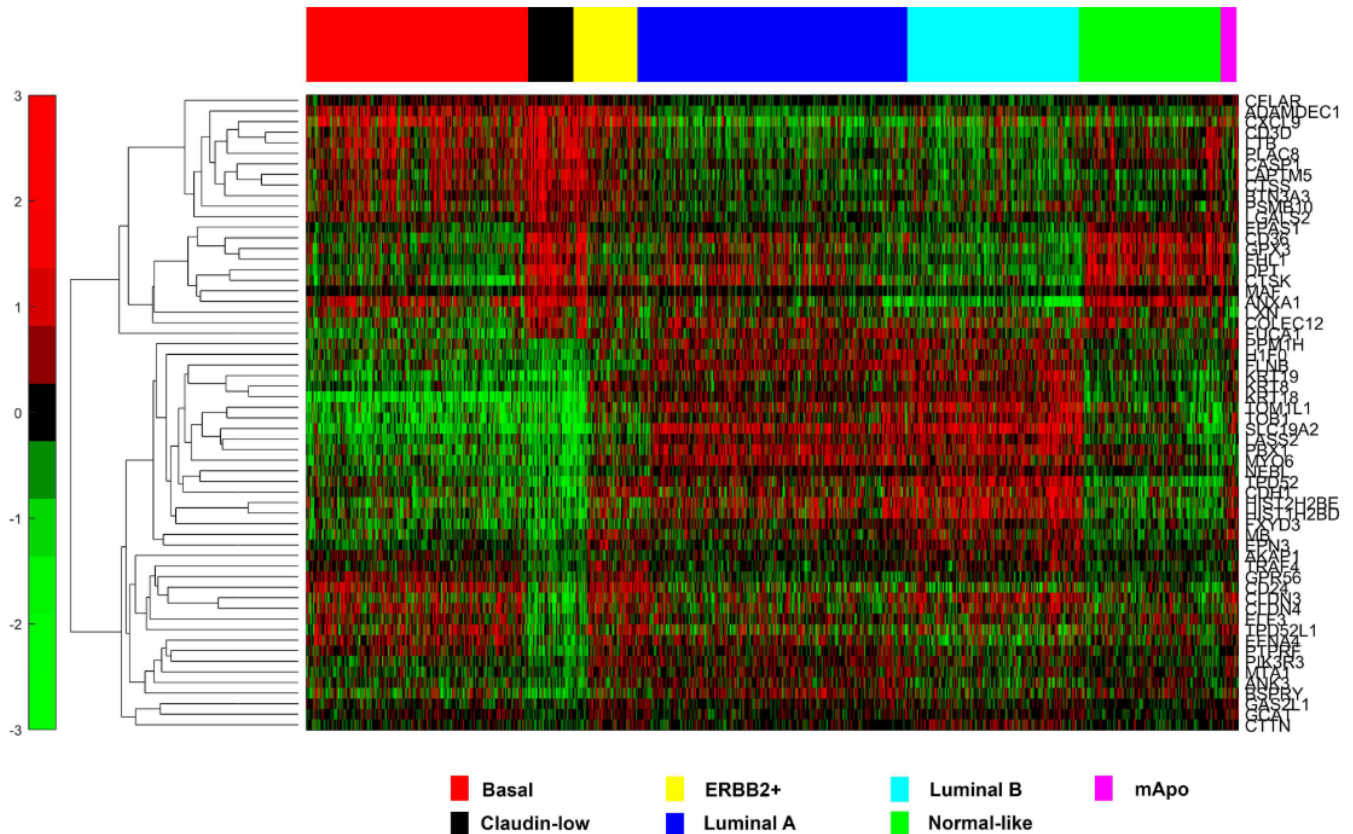


Figura. 1. Mapa de calor de 60 genes diferencialmente expresados entre los subtipos moleculares de cáncer de mama. Se utilizaron 1,593 muestras de tumores de mama y tejidos adyacentes, para analizar la expresión de genes que codifican para proteínas. Se encontraron 60 genes diferencialmente expresados en los tumores de tipo CL, en contraste con los tumores de todos los demás subtipos moleculares. Las filas representan genes y las columnas pacientes. La intensidad del color refleja la expresión relativa del gen, verde: sobrepresado y rojo subexpresado. mAPO: subtipo molecular apocrino. (16).

Asimismo, en comparación con los otros subtipos de CaM, los tumores de tipo CL suelen presentarse a una edad más temprana (52.8 *versus* 59 años); generalmente son de alto grado (el 68% *versus* el 15% son de grado III) y de mayor tamaño (32.9% vs 18.5% son >2 cm). Además, se caracterizan por tener una tasa de infiltración linfocítica alta (41.9% vs 7.9%) (16).

1.2 Línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231

La 'serie' de líneas celulares de tipo MDA, fue establecida a partir de una paciente diagnosticada con carcinoma ductal infiltrante, en el Hospital M. D. Anderson (Houston, Texas). A pesar de originarse de la misma paciente, cada una de las líneas presenta tanto genotipos como fenotipos diferentes (Tabla 2) (19,20).

Tabla 2. Características de las diferentes líneas celulares de tipo MDA-MB

Línea Celular	ER	PR	HER2	Subtipo	BRCA1	TP53	Tumor
MDA-MB-134	+	-	-	Luminal A	WT	+/- ^{WT}	IDC
MDA-MB-157	-	-	-	TNBC	WT	-	MC
MDA-MB-175	+	-	-	Luminal A	ND	+/- ^{WT}	IDC
MDA-MB-231	-	-	-	Claudin-low	WT	+/+ ^M	IDC
MDA-MB-330	+	-	+	Luminal B	WT	-	ILC
MDA-MB-361	+	+/-	+	Luminal B	WT	-	AC
MDA-MB-415	+	+/-	-	Luminal A	WT	+/+	AC
MDA-MB-435	-	-	-	TNBC	WT	+/+ ^M	AC
MDA-MB-436	-	-	-	TNBC	MU	-	AC
MDA-MB-453	-	-	+	HER2	WT	-	AC
MDA-MB-468	-	-	-	Basal	WT	+/+	AC

TNBC: Cáncer de mama triple negativo. *WT*: wild type, *MU*: mutado, *ND*: no determinado. *IDC*: Carcinoma ductal invasivo, *ILC*: Carcinoma lobular invasivo *AC*: Adenocarcinoma, *MC*: Carcinoma medular.

La línea M231 es la única línea celular, de la 'serie' MDA, que se encuentra agrupada en el subtipo molecular CL (17). Estas células presentan un fenotipo fusiforme y expresan tanto marcadores de tejidos epiteliales como marcadores mesenquimales, lo cual favorece la migración celular y se relaciona con un fenotipo altamente invasivo y metastásico (Figura 2; Tabla 3) (4,21,22). Se ha reportado que

estas células dependen de la autofagia para sobrevivir (23), la cual es controlada, al menos en parte, por la proteína proapoptótica **BIK** (Proteína de muerte que interacciona con BCL2) (24).

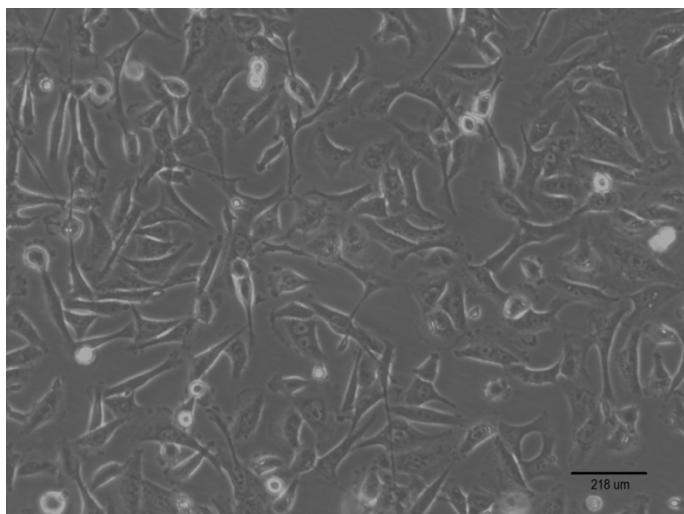


Figura 2. Fenotipo fusiforme de las células M231. Imagen tomada el día 3 de cultivo, a una confluencia del 80% (20X).

Tabla 3. Marcadores expresados por la línea M231

Marcadores Epiteliales	Marcadores Mesenquimales
<p>↓ CDH1 (Caderina E): proteína que participa en la adhesión célula-célula; la disminución en la expresión de esta proteína permite el desprendimiento de las células del sitio primario.</p> <p>↓ EPCAM (Molécula de adhesión celular epitelial): glicoproteína transmembranal que participa en la adhesión celular. La pérdida de su expresión se asocia con una mayor capacidad migratoria de las células.</p>	<p>↑ VIM (Vimentina): proteína de filamentos intermedios, de tipo III, que regula de forma positiva la migración al aumentar la motilidad celular.</p> <p>↑ SNAI1 (Represor transcripcional de la familia Snail 1): factor de transcripción que reprime la expresión de la CDH1 al unirse a su región promotora y favorece la invasión celular.</p>
<p>↓: baja expresión. ↑: alta expresión</p>	

1.3 BIK en la línea celular de cáncer de mama M-231

BIK es una proteína perteneciente a la familia BCL-2 (proteína reguladora de la apoptosis BCL2). Las proteínas de esta familia regulan la apoptosis, por la vía mitocondrial, y sus miembros se clasifican en subgrupos de acuerdo a su función: anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, o respecto a la presencia de motivos estructurales de tipo BH (dominios de homología BCL2), en multidominios o *BH3-only* (Figura 3) (25,26).

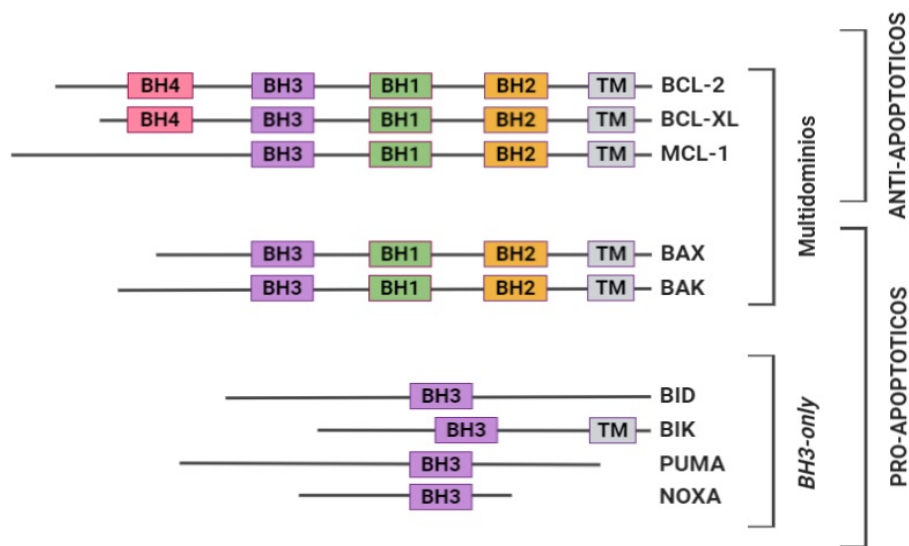


Figura 3. Clasificación de los miembros de la familia BCL-2. TM es el dominio de unión transmembranaral; BH1 y BH2 son dominios de unión a otros miembros de la familia; BH3 es el dominio que induce apoptosis, mientras que BH4 la inhibe.

Los integrantes de la subfamilia *BH3-only* no son por sí mismos capaces de inducir la apoptosis, sino que necesitan unirse a las proteínas anti-apoptóticas, BCL-2 por ejemplo, y permiten que las proteínas pro-apoptóticas multidominio, como BAX (Proteína X asociada a BCL-2, reguladora de la apoptosis) y BAK1 (Antagonista 1 de BCL-2), formen dímeros e induzcan la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria (27). A través de estos poros se liberan las proteínas

DBLOH (proteína mitocondrial DIABLO de unión a IAP) y el CYC (citocromo C9), lo cual conduce a la activación de las caspasas, que son las proteínas efectoras de la apoptosis (27).

La proteína BIK es el miembro fundador de la subfamilia “*BH3-only*” (28). Se localiza en el cromosoma 22q13.3 y es una fosfoproteína localizada en el retículo endoplásmico (29).

Diversos estudios, en pacientes con cáncer (carcinoma renal, gliomas, cáncer colorrectal, linfomas de células B y CaM Luminal A), han demostrado que BIK puede actuar como un supresor tumoral (28,30,31). En cambio, un estudio realizado en el 2005, en pacientes mexicanas, encontró que la expresión de BIK estaba a la alta y que esto se asociaba con un mal pronóstico (menor sobrevida) (32). Posteriormente, en el 2016 se determinó que la interferencia de BIK, utilizando un siRNA específico, alteró la expresión de varios miRNAs asociados a la tumorigénesis y agresividad de las células M231 (24).

Como se mencionó anteriormente, BIK se localiza generalmente en el citoplasma celular; sin embargo, estudios de nuestro laboratorio demostraron su presencia en el núcleo de las células M231 (33) e interacción con ~16,000 regiones genómicas tanto codificantes como no codificantes (5).

Dentro de las regiones no codificantes, a las cuales se une BIK, se encuentran varios miRNAs, incluyendo la región promotora del miR-137 (Tabla 4) (5). Todo lo anterior indica que BIK tiene otras funciones en la línea M231, además de su actividad como proteína pro-apoptótica.

Tabla 4. Interacción de BIK con miRNAs específicos

MicroRNA	Cromosoma	MicroRNA	Cromosoma
miR-200a-3p/5p	-	miR-202-3p/5p	10
miR-34a-3p/5p	1	miR-100-3p/5p	11
miR-200b-3p/5p	1	miR-708-3p/5p	11
miR-137	1	miR-1261	11
miR-1302	1	miR-203a-3p/5p	12
miR-1471	2	miR-1269	14
miR-570-3p/5p	2	miR-495-3p/5p	14
miR-563	3	miR-656-3p/5p	14
miR-135a-3p/5p	3	miR-1247-3p/5p	14
miR-1224-3p/5p	3	miR-9-3p	15
miR-572	3	miR-1275	15
miR-1251-3p/5p	4	miR-10a-3p/5p	17
miR-143-3p/5p	4	miR-187-3p/5p	18
miR-583	5	miR-516b-3p/5p	19
miR-1302	5	miR-155-3p/5p	21
miR-146a-3p/5p	5	miR-130b-3p/5p	22
miR-30a-3p/5p	6	miR-let-7b-3p/5p	22
miR-548f-3p	7	miR-325	X
miR-29a-3p/5p	7	miR-503-3p/5p	X
miR-124-3p/5p	8	mir-718	X
miR-548h-3p/5p	8	miR-424-3p/5p	X
miR-873-3p/5p	9		

1.4 microRNAs

En la actualidad, se sabe que el transcriptoma humano es más complejo de lo que se había planteado en un inicio, puesto que no sólo comprende transcritos que codifican para proteínas (~2 % del genoma), sino que también está formado por

transcritos que no codifican para proteínas (~98% del genoma) (34). Entre los transcritos que no codifican para proteínas (Figura 4), se encuentran las secuencias repetidas: LINEs (Elementos nucleares dispersos largos); SINEs (Elementos nucleares dispersos cortos); LTRs (Repeticiones terminales largas), transposones, satélites); secuencias micro-, mini- y satélite, las cuales constituyen el ~45% del genoma humano, los pseudogenes (~21%) y los ncRNAs (~30%) (34,35).

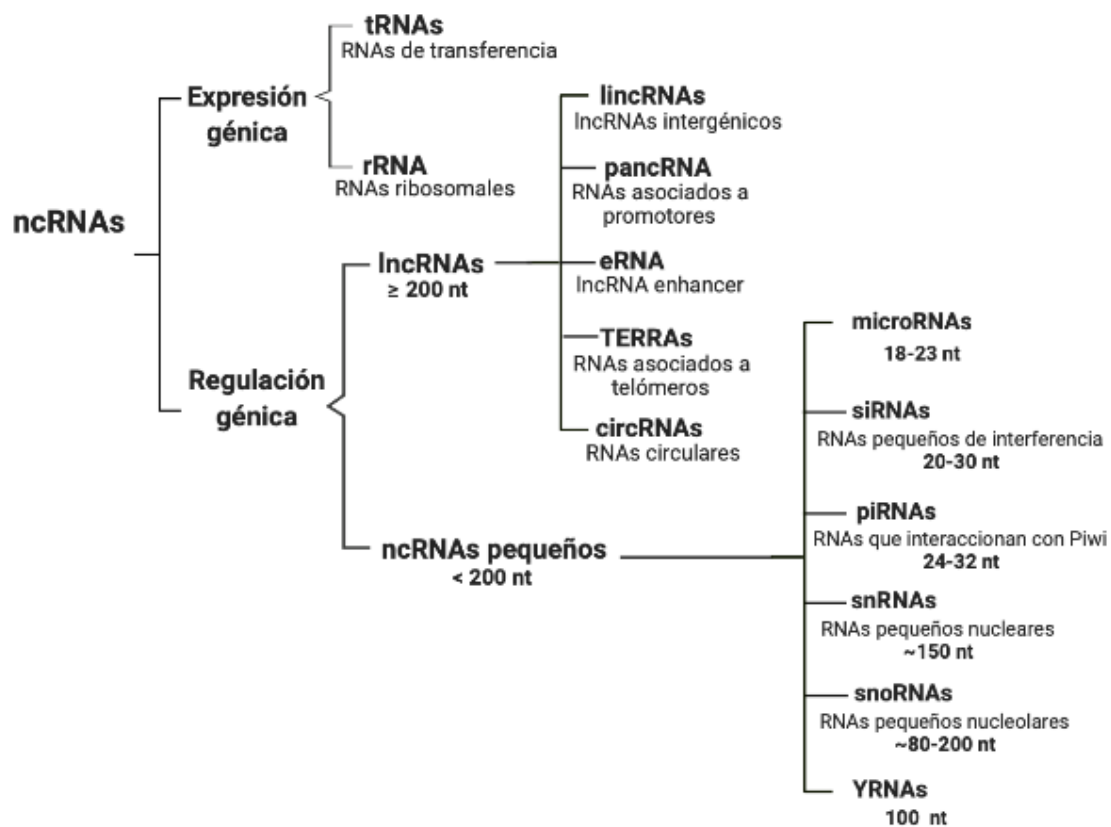


Figura 4. Clasificación de los RNAs no codificantes (ncRNAs). Los ncRNAs se clasifican de acuerdo con su función: los que participan en la expresión génica y los que la regulan. Estos últimos se clasifican también de acuerdo a su longitud.

Los ncRNAs representan aproximadamente el 60% de los RNAs presentes en el genoma humano y tienen una amplia gama de con estructuras y funciones

diferentes (30). Los ncRNAs se clasifican en dos grupos: los que participan en la expresión génica (tRNAs y rRNAs) y los que la regulan (lncRNAs, miRNAs, siRNAs, piRNAs [RNAs piwi], snRNAs [RNAs pequeños nucleares], snoRNAs [RNAs pequeños nucleolares] y YRNAs, Figura 4). Dentro de este heterogéneo grupo, los miRNAs son los ncRNAs pequeños más estudiados (35,36).

Los miRNAs son un grupo conservado de moléculas no codificantes de aproximadamente 18-24 u 80-100 nt de longitud (6,9,37), que tienen como función la regulación génica a nivel transcripcional y postranscripcional (7,8,38), así como la activación de vías de señalización celular, al funcionar como ligando de los receptores TOLL (39). Se estima que los miRNAs representan el ~1-2% del genoma humano y los reportes actuales indican que existen aproximadamente 2,600-3,000 miRNAs maduros en los humanos (40,41), los cuales tienen el potencial para regular aproximadamente el 60% de los genes que codifican para proteínas (35).

Un estudio realizado en el 2013, demostró, mediante CLASH (Entrecruzamiento, ligación y secuenciación de híbridos), que los miRNAs pueden tener como blanco otros tipos de RNA, además de los mRNAs; entre ellos se encuentran los lncRNAs, rRNAs, tRNAs, otros miRNAs y los pseudogenes (Figura 5) (42)

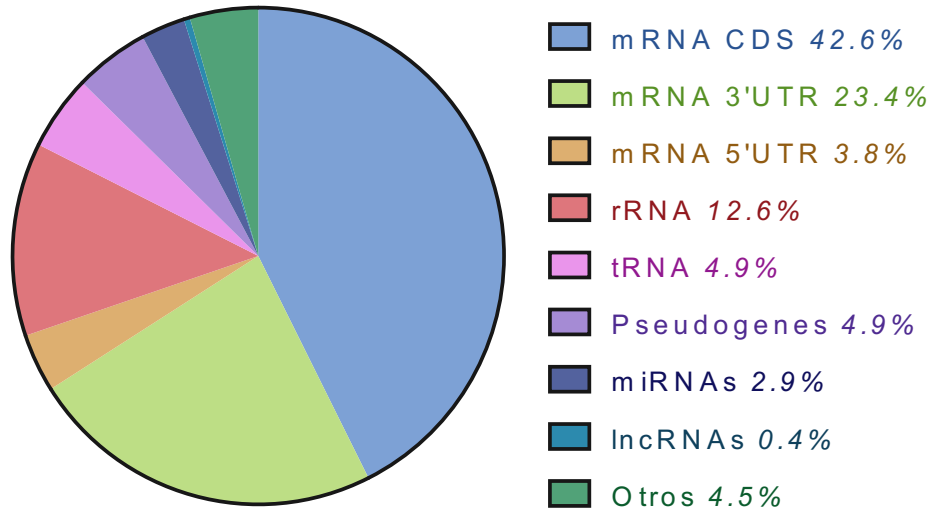


Figura 5. Distribución de las interacciones entre miRNAs y diferentes especies de RNA. Los principales blancos de los miRNAs son los mRNAs; sin embargo, también pueden interactuar con diferentes tipos de ncRNAs y pseudogenes (CDS: Región codificante). Otros RNAs: snoRNAs y snRNAs.

1.4.1 Regulación de RNAs no codificantes por miRNAs

Existen diferentes estudios en donde se ha demostrado que algunos miRNAs regulan la expresión de los lncRNAs. Por ejemplo, HOTAIR (Transcrito antisentido de HOX) es un lncRNA muy estudiado en el cáncer y se sabe que promueve la proliferación e invasión de las células cancerosas (43). En el 2014, un estudio mostró que el miR-141 reconoce, mediante su secuencia semilla, una secuencia cerca del extremo 5' de HOTAIR, para su escisión en pequeños fragmentos de ~0.5 kb (similar a la acción de los siRNAs) por la proteína AGO2 (12). El lncRNA nuclear, MALAT1 (Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis), se ha descrito como blanco de regulación por el miR-9, el cual regula negativamente la expresión de MALAT1 dentro del núcleo. Esto ocurre por la unión de la secuencia semilla del miRNA con un 'elemento de respuesta a miRNA (MRE) del lncRNA, de

forma dependiente de AGO2, sin embargo se desconoce cuál mecanismo emplea este miRNA para reprimir la expresión de MALAT1 (11). Otro estudio mostró que el lncRNA GAS5 es un blanco directo del miR-21; en este caso la interacción no es dependiente de la secuencia semilla, sino que todo el miRNA (unido a AGO2) reconoce una región en el exón 4 del lncRNA para regularlo negativamente (44). Además, hay estudios que muestran que algunos miRNAs maduros pueden unirse a pri-miRNAs para bloquear o promover su biogénesis. El mmu-miR-790 reconoce y se une a los pri-miR-15a y pri-miR-16-1 para bloquear su procesamiento; esto evita la formación de formas maduras. Por el contrario, el let-7 maduro se une al pri-let-7 y aumenta la formación de formas maduras; es decir, let-7 promueve el procesamiento de su propio transcrito primario (pri-miRNA) (45).

1.5 Ubicación genómica y biogénesis de los microRNAs

Los genes que codifican para miRNAs pueden localizarse tanto en regiones intergénicas como intragénicas: el 52% de los miRNAs son intergénicos, el 40% se localiza en intrones y el 8% en exones (46). Los miRNAs intergénicos tienen sus propios promotores, en cambio, los intragénicos con frecuencia están regulados por su gen huésped; sin embargo, algunos pueden tener sus promotores independientes (46). En la actualidad se conocen cinco vías de biogénesis para los miRNAs, la canónica (Figura 6) y cuatro no canónicas: dentro de ellas se encuentran la que da origen a los mirtrones; la tercera que produce a los simtrones; la que transcribe miRNAs delimitados por secuencias ALU; y la de los agotrones (Tabla 5) (47).

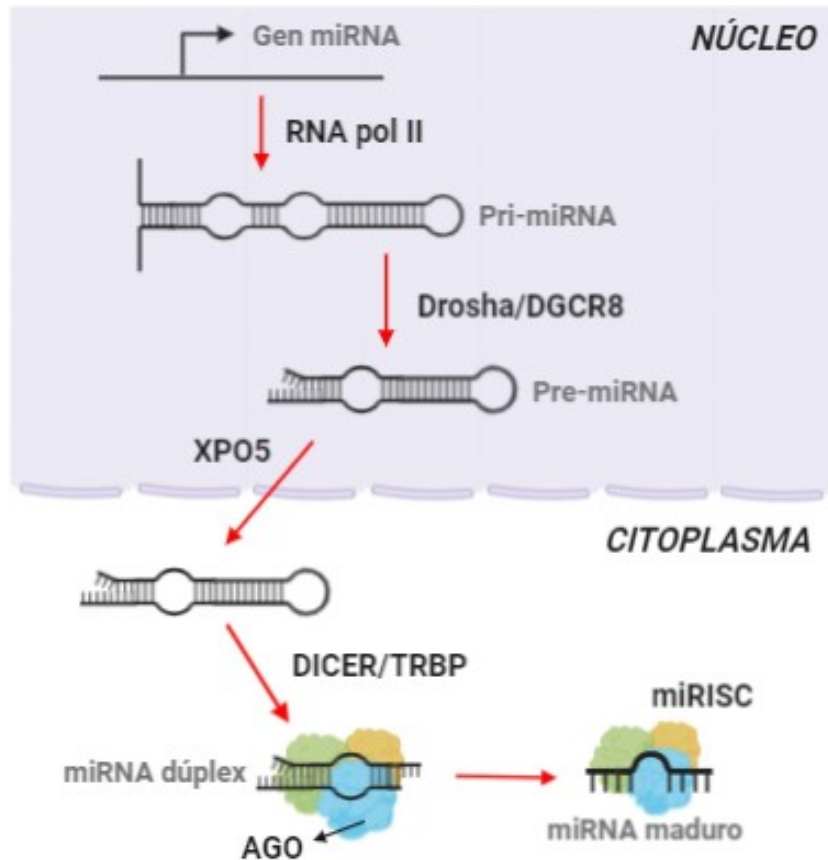


Figura 6. Biogénesis canónica de los microRNAs. La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo, en donde son transcritos por la RNA polimerasa II (algunos por la RNA polimerasa III), la cual genera transcritos de ~1 kb, conocidos como pri-miRNAs. Los pri-miRNAs son escindidos por el complejo microprocesador, formado por la RNAsa III DROSHA y la proteína DGCR8 (Región crítica del síndrome DiGeorge 8), el cual genera una estructura de ~70-100 pb en forma de tallo-asa conocida como pre-miRNA. Los pre-miRNAs son después transportados hacia el citoplasma por la XPO5 (Exportina 5), en donde son nuevamente escindidos por otro complejo proteico formado por la RNAsa III, Dicer y la proteína de unión a RNA de doble cadena TRBP (Subunidad del complejo de RISC). Este complejo genera un miRNA maduro de doble cadena, de 20-25 pb, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo saliente en la terminal 3', el cual es reconocido por la familia de proteínas AGO. Las proteínas AGO se unen al miRNA maduro para formar el complejo miRISC (Complejo de silenciamiento inducido por miRNAs). Las proteínas AGO son las encargadas de elegir la hebra del miRNA que llevará acabo el reconocimiento del mRNA; actualmente se sabe que AGO elige la hebra funcional termodinámicamente más estable (35,48).

Tabla 5. Vías no canónicas de biogénesis de los miRNAs.

Vía de biogénesis	Características
Mirtrones	Estos miRNAs se generan a partir de intrones pequeños (50-120 nt) conocidos como “intrones de horquilla corta”. Su procesamiento es independiente del complejo Drosha ya que se generan por splicing. Una vez traslocados al citoplasma son procesados por Dicer como los miRNAs canónicos (49).
Simtrones	Su mecanismo de biogénesis es similar a la de los mirtrones: se localizan en pequeños intrones, pero se producen en ausencia de splicing y de forma dependiente de Drosha. Además, estos miRNAs no requieren de la XPO5, para su traslado hacia el citoplasma, no son procesados por DICER y no se asocian con las prtoteínas AGO (50).
Delimitados por secuencias ALU	Los genes de estos miRNAs se encuentran intercalados entre elementos repetitivos cortos ALU y, a diferencia de los miRNAs convencionales, éstos dependen de la actividad de la RNA Pol III. Estos miRNAs se transcriben junto con las secuencias ALU, dando origen a la estructura tallo-asa característica de los pre-miRNAs. Posteriormente los pre-miRNAs son procesados y exportados al citoplasma para ensamblarse en el complejo RISC (51).
Agotrones	Derivan de intrones cortos, son independientes de DROSHA, se transportan al citoplasma mediante un mecanismo aún desconocido y escapan al procesamiento de DICER, por lo que conservan su estructura secundaria y alcanzan una longitud de hasta ~100 pb. Se encuentran altamente conservados en mamíferos y se localizan en el núcleo (9).

1.6 Importancia de los microRNAs en la regulación génica

Los miRNAs se consideran moléculas clave en la regulación de diversos procesos biológicos, como por ejemplo la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis,

la angiogénesis y metástasis (37,52–54). Se estima que un miRNA puede tener ~100-150 mRNAs blanco en un tipo celular (6).

Los miRNAs maduros reconocen a su mRNA blanco mediante una región de ~6-7 nt, en su extremo 5', conocida como "secuencia semilla". La secuencia semilla del miRNA reconoce a los 'elementos de respuesta a miRNA' (MRE, por sus siglas en inglés) presentes en los mRNAs (Figura 7A). Los MRE se localizan comúnmente en el extremo 3'UTR del mRNA; sin embargo, también pueden estar presentes en el extremo 5'UTR o incluso en la región codificante (6,42). A pesar de que canónicamente la unión miRNA-mRNA es dependiente de la secuencia semilla, diversos estudios han demostrado, mediante AGO-HITS-CLIP, que existen interacciones no canónicas miRNA-mRNA (~15%) que no dependen de dicha secuencia semilla; es decir, toda la secuencia del miRNA puede reconocer a su blanco (los ~22 nt) o con ciertos nucleótidos a lo largo de todo el miRNA, no sólo los ubicados en la secuencia semilla (Figura 7B) (48).

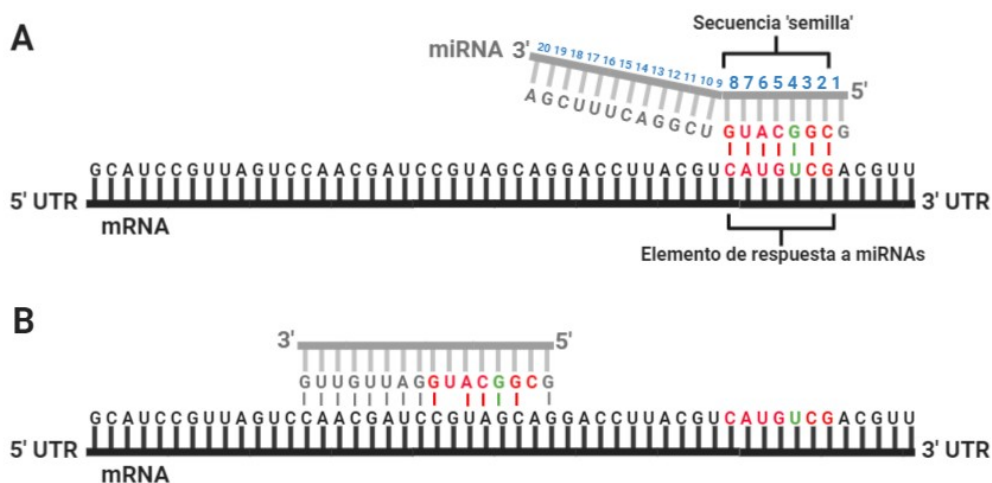


Figura 7. Interacciones miRNA-mRNA. A) Interacción canónica: unión de la secuencia semilla del miRNA con el 'elementos de respuesta a miRNA' (MRE), presente en la región 3'UTR del mRNA. B) Interacción no canónica: varios nucleótidos a lo largo del miRNA interactúan con la región codificante del mRNA.

En los animales, y en particular en los mamíferos, la complementariedad miRNA-mRNA es parcial; es decir, no se aparean por completo todos los nucleótidos de la secuencia semilla y el MRE. Este apareamiento parcial conduce a la inhibición de la traducción y/o a la desestabilización del mRNA (6,48). El complejo efector miRISC, formado mínimamente por las proteínas AGO y el miRNA maduro, es el encargado de llevar a cabo la regulación postranscripcional: el miRNA sirve como guía para reconocer al mRNA blanco y las proteínas AGO sirven como un andamio para reclutar otras proteínas, de tal forma que es AGO quien determina de qué forma se va a regular al mRNA (48). La ruta de regulación se selecciona dependiendo de la concentración de los componentes de RISC, de la secuencia del RNA blanco y/o del tipo celular (55).

Para llevar a cabo la desestabilización del mRNA, la proteína adaptadora TNRC6 (Adaptador 6 que contiene repetición de trinucleótidos) es reclutada por AGO2. TNRC6 interactúa con PABPC (Proteína citoplasmática de unión poli (A)), para reclutar a los complejos proteicos CCR4-NOT (Receptor de quimiocina con motivo C-C 4 y Subunidad del complejo de transcripción CCR4-NOT) y PAN2-PAN3 (Subunidad de ribonucleasa específica de poli (A) 2 y 3) (6). El complejo PAN2-PAN3 deadenila (elimina la cola de poly (A)), mientras que CCR4-NOT recluta a la proteína DDX6 (Helicasa *dead-box* 6), la cual retira el 5'cap. Estas modificaciones en el mRNA provocan su desestabilización y posterior degradación por la exonucleasa XRN1 (Exoribonucleasa 1 5'-3') (Figura 8) (6).

En la inhibición de la traducción, TNRC6 impide que el mRNA adopte una estructura de asa cerrada, necesaria para el inicio de la traducción (47). DDX6 compete con el factor eIF4E2 (Factor 2 de inicio de la traducción eucarionte), el cual

reconoce el 5'cap de los mRNAs para reclutar a los ribosomas e iniciar la traducción (6,56). Además, AGO2 recluta a la proteína eIF6 (Factor 6 de inicio de la traducción eucariota), la cual se une a la subunidad ribosómica 60S y evita su asociación con la subunidad ribosómica 40S, para formar el complejo de iniciación 80S (57). Durante la elongación, AGO2 puede también provocar la disociación temprana de los ribosomas o reclutar enzimas para degradar el polipéptido nascente (Figura 8) (57). Asimismo los complejos miRISC pueden conducir a sus blancos a complejos proteicos citoplasmáticos conocidos como cuerpos P, en donde se almacenan y degradan los mRNAs (58).

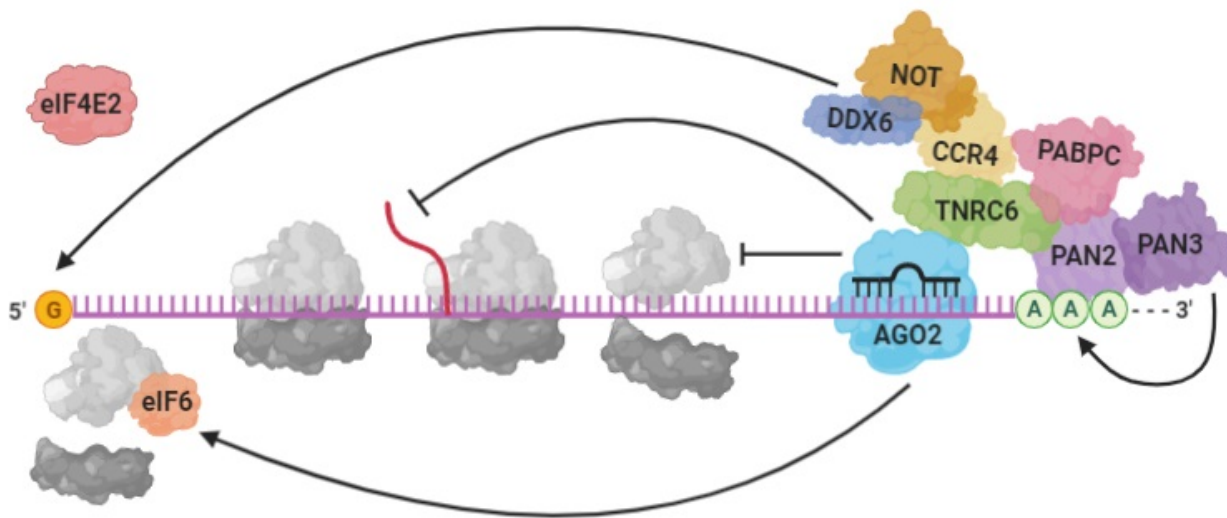


Figura 8. Regulación post-transcripcional mediada por microRNAs. El complejo miRISC (complejo de silenciamiento inducido por miRNAs) recluta varias proteínas, entre ellas TNRC6, que evita la circularización del mRNA e interactúa con PABPC para reclutar al complejo de deasilación PAN2-PAN3. CCR4-NOT recluta a DDX6, que compite con el factor eIF4E2 para evitar el inicio de la traducción. En adición, AGO2 recluta a eIF6, que evita la asociación de los ribosomas, atrae enzimas para degradar al polipéptido nascente y provoca la disociación temprana de los ribosomas.

Aunque se ha observado que la represión de la traducción es más frecuente que la deadenilación del mRNA, cuantitativamente hablando, la desestabilización del mRNA es el proceso que tiene más impacto sobre los niveles de proteínas, al reducirlos en un ~75%; por su parte, la represión transcripcional reduce entre 6 y 25% los niveles proteicos (48).

Aunque la regulación a nivel post-transcripcional es la actividad más ampliamente descrita para los miRNAs, también existe evidencia de que los miRNAs regulan la expresión génica a nivel transcripcional (7,8). Un ejemplo de esto es el miR-320, el cual se encuentra codificado en la región promotora del gen *POLR3D* (Subunidad D de la RNA polimerasa III), en la hebra antisentido. Este miRNA maduro, con su secuencia completa y en asociación con AGO1, reconoce el promotor de *POLR3D* y recluta maquinaria (metiltransferasas de histonas) para silenciar su expresión (7,55). Por otro lado, toda la secuencia del miR-373 reconoce al promotor de *CDH1* (Caderina E) e induce su expresión, al promover la unión de la RNA polimerasa II en el promotor (8). Estos estudios muestran mecanismos a través de los cuales los miRNAs pueden inducir o reprimir la expresión génica, al reconocer secuencias promotoras.

Otra función descrita para los miRNAs es como ligandos de los receptores TLR (Receptores tipo Toll). El miR-21 y el miR-29a son secretados en exosomas, derivados de tumores pulmonares humanos, y se unen a los receptores TLR8, los cuales están presentes en los macrófagos; esto induce inflamación, crecimiento tumoral y metástasis (39). Otro miRNA que se une a este tipo de receptores es let-7b, quien se une al receptor TLR7 de los macrófagos murinos y provoca inflamación; esto en un modelo de artritis reumatoide (39).

1.7 El miRNA 137

El miRNA-137 es un miRNA intragénico (exónico) y antisentido, cuya secuencia se encuentra dentro del gen de un lncRNA, el *MIR-137HG* (52,59). Este gen se localiza en una unidad transcripcional (UT) que tiene más de 60 kb de longitud, ubicada en el brazo corto del cromosoma 1 (1p21.3). Esta es una región con múltiples repeticiones en tándem de 15 nucleótidos (VNTR: 5'-TAGCAGCGGCAGCGG-3'), las cuales pueden regular la transcripción del gen *MIR137HG* (59). El gen *MIR-137* se localiza en el exón 3 *MIR137HG*, a partir del cual se procesa el miR-137 maduro, de 23 pb (Figura 10) (52,60). El promotor interno de este miRNA se localiza en el intrón 2 de su gen hospedero y presenta marcas de histonas asociadas a promotores canónicos activos (H3K4me3 y H3K27Ac) (59). Este promotor interno está regulado por una isla CpG, ubicada río arriba de su secuencia (52,60). Varios estudios han reportado que el *MIR-137* se encuentra reprimido por hipermetilación de su promotor en cáncer gástrico, de endometrio, de pulmón y de próstata (61–64). Un estudio demostró que la proteína REST (Factor de transcripción silenciador de RE1) se une al promotor del miR-137 y actúa como un represor transcripcional (59). Además, se identificó mediante Chip-on-chip una secuencia cercana al promotor del miR-137, a la cual se une la proteína BIK, lo que sugiere fuertemente que BIK regula la expresión del miR-137 (Figura 9).

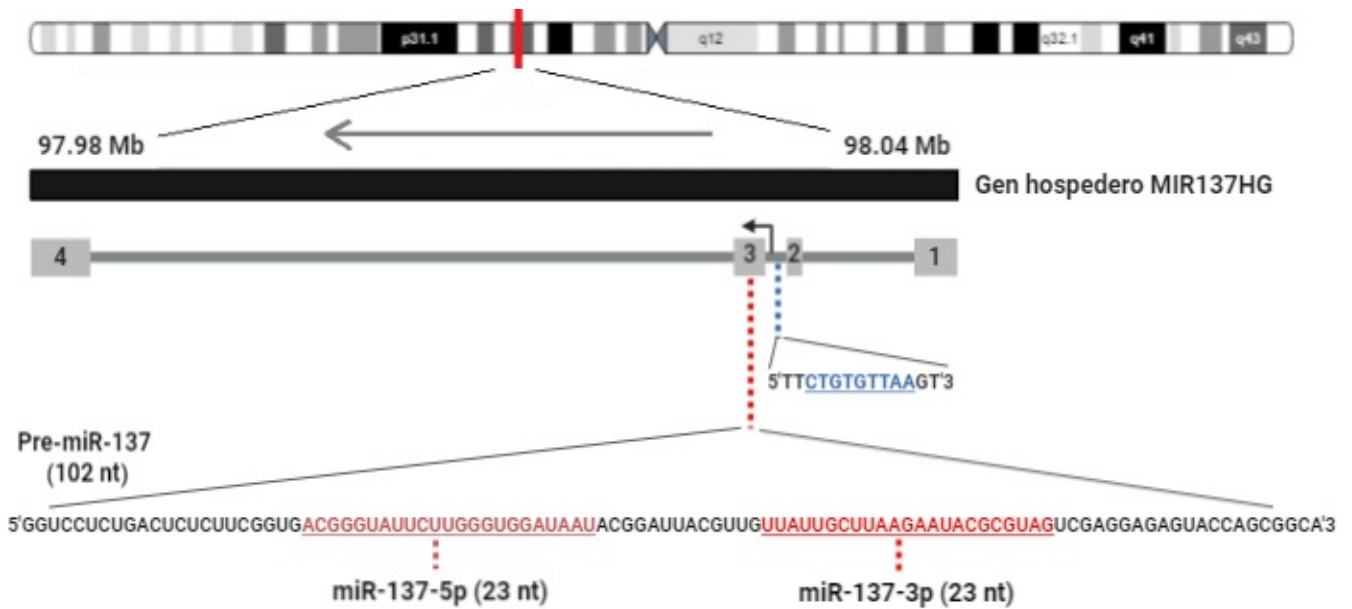


Figura 9. Localización genómica del *MIR-137*. El gen de este miRNA se encuentra en el exón 3 del gen *MIR137HG*, el cual codifica para un lncRNA. La línea punteada azul marca el sitio de unión de BIK al promotor del *MIR-137*. La línea punteada roja indica la secuencia dentro del exón 3 que da origen al pre-miR-137, del cual posteriormente se obtienen dos microRNAs maduros.

El miR-137 es un miRNA citoplasmático (52) y hasta el momento no hay estudios que indiquen la presencia de este miRNA en el núcleo. Análisis bioinformáticos han identificado ~1500 posibles genes blanco del miR-137, de los cuales ~300 han sido validados experimentalmente para el miR-137-3p (14,52). La mayoría de los blancos validados y predichos para este miRNA se relacionan con el control del ciclo celular (52).

En condiciones de homeostasis, el miR-137-3p se expresa en el cerebro embrionario y adulto, tanto de ratones como de humanos (65,66). Este miRNA tiene una función reguladora crítica durante el desarrollo neuronal, debido a que regula genes asociados con la proliferación y diferenciación de Células troncales neurales (NSC) (52).

1.8 El miR-137 en cáncer

El miR-137-3p se ha descrito como un supresor tumoral en varios tipos de cáncer (melanoma, osteosarcoma, gliomas pediátricos, pulmón, ovario, tiroides, gástrico y mama), en donde inhibe la proliferación, migración, invasión y angiogénesis (13,67–73). En pacientes con glioblastoma multiforme una baja expresión del miR-137-3p se asocia con estadios más avanzados de la enfermedad y con una menor supervivencia (73,74). En melanoma, el miR-137 regula negativamente a AURKA (Aurora cinasa A) y a MITF (Factor de transcripción inductor de melanocitos), ambos genes clave en el desarrollo de este tipo de cáncer (75). En cáncer gástrico, KLF12 (Factor parecido a Krupperl 12) y TWIST (Factor de transcripción de la familia TWIST BHLH) son dos genes blanco del miR-137-3p que promueven la proliferación, migración y pluripotencia; además, la expresión relativamente baja del miR-137, en pacientes con cáncer gástrico, se asocia a un menor tiempo de supervivencia (68). Los niveles del miR-137-3p se encuentran a la baja en NSCLC (Cáncer de pulmón de células no pequeñas), en relación con el tejido adyacente, y uno de sus principales blancos es NCOA3 (Coactivador 3 del receptor nuclear), el cual es un oncogén asociado al desarrollo y progresión tumoral (67). En osteosarcoma, el miR-137-3p tiene como blanco a EZH2 (Potenciador de Zeste, de la subunidad 2 del complejo represor de Polycomb 2), una metiltransferasa de histonas que reprime la expresión de genes supresores de tumores y que se asocia con tumores más agresivos, y un mal pronóstico (69). Otro gen blanco del miR-137-3p es XIAP (Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X), una proteína que inhibe la actividad de las caspasas, cuya inhibición evita la apoptosis; XIAP se encuentra sobre-expresada en cáncer de ovario (76). En el 2012, un estudio demostró que el

miR-137-3p se encuentra a la baja en varias líneas de cáncer de mama (MCF-7, T-47D, SK-BR-3, BT-474 y MDA-MB-231) y que el ESRRA (Receptor alfa relacionado con estrógenos), un receptor nuclear huérfano que promueve la progresión tumoral, es un blanco de este miRNA en las líneas MCF-7, SK-BR-3, BT-474 y MDA-MB-231 (13).

Lo anterior sugiere que el miR-137-3p actúa como un supresor tumoral en distintos tipos de cáncer; sin embargo, en cáncer de vejiga se observó que los niveles de este miRNA se encuentran a la alta y que esto se asocia con una mayor proliferación, migración e invasión. En este tipo de cáncer, el miR-137 tiene como blanco al supresor tumoral PAQR3 (Miembro 3 de la familia de receptores de progestina y adipocina), el cual es un inhibidor de la vía RAF/MEK/ERK (77).

Similar a lo anterior, la expresión del miR-137-3p se encuentra significativamente a la baja en las células MDA-MB-231, comparado con las células epiteliales no transformadas HMEC (Células epiteliales mamarias humanas); no obstante, el efecto fisiológico de esto no se determinó (14).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Con base en la evidencia mostrada anteriormente, acerca de la presencia de la proteína BIK en el núcleo de las células M231 y de su interacción con el genoma de dichas células, es muy probable que esta proteína esté regulando la expresión de múltiples RNAs, entre ellos el miR-137, el cual se ha encontrado a la baja en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, y descrito como un supresor tumoral. Por tanto, el miR-137 podría estar regulando procesos carcinogénicos importantes en las células M231.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el estudio de los ncRNAs ha tomado relevancia en la investigación de diversas enfermedades, debido a su gran potencial para regular la expresión génica y participar en el mantenimiento de la estabilidad genómica

En una célula, los miRNAs pueden tener hasta 150-200 mRNAs blanco, por lo que la identificación de los blancos moleculares de un miRNA, en un tipo celular determinado, es de gran importancia para poder comprender los procesos celulares que regula un miRNA específico.

Por consiguiente, la identificación de los mRNAs blanco del miRNA-137-3p, en la línea celular MDA-MB-231, permitirá conocer las vías de señalización que son reguladas por este miRNA y esto resultará en un mejor entendimiento de los procesos desregulados en el subtipo de cáncer de mama “*claudin-low*”

4. HIPÓTESIS

El miRNA-137-3p tendrá como blanco de regulación a mRNAs que participan en vías de señalización relacionadas con la migración e invasión de las células MDA-MB-231.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Identificar los mRNAs blanco del miR-137-3p en las células MDA-MB-231, así como la participación de algunos de estos en las vías de migración e invasión.

5.2 Objetivos Particulares

1. Identificar experimentalmente los RNAs que se unen al miR-137-3p, en las células MDA-MB-231 con el ensayo miRTrap.
2. Identificar *in silico*, los mRNAs blanco del miR-137-3p.
3. Determinar los mRNAs blanco del miR-137-3p que participan en las vías migración e invasión celular.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo Celular

La línea celular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) se cultivó (2×10^6 células) en medio Leibovitz's L-15, con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 U/mL de penicilina (Gibco™). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera 100% aire.

6.2 Transfección del RNA de interferencia (siRNA)-específico para BIK

Para la interferencia de BIK, se utilizó un siRNA específico de doble cadena: 5'-AAGACCCCUCUCCAGAGACAU-3' y 5'-AAAUGUCUCUGGAGAGGGGUC-3', a una concentración final de 600 nM (24). El siRNA se transfectó usando Oligofectamine™ Transfection Reagent (Invitrogen™). Se sembraron 2×10^6 células por pozo, en cajas de 6 pozos (9.6 cm²), en medio sin antibiótico. Para cada muestra se prepararon dos tubos, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción para los complejos de transfección del siRNA

TUBO 1 (siRNA)	
REACTIVO	VOLUMEN
siRNA (600 nM)	30 uL
OPTIMEM	170 uL
VOLUMEN FINAL	200 uL

TUBO 2 (Polímero de transfección)	
REACTIVO	VOLUMEN
Oligoinfectamina	20 uL
OPTIMEM	2 uL
VOLUMEN FINAL	22 uL

Después, los tubos se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente (25°C; 30 minutos) para permitir la formación de los complejos lipídicos de transfección. Las células se lavaron con 1 mL de PBS 1X (Solución salina tamponada con fosfatos: [138 mM] NaCl; [3 mM] KCl; [8.1 mM] Na₂HPO₄; y [1.5 mM] KH₂PO₄) y después con 1 mL de OPTIMEM. A cada pozo se le agregaron 800 µL de OPTIMEM y luego se agregaron, por goteo, los complejos de transfección. Por último, las células se incubaron con el siRNA durante 52 hrs a 37°C.

6.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó utilizando TRIzol™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y ciertas modificaciones hechas por Drago-García D. (2015): se añadió 1 mL de TRIzol y 200 µL de cloroformo a cada muestra, se centrifugaron a 15,000xg durante 15 minutos, posteriormente la fase acuosa se aisló y se precipitó el RNA con isopropanol centrifugando a 16,000xg durante 30 minutos. La muestra se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua libre de nucleasas. La concentración, pureza y calidad del material se determinó por espectrofotometría, en el NanoDrop 1000 (ThermoScientific, EUA). Una vez purificado, el RNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.4 PCR en tiempo real (qPCR), para la detección de mRNAs

6.4.1 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para detectar la expresión de los mRNAs (BIK), el cDNA se sintetizó a partir del RNA total, con el kit SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) (Tabla 7). El tiempo de incubación fue el siguiente: 10 min a 42°C; 60 min a 50°C y 10 min 70°C.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para mRNAs

COMPONENTE	VOLUMEN
Random primer	0.5 µL
SCRIPT RT Buffer complete	4 µL
dNTP Mix	1 µL
DTT stock solution	1 µL
RNase inhibitor	1 µL
SCRIPT Reverse Transcriptase	0.5 µL
Templado de RNA	Variable (200 ng)
Agua libre de RNAsas	Variable
VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN	20 µL

6.4.2 Amplificación de los mRNAs

La expresión del mRNA BIK se determinó con el kit RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon) (Tabla 8). Las condiciones de la PCR fueron: activación de la polimerasa (95°C; 15 min); 40 ciclos: 95°C (15 seg); TM° (1 min). La expresión se normalizó con el mRNA 18S RNA. Los primers y TM° de los oligos se muestran en la Tabla 9. La expresión relativa se obtuvo con el modelo Livak y Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (78).

Tabla 8. Mezcla de reacción para la qPCR de mRNAs

COMPONENTE	VOLUMEN
RealQ Plus 2x Master Mix	10 µL
Primer Forward	1 µL
Primer Reverse	1 µL
Templado de cDNA	Variable (300 ng)
Agua libre de RNAsas	Variable
VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN	15

Tabla 9. Secuencia de los oligos utilizados para la qPCR

Gen	Secuencias de los oligos	TM°
BIK	Forward 5'- GAGACATCTTGTGGAGACC -3' Reverse 3'-TCTAAGAACATCCCTGATGT-5'	66.85°
18S RNA	Forward 5'- TACCACATCCAAGGAAGGCAGCA -3' Reverse 3'- TGGAATTACCGCGGCTTGCTGGC -5'	75.6°

6.5 PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de miRNAs

6.5.1 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para determinar la expresión de los miRNAs maduros, se sintetizó cDNA utilizando el kit miScript II RT (Qiagen), a partir del RNA total aislado de las células MDA-MB-231. Los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 10. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 37°C (60 min) y 95°C (5 min).

Tabla 10. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para miRNAs

COMPONENTE	VOLUMEN
5x miScript HiSpec Buffer	4 µL
10x Buffer miScript Nucleics Mix	2 µL
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µL
Templado de RNA	Variable (200 ng)
Agua libre de RNAsas	Variable
VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN	20 µL

6.5.2 Amplificación de los miRNAs maduros

La evaluación de la expresión de los miRNAs maduros (por qPCR) se realizó con el kit miScript SYBR® Green PCR (Qiagen) (Tabla 11). Este kit genera productos

finales (amplicones) de ~100 pb. La reacción se realizó en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoScientific, EUA), bajo las siguientes condiciones: activación de la polimerasa durante 15 min a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 94°C; 30 seg a 55°C; y 30 seg a 70°C. La expresión del miR-137 se normalizó con la del miR-16.

Tabla 11. Mezcla de reacción para la qPCR de miRNAs

COMPONENTE	VOLUMEN
2x SYBR Green PCR Master Mix	12.5 µL
10x miScript Universal Primer	2.5 µL
Primer específico	2.5 µL
Templado de cDNA	Variable (300 ng)
Agua libre de RNAsas	Variable
VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN	25 µL

Al finalizar las reacciones de qPCR, el tamaño de los amplicones y la especificidad de la reacción se verificó en geles de agarosa (1.5%). Por último, los valores de expresión relativa se obtuvieron por medio del modelo descrito por Livak y Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (78).

6.6 Ensayo MirTrap

El fundamento del ensayo MirTrap se describe con más detalle en el ANEXO 1.

6.6.1 Diseño y acoplamiento de los miRNAs “mimic” 1303 y 137

El hsa-miR-1303 se usó como miRNA control. Este ensayo requiere como control cualquier miRNA diferente al que se quiere estudiar (Cambronne et al., 2012).

En primer lugar, los miRNAs “mimic” se diseñaron de acuerdo con las especificaciones del protocolo MirTrap (Clontech® Laboratories, Inc). Ambas hebras se diseñaron con extremos 3’ salientes (azul) y 5’ fosforilados (amarillo) y sintetizaron en Dharmacon (Horizon Discovery Group). Además, la hebra complementaria contiene un nucleótido no complementario cerca del extremo 3’ (verde), como se observa en la Figura 10.

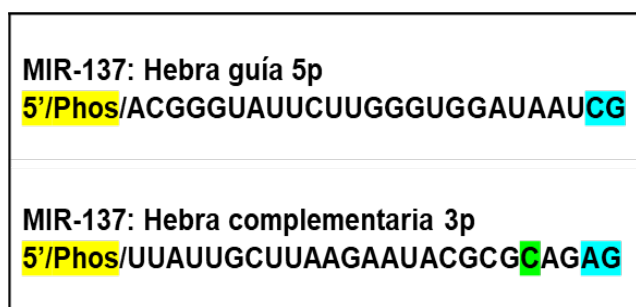


Figura 10. Secuencia del miR-137 mimic, diseñado para el ensayo MirTrap.

Una vez obtenidos los oligos, las hebras del miR-1303 se resuspendieron en buffer de resuspensión (20 nM NaCl, 10 mM Tris, pH=8), para una concentración de 200 µM de cada oligo y después se mezclaron en una relación 1:1, para tener una concentración final de 100 µM. El alineamiento se llevó a cabo al incubarlos durante 2 min a 95°C, 1 hr a 37°C y 5 min a 25°C . El miR-1303 dúplex se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso. Por otro lado, para las hebras del miR-137 se probaron las mismas condiciones que para el miR-1303 y, además de otras dos condiciones: a) Buffer de suspension 200 nM NaCl, 10 mM Tris, pH=8, con incubación durante 2 min a 95°C y 2.5 hrs a 25°C; y b) Buffer de suspension 20 mM NaCl, 10 mM Tris, pH=8, con incubación durante 2 min a 95°C y 2 hrs a 25°C El

miR-137 dúplex se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento de su transfección.

6.6.2 Transfección del miRNA mimic y de los plásmidos

Se sembraron 2×10^6 células por pozo, en cajas de 6 pozos (9.6 cm^2), en medio completo (L-15+10%SFB) y una vez que estuvieron a una confluencia del ~60%, se procedió con la transfección del miR-1303 y del vector pMirTrap. Para el vector Control, se sembraron 2×10^3 células por pozo, en una cámara de poliestireno de 4 pozos. Para cada muestra se prepararon 2 tubos, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Mezcla de reacción para los complejos de transfección del ensayo MirTrap

TUBO 1 (microRNA/plásmido)	
REACTIVO	VOLUMEN
miR-132	5 uL (500 pmoles)
pMirTrap Vector	60 uL (30 µg)
pMirTrap Control Vector	20 uL (10 µg)
Xfect Reaction Buffer	515 UI
VOLUMEN FINAL	600 µL

TUBO 2 (Polímero de transfección)	
REACTIVO	VOLUMEN
Xfect Reaction Buffer	528 µL
Xfect Polymer	12 µL
Xfect miRNA TP	60 µL
VOLUMEN FINAL	600 µL

6.6.3 Determinación de la eficiencia de transfección

24 horas después de transfectar las células con el vector control, las células se lavaron con PBS 1X (Solución salina tamponada con fosfatos: [138 mM] NaCl; [3 mM] KCl; [8.1 mM] Na₂HPO₄; y [1.5 mM] KH₂PO₄, pH=7). Posteriormente se les agregó 1 mL de metanol frío (4°C), a cada pozo y se incubaron durante 15 minutos. La cámara de poliestireno se retiró y el portaobjetos se almacenó en PBS a 4°C. Luego, las células se incubaron con Dapi (0.3 µM), durante 10 minutos, y lavaron 3 veces con PBS. Entonces, se les agregó 1 mL de glicerol al 79%, y se colocó un cubreobjetos. Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Alphaphot Ys, Se analizaron 10 campos y se contaron en total 98 células.

6.6.4 Inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA

Las perlas con la secuencia anti-DYKDDDDK, se lavaron con buffer Lysis/Wash 1X, tRNA (10mg/mL) y BSA (10 mg/mL). Después de 4 horas de incubación, las células se lavaron con PBS frío, se lisaron con el buffer Lysis/Wash y se incubaron en hielo durante 10 minutos. El lisado celular se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 12,000xg durante 30 minutos a 4°C. Luego, se transfirieron 50 µL del sobrenadante a un nuevo tubo, el cual se etiquetó como 'Before IP' (RNA total), y se almacenó a -80°C hasta la extracción del RNA. El resto del sobrenadante se transfirió al tubo con las perlas anti-DYKDDDDK, previamente lavadas y bloqueadas. La muestra se colocó en una plataforma rotatoria, a baja velocidad, durante 2 horas a 4°C y se centrifugó a 1,000xg por 1 minuto. El tubo se colocó en una gradilla (2 min), para que las perlas se sedimentaran; finalizado el tiempo, el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó 3 veces con buffer Lysis/Wash, y el

tubo se etiquetó como 'After IP' (unión específica de los mRNAs al miR-1303 o al miR-137). La muestra se almacenó a -80°C hasta la extracción del RNA.

6.6.5 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó como se explicó anteriormente. Una vez purificado, el RNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7 Análisis de microarreglos de expresión (HTA 2.0)

Para realizar la síntesis de cDNA, se utilizó el kit GeneChip™ WT Pico Reagent Kit (Affymetrix) de acuerdo a las especificaciones del protocolo. Se usó el RNA obtenido de las células transfectadas con el miR-137 o miR-1303 y el vector pMirTrap. La reacción de amplificación, se realizó a partir de 13.2 ng y 10.23 ng de RNA para cada miRNA respectivamente. Después de la síntesis del cDNA, se determinó su concentración usando NanoDrop 1000 (ThermoScientific, EUA). Después el cDNA se fragmentó, se marcó con biotina y se hibridó en microarreglos Affymetrix HTA 2.0 utilizando el kit de hibridación, lavado y tinción GeneChip® de (Affymetrix). Las muestras se cargaron en los microarreglos y se incubaron durante 16 horas a 45°C rotando a 60 rpm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los microarreglos se tiñeron y lavaron usando una estación de fluidos GeneChip® 450 (Affymetrix,) usando el protocolo FS450-000X, de acuerdo con el manual del kit de Affymetrix. A continuación, se leyeron las intensidades de expresión de los microarrays usando un GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix).

6.8 Análisis bioinformático

El análisis de los datos primarios de los microarreglos HTA 2.0 se realizó en el programa R (versión 4.0.5) utilizando Bioconductor. Los archivos CEL obtenidos se leyeron usando el paquete *pd.hta.2.0* (79). En primer lugar, se utilizó el comando *pm*, del paquete *oligo* (80), para obtener los valores de intensidad de todas las sondas, y realizar una exploración de los datos, es decir, para verificar la distribución de las intensidades mediante histogramas y diagramas caja-bigotes. Luego se utilizó el comando *rma* del paquete *oligo*, para normalizar los datos. Después de la normalización, a partir de los datos de intensidad de las sondas, se filtraron los datos para obtener únicamente las sondas con un cambio en la intensidad >2 ($p < 0.05$). Se obtuvo una lista de IDs, la cual posteriormente se asoció con el nombre del gen. Una vez indentificados los genes presentes en la muestra, se utilizó el paquete *topGo* (81) para llevar a cabo un análisis de enriquecimiento de vías GO (Gene Ontology), y los paquetes *gage* (82) y *pathview* (83) para un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto).

6.9 Análisis estadístico

Los resultados se representaron usando la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Los experimentos fueron analizados mediante la prueba t de Student, para muestras independientes. Se tomaron como diferencias significativas los valores de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism V.6

7. RESULTADOS

7.1 Cultivo de la línea celular M231

Las células M231 (2×10^6 células) se cultivaron en medio completo, como se describió en los métodos. Éstas mostraron el fenotipo fusiforme característico de

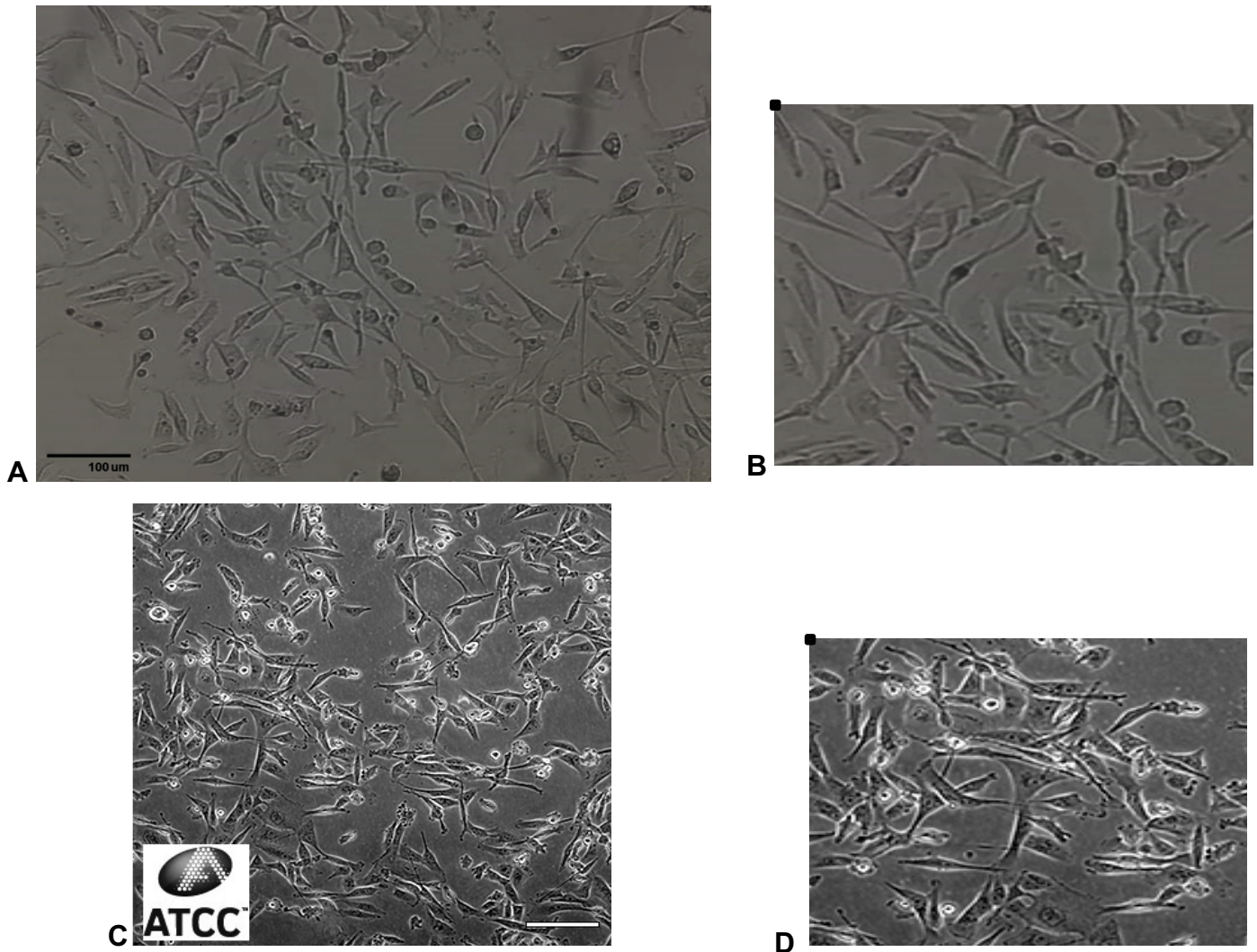


Figura 11. Fenotipo fusiforme de las células M231. A) Células a los 2 días de cultivo a una confluencia de 40% (20X). **B)** Acercamiento de la Figura 12A , en donde se observa el fenotipo fusiforme de las células. *Imágenes tomadas en un microscopio invertido Olympus.* **C)** Imagen tomada de la ATCC. **D)** Acercamiento de la imagen.

esta línea celular (Figura 12A y B), descrito por la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Figura 12C y D). Las células siguieron una cinética de crecimiento similar a lo reportado previamente (Cervantes-Ayala, 2018). Una vez que las células estuvieron a una confluencia del ~60%, éstas se utilizaron para llevar a cabo las transfecciones para la interferencia de BIK (siRNA) y para el Ensayo MirTrap.

7.2 Interferencia de *BIK*

7.2.1 Determinación de la expresión del mRNA *BIK*

Datos previos del laboratorio indicaron la interacción de BIK con la región promotora del miR-137 (Ruiz Esparza-Garrido et al., 2018), por lo que cambios en la expresión de BIK podrían reflejarse en la del miR-137. Con base en lo anterior, la expresión de BIK se atenuó con un siRNA específico. Después de la transfección del siRNA, las células se incubaron durante 52 horas, luego se extrajo y cuantificó el RNA (Figura 12 y Tabla 13). Durante la estandarización de la qPCR para el análisis de expresión de BIK se observó la presencia de un solo amplicón (curva Melt, Fibura 13B). La interferencia de *BIK* mostró una disminución en los niveles del transcrito de este gen, en las células MDA-MB-231, en contraste con las células no transfectadas (-4.24 ± 0.04 veces *versus* 1 ± 0.021) (Figura 13A).

Tabla 13. Concentración de RNA después de la transfección del siRNA-BIK

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	A260	260/280	260/230
Control	27.54	0.79	2.01	1.83
siRNA-BIK	30.37	0.86	2.03	1.98

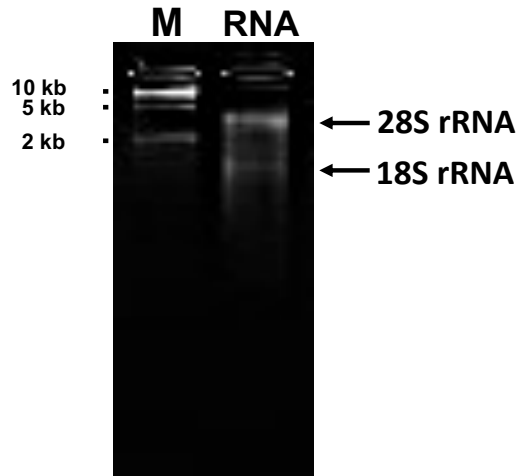


Figura 12. Extracción de RNA total de las células M231. Gel de agarosa (1.5%) en donde se pueden observar las bandas ribosomales: 18S (~1.5 kb) y 28S (~2.5 kb). Carril 1 o M=marcador de tamaño molecular (10 kb). Carril 2: RNA.

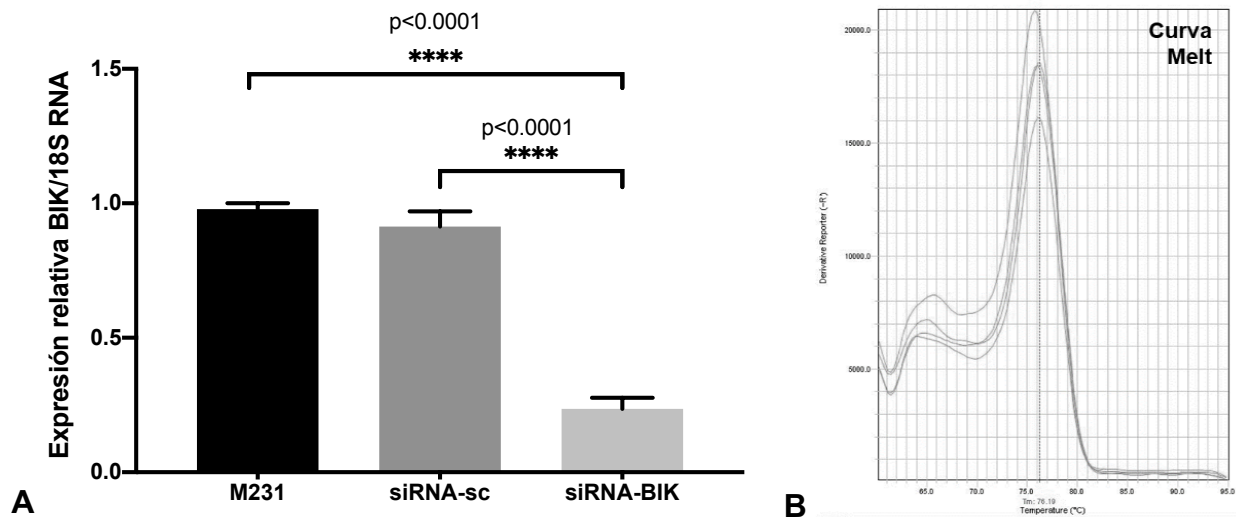


Figura 13. Expresión de BIK en las células M231, después de la interferencia con el siRNA-BIK. **A)** Expresión relativa de BIK. La expresión de BIK disminuyó 4.24 ± 0.04 veces. Se utilizó el gen 18SRNA para normalizar su expresión. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (**=p < 0.001; t Student). **B)** La Curva melt: cinética de disociación de los fragmentos amplificados mostró un solo pico de amplificación, lo que indica que se formaron los amplicones del tamaño esperado (TM de disociación: 76.19°C.)

7.2.2 Determinación de la expresión del miR-137

Interesantemente, la interferencia de BIK aumentó significativamente (~3 veces) la expresión del miR-137 en las células M231 transfectadas (1.57 ± 0.21) versus las M231 control (0.53 ± 0.097), en contraste con las células HMEC (1 ± 0.01) (Figura 14A). La curva Melt mostró la presencia de un amplicón (Figura 14B).

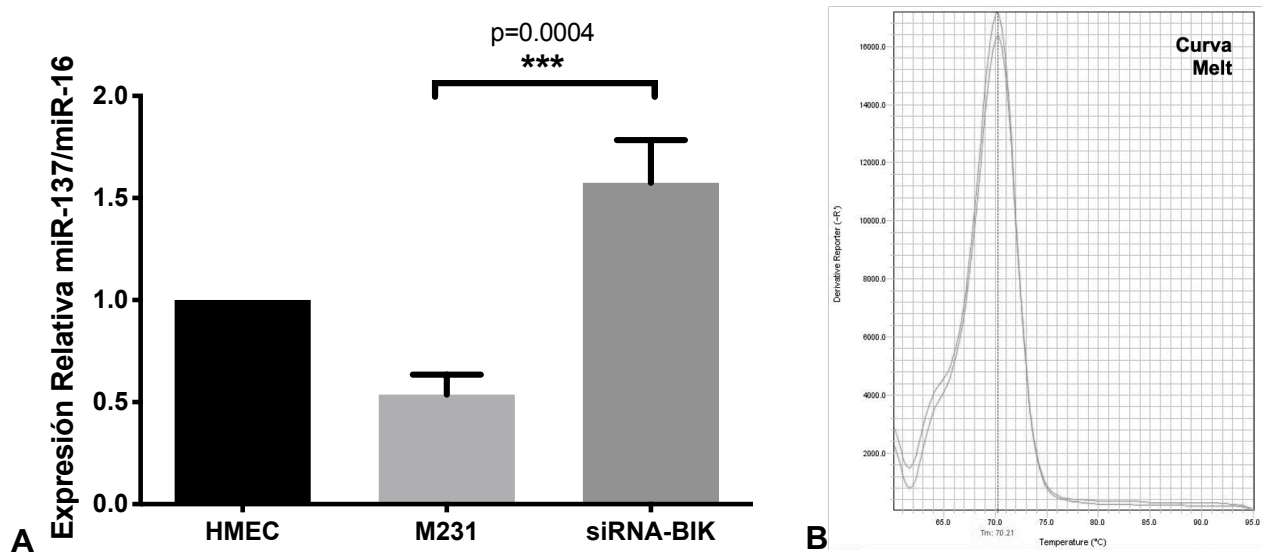


Figura 14. Expresión del miR-137 en las células M231, después de la interferencia con el siRNA-BIK. A) Expresión relativa del miR-137. La expresión del miR-137 en las células transfectadas con siRNA-BIK aumentó (1.57 ± 0.21) en contraste con las células HMEC (1 ± 0.01). Se utilizó el miR-16 para normalizar la expresión. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (***)= $p < 0.001$; t Student). **B)** La Curva melt: cinética de disociación de los fragmentos amplificados mostró un solo pico de amplificación, lo que indica que se formaron los amplicones del tamaño esperado (TM de disociación: 70.21°).

7.3 Ensayo miRTrap

Para el ensayo de captura de RISC, el miR-1303 se usó como miRNA control. Para determinar si las células MDA-MB-231 expresan este miRNA, su expresión se determinó mediante qPCR. Primero, se extrajo el RNA total y se evaluó la concentración y pureza en un NanoDrop (Tabla 14). Posteriormente, se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 2% (Figura 16).

Tabla 14. Concentración de RNA extraído de las células M231

Muestra	Concentración (ng/μL)	A260	260/280	260/230
RNA	52.54	1.19	1.96	1.76
RNA	51.37	1.06	1.92	1.75

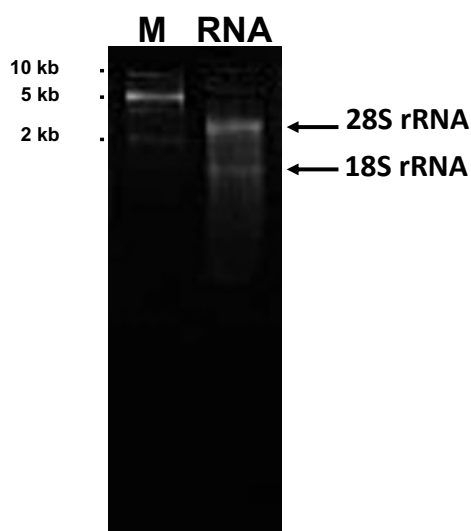


Figura 15. Extracción de RNA total de las células M231.

Gel de agarosa (1.5%) en donde se pueden observar las bandas ribosomales: 18S (~1.5 kb) y 28S (~2.5 kb). Carril 1 o M=marcador de tamaño molecular (10 kb). Carril 2: RNA

7.3.1 Expresión del miR-1303

Una vez extraído el RNA, el cDNA se sintetizó y determinó la expresión del miR-1303 (por qPCR) en las células M231. Los resultados mostraron que la expresión del miR-1303 estuvo significativamente elevada en las células MDA-MB-231, en comparación con las células HMEC (11.74 ± 0.89 versus 1.1 ± 0.053) (Figura 16A).

Además, la expresión de este miRNA, en las células MCF-7, no difirió en contraste con las células HMEC, pero sí, respecto a las M231 (5.19 ± 3.25 vs. 11.74 ± 0.89) (Figura 16A). La curva Melt (curva de disociación) mostró un solo pico de amplificación, lo que indica la especificidad de la reacción (Figura 16B).

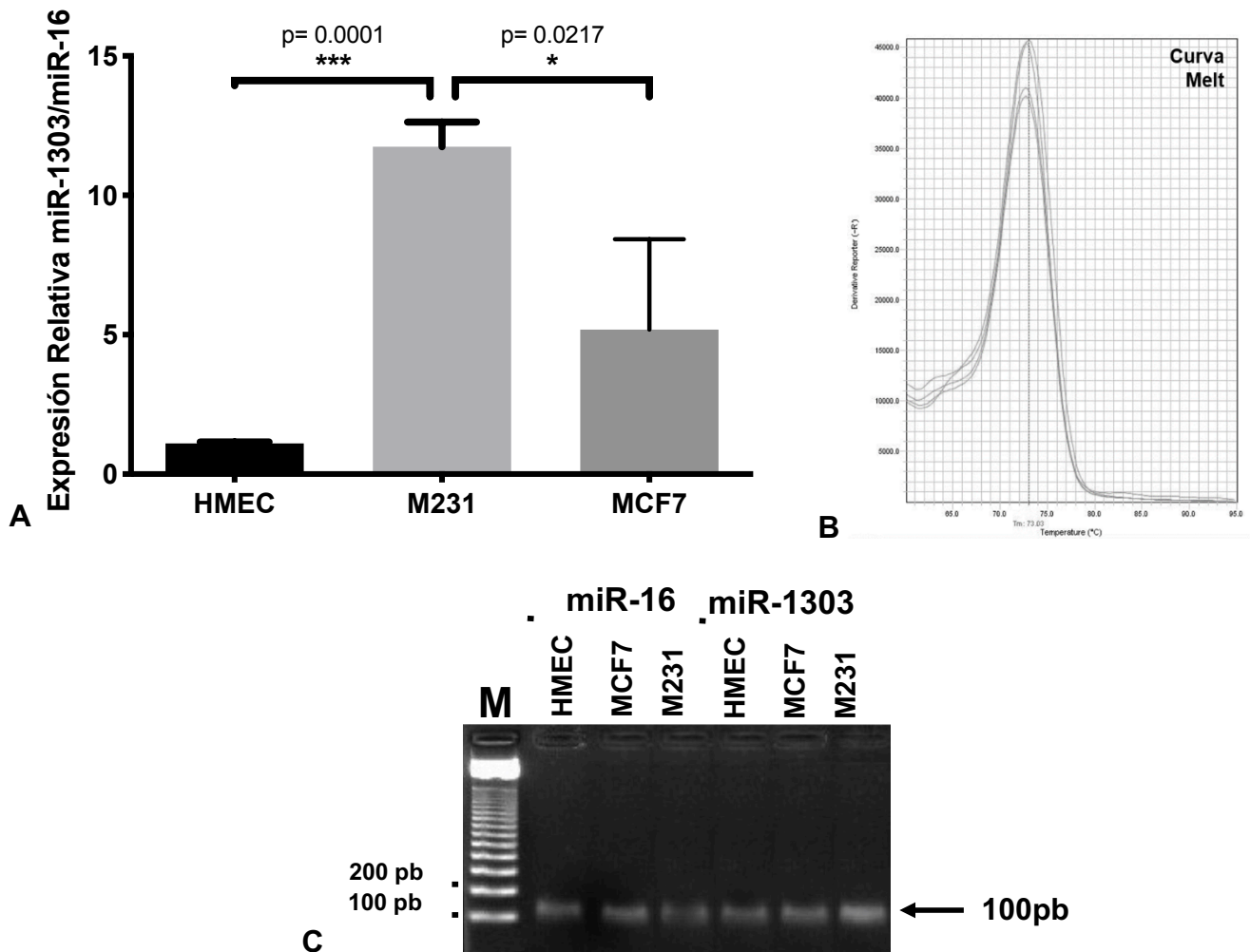


Figura 16. Expresión del miR-1303 en las líneas celulares de CaM MCF-7 y M231. A) Expresión relativa del miR-1303. La expresión del miR-1303 se encuentra a la alta en las líneas M231 y MCF7 (11.74 ± 0.89 y 5.19 ± 3.25 , respectivamente). Se utilizó el miR-16 para normalizar la expresión. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (***)= $p < 0.001$; t Student). **B)** Curva Melt: cinética de disociación de los fragmentos amplificados: TM de disociación: 73.03°C **C)** Gel de agarosa (2%) en donde se observan las bandas correspondientes al miR-16 (carril 2-4) y miR-1303 (carril 5-7) en las líneas HMEC, MCF-7 y M231. Carril 1 o M= marcador de peso molecular de 100 pb.

7.3.2 Transfección del miR-1303 y del Vector MirTrap Control

Antes de llevar a cabo la transfección, las hebras (3' y 5') del miR-1303 se acoplaron mediante PCR y se confirmó la formación del miRNA-1303 dúplex en un gel de agarosa al 2% (Figura 17).

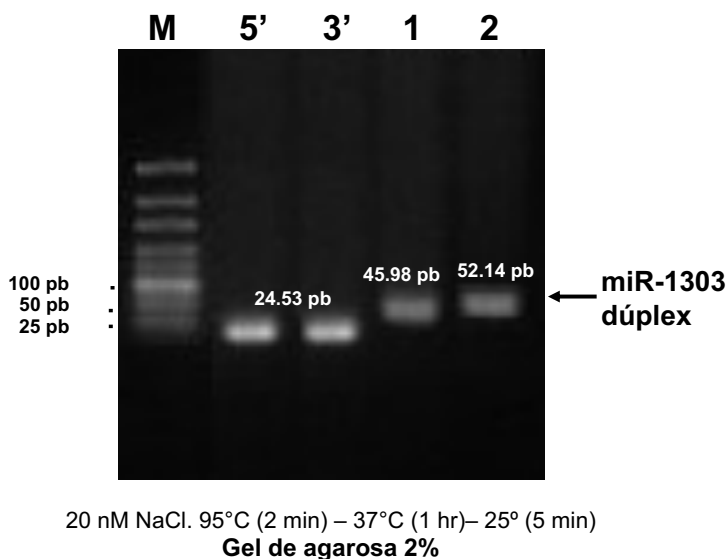


Figura 17. Acoplamiento de las hebras 5' y 3' del miR-1303. Gel de agarosa (2%) en donde se observa la formación del miR-1303 dúplex. Condiciones de acoplamiento: buffer de resuspensión (20 nM NaCl, 10 mM Tris); incubación durante 2 min a 95°C, 1 hr a 37°C y 5 min a 25°. Carril 1 o M=marcador de tamaño molecular de 25 pb. Carril 2 o 5'=Hebra 5' miR-1303. Carril 3 o 3'=Hebra 3' miR-1303. Carril 4 y 5 = muestras luego de la incubación y formación del miRNA-1303 dúplex(100 μ M).

Luego de la formación del dúplex, las células se transfectaron con el miR-1303 dúplex, el Vector MirTrap y el Vector MirTrap Control; este último permite evaluar la eficiencia de la transfección por imágenes de fluorescencia. El fenotipo celular se observó antes y después de la transfección (Figura 18A y B) y no hubo cambios significativos en el fenotipo de las células, aunque algunas células se despegaron de la placa de cultivo.

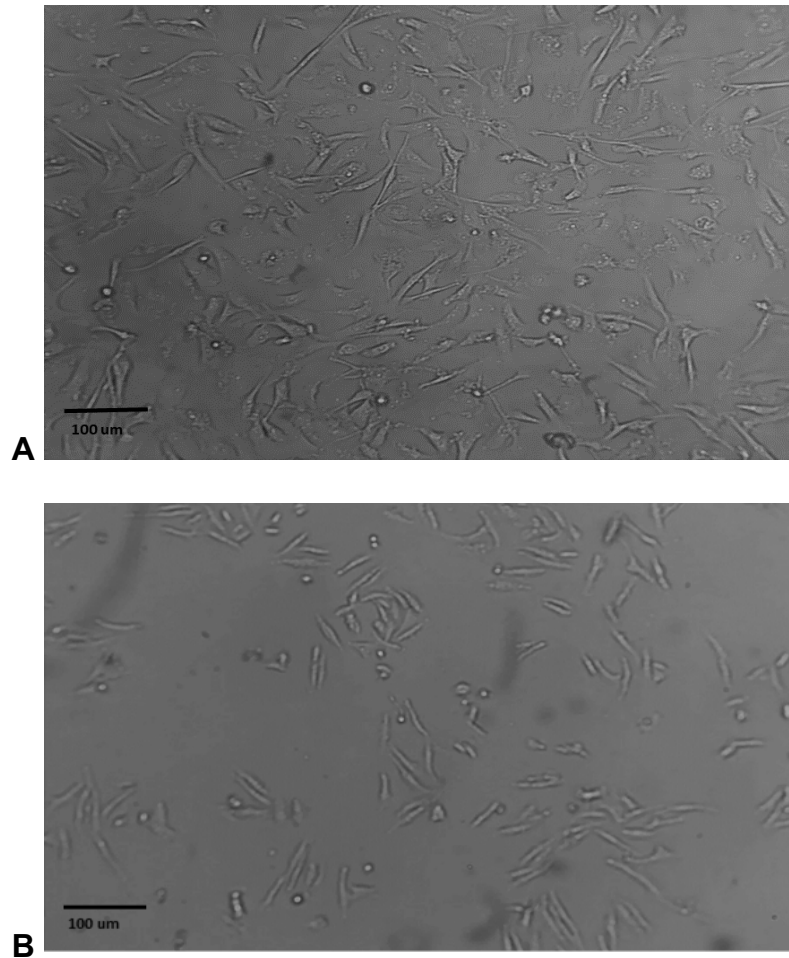
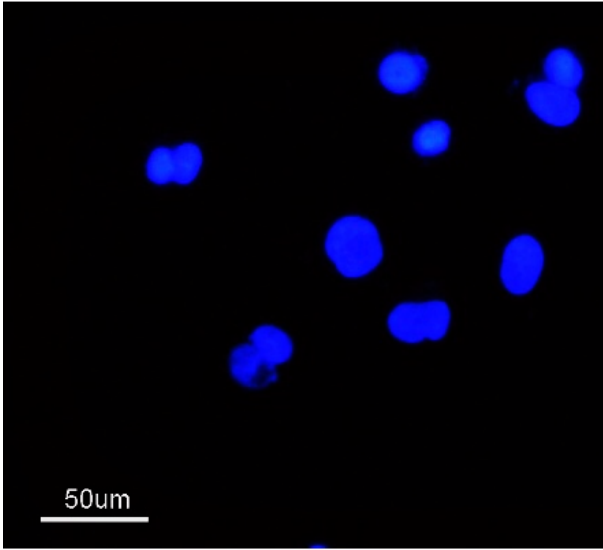
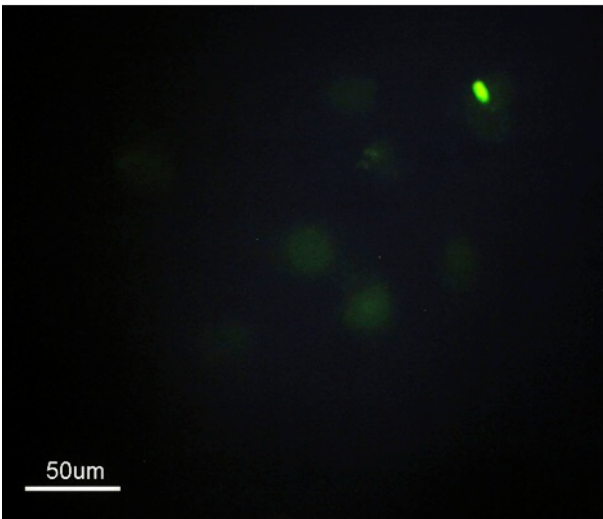


Figura 18. Visualización de las células M231 durante la transfección del vector MirTrap y el vector Control. A) Foto tomada antes de la transfección (20X). **B)** Foto después de 24 hrs de la transfección (20X). Las imágenes muestran que el fenotipo celular no se alteró significativamente, aunque hubo una disminución en el número celular. *Imágenes tomadas en un microscopio invertido Olympus.*

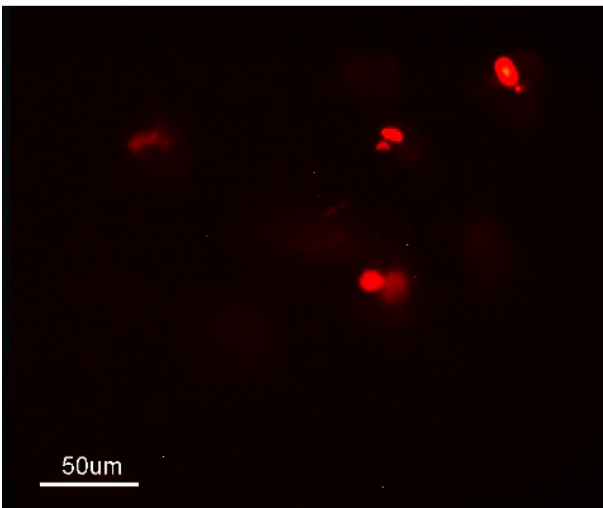
Veinticuatro horas después de la transfección, las células se fijaron, se incubaron con Dapi (azul) y observaron en un microscopio de fluorescencia para analizar la eficiencia de la transfección. La Figura 19, representativa del experimento, muestra que 95/98 células presentes en la placa expresan GFP (verde) y 91/98 expresan DsRed (rojo), por lo que la eficiencia de transfección es muy alta (~96.9% y ~92.8%).



A



B

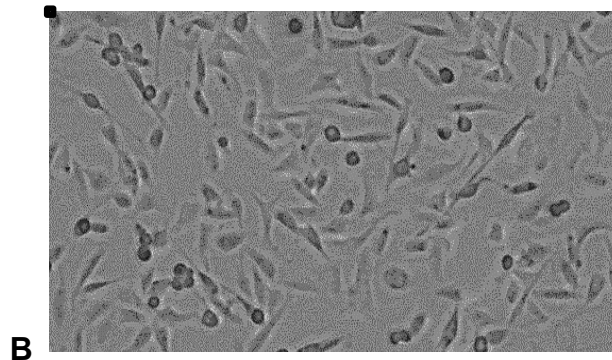
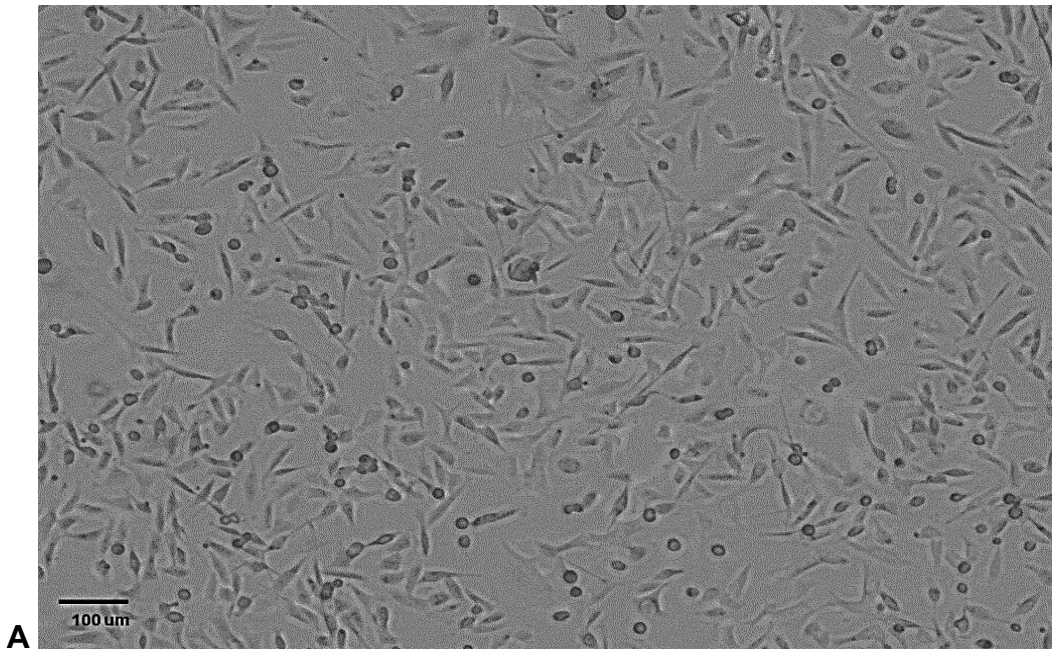


C

Figura 19. Imágenes de fluorescencia de las células M231 (20X) después de la transfección del vector Control. A) Células incubadas con DAPI: se observan los núcleos en azul. **B)** Proteína GFP. **C)** Proteína DsRed. Imágenes tomadas en un microscopio Nikon Alphaphot Ys. En el ANEXO 2 se muestran más imágenes fluorescencia.

7.3.3 Transfección del miR-1303 mimic y del vector *MirTrap*

El miR-1303 mimic se transfectó junto con el plásmido pMirTrap, en las células M231, y como control negativo (Ctrl -) se transfectaron todos los reactivos excepto el miR-1303 mimic. De igual forma, el fenotipo de las células se monitoreó antes (Figura 20A) y después (Figura 20B) de la transfección. Después de la transfección se observó que algunas células perdieron su morfología alargada, se volvieron redondas (como si hubieran perdido su diferenciación) y varias se despegaron de la placa de cultivo.



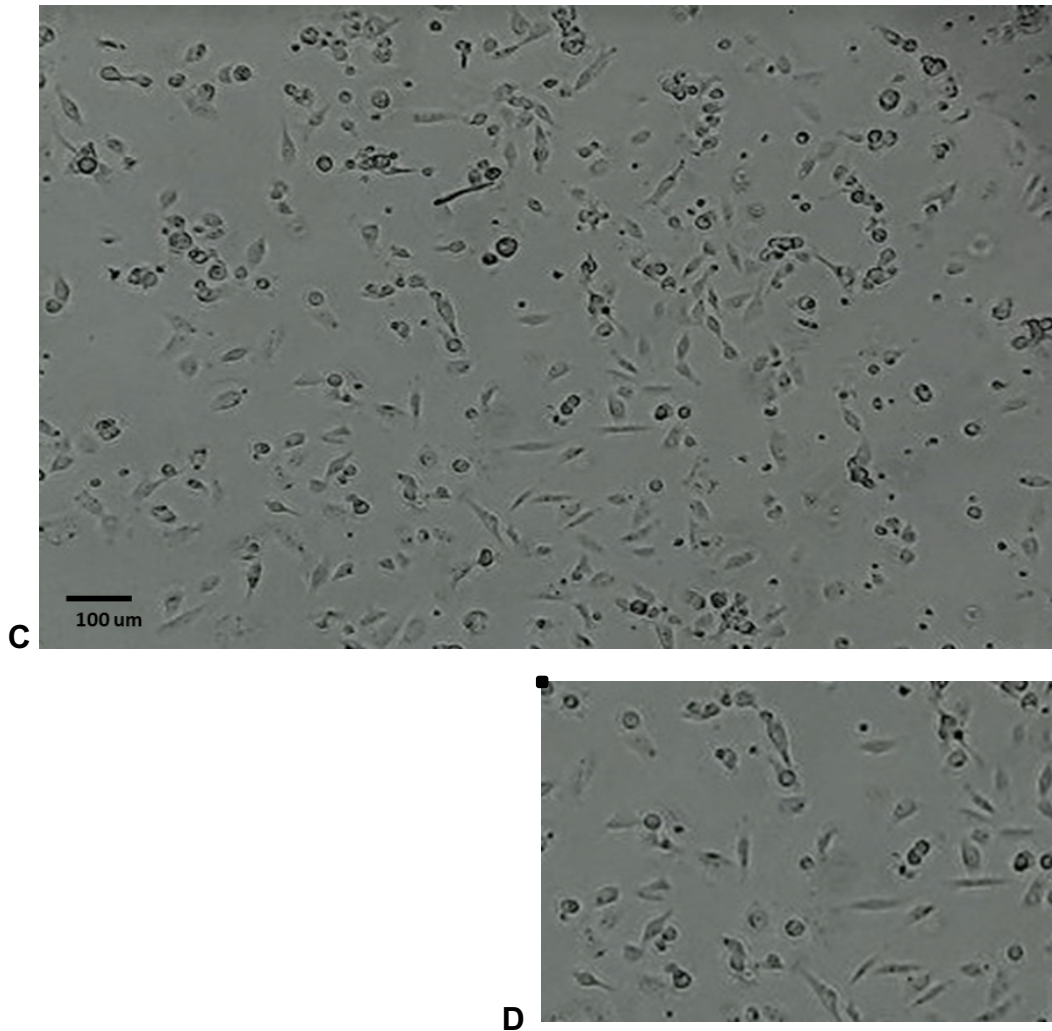


Figura 20. Visualización de las células M231 durante la transfección del miR-1303 y del vector MirTrap. A) Foto tomada antes de la transfección (10X) y **B)** Acercamiento. **C)** Foto después de transfectar las células en donde se observa que las células sufrieron estrés, puesto que la mayoría perdió su forma y algunas se despegaron del plato de cultivo. (10X, 24 h después de la transfección) y **D)** acercamiento. *Imágenes tomadas en un microscopio invertido Olympus.*

Para determinar la viabilidad, las células se contaron antes y después de la transfección. Se observó una disminución en el número de células en los cultivos transfectados, tanto en el cultivo control (de 1×10^6 a 8.1×10^5) como en el transfectado con el miR-1303 mimic (de 1×10^6 a 6.6×10^5) (Figura 21A), siendo en

esta última condición donde se observó la mayor disminución celular (83.12% vs. 67.37%) (Figura 21B) .

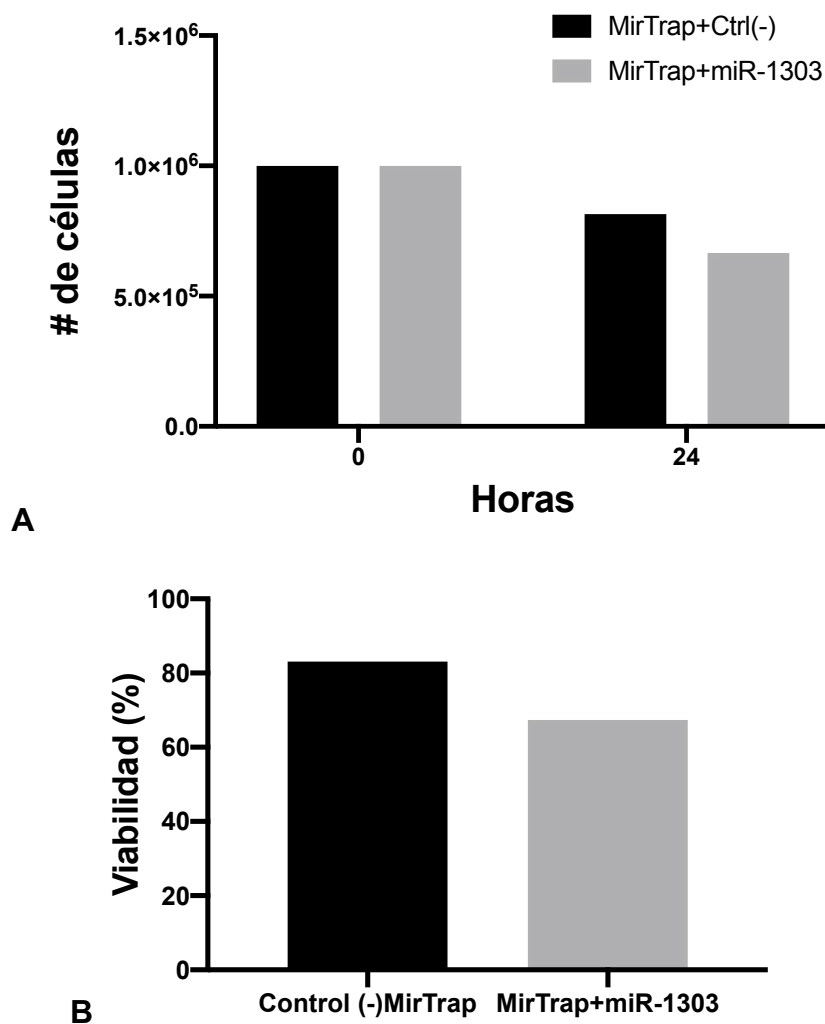


Figura 21. Viabilidad de las células M231 luego de la transfección del miR-1303 y del vector MirTrap. A) Cuantificación de las células M231 antes y después de la transfección. **B)** La Viabilidad celular se determinó mediante azul de tripano luego del ensayo MirTrap. Los resultados mostraron una mayor disminución de la viabilidad en las células transfectadas con el miR-1303 y el MirTrap. Los datos son de un experimento.

7.3.4 Inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA:

miR-1303

Después de las 24 horas de incubación, se realizó la inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA y luego se procedió con la extracción del RNA (Tabla 15). Los coeficientes para la cuantificación del RNA fueron buenos, pero no del todo satisfactorios, pues uno de ellos ($260/230=0.36-1.63$) indica la presencia de etanol en algunas muestras (Tabla 15). Como se esperaba, hubo RNA en la fracción Before IP de todas las muestras (Before IP: corresponde al RNA total). Por el contrario, no se encontró RNA en el Control (-), la muestra que no contenía miR-1303 pero sí en las muestras transfectadas con el miR-1303 mimic 'After IP' (Tabla 15). El RNA específico (After IP), representó el 41% del RNA total.

Tabla 15. Concentración de RNA: ensayo MirTrap para el miR-1303

Muestra	Concentración (ng/μL)	A260	260/280	260/230
Before IP. Ctrl(-) (RNA Total)	32.46	0.997	1.91	0.75
After IP. Ctrl(-) (RNA Específico).	-	-	-	-
Before IP miR-1303 mimic (RNA Total)	23.52	0.638	1.83	0.54
	39.5	1.024	1.86	0.75
After IP miR-1303 mimic (RNA Específico)	10.01	0.217	1.89	0.36
	16.38	0.356	1.92	1.63

7.3.5 Expresión del miR-137

Previo al ensayo MirTrap, la expresión del miR-137 se determinó mediante qPCR, en las células M231 y MCF-7. La qPCR mostró que la expresión del miR-137 fue baja en la línea M231, en comparación con las células HMEC (0.40 ± 0.1 vs 1.001

± 0.033); sin embargo, en MC-7, la expresión del miR-137 fue mayor a la observada en la línea celular HMEC (1.82 ± 0.42 vs 1.001 ± 0.033) (Figura 22A). La curva Melt (curva de disociación) mostró un solo pico de amplificación, lo que indica la especificidad de los primers(Figura 22B).

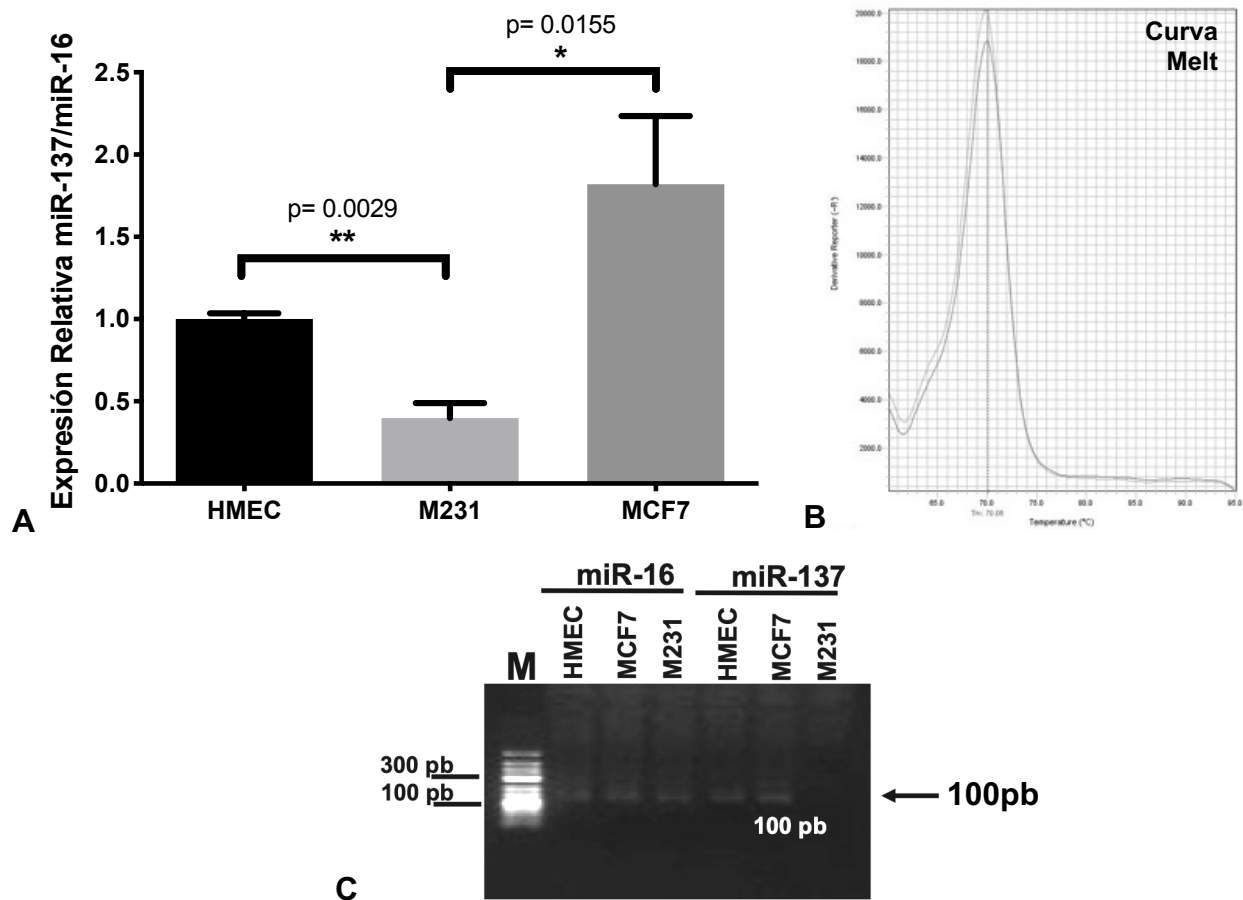
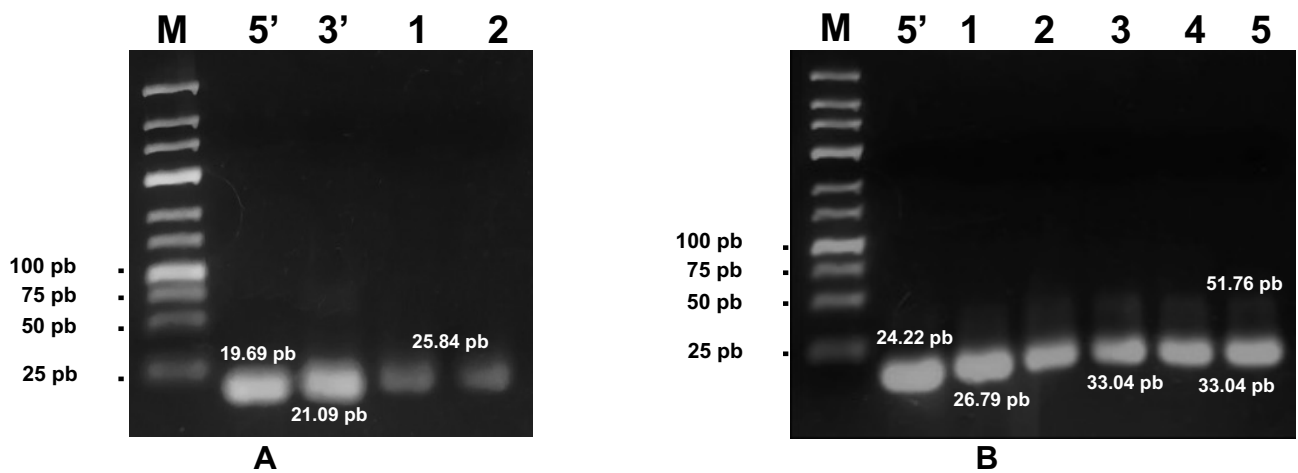


Figura 22. Expresión del miR-137 en las líneas celulares de CaM MCF7 y M231. A) Expresión relativa del miR-137. La expresión del miR-137 mostró una disminución en las células M231 (0.40 ± 0.1) en comparación con HMEC y MCF7 (1.001 ± 0.033 y 1.82 ± 0.42) Se utilizó el miR-16 para normalizar su expresión. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (** = $p < 0.005$; t Student). **B)** Curva Melt: cinética de disociación de los fragmentos amplificados: Temperatura de disociación: 70.06°C . **C)** Gel de agarosa (2%) en donde se observan las bandas correspondientes al miR-16 (carril 2-4) y miR-137 (carril 5-7) en las líneas HMEC, MCF-7 y M231. Carril 1 o M= marcador de peso molecular de 100 pb.

7.3.6 Transfección del miR-137 mimic y el vector MirTrap

El acoplamiento de las hebras del miR-137 se llevó a cabo por PCR. Las hebras del miR-137 (3' y 5') se hibridaron y la formación del dúplex se evaluó en un gel de agarosa al 2% (Figura 23). Debido a la estructura de este miRNA, se usaron 3 diferentes concentraciones de NaCl en el buffer de resuspensión (20 nM, 200 nM y 20 mM de NaCl, respectivamente) y tiempos de incubación distintos (Figura 23A, B y C), para establecer las mejores condiciones para el acoplamiento del miR-137. En las Figuras A y B, no se observó formación de dúplex. Los datos indicaron que la concentración de 20 mM de NaCl y una incubación a 95°C (2 min) y 25°C (2 h) maximizó la formación del dúplex (Figura 23C). Se realizó también un gel de poliacrilamida (12%) para visualizar de manera más clara la formación del miR-137 dúplex (Figura 23D).



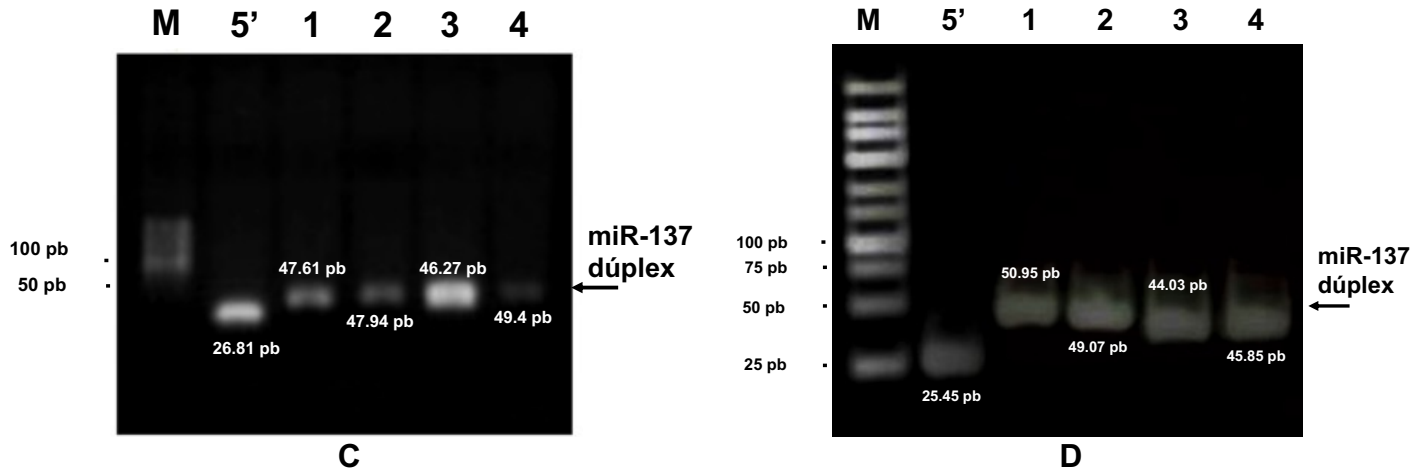


Figura 23. Acoplamiento de las hebras 5' y 3' del miR-137. Geles de agarosa (2%) en donde se observan diferentes muestras de la mezcla de las hebras del miR-137, después de la reacción de acoplamiento. **A)** 20 nM NaCl; 95°C (2 min) – 37°C (1 hr) – 25 (5 min). **B)** 200 nM NaCl; 95°C (2 min) – 25°C (2.5 hr). **C)** 20 mM NaCl; 95°C (2 min) – 25°C (2 hr). **D)** Gel de poliacrilamida (12%). La flecha indica la formación de miR-137 dúplex (50 pb). M=marcador de tamaño molecular de 25 pb, 5'=Hebra 5' miR-1303, 3'=Hebra 3' miR-1303, 1,2,3,4= alícuotas 100 µM.

Después de la formación del miR-137 dúplex, éste se transfectó en las células M231, con el vector MirTrap, y como control negativo (Ctrl -) se transfectaron los reactivos sin el miR-137 dúplex. El fenotipo de las células se monitoreó antes (Figura 24A) y después (Figura 24B) de la transfección. La Figura 24 muestra que algunas células sufrieron cambios en su morfología fusiforme.

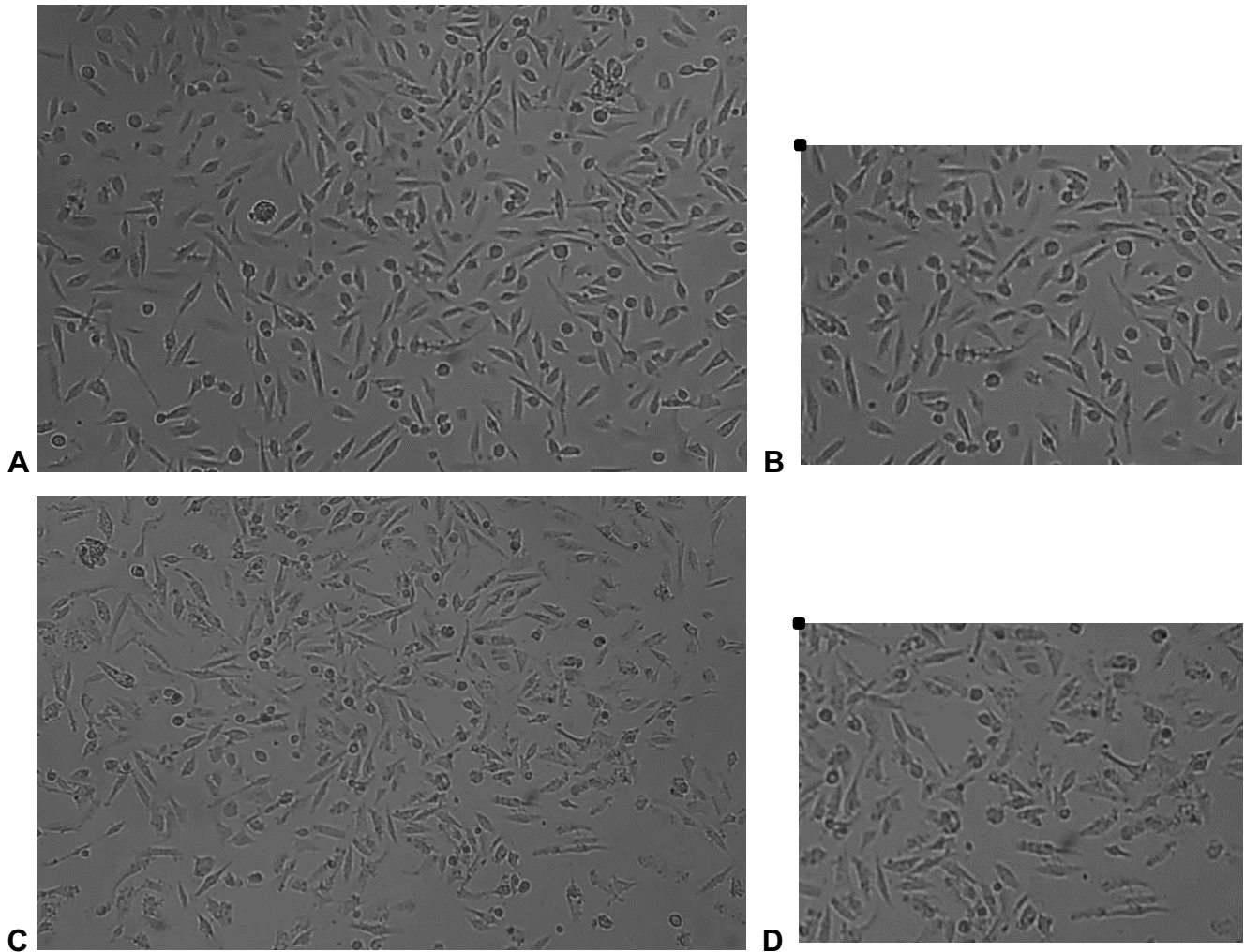


Figura 24. Visualización de las células M231, durante la transfección del miR-137 y el vector MirTrap. A) Foto tomada antes de la transfección (10X) y **B)** acercamiento. **C)** Foto después de transfectar las células (10X, 24 hrs después de la transfección) y **D)** acercamiento. *Imágenes tomadas en un microscopio invertido Olympus.*

Para determinar la viabilidad celular, las células se contaron antes y después de la transfección. Se observó una pequeña disminución en el número de células en el cultivo control (de 1×10^6 a 9.6×10^5), mientras que en el transfectado con el miR-137 mimic hubo mayor disminución celular (de 1×10^6 a 8.6×10^5) (Figura 25A),

lo cual se observa en los porcentajes de viabilidad, del 96.01% y 87.63% respectivamente (Figura 25B).

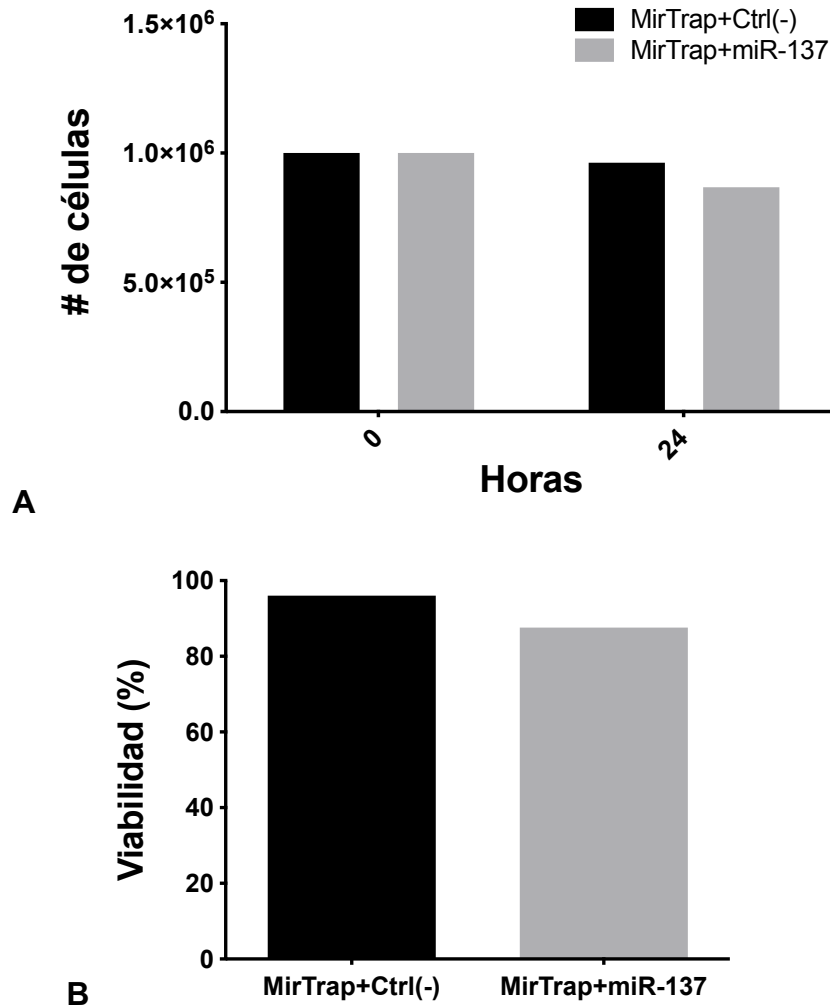


Figura 25. Viabilidad de las células M231 luego de la transfección del miR-137 y del vector MirTrap. A) Cuantificación de las células M231 antes y después de la transfección. Los resultados mostraron que la mayoría de las células conservó su fenotipo y no se despegaron demasiadas células del plato de cultivo. **B)** La viabilidad celular luego del ensayo MirTrap no se vio dramáticamente afectada. Los datos son de un solo experimento.

7.3.7 Inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA:

miR-137

Luego de la transfección e incubación de las células, se realizó la inmunoprecipitación de los complejos RISC/miRNA/mRNA y la extracción del RNA y su posterior cuantificación (Tabla 16). Se obtuvo RNA en la fracción “Before IP” (RNA total) de todas las muestras y sólo se obtuvo RNA en las fracciones “After IP” de las muestras que se transfectaron con el miR-137 mimic, lo que indica que se pudieron aislar los RNAs asociados al miR-137 (Tabla 16). El RNA específico, representó el 22% del RNA total.

Tabla 16. Concentración de RNA: ensayo MirTrap para el miR-137

Muestra	Concentración (ng/μL)	A260	260/280	260/230
Before IP Ctrl (-) <i>(RNA Total)</i>	50.55	1.029	1.93	1.72
	40.73	1.024	2.01	1.88
After IP Ctrl (-) <i>(RNA Específico)</i>	-	-	-	-
	-	-	.	-
Before IP miR-137 mimic <i>(RNA Total)</i>	55.56	1.034	1.87	1.63
	45.91	1.027	2.08	1.81
After IP miR-137 mimic <i>(RNA Específico)</i>	11.86	0.226	1.92	1.72
	10.61	0.212	1.93	1.87

7.4 Arreglos de Genoma Humano HTA2.0

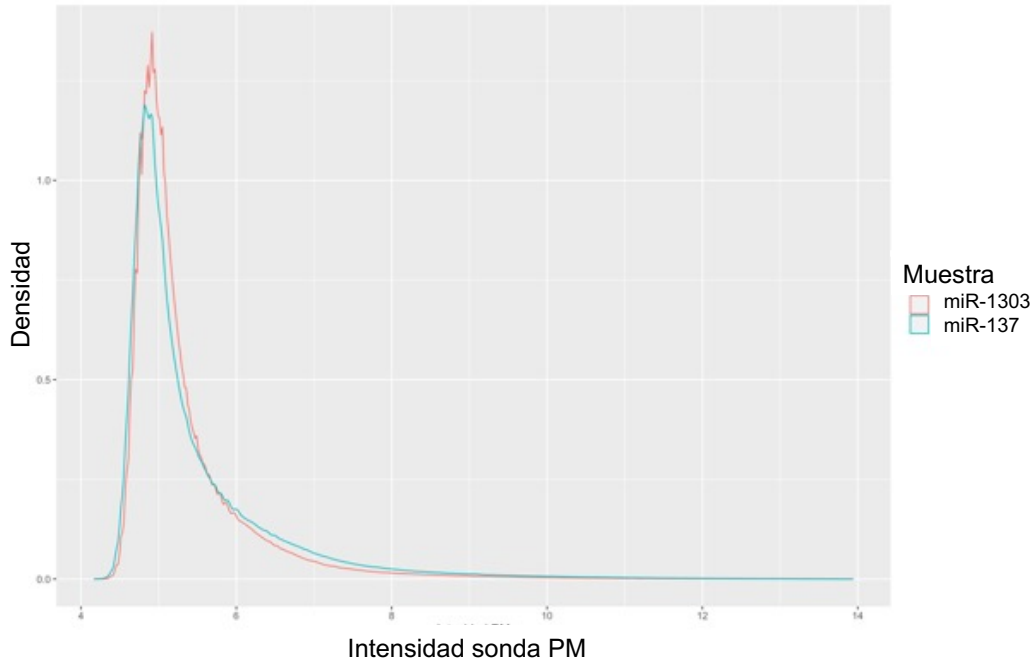
Los arreglos se realizaron como se describe en el protocolo de Affymetrix. Se amplificó el RNA y se sintetizó cDNA, el cual posteriormente se fragmentó y marcó con biotina, para hibridar los fragmentos marcados en el arreglo Affymetrix HTA 2.0. El arreglo con la muestra hibridada se leyó en un GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix).

7.4.1 Análisis bioinformático de los datos del arreglo de expresión

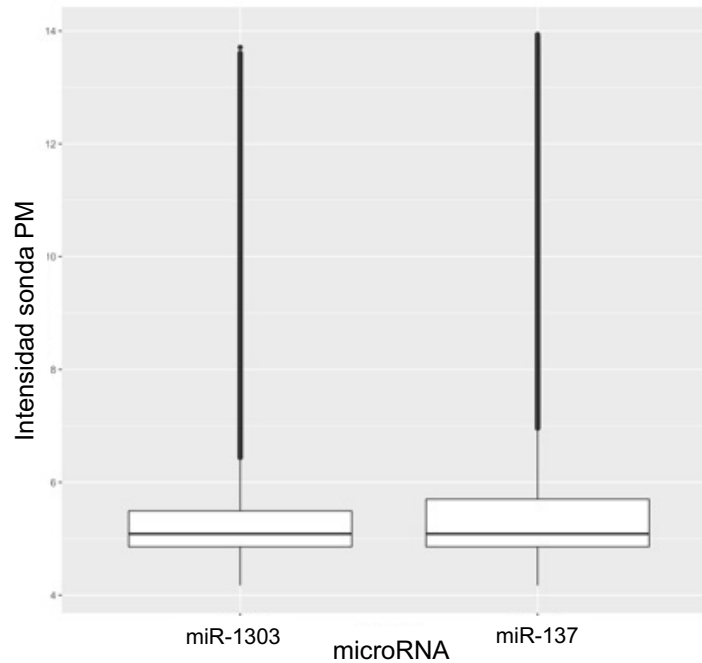
Los archivos CEL, obtenidos de la hibridación de los microarreglos HTA 2.0, se analizaron en el programa R. Se obtuvo un archivo CEL para cada uno de los microRNAs.

7.4.2 Exploración de los datos

En primer lugar, se analizaron los datos de intensidad de las sondas PM (*Perfect Match* = acoplamiento perfecto) para hacer una exploración primaria de éstos y determinar la distribución de cada conjunto de datos. Esta distribución se observó mediante un histograma que muestra el comportamiento de las sondas para ambos miRNAs (Figura 26A), y un diagrama caja-bigote que muestra tanto la distribución como la mediana de los datos (Figura 26B). En ambos gráficos se observó una diferencia mínima en las distribuciones de los conjuntos de datos, lo cual se puede apreciar en las curvas del histograma 26A, siendo ésta más clara en la Figura 26B, esto indica que los datos requieren ser normalizados para que puedan ser comparables. Esta diferencia se debe a la distribución diferencial de las intensidades de sonda en cada una de las muestras.



A

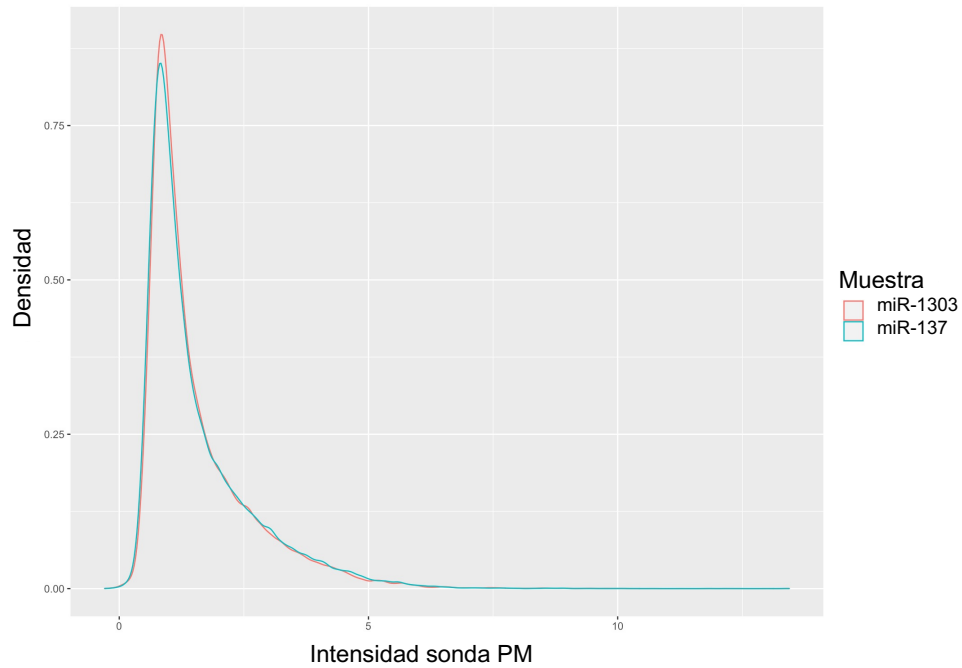


B

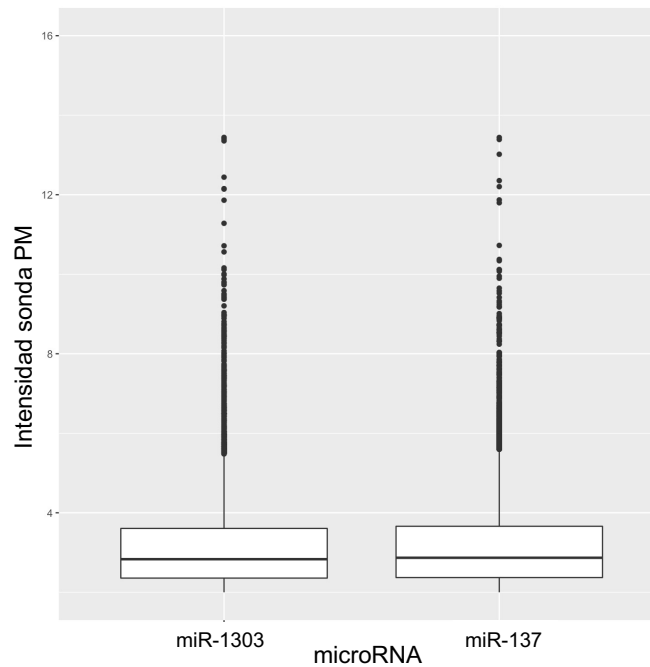
Figura 26. Distribución de los datos de intensidad de las sondas hibridadas en los arreglos HTA 2.0. A) Histograma de intensidad de las sondas, en rojo el miR-1303 y en azul el miR-137. **B)** Box-plot de la intensidad de las sondas. La intensidad de las sondas mostrada es respecto a la señal de fondo. Datos analizados con el paquete *oligo* y visualizadas con *ggplot2*.

7.4.3 Normalización de los datos

Después de la exploración inicial, se aplicó el método RMA (Promedio robusto de microarreglo) un método de normalización por cuartiles (84). El objetivo de este método fue eliminar el ruido de fondo. Para verificar si la normalización se llevó de forma correcta, se volvieron a graficar los datos en un histograma (Figura 26A) y en un diagrama de caja-bigote (Figura 26B). Las gráficas mostraron que la diferencia entre la distribución de los conjuntos de datos disminuyó luego de la normalización, lo cual indica que los datos son comparables entre sí.



A



B

Figura 27. Distribución normalizada de los datos de intensidad de las sondas hibridadas en los arreglos HTA 2.0. A) Histograma de los datos de intensidad normalizados, en rojo el miR-1303 y en azul el miR-137. **B)** Box-plot de los datos de intensidad normalizados. Datos analizados con el paquete *oligo* y visualizadas con *ggplot2*.

Después, se llevó a cabo un Análisis de componentes principales (PCA), el cual agrupa los datos en los componentes principales, a partir de la varianza de los datos, para representar, de manera visual, que la variabilidad de cada conjunto refleja su agrupación (Figura 28). Esto fue con la finalidad de verificar que a pesar de estar normalizados y ser comparables entre sí, los datos de intensidad de sondas para cada miRNA se agrupan de forma independientes.

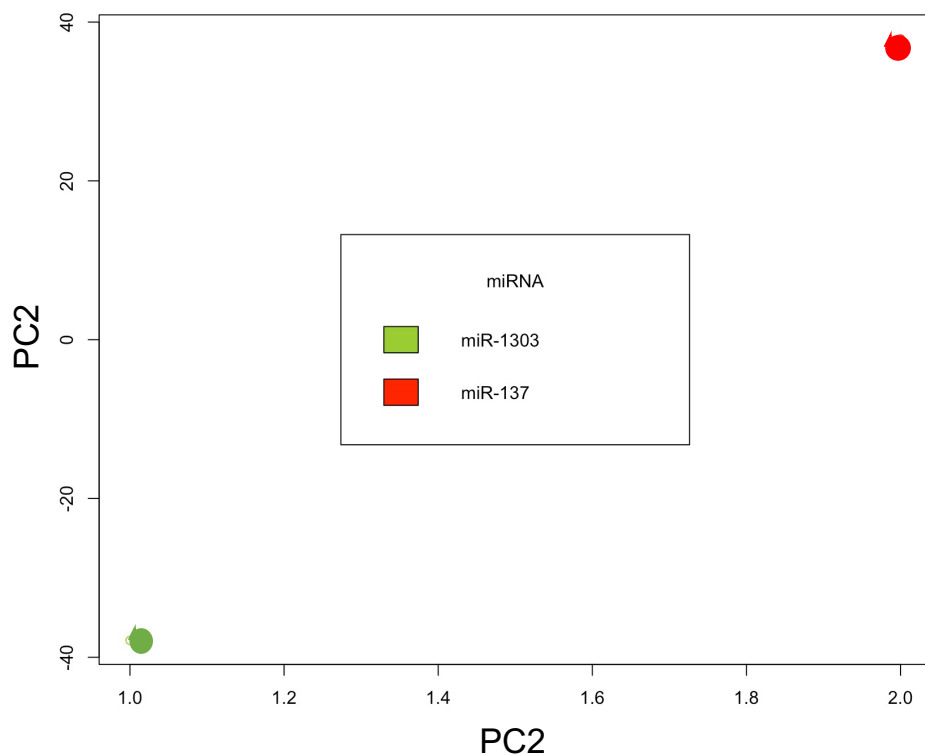
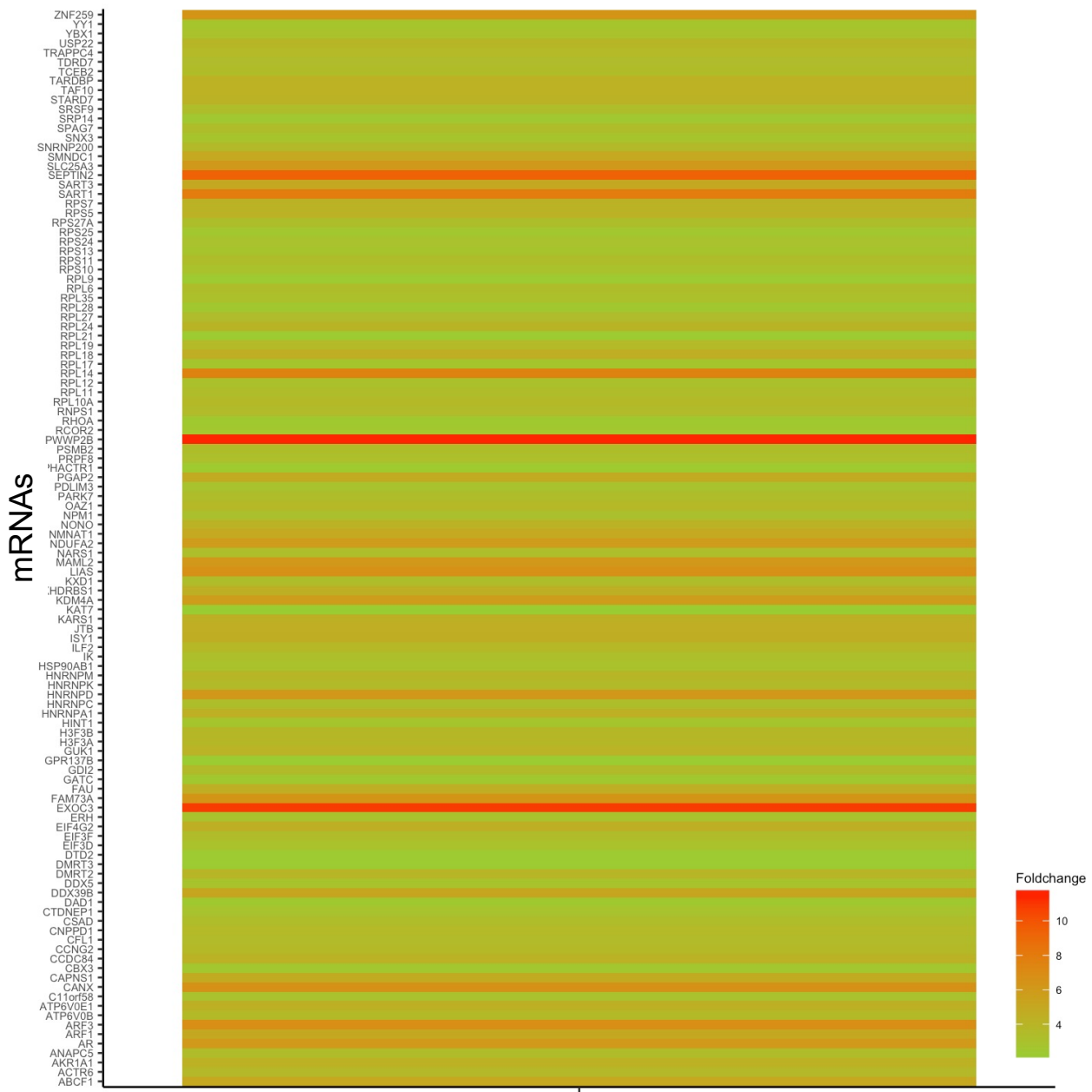


Figura 28. Análisis de componentes principales de los datos del miR-1303 y el miR-137. Los datos mostraron que ambas muestras se agrupan de forma independiente.

7.4.4 Identificación de los mRNAs blanco del miR-137 y el miR-1303

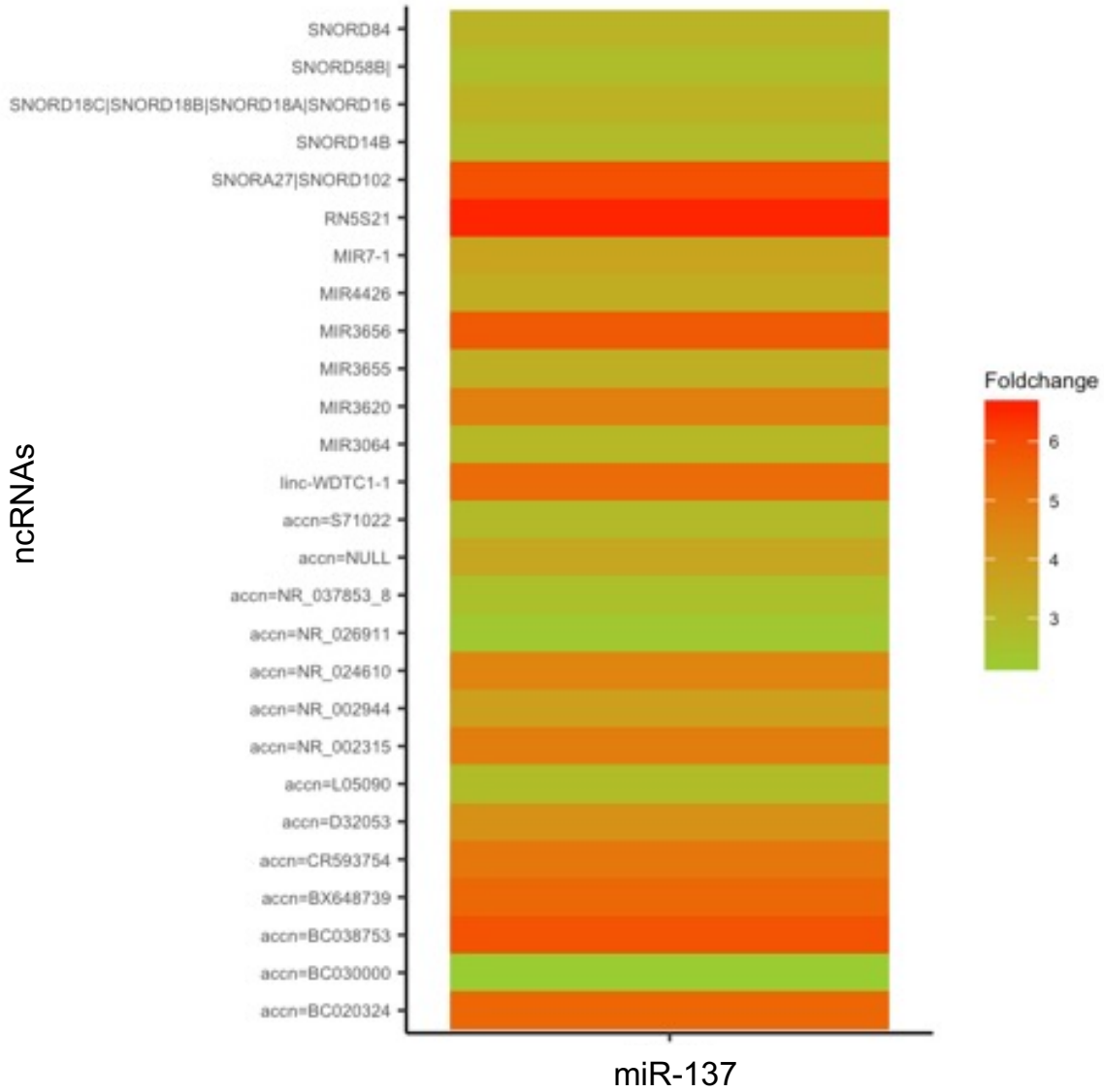
Posterior a la exploración y normalización de los datos, se procedió con la identificación de los genes presentes en cada uno de los microarreglos. Para esto, se estableció el siguiente parámetro: se definieron como blancos las sondas hibridadas que mostraron un cambio de intensidad >2 (Figura 29). Una vez identificadas estas sondas, se obtuvieron los IDs correspondientes a cada sonda y, por último, se asoció el nombre del gen a cada ID, lo que permitió obtener los blancos moleculares del miR-137 (Tabla 17) y miR-1303 (Tabla 18). Los resultados mostraron 139 genes blanco para el miR-137, de los cuales 109 corresponden a mRNAs blanco; 1 rRNA; 5 snoRNAs; 15 lncRNAs; 6 miRNAs y 3 pseudogenes (Figuras 29 A y B). En el caso del miR-1303 se identificaron 83 genes blanco, 77 mRNAs; 5 lncRNAs y 1 pseudogen (Figuras 29C y D). Es importante mencionar que estos miRs compartieron 22 mRNAs blanco.

La Figura 29E muestra gráficamente los mRNAs blanco que mostraron un cambio en la intensidad de las sondas mayor a 2 (fold change >2) para cada miRNA. En el caso del miR-137, los mRNA con mayor fold change, y que por tanto podrían ser blancos preferenciales de este miRNA, fueron EXOC3 (Componente 3 del complejo de exoquistes), PWWP2B (Dominio PWWP 2B) y SEPTIN2 (Septina 2). Para el miR-1303, los mRNAs con mayor cambio (fold change >2) fueron FBXO34 (Proteína 34, caja F), CANX (Calnexina) y HNRNPD (Ribonucleoproteína nuclear heterogénea D).

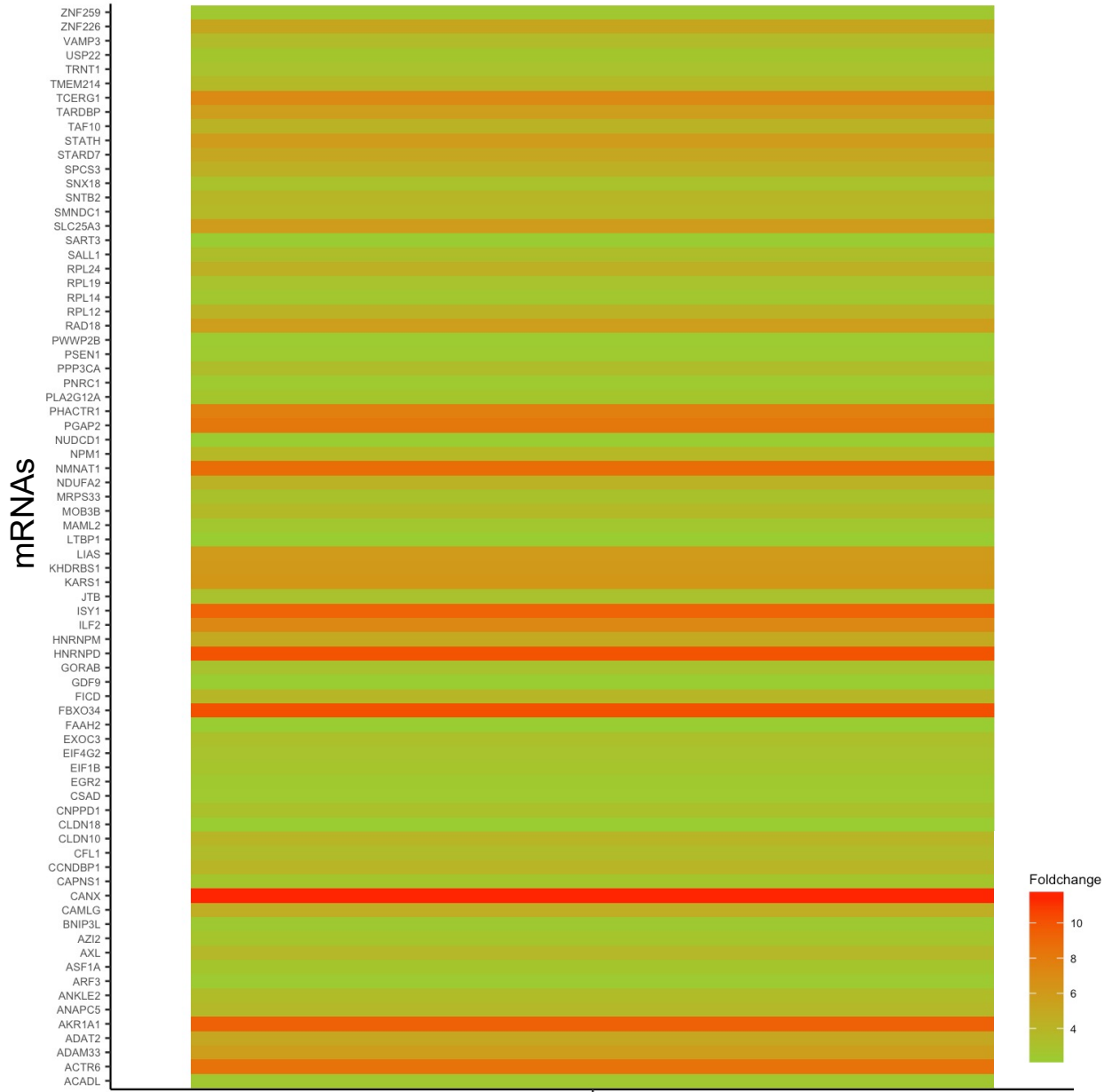


A

miR-137



B



c

miR-1303

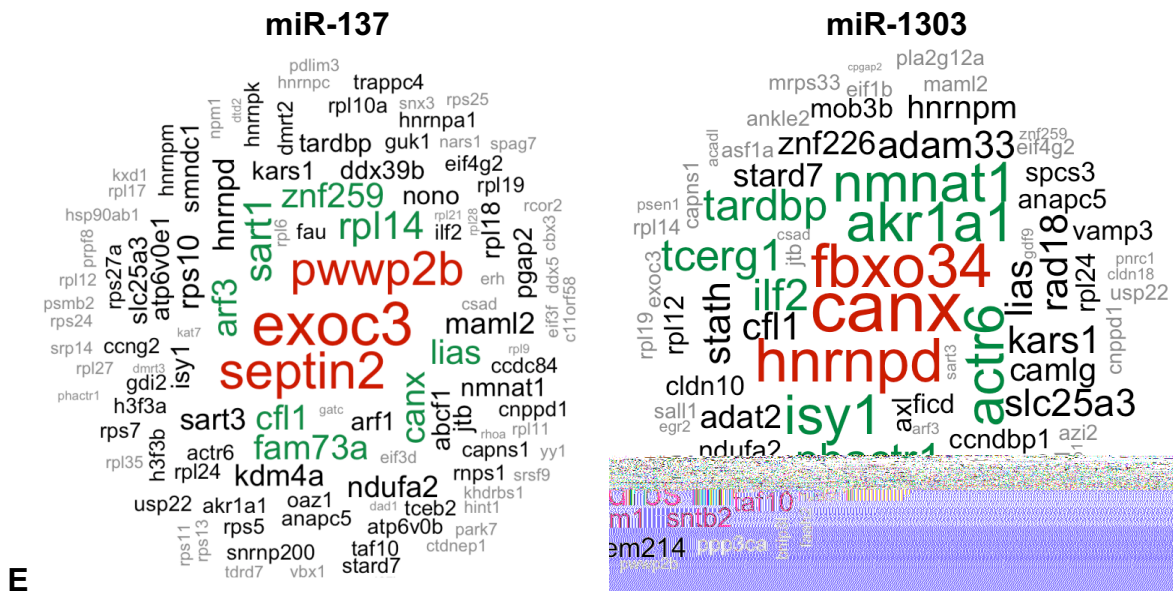
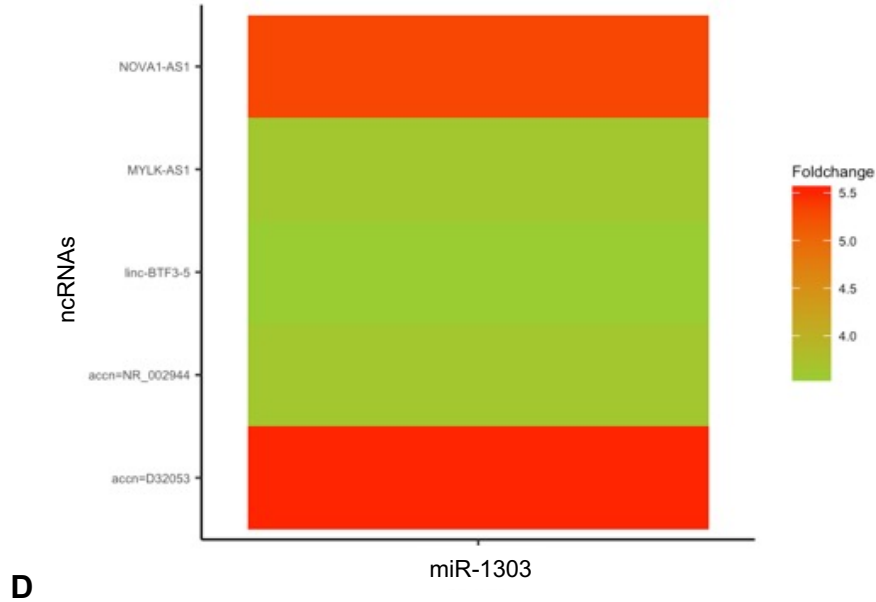


Figura 29. Mapas de calor y gráficos de nube de los RNAs blanco de los miRs 137 y 1303. A) mRNAs y **B)** ncRNAs blanco del miR-137. **C)** mRNAs y **D)** ncRNAs blanco del miR-1303. La columna muestra el nivel de expresión y las filas representan los genes. En color rojo se muestran los mRNAs con mayor fold change y en verde los que tienen menor fold change. **E)** mRNAs blanco del miR-137 y miR-1303. Los gráficos muestran los nombres de los mRNAs blanco, mientras que el tamaño del nombre del gen es directamente proporcional a su fold change. El color indica un intervalo en el fold change de las sondas, en orden descendente: rojo (10-12), verde (6-10), negro (2-6) y gris (2). Gráficos realizados en el programa R, con el paquete *wordcloud* ().

Tabla 17. Lista de los blancos identificados para el miR-137

No.	Gen	Descripción
1	RPL12	Proteína ribosomal L12
2	RPS10	Proteína ribosomal S10
3	H3F3B	Histona H3, familia 3B (H3.3B)
4	H3F3A	Histona H3, familia 3 ^a
5	PGAP2	Post-GPI adhesión a proteínas 2
6	CFL1	Cofilina 1
7	MAML2	Tipo mente maestra, coactivador transcripcional 2 (<i>Drosophila</i>)
8	DTD2	D-aminoacil-TRNA desacilasa 2
9	PARK7	Deglicasa asociada a Parkinson
10	NMNAT1	Nicotinamida nucleótido adenililtransferasa 1
11	TARDBP	Proteína TAR de unión a DNA
12	RPL11	Proteína ribosomal L11
13	KHDRBS1	Dominio de unión de RNA KH, asociada a transducción de señales 1
14	ATP6V0B	ATPasa H + que transporta la V0, subunidad B
15	AKR1A1	Miembro A1, familia Aldo-Keto Reductasa 1
16	GUK1	Guanilato cinasa 1
17	PSMB2	Proteosoma 20S, subunidad Beta 2
18	ILF2	Factor de unión potenciador de interleucina 2
19	JTB	Punto de ruptura de la translocación de salto
20	RPS7	Proteína ribosomal S7
21	SEPTIN2	Septina 2
22	STARD7	Dominio de transferencia de lípidos relacionado con StAR 7
23	SNRNP200	Subunidad 200 de ribonucleoproteína nuclear pequeña U5
24	CNPPD1	Dominio Pas1/PHO80, ciclina 1
25	RPL14	Proteína ribosomal L14
26	RHOA	Miembro A de la familia homologo de Ras
27	RPL24	Proteína ribosomal L24
28	ISY1	Homólogo del factor de empalme ISY1 (<i>S. cerevisiae</i>)
29	LIAS	Ácido lipoico sintetasa
30	RPL9	Proteína ribosomal L9
31	HNRNPD	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea D

32	EXOC3	Componente 3 del complejo de exoquistes
33	NPM1	Nucleofosmina 1
34	ATP6V0E1	ATPasa H + que transporta V0, subunidad E1
35	CANX	Calnexina
36	HINT1	Proteína 1 de unión a nucleótidos de la tríada de histidina
37	NDUFA2	NADH: oxidoreductasa de ubiquinona, subunidad A2
38	PHACTR1	Regulador 1 de fosfatasa y actina
39	ABCF1	Casete de unión a ATP, subfamilia F, miembro 1
40	RPL10A	Proteína ribosomal L10a
41	HSP90AB1	Proteína de choque térmico 90 alfa, familia clase B, miembro 1
42	RPS10	Proteína ribosomal S10
43	SNX3	Clasificación de nexina 3
44	CBX3	Caja de cromo 3
45	RPL35	Proteína ribosomal L35
46	RPL12	Proteína ribosomal L12
47	AR	Receptor de andrógeno
48	NONO	Dominio no POU que contiene unión a octamero
49	RPS24	Proteína ribosomal S24
50	PWWP2B	Dominio PWWP 2B
51	GDI2	Inhibidor 2 de la disociación de GPD
52	SMNDC1	Dominio de la neurona motora de supervivencia 1
53	EIF3F	Factor de inicio de la traducción eucarionte 3, subunidad F
54	C11orf58	Marco de lectura abierto 58 del cromosoma 11
55	SART1	Factor 1 asociado al spliceosoma, reclutador de U4/U6.U5 Tri-SnRNP
56	CCDC84	Dominio de bobina 84
57	TAF10	Factor 10 asociado a la proteína de unión a la caja TATA
58	EIF4G2	Factor de inicio de la traducción eucarionte 4, gamma 2
59	FAU	FAU ubiquitina y roteína ribosomal de fusión S30
60	CFL1	Cofilina
61	ZNF259	Dedo de zinc ZPR1
62	RPS25	Proteína ribosomal S25
63	HNRNPA1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1
64	SLC25A3	Soluto de la familia acarreadora 25, miembro 3
65	ACTR6	Proteína 6 relacionada con la actina

66	GATC	Glutamil(Gln)-tRNA, subunidad C de amidotransferasa
67	ARF3	ADP Factor de ribosilación 3
68	CSAD	Cisteína ácido sulfínico descarboxilasa
69	SART3	Proteína de reciclaje U4/U6 asociada al factor 3 del spliceosoma
70	RPL6	Proteína ribosomal L6
71	SRSF9	Factor de empalme 9, rico en serina y arginina
72	ANAPC5	Complejo de promoción de anafase, subunidad 5
73	YY1	Factor de transcripción YY1
74	HNRNPC	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea C
75	FAM73A	Familia con similitud de secuencia 73, miembro A
76	RPL21	Proteína ribosomal L21
77	DAD1	Defensor contra la muerte celular 1
78	ERH	ERH MRNA Factor de empalme y mitosis
79	SRP14	Partícula de señal de reconocimiento 14
80	RNPS1	Proteína 1 de unión a RNA con dominio rico en serina
81	TCEB2	Factor de elongación de la transcripción B, polipéptido 2
82	KARS1	Lisil-tRNA sintetasa 1
83	RPL19	Proteína ribosomal L19
84	RPL27	Proteína ribosomal L27
85	KAT7	Acetiltransferasa de lisina 7
86	PRPF8	Pre-MRNA, Factor de procesamiento 8
87	SPAG7	Antígeno asociado a espermatozoides 7
88	CTDNEP1	CTD, Envoltura nuclear fosfatasa 1
89	USP22	Ubiquitina específica de peptidasa 22
90	NARS1	Asparaginil-tRNA sintetasa 1
91	OAZ1	Antienzima ornitina descarboxilasa 1
92	HNRNPM	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea M
93	KXD1	Proteína que contiene motivo KxDL 1
94	CAPNS1	Subunidad pequeña de calpaina 1
95	RPS11	Proteína ribosomal S11
96	RPL28	Proteína ribosomal L28
97	RPS5	Proteína ribosomal S5
98	RPL18	Proteína ribosomal L18
99	EIF3D	Factor de inicio de la traducción eucarionte 3, subunidad D

100	DDX39B	Helicasa 39B, que contiene la caja DExD
101	TDRD7	Proteína 7 que contiene dominio Tudor
102	DMRT3	Factor de transcripción 3 relacionado con Doublesex y Mab-3
103	PDLIM3	Proteína 3 con dominio PDZ y LIM
104	DMRT2	Factor de transcripción 2 relacionado con Doublesex y Mab-3
105	YBX1	Proteína 1 de unión a la caja Y
106	KDM4A	Desmetilzasa específica de lisina 4 ^a
107	RCOR2	Correpressor REST 2
108	GPR137B	Recptor acoplado a proteínas G 137B
109	CCNG2	Ciclina G2
110	FAM73A RN5S21	Familia con similitud de secuencia 73, miembro A RNA ribosomal 5S, 21
111	SNORA27 SNORD102 RPL21	RNA pequeño nucleolar, caja H/ACA 27 RNA pequeño nucleolar, caja C/D 102 Proteína ribosomal L21
112	RPS13 SNORD14B RPL4	Proteína ribosomal S13 RNA pequeño nucleolar, caja C/D 14B
113	SNORD18C/B /A SNORD16	Proteína ribosomal L41 RNA pequeño nucleolar, caja C/D 18C/B/A RNA pequeño nucleolar, caja C/D 16
114	SNORD58B RPL17	RNA pequeño nucleolar, caja C/D 58B Proteína ribosomal L17
115	DDX39B SNORD84	Helicasa 39B, que contiene la caja DExD RNA pequeño nucleolar, caja C/D 84
116	MIR7-1 HNRNPK	microRNA 7-1 Ribonucleoproteína nuclear heterogénea K
117	ARF1 MIR3620	ADP Factor de ribosilación 1 microRNA-3620
118	RPS27A MIR4426	Proteína ribosomal S27a microRNA-4426
119	IK MIR3655	Citocina IK microRNA-3655
120	TRAPPC4 MIR3656	Subunidad 4 del complejo de partículas de tráfico de proteínas microRNA-3656

121	DDX5 MIR3064	Helicasa 5, que contiene caja DEAD microRNA-3064
122	---	linc-WDTC1-1
123	---	accn=NR_002315 class=lncRNA
124	---	class=lincRNA name=Human lincRNA linc-CPEB2-13
125	---	accn=NR_024610 class=lncRNA accn=NR_024611 class=lncRNA
126	---	accn=NR_037853_8 class=lncRNA
127	---	accn=L05090 class=mRNAlike lncRNA
128	---	accn=NR_002944 class=lncRNA
129	---	accn=S71022 class=mRNAlike lncRNA
130	---	accn=NR_026911 class=lncRNA accn=AY320407 class=mRNAlike lncRNA
131	---	accn=BC020324 class=mRNAlike lncRNA
132	---	accn=BC030000 class=mRNAlike lncRNA accn=CR616839 class=mRNAlike lncRNA accn=CR600624 class=mRNAlike lncRNA
133	---	accn=D32053 class=mRNAlike lncRNA
134	---	accn=CR593754 class=mRNAlike lncRNA
135	---	accn=BC038753 class=mRNAlike lncRNA accn=BC045573 class=mRNAlike lncRNA
136	---	accn=BX648739 class=mRNAlike lncRNA
137	LOC643387	Pseudogén de la proteína de unión a DNA TAR
138	LOC493754	Pseudogen del factor de intercambio de nucleótidos de guanina RAB
139	RPL21P28	Proteína ribosomal L21, pseudogen 28

Tabla 18. Lista de los blancos identificados para el miR-1303

No.	Gene	Descripción
1	PGAP2	Post-GPI adhesión a proteínas 2
2	CFL1	Cofilina 1
3	MAML2	Tipo mente maestra, coactivador transcripcional 2 (<i>Drosophila</i>)
4	FBXO34	Proteína 34, caja F
5	NMNAT1	Nicotinamida nucleótido adenililtransferasa 1
6	TARDBP	Proteína TAR de unión a DNA
7	KHDRBS1	Dominio de unión de RNA KH, asociada a transducción de señales 1

8	AKR1A1	Miembro A1, familia Aldo-Keto Reductasa 1
9	RAD18	RAD18 E3 Ubiquitina protein-ligasa
10	TCERG1	Regulador de la elongación de la transcripción 1
11	ACADL	Cadena larga de acil-CoA deshidrogenasa
12	PPP3CA	Proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica alfa
13	LTBP1	Proteína de unión al factor beta de crecimiento transformante latente 1
14	ILF2	Factor de unión potenciador de interleucina 2
15	GDF9	Factor de diferenciación del crecimiento 9
16	SALL1	Factor de transcripción tipo Spalt 1
17	JTB	Punto de ruptura de la translocación de salto
18	STARD7	Dominio de transferencia de lípidos relacionado con StAR 7
19	CNPPD1	Dominio Pas1/PHO80, ciclina 1
20	RPL14	Proteína ribosomal L14
21	RPL24	Proteína ribosomal L24
22	ADAT2	Adenosina deaminasa específica de tRNA 2
23	SNTB2	Sintrofina beta 2
24	ISY1	Homólogo del factor de empalme ISY1 (<i>S. cerevisiae</i>)
25	LIAS	Ácido lipoico sintetasa
26	HNRNPD	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea D
27	EXOC3	Componente 3 del complejo de exoquistes
28	NPM1	Nucleofosmina 1
29	CANX	Calnexina
30	NDUFA2	NADH: oxidoreductasa de ubiquinona, subunidad A2
31	PHACTR1	Regulador 1 de fosfatasa y actina
32	CSAD	Descarboxilasa de ácido cisteína sulfínico
33	RPL12	Proteína ribosomal L12
34	ZNF259	Dedo de zinc ZPR1
35	PWWP2B	Dominio PWWP 2B
36	SMNDC1	Dominio de la neurona motora de supervivencia 1
37	TAF10	Factor 10 asociado a la proteína de unión a la caja TATA
38	ADAM33	Dominio 33 de la metalopeptidasa ADAM
39	MRPS33	Proteína ribosómica mitocondrial S33
40	NUDCD1	Proteína 1 que contiene el dominio NudC
41	EIF4G2	Factor de inicio de la traducción eucarionte 4, gamma 2

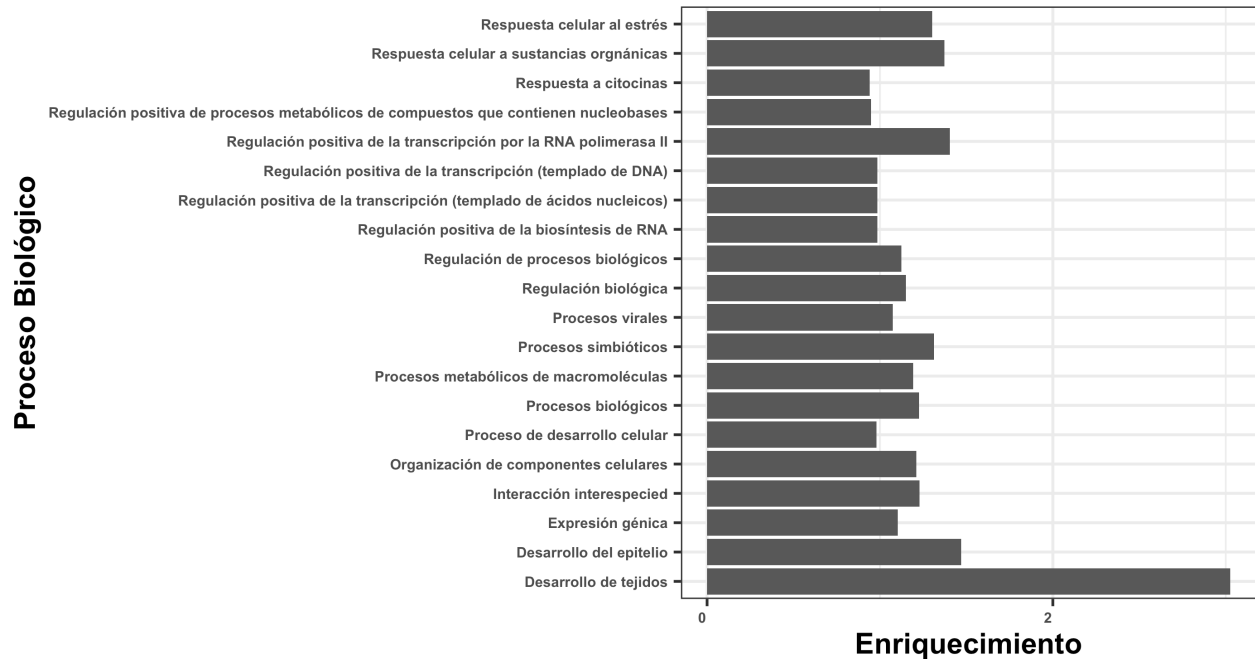
42	CFL1	Cofilina
43	PSEN1	Presenilina 1
44	AXL	Receptor AXL tirosin-cinasa
45	SLC25A3	Soluto de la familia acarreadora 25, miembro 3
46	ACTR6	Proteína 6 relacionada con la actina
47	ARF3	ADP Factor de ribosilación 3
48	GORAB	Golgin que interacúa con RAB6
49	SART3	Proteína de reciclaje U4/U6 asociada al factor 3 del spliceosoma
50	ANAPC5	Complejo de promoción de anafase, subunidad 5
51	TMEM214	Proteína transmembrana 214
52	KARS1	Lisil-tRNA sintetasa 1
53	CAMLG	Ligando modulador de calcio
54	RPL19	Proteína ribosomal L19
55	USP22	Ubiquitina específica de peptidasa 22
56	HNRNPM	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea M
57	CAPNS1	Subunidad pequeña de calpaina 1
58	STATH	Estaterina
59	AZI2	Proteína 2 inducida por 5-Azacidina
60	VAMP3	Proteína de membrana asociada a la vesícula 3
61	TRNT1	tRNA nucleotidil transferasa 1
62	FICD	Adenililtransferasa de dominio FIC
63	EIF1B	Factor de iniciación de la traducción eucariota 1B
64	PNRC1	Coactivador de receptor nuclear rico en prolina 1
65	CLDN18	Claudina 18
66	ANKLE2	Proteína que contiene repetición de anquirina y dominio LEM
67	CLDN10	Claudina 10
68	ASF1A	Chaperona de histona anti-silenciamiento 1A
69	BNIP3L	Proteína 3 similar a la proteía que interactúa con BCL2
70	SNX18	Nexina 18
71	SPCS3	Subunidad 3 del complejo peptidasa señal
72	EGR2	Proteína de respuesta de crecimiento temprano 2
73	MOB3B	Activador de quinasa MOB 3B
74	PLA2G12A	Fosfolipasa A2, grupo XIA
75	CCNDBP1	Proteína de unión 1 a ciclina D1

76	FAAH2	Hidrolasa amida de ácido grasos 2
77	ZNF226	Proteína de dedos de zinc 226
78	MYLK-AS1	RNA antisentido MYLK (no codificante para proteínas)
79	---	accn=NR_002944 class=lncRNA
80	---	accn=D32053 class=mRNAlike lncRNA
81	NOVA1-AS1	RNA antisentido NOVA1 (no codificante para proteínas)
82	---	linc-BTF3-5 chr5:+:72509773-72584666
83	LOC493754	Pseudogen del factor de intercambio de nucleótidos de guanina RAB

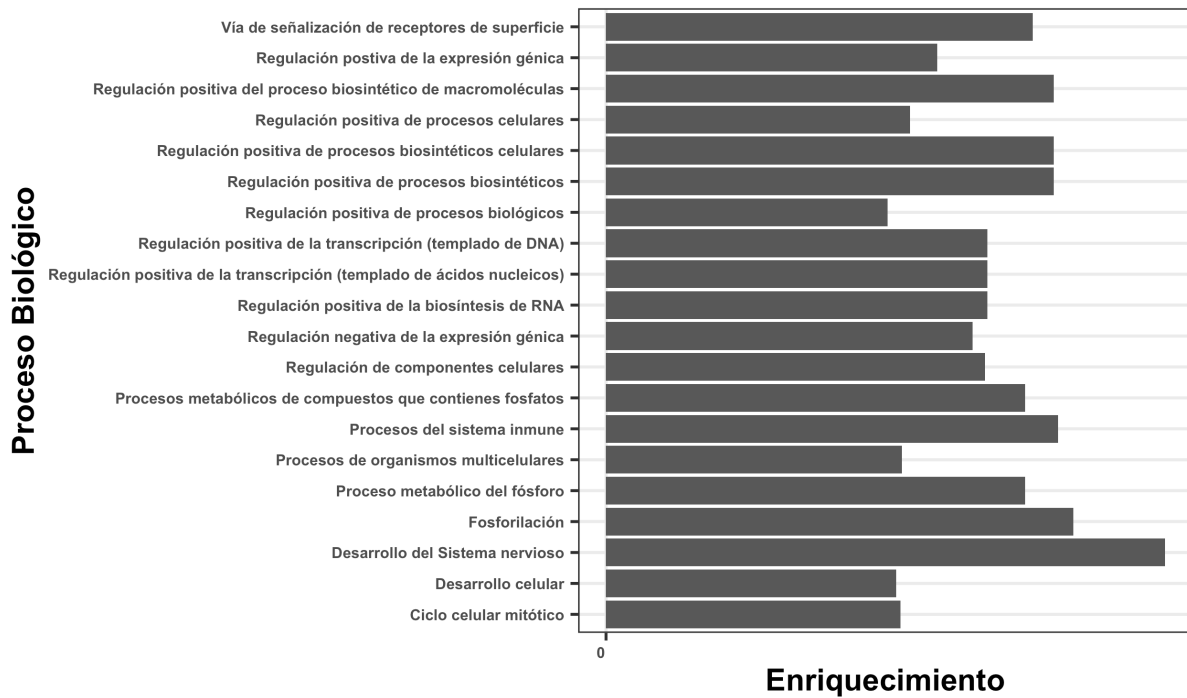
7.4.5 Análisis de enriquecimiento de vías con GO (Ontología génica)

del miR-137 y el miR-1303

Una vez identificados los mRNAs blanco de cada miRNA, se llevó a cabo un análisis GO (Ontología génica), para vislumbrar los procesos regulados por los blancos de los miRNAs estudiados (Figura 30). Los resultados mostraron que el proceso biológico más enriquecido para el miR-137 es el desarrollo de tejidos, seguido por el desarrollo de epitelio y la regulación positiva de la transcripción por la RNA polimerasa II (Figura 30A). En cambio, para el miR-1303 el desarrollo del sistema nervioso fue el proceso más enriquecido, seguido de procesos inmunes y fosforilación (Figura 30B).



A



B

Figura 30. Análisis de enriquecimiento de vías con GO. A) Análisis GO con los genes blanco del miR-137. **B)** Análisis GO GO con los genes blanco del miR-1303. Para cada uno de los miRNAs se muestran los procesos biológicos mayormente enriquecidos de acuerdo a los mRNAs blanco identificados. Datos analizados con el paquete *topGO* ().

7.4.6 Análisis de enriquecimiento de vías con KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) del miR-137 y el miR-1303

Además del análisis GO, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto), el cual proporciona información funcional (Tabla 19 y 20) Este análisis mostró, para el miR-137, varias vías involucradas en la migración e invasión celular, tales como moléculas de adhesión (CAMs), adhesión focal y uniones estrechas (Tabla 19). Mientras que para el miR-1303 se encontraron mayormente enriquecidos los procesos metabolismo de fármacos y otras enzimas, vías involucradas en cáncer, vías metabólicas, así como moléculas de adhesión, adhesión focal, uniones estrechas, entre otras (Tabla 20).

Tabla 19. Análisis de enriquecimiento de vías con KEGG de los mRNAs blanco del miR-137

No.	KEGG.ID	DESCRIPCIÓN
1	hsa03040	Spliceosoma
2	hsa03010	Ribosoma
3	hsa00232	Metabolismo de la cafeína
4	hsa00983	Metabolismo de fármacos - otras enzimas
5	hsa01100	Vías metabólicas
6	hsa00230	Metabolismo de las purinas
7	hsa05340	Inmunodeficiencia primaria
8	hsa04514	Moléculas de adhesión (CAMs)
9	hsa05412	Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho
10	hsa04010	Vía de señalización MAPK
11	hsa04012	Vía de señalización ErbB
12	hsa04062	Vía de señalización de quimiocinas
13	hsa04150	Vía de señalización mTOR
14	hsa04210	Apoptosis
15	hsa04370	Vía de señalización VEGF
16	hsa04380	Diferenciación de osteoclastos

17	hsa04510	Adhesión focal
18	hsa04530	Uniones estrechas
19	hsa04620	Vía de señalización de receptores tipo Toll
20	hsa04630	Vía de señalización Jak-STAT

Tabla 20. Análisis de enriquecimiento de vías con KEGG de los mRNAs blanco del miR-1303

No.	KEGG.ID	Descripción
1	hsa00983	Metabolismo de fármacos - otras enzimas
2	hsa05200	Vías involucradas en cáncer
3	hsa01100	Vías metabólicas
4	hsa00230	Metabolismo de purinas
5	hsa04640	Linaje celular hematopoyético
6	hsa04722	Diferenciación de osteoclastos
7	hsa04514	Moléculas de adhesión (CAMs)
8	hsa04370	Vía de señalización VEGF
9	hsa04210	Apoptosis
10	hsa04150	Vía de señalización mTOR
11	hsa04630	Vía de señalización Jak-STAT
12	hsa04010	Vía de señalización MAPK
13	hsa04912	Vía de señalización GnRH
14	hsa04620	Vía de señalización de receptores tipo toll
15	hsa04530	Uniones estrechas
16	hsa04722	Vía de señalización de neurotrofina
17	hsa04510	Adhesión focal
18	hsa04270	Contracción del músculo liso
19	hsa04660	Vía de señalización de receptores de células T
20	hsa04662	Vía de señalización de receptores de células B

Por último, se realizó un análisis de los mRNAs blanco del miR-137 para determinar su participación en la carcinogénesis y se encontró que la mayoría de ellos convergen en los procesos de invasión, migración y quimiorresistencia (Figura 30). Se observó que algunos de los mRNAs identificados para el miR-137, son

también blanco de regulación de otros miRNAs. Además hay evidencia de que YBX1 y KDM4 están validados como blancos directos del miR-137 en otros modelos (85,86).

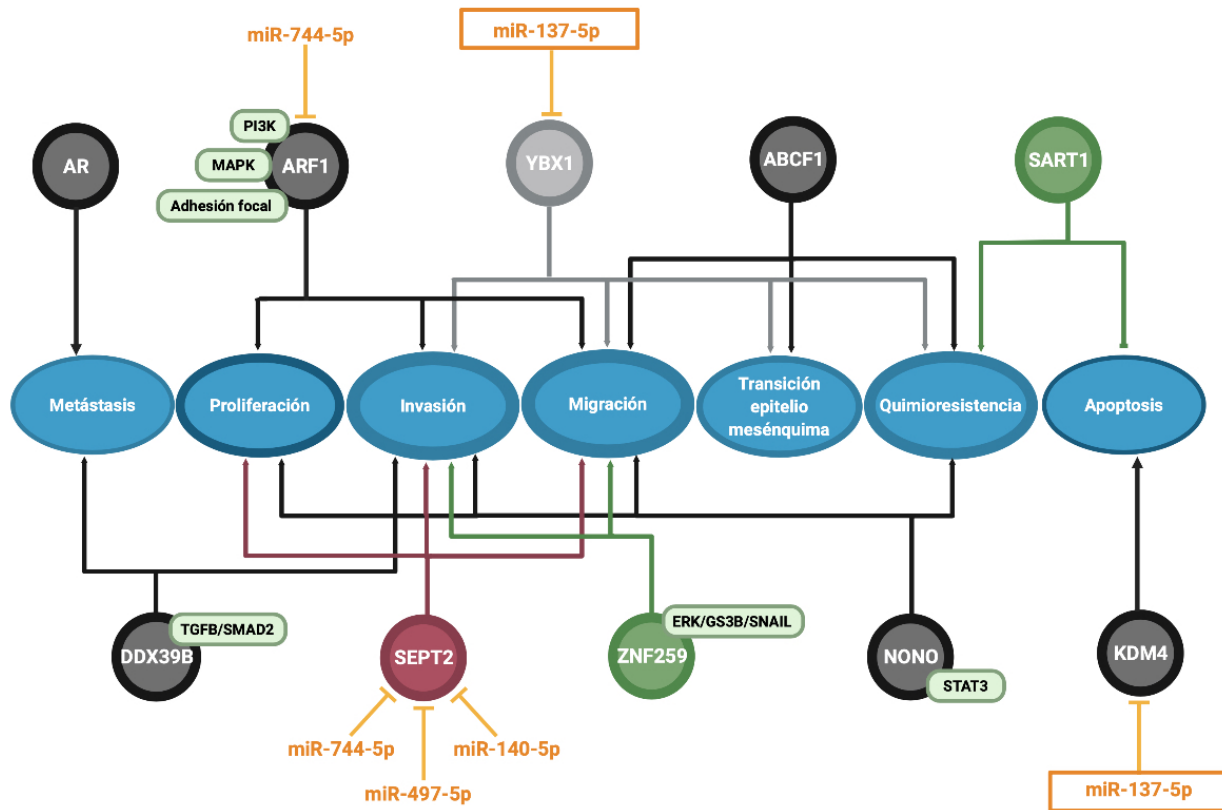


Figura 31. Esquema representativo de algunos blancos del miR-137 involucrados en la carcinogénesis. En la figura se muestran en círculos ejemplos de mRNAs blanco del miR-137, se encuentran coloreados de acuerdo con su fold change en orden descendente: rojo, verde, negro y gris. Se muestran otros miRNAs validados en otros estudios como reguladores de ciertos transcritos presentes en esta red. Algunos transcritos también tienen incluyen la vía a través de la cual regulan el proceso carcinogénico. En círculos turquesa se observan los procesos biológicos en los que convergen los blancos del miR-137.

8. DISCUSIÓN

Dentro del cuerpo humano, los genes funcionan en una complicada red de interacción y están regulados tanto temporal como espacialmente (87). Debido a este nivel de complejidad, el enfoque tradicional de estudiar gen por gen no es suficiente para establecer una visión global de lo que sucede en las células (87). Los miRNAs son moléculas que juegan un papel importante en la regulación génica, puesto que cada uno puede regular hasta 200 transcritos en una célula (6) por lo que identificar los blancos directos de un miRNA, en un tipo celular determinado, nos da un panorama de su función (6) y de las redes de interacción en las que está involucrado (56).

Estudios previos en nuestro laboratorio, realizados en la línea celular M231, mostraron que BIK se localiza en el núcleo de la línea celular M231 y que establece interacciones físicas con diversas regiones del genoma, entre ellas la región promotora del miR-137 (5), el cual ha sido descrito como supresor de tumores u oncogén, dependiendo el tipo celular (70,77). Con el propósito de conocer la participación del miR-137 en la oncogénesis de las células MDA-MB-231 en el presente estudio nos propusimos identificar experimentalmente los mRNA blanco del miR-137 por medio del sistema MirTrap.

Eficiencia de la transfección

Luego de la transfección de los plásmidos y los miRNAs, durante el ensayo MirTrap, se observó una reducción en el número de células en el cultivo. Esto pudo deberse a diferentes factores, por ejemplo, el estrés que generan los reactivos de

transfección o a la sobre-expresión de los miRNAs, en particular del miR-1303, con el cual se observó una mayor disminución en el número de células. La eficiencia de la transfección depende de la relación polímero-ácido nucleico, del pH del medio y de las condiciones de la membrana celular, por lo que la eficiencia varía dependiendo del tipo de célula (88). Nuestros resultados mostraron, de manera general, que los agentes de transfección del MirTrap son muy eficientes para la transfección de las células M231.

Identificación de los RNAs blanco del miR-137

Con el creciente uso de las tecnologías NGS (Secuenciación de Siguiete Generación), los microarreglos han dejado de utilizarse con la misma frecuencia, sin embargo, cuentan con una serie de ventajas que hacen de su uso una opción viable (87). Entre las ventajas con las que cuentan destacan: i) es un método de alto rendimiento en el que se pueden analizar miles de genes; ii) tiene un costo menor que las tecnologías de NGS iii) los tiempos de preparación de las muestras, hibridación y análisis de datos son menores, además de que teniendo los conocimientos adecuados se puede extraer la misma información que en los métodos de secuenciación (87). Los arreglos HTA 2.0 tienen 44699 genes y 22829 regiones no codificantes por lo que son una herramienta de análisis bastante robusta en cuanto a cobertura de transcritos.

El análisis de los datos mostró que el número de mRNAs encontrados con este análisis coincide con el número de blancos que un miRNA puede tener en una célula (6) y dos de ellos (KDM4 y YBX1) ya se han documentado como blancos validados del miR-137 (86,89), lo cual sustenta nuestro análisis. En otros estudios

utilizando la metodología MirTrap y secuenciación se han identificado entre 94 y 281 blancos para diferentes miRNAs, un intervalo de blancos similar al que se encontró en este trabajo (90).

De acuerdo con lo reportado, el análisis del sistema MirTrap mostró diversos mRNAs blanco tanto para el miRNA control (miR-1303) como para el miRNA de interés, el miR-137. Con base en la intensidad de la señal (Delta Rn; mínimo un cambio de 2 veces), los mRNAs que parecen blancos preferentes del miR-137 fueron EXOC3, SEPTIN2 y PWWP2B. Hay evidencia científica que muestra la participación de SEPT2 en el control de la migración e invasión celular, así como en la proliferación (91–95). La proteína SEPT2 (Septina 2), pertenece a la familia de las septinas (proteínas de unión a GTP del citoesqueleto) y se ha propuesto como un oncogén en varios tipos de cáncer; por ejemplo en hepatocarcinoma, cáncer de vías biliares, cáncer colorrectal y de mama(94). En la línea M231, se ha visto que la inhibición de su expresión disminuye la proliferación, migración e invasión (94,95). Además, para esta proteína se han descrito 3 miRNAs que se unen a ella y la regulan a la baja: miR-497-5p, miR-140-5p y miR-744-5p (94,95). En este trabajo, nuestros resultados muestran que el miR-137 es un miRNA que interacciona con SEPT2 y potencialmente regula su expresión en la línea M231. Sería interesante determinar si el restablecimiento de los niveles del miR-137 disminuyen la proliferación, migración e invasión celular de forma similar a lo que se observa cuando se restablece la expresión de SEPT2.

Los mRNAs YBX1 y KDM4 ya se han validado (mediante ensayos de gen reportero) como blancos del miR-137 y de particular interés resulta YBX1, debido a que en mesotelioma pleural maligno la expresión ectópica del miR-137 redujo la

proliferación, migración e invasión, al regular negativamente a YBX1 que está involucrada en la transición epitelio-mesénquima (89)

Si bien el miR-1303 no es el miRNA de interés, los resultados mostraron cosas muy interesantes. Primero, su expresión es muy alta en estas células y esto podría estar indicando una participación importante de este miRNA en la oncogénesis de las células M231. Los mRNAs que parecen blancos preferentes de este miRNA fueron CANX, FBXO34 y HNRNPD. Un estudio previo reportó al mRNA CLDN18 (Claudina 18) como blanco de este miRNA (96) . En células de cáncer gástrico se encontró una sobre-expresión del miR-1303 y una baja expresión de *CLDN18*, lo cual se asoció con la invasión y migración, mientras que se observó un aumento de *CDLN18* y una disminución de la proliferación, migración e invasión en células transfectadas con un inhibir del miR-1303 (96).

Nuestros resultados nos dan indicio de cuál podría ser la función del miR-137 y del miR-1303 en las células MDA-MB-231; todo parece indicar que estos miRNAs están controlando procesos oncogénicos tales como la migración e invasión de las células, quimiorresistencia y proliferación. No obstante, estudios funcionales son necesarios para demostrar esto.

El análisis de ontología génica (GO) recopiló información sobre los procesos biológicos, sin embargo, para analizar a nivel funcional la implicación de estos blancos en la carcinogénesis, se realizó también un análisis KEGG, el cual mostró las 20 vías funcionales con mayor enriquecimiento, entre las cuales se encuentran: la vía del ribosoma, del spliceosoma, de moléculas de adhesión, de adhesión focal, vía MAPK, apoptosis, de uniones estrechas y vía JAK/STAT (Tabla 19). Esto concuerda con los procesos mostrados en la Figura 33 en los que convergen los

blancos del miR-137, más enriquecidos. Por lo que los análisis sugieren que el miR-137 podría tener un papel importante en la regulación de la migración e invasión de la línea M231, así como en otros procesos tales como proliferación, apoptosis, transición epitelio mesénquima, quimiorresistencia y metástasis (Figura 32). En cuanto al miR-1303 los procesos mayormente enriquecidos en el análisis KEGG fueron: metabolismo de fármacos y otras enzimas, vías involucradas en cáncer, vías metabólicas, moléculas de adhesión, adhesión focal, uniones estrechas, entre otras (Tabla 20).

RNAs no codificantes blanco del miR-137

Por último, se ha informado que los miRNAs pueden unirse a pseudogenes y lncRNAs (11,12) Se ha informado que los pseudogenes poseen sitios de unión para microRNAs, lo cual permite que los pseudogenes actúen como competidores endógenos de RNA (ceRNAs) evitando que los miRNAs se unan a sus blancos y ejerzan sus funciones (87). En particular, las interacciones lncRNA-miRNA forman redes de regulación altamente complejas, puesto que puede implicar la regulación negativa del lncRNA por el miRNA o la regulación del miRNA por el lncRNA (97). Por el contrario existen estudios en donde se ha demostrado que algunos miRNAs regulan la expresión de los lncRNAs. Por ejemplo, el miR-141 regula al lncRNA HOTAIR (12) mientras que el lncRNA nuclear, MALAT1 es regulado negativamente por el miR-9, (44).

Existen múltiples trabajos que han demostrado que el miR-137 puede ser regulado negativamente por lncRNAs. Por ejemplo, el lncRNA XIST (Transcrito

específico de inactivación del cromosoma X) está regulado positivamente y actúa como oncogén en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En este cáncer, se observó que XIST actúa como una esponja molecular para el miR-137, lo cual disminuye los niveles disponibles de éste e impide que se una a sus blancos (98). Otros lncRNAs que actúan como esponjas de este miRNA son DSCAM-AS1 en cáncer de mama, HOTTIP (RNA antisentido de la transcripción terminal HOXA) en cáncer de páncreas, y OIP5-AS1 (ARN 1 antisentido de la proteína 5 que interactúa con Opa) y NCK-AS1 (RNA 1 antisentido de la proteína adaptadora NCK) en osteosarcoma (99–102). Estos ejemplos indican que los niveles celulares y/o la disponibilidad del miR-137 pueden verse afectados debido a los niveles de expresión y/o disponibilidad de ciertos lncRNAs que actúan como esponjas de miRNAs, lo cual muestra otro nivel de regulación al que puede estar sometido este miRNA. De acuerdo con lo anterior, y a lo encontrado en este trabajo, la interacción del miR-137 con lncRNAs podría relacionarse con una actividad de esponja molecular, para la regulación de los niveles celulares del miR-137 (Figura 32); no obstante, es necesario identificar el impacto biológico que tiene la interacción de este miRNA con los ncRNAs identificados en este trabajo.

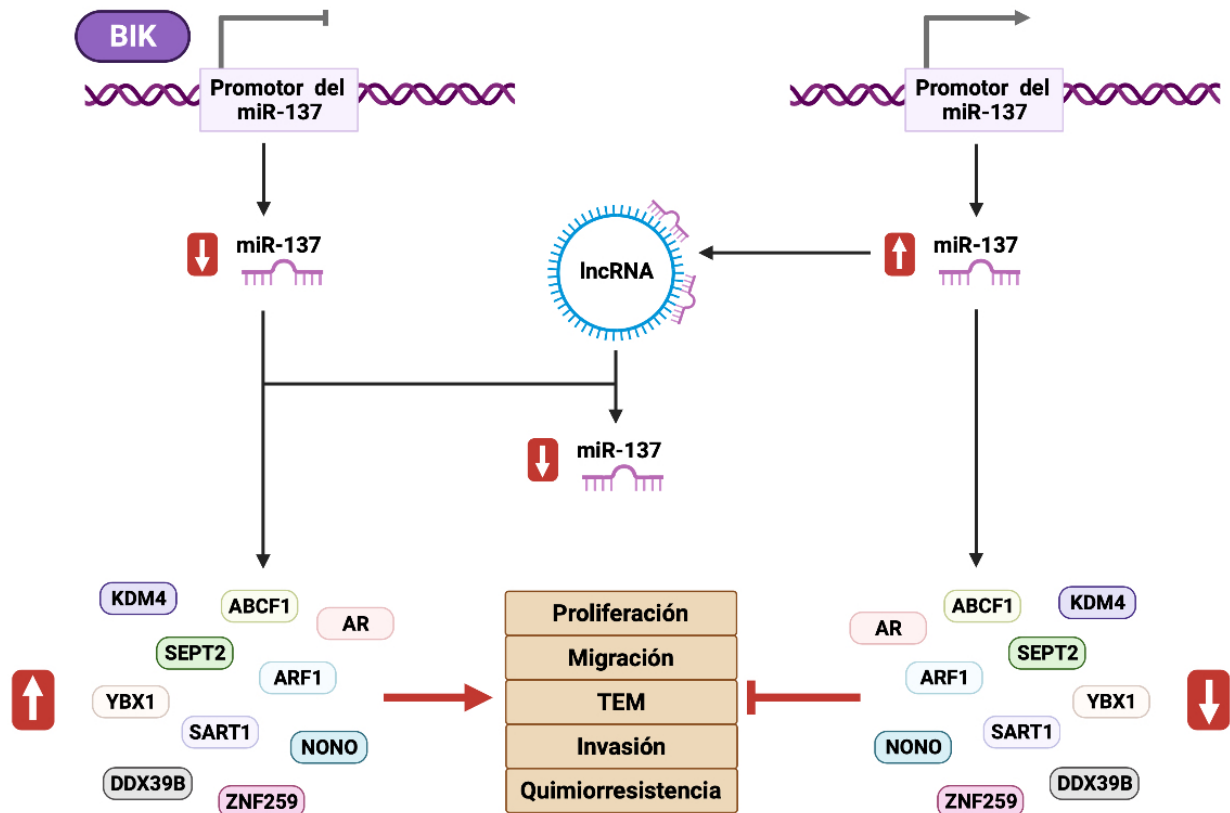


Figura 32. Esquema general de algunos elementos de la red de regulación del miR-137 en la línea M231. En la figura se resumen los hallazgos del presente trabajo. Del lado izquierdo, se observa que cuando está presente BIK, en la región promotora del miR-137, los niveles de este miRNA se encuentran a la baja y por tanto los niveles celulares de sus mRNAs blanco incrementan y esto promueve las vías de proliferación, migración, TEM (transición epitelio-mesénquima), invasión y quimiorresistencia. Por el contrario, En el lado derecho se observa que en ausencia de BIK los niveles del miR-137 se restablecen y la expresión de sus mRNAs blanco disminuye, lo que impide la activación de vías oncogénicas. Además, la interacción del miR-137 con ciertos lncRNAs también disminuir los niveles disponibles de este miRNA.

9. CONCLUSIONES

Nuestros resultados parecen indicar que BIK regula la expresión del miR-137 en las células MDA-MB-231. La demostración previa, de la interacción física de BIK con la región promotora de este miRNA, sugiere fuertemente que esta regulación es de manera directa.

La identificación de los blancos del miR-137 indica que muy probablemente este miRNA está regulando la invasión, migración y proliferación de las células MDA-MB-231, así como otros procesos oncogénicos. Con base en todo lo anterior, proponemos un modelo en el que BIK está bloqueando la expresión del miR-137 y esto resulta en un incremento en los niveles de expresión de ciertos mRNAs blanco que participan en diferentes procesos oncogénicos. En contraste, la disminución de los niveles de BIK restablece los niveles del miR-137 y en consecuencia, los niveles de los mRNAs blanco de este miRNA disminuyen y se atenúa el fenotipo maligno de las células MDA-MB-231 (Figura 32). Asimismo, el miR-137 parece estar controlando la expresión de varios lncRNAs y otros ncRNAs, por lo que el efecto de este miRNA se potenciaría aun más. Nuestra investigación aporta conocimiento relevante sobre la participación del miR-137 en el fenotipo maligno de las células derivadas de cáncer de mama triple negativo

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sistema Nacional de Informacion en Salud. Principales causas de mortalidad en mujeres. INEGI [Internet]. 2014;2050. Available from: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
2. Harbeck N, Penault- Llorca F, Cortes J, Gnat M, Cardoso F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(66):1–31.
3. Shi Y, Ye P, Long X. Differential Expression Profiles of the Transcriptome in Breast Cancer Cell Lines Revealed by Next Generation Sequencing. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):804–16.
4. Cahall CF, Lilly JL, Hirschowitz EA, Berron BJ. A Quantitative Perspective on Surface Marker Selection for the Isolation of Functional Tumor Cells. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9(Suppl 1):1–11.
5. Ruiz Esparza-Garrido R, Ayala K, Rodríguez-Corona JM, Velázquez-Flores MÁ. Accurate Identification of BIK Binding Sites at the MDA-MB-231 Cell Genome by Human Tiling Arrays. *Cancer Biol Ther Oncol.* 2018;2(1):1–10.
6. Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell.* 2018;173:20–51.
7. Kim DH, Sætrom P, Snøve O, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *PNAS.* 2008;105(42):16230–16235.
8. Place RF, Li L-C, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *PNAS.* 2008;105(5):1608–13.
9. Hansen TB, Venø MT, Jensen TI, Schaefer A, Damgaard CK, Kjems J. Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun.* 2016;7(May):1–10.
10. Stagsted LVW, Daugaard I, Hansen TB. The agotrons: Gene regulators or Argonaute protectors? *BioEssays.* 2017;39(4):1–6.
11. Leucci E, Patella F, Waage J, Holmstrøm K, Lindow M, Porse B, et al. MicroRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci Rep.* 2013;3:1–6.
12. Chiyomaru T, Fukuhara S, Saini S, Majid S, Deng G, Shahryari V, et al. Long non-coding RNA hotair is targeted and regulated by MIR-141 in human cancer cells. *J Biol Chem.* 2014;289(18):12550–65.
13. Zhao Y, Li Y, Lou G, Zhao L, Xu Z, Zhang Y, et al. MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer

- cells. PLoS One. 2012;7(6).
14. Cervantes-Ayala AV. Caracterización del miR-137 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. 2019.
 15. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;215(13):1–7.
 16. Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, et al. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS One.* 2017;12(1):1–17.
 17. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5).
 18. Perou CM. Molecular stratification of Triple negative breast cancer. *The on.* 2010;15(suppl 5):39–48.
 19. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer.* 2017;8(16):3131–41.
 20. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006;10(6):515–27.
 21. Cailleau R, Young R, M O, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53:661–74.
 22. Wei Z, Shan Z, Shaikh ZA. Epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells treated with cadmium and the role of Snail. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;344:46–55.
 23. Maycotte P, Gearheart CM, Barnard R, Aryal S, Levy JMM, Fosmire SP, et al. STAT3-Mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer Res.* 2014;74(9):2579–90.
 24. Ruiz Esparza-Garrido R, Torres-Márquez ME, Viedma-Rodríguez R, Velázquez-Wong AC, Salamanca-Gómez F, Rosas-Vargas H, et al. Breast cancer cell line MDA-MB-231 miRNA profile expression after BIK interference: BIK involvement in autophagy. *Tumor Biol.* 2016;37(5):6749–59.
 25. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008;27(Suppl 1):1–31.
 26. Viedma-Rodríguez R, Baiza-Gutman LA, García-Carranća A, Moreno-Fierros L, Salamanca-Gómez F, Arenas-Aranda D. Suppression of the death gene BIK is a critical factor for resistance to tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Oncol.*

- 2013;43(6):1777–86.
27. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009;122(4):437–41.
 28. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK-the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene.* 2008;27(Suppl 1(1)):S20–S29.
 29. Pandya V, Glubrecht D, Vos L, Hanson J, Mackey J, Hugh J, et al. The pro-apoptotic paradox: the BH3-only protein Bcl-2 interacting killer (Bik) is prognostic for unfavorable outcomes in breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(22).
 30. Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosom Cancer.* 2003;38(1):91–6.
 31. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, et al. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ.* 2006;13(4):619–27.
 32. García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Peñaloza R, et al. A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer.* 2005;5(93):1–11.
 33. Martínez-Damas MG. Determinación de la expresión proteica de BIK en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7. No Title. Instituto Politécnico Nacional; 2012.
 34. Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science (80-).* 2001;291(5507):1304–51.
 35. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med.* 2012;10(1):1.
 36. Malek E, Jagannathan S, Driscoll JJ. Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer. *Oncotarget.* 2014;5(18):8027–38.
 37. Vincent K, Pichler M, Lee GW, Ling H. MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15(8):14475–91.
 38. Rana TM. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):23–36.
 39. Zitzer NC, Garzon R, Ranganathan P. Toll-Like Receptor Stimulation by MicroRNAs in Acute Graft-vs . -Host Disease. *Front Immunol.* 2018;9:1–7.

40. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(7):3353–64.
41. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *47.* 2019. p. 155–62.
42. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell.* 2013;153(3):654–65.
43. Wu Y, Zhang L, Wang Y, Li H, Ren X, Wei F, et al. Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(10):9531–8.
44. Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, Zhang X, Bai C, Xu M, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death Differ.* 2013;20(11):1558–68.
45. Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY, Chen X. Nuclear microRNAs and their unconventional role in regulating non-coding RNAs. *Protein Cell.* 2013;4(5):325–30.
46. Mott JL, Mohr AM. Overview of microRNA biology. 2015;35(1):3–11.
47. Dugaard I, Hansen TB. Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends Genet.* 2017;33(3):208–19.
48. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10).
49. Chung W, Agius P, Westholm JO, Chen M, Okamura K, Robine N, et al. Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. 2011;286–300.
50. Ruiz R, Garrido E, Velázquez-Flores MÁ. Nuevos e inesperados mecanismos de biogénesis y acción de los miRNAs. *Rev Educ Bioquímica.* 2016;35(3):55–70.
51. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1097–101.
52. Mahmoudi E, Cairns MJ. MiR-137: an important player in neural development and neoplastic transformation. *Mol Psychiatry.* 2017;22(1):44–55.
53. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The roles of microRNAs in breast cancer. *Cancers (Basel).* 2015;7(2):598–616.
54. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803(11):1231–43.
55. Zhang Y, Yun Z, Gong L, Qu H, Duan X, Jiang Y, et al. Comparison of miRNA Evolution and Function in Plants and Animals. *MicroRNA.* 2018;7(1):4–10.

56. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421–33.
57. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 2010;79(1):351–79.
58. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
59. Warburton A, Breen G, Rujescu D, Bubb VJ, Quinn JP. Characterization of a REST-regulated internal promoter in the schizophrenia genome-wide associated gene MIR137. *Schizophr Bull.* 2015;41(3):698–707.
60. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 2011;278(10):1598–609.
61. Guan Y, Guan X, An H, Baihetiya A, Wang W, Shao W, et al. Epigenetic silencing of miR-137 induces resistance to bicalutamide by targeting TRIM24 in prostate cancer cells. *Am J Transl Res.* 2019;11(5):3226–37.
62. Min L, Wang F, Hu S, Chen Y, Yang J, Liang S, et al. Aberrant microRNA-137 promoter methylation is associated with lymph node metastasis and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(5):7744–50.
63. Steponaitiene R, Kupcinskis J, Langner C, Balaguer F, Venclauskas L, Pauzas H, et al. Epigenetic silencing of miR-137 is a frequent event in gastric carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2016;55(4):376–86.
64. Zhang W, Shan JCT, Wang IAL, Huang TH, Rader JS, Sheng X, et al. miR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation. 2018;
65. Smrt RD, Szulwach KE, Pfeiffer RL, Li X, Guo W, Pathania M, et al. MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase Mind Bomb-1. *Mind.* 2011;28(6):1060–70.
66. Yin J, Lin J, Luo X, Chen Y, Li Z, Ma G, et al. MiR-137: A new player in schizophrenia. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):3262–71.
67. Chen R, Zhang Y, Zhang C, Wu H, Yang S. miR-137 inhibits the proliferation of human non-small cell lung cancer cells by targeting SRC3. *Oncol Lett.* 2017;13(5):3905–11.
68. Du Y, Chen Y, Wang F, Gu L. miR-137 plays tumor suppressor roles in gastric cancer cell lines by targeting KLF12 and MYO1C. *Tumour Biol.* 2016;37(10):13557–69.

69. Feng Q, Wu Q, Liu X, Xiong Y, Li H. MicroRNA-137 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):3167–74.
70. Li D, Shan W, Fang Y, Wang P, Li J. miR-137 acts as a tumor suppressor via inhibiting CXCL12 in human glioblastoma. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(60):101262–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29254162><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5731872><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29254162><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5731872>
71. Luo C, Tetteh PW, Merz PR, Dickes E, Abukiwan A, Hotz-Wagenblatt A, et al. miR-137 Inhibits the Invasion of Melanoma Cells through Downregulation of Multiple Oncogenic Target Genes. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):768–75.
72. Luo Y, Li X, Dong J, Sun W. microRNA-137 is downregulated in thyroid cancer and inhibits proliferation and invasion by targeting EGFR. *Tumor Biol*. 2016;37(6):7749–55.
73. Tamim S, Vo DT, Uren PJ, Qiao M, Bindewald E, Kasprzak WK, et al. Genomic analyses reveal broad impact of miR-137 on genes associated with malignant transformation and neuronal differentiation in glioblastoma cells. *PLoS One*. 2014;9(1).
74. Li H, Li Y, Li Y, Shi X, Chen H. Circulating microRNA-137 is a potential biomarker for human glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:3599–604.
75. Chang X, Zhang H, Lian S, Zhu W. miR-137 suppresses tumor growth of malignant melanoma by targeting aurora kinase A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;475(3):251–6.
76. Li X, Chen W, Zeng W, Wan C, Duan S, Jiang S. microRNA-137 promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the regulation of XIAP. *Br J Cancer*. 2017;116(1):66–76.
77. Xiu Y, Liu Z, Xia S, Jin C, Yin H, Zhao W, et al. MicroRNA-137 upregulation increases bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting PAQR3. *PLoS One*. 2014;9(10):1–7.
78. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
79. MacDonald J. pd.hta.2.0: Platform Design Info for Affymetrix HTA-2_0. R package

version 3.12.2. 2017.

80. Carvalho B, RA I. A Framework for Oligonucleotide Microarray Preprocessing. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2363–7.
81. Alexa A RJ. topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.42.0. 2020.
82. Luo, Weijun, Friedman, Michael, Shedden, Kerby, et al. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(161).
83. Luo, Weijun, Brouwer, Cory. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*. 2013;29(14).
84. Eschrich S, Hoerter A, Bloom G, Fenstermacher D. Tissue-specific RMA models to incrementally normalize Affymetrix GeneChip data. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2008;2008:2419–12.
85. Guo Y, Pang Y, Gao X, Zhao M, Zhang X, Zhang H, et al. MicroRNA-137 chemosensitizes colon cancer cells to the chemotherapeutic drug oxaliplatin (OXA) by targeting YBX1. *Cancer Biomarkers*. 2017;18(1):1–9.
86. Nilsson EM, Laursen KB, Whitchurch J, McWilliam A, Ødum N, Persson JL, et al. MIR137 is an androgen regulated repressor of an extended network of transcriptional coregulators. *Oncotarget*. 2015;6(34):35710–25.
87. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform*. 2019;20(5):1836–52.
88. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(8):3173–8.
89. Johnson TG, Schelch K, Cheng YY, Williams M, Sarun KH, Kirschner MB, et al. Dysregulated Expression of the MicroRNA miR-137 and Its Target YBX1 Contribute to the Invasive Characteristics of Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017;13(2):258–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.10.016>
90. Cambronne XA, Shen R, Auer PL, Goodman RH. Capturing microRNA targets using an RNA-induced silencing complex (RISC)-trap approach. *PNAS*. 2012;109(50):20473–20478.
91. Yu W, Ding AEX, Chen AEF, Liu M, Shen AES, Gu AEX, et al. The phosphorylation of SEPT2 on Ser218 by casein kinase 2 is important to hepatoma carcinoma cell proliferation. *Mol Cell Biochem*. 2009;325:61–7.
92. Yu J, Zhang W, Tang H, Qian H, Yang J. Septin 2 accelerates the progression of

- biliary tract cancer and is negatively regulated by mir-140-5p. *Gene* [Internet]. 2016;589(1):20–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.05.005>
93. Zhang W, Liao K, Liu D. MicroRNA-744-5p is downregulated in colorectal cancer and targets SEPT2 to suppress the malignant phenotype. *Mol Med Rep*. 2021;23(1):1–9.
 94. Zhang N, Liu L, Fan N, Zhang Q, Wang W, Zheng M. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK / ERK activation. *Oncotarget*. 2016;7(38):61587–600.
 95. Cai B, Wang X, Bu Q, Li P, Xue Q, Zhang J, et al. LncRNA AFAP1-AS1 Knockdown Represses Cell Proliferation, Migration, and Induced Apoptosis in Breast Cancer by Downregulating SEPT2 Via Sponging miR-497-5p . *Cancer Biother Radiopharm*. 2020;00(00):1–11.
 96. Zhang SJ, Feng JF, Wang L, Guo W, Du YW, Ming L, et al. miR-1303 targets claudin-18 gene to modulate proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Dig Dis Sci*. 2014;59(8):1754–63.
 97. Yamamura S, Imai-Sumida M, Tanaka Y, Dahiya R. Interaction and cross-talk between non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(3):467–84.
 98. Jiang H, Zhang H, Hu X, Li W. Knockdown of long non-coding RNA XIST inhibits cell viability and invasion by regulating miR-137/PXN axis in non-small cell lung cancer. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;111:623–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.022>
 99. Ma Y, Bu D, Long J, Chai W, Dong J. LncRNA DSCAM-AS1 acts as a sponge of miR-137 to enhance Tamoxifen resistance in breast cancer. *J Cell Physiol*. 2018;(1):15.
 100. Yin F, Zhang Q, Dong Z, Hu J, Ma Z. LncRNA HOTTIP Participates in Cisplatin Resistance of Tumor Cells by Regulating miR-137 Expression in Pancreatic Cancer. *Onco Targets Ther*. 2020;13:2689–99.
 101. Sun X, Tian C, Zhang H, Han K, Zhou M, Gan Z, et al. Long noncoding RNA OIP5-AS1 mediates resistance to doxorubicin by regulating miR-137-3p / PTN axis in osteosarcoma. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020;128(110201). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110201>
 102. Cheng Y, Shen X, Zheng M, Zou G, Shen Y. Knockdown Of lncRNA NCK-AS1 Regulates Cisplatin Resistance Through Modulating miR-137 In Osteosarcoma Cells. *Onco Targets Ther*. 2019;12:11057–68.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Ensayo MirTrap

Este sistema permite la expresión de una mutante de la proteína TNRC6, subunidad del complejo RISC, lo que hace posible que el miRNA de interés se una a sus mRNAs blanco pero restringe cualquier otro proceso (90). La etiqueta DYKDDDDK en la subunidad mutante permite la captura e inmunoprecipitación del complejo RISC que contiene el complejo miRNA-mRNA (Figura 33).

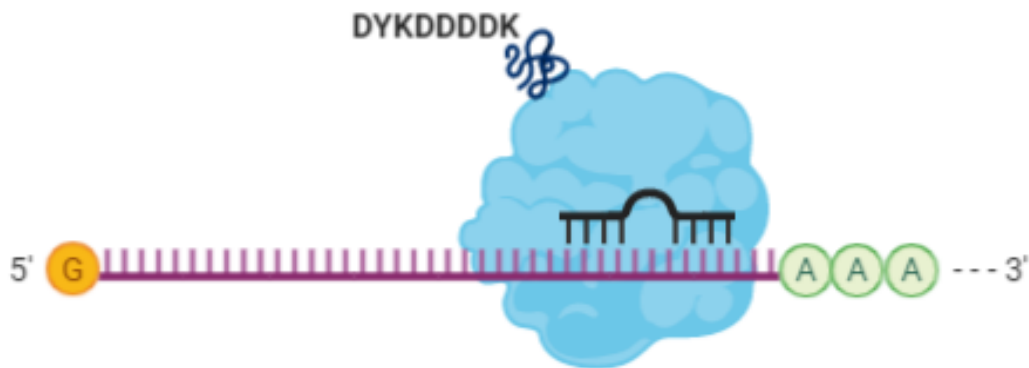


Figura 33. Esquema general del fundamento del ensayo MirTrap. Se representa a la proteína mutada TNRC6 (azul) con la etiqueta DYKDDDDK que permite la posterior inmunoprecipitación del complejo RISC/miRNA/mRNA.

Este sistema está compuesto de dos plásmidos, uno control (Figura 34) que expresa las proteínas GFP (Proteína verde fluorescente) y DsRed (Proteína roja fluorescente) para verificar la eficiencia de transfección y un plásmido que expresa la proteína TNCR6 mutada (Figura 35).

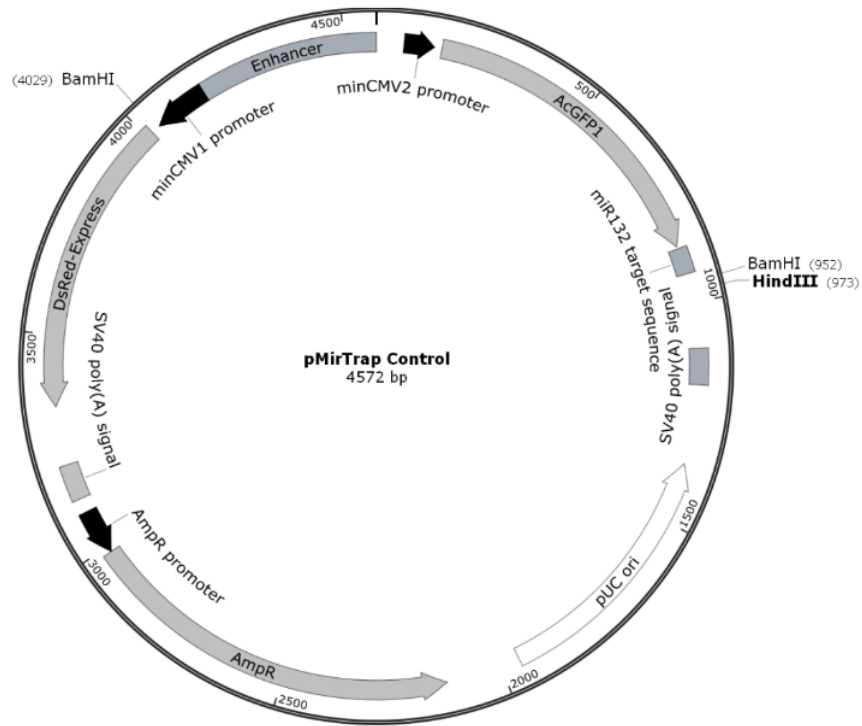


Figura 34. Vector pMirTrap Control

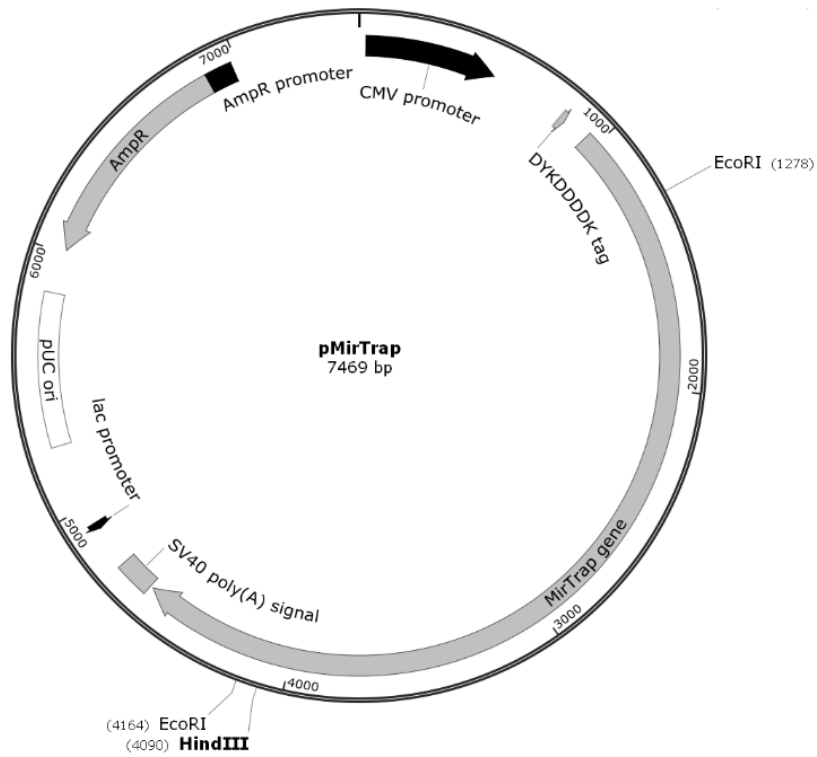


Figura 35. Vector pMirTrap

ANEXO 2. Evaluación de la eficiencia de transfección

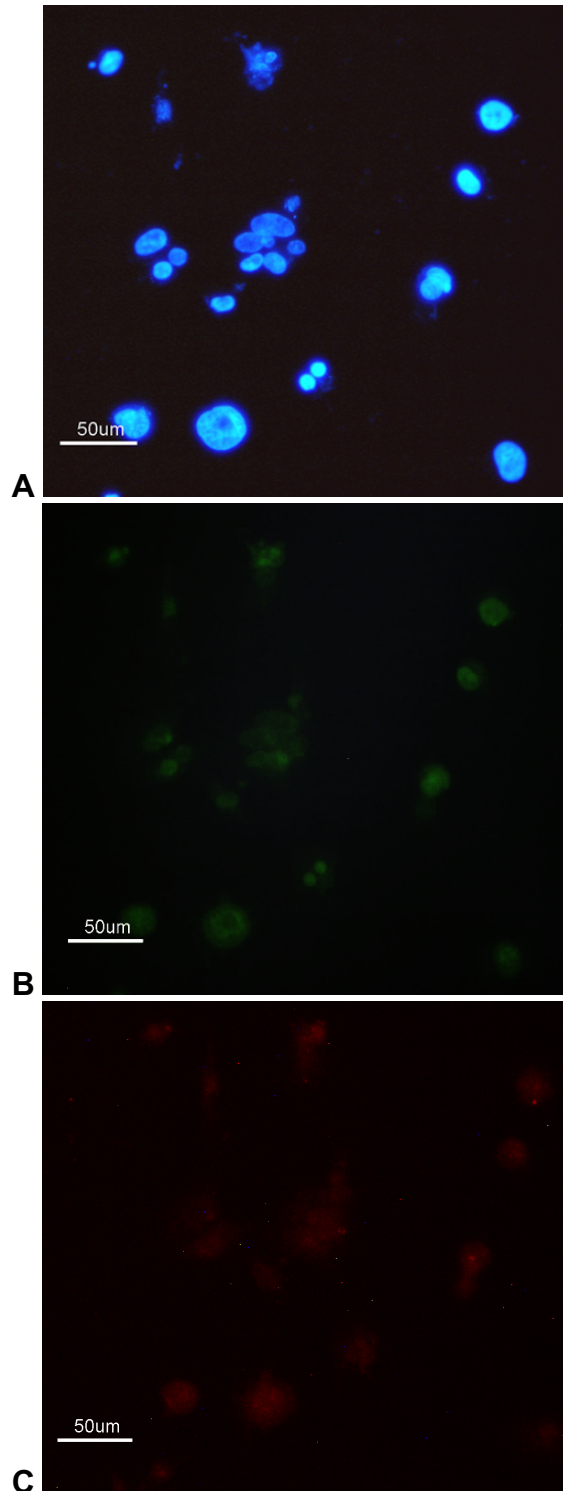


Figura 36. Imágenes de fluorescencia de las células M231 después de la transfección del vector Control. A) Células incubadas con DAPI, en donde se observan los núcleos en color azul. B) Proteína GFP. C) Proteína DsRed. Imágenes de fluorescencia tomadas en un microscopio Nikon Alphaphot Ys