



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Identificación de MicroRNAs
Desregulados en Células Troncales
Cancerosas

T E S I S

que presenta

QFB KAREN NAYELI CHAPARRO PULIDO

como requisito para obtener el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en
Biotecnología de Salud

Directores de Tesis:

Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina

Dr. Mario César López Camarillo

El proyecto de investigación titulado **Identificación de miRNAs Desregulados en Células Troncales Cancerosas**, se llevó a cabo en los laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en el laboratorio de posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En el presente proyecto participaron como directores de tesis la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina (FCQB-UAS) y el Dr. Mario César López Camarillo (UACM, México) y como asesores los Dres. Rosalío Ramos Payán y José Geovanni Romero Quintana (FCQB UAS).

Agradecimientos

A la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina por su apoyo, asesoría, comprensión y confianza.

Al Dr. César López Camarillo por la oportunidad de trabajar en este proyecto.

Al Dr. Rosalío Ramos Payán por permitirme una vez más formar parte de su equipo de trabajo pero sobre todo por la paciencia durante este periodo que no fue fácil.

Al Dr. José Giovanni Romero Quintana por ser un gran asesor, pero sobre todo por su amistad y apoyo incondicional.

A todos mis compañeros de laboratorio Mariana, Erik, Raquel, Geraldine, Ruy, Germán, Dra. Erika, Dr. Eduardo, Carlos, Fernando y Marimar mil gracias, son una parte importante de este proyecto.

A los compañeros del laboratorio 2 del posgrado en Ciencias Genómicas, gracias por su apoyo.

A mi familia por su apoyo en todo momento, pero sobre todo por siempre ser el pilar que me sostiene y me impulsa a seguir, los adoro y gracias infinitas por estar siempre conmigo.

A mis amigos que siempre están conmigo cuando los necesito.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por permitirme fortalecer mi formación académica.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	lx
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
A. CÁNCER	5
B. ONCOGENESIS	6
1. Inicio	7
1. Promoción P	7
2. Progresión	8
C. METÁSTASIS	9
D. ANATOMIA DE LA MAMA	10
E. CÁNCER DE MAMA	14
F. CLASIFICACION DELCANCER DE MAMA	14
G. EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER	15
1. Epidemiología del cáncer de mama en el mundo	16
2. Epidemiología del cáncer de mama en México	16
H. FACTORES DE RIEGO EN CÁNCER DE MAMA	25
I. TRATAMIENTO	26
J. CÉLULAS TRONCALES	29
K. CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS	30

1. Marcadores moleculares en células troncales carcinogénicas	36
L. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN AFECTADAS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS	39
M. MiRNAS	40
1. Biogénesis de los miRNAs	41
1. Función	43
N. REGULACIÓN DE miRNAs	43
O. miRNAs Y CÁNCER	44
P. miRNAs COMO ONCOGENES Y SUPRESORES DE TUMOR	44
Q. ANTECEDENTES	47
IV. JUSTIFICACIÓN	51
V. HIPÓTESIS	52
VI. OBJETIVOS	53
A. OBJETIVO GENERAL	53
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	54
A. CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA MCF-7 Y CÉLULAS CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	54
B. AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES A PARTIR DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7	54
1. Citometría de flujo y clasificación celular	55
C. EXTRACCIÓN DE ARN DE LA SUBPOBLACIÓN MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-low} Y MCF-7 PARENTAL	55
D. CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN TOTAL PURIFICADO	56

E. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDAD	57
1. Síntesis de cDNA	57
2. Cuantificación de la expresión de los genes de pluripotencialidad	57
3. Análisis de la expresión proteínica de genes específicos de pluripotencialidad	58
F. ANÁLISIS DEL MICRORNAOMA	60
1. Transcripción reversa (RT) de miRNAs	60
2. Preamplificación del producto de RT	60
3. Perfiles de expresión de miRNAs	61
4. Análisis estadístico	61
G. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	62
H. TRANSFECCIÓN DEL PRECURSOR DEL miR-583	62
I. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	63
1. Extracción de proteínas de células transfectadas con el pre-miR-583	63
J. ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN	63
K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	65
B. MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDAD EN CÉLULAS MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	69
C. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MIRNAS EN CÉLULAS MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} Y CÉLULAS MCF-7	75
D. BLANCOS PREDICHOS Y VALIDADOS DE LOS MIRNAS	78

DEL PERFIL DE EXPRESIÓN	
1. Selección de un miRNA para su estudio funcional	81
E. MIR-583 SE ENCUENTRA APAGADO EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 DE CÁNCER DE MAMA	86
F. LA EXPRESIÓN DEL MIR-583 INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GSK3B	90
IX. CONCLUSIONES	92
X. BIBLIOGRAFÍA	93
XI. ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Anatomía de la glándula mamaria	13
2	Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial en cada género	20
3	Incidencia y prevalencia de los distintos tipos de cáncer en ambos sexos a nivel mundial	21
4	Tasa de mortalidad en mujeres mexicanas por cáncer cervicouterino y cáncer de mama	23
5	Tasa estandarizada de mortalidad por cáncer de mama en las regiones geográficas de México	24
6	Evolución de una masa tumoral	32
7	Origen de las células troncales de cáncer de mama	34
8	Implicación de las células madre en el desarrollo mamario y la tumorigénesis de mama	35
9	Biogénesis de miRNAs	46
10	Análisis de puntos en una escala lineal de la línea celular MCF-7	67
11	Cultivo celular de la línea MCF-7 de cáncer de mama y células troncales MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	68
12	Cultivo celular de la línea MCF-7 de cáncer de mama y células troncales MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Marcadores comúnmente usados para identificar células troncales cancerosas de mama	38
2	Blancos predichos y validados de los miRNAs modulados en células MCF-7	80
3	miRNAs desregulados en células MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} analizados en cáncer	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	MicroRNAs modulados en la subpoblación de células troncales MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ^{-low} analizados por TLDAs	77
2	Genes modulados por el miR-583 en células MCF-7 que participan en mantener el fenotipo troncal	84
3	Análisis estadístico de la expresión del miR-583	89

I. RESUMEN

El cáncer o carcinoma de mama, es una neoplasia maligna que tiene su origen en la proliferación acelerada e incontrolada de las células epiteliales de los conductos glandulares o de lobulillos mamarios. Uno de los tópicos más interesantes en relación al cáncer son las células troncales cancerosas (CSCs). Para poder identificar estas células es necesario el uso de marcadores de superficie específicos tales como ALDH1⁺ y CD44⁺/CD24⁻, además de aquellos que permiten identificar el número de vías de señalización de células troncales normales que pueden estar operando en CSCs. Por lo tanto puede haber una desregulación en los genes que modulan estas vías y provocar que haya una actividad de las células troncales normales a cancerosas, esto puede ser regulado mediante microRNAs (miRNAs), éstos son una familia de pequeños ARNs monocatenarios no codificantes de 21-25 nucleótidos, que regulan la expresión génica al inhibir la traducción o inducir la degradación de los ARNs mensajeros (ARNm) blanco. La asociación entre la expresión de miRNAs y el cáncer fue más evidente al determinar que un gran número de genes que codifican para miRNAs están en regiones que comúnmente sufren alteraciones cromosómicas en un proceso cancerígeno. En el presente trabajo analizamos el perfil de expresión del microRNAoma (667 miRNAs) de una subpoblación de células troncales de la línea celular MCF-7 (CD44⁺/CD24^{-low}) de cáncer mama y el análisis funcional del miR-583 desregulado en células MCF-7 troncales y parentales, se analizó como gen blanco a GSK3 β , del cual se modificó la expresión de la proteína una vez restaurada la expresión del miRNA, por lo cual este miRNA podría estar implicado en la resistencia al tratamiento y en el mantenimiento del estado troncal.

Palabras claves: *cáncer, microRNAs, células troncales, miR-583.*

ABSTRACT

Cancer or breast carcinoma, is a malignant neoplasm that has its origin in the accelerated and uncontrolled proliferation of the epithelial cells of the glandular ducts or the lobule mammals. One of the most interesting topics regarding cancer of cancerous stem cells (CSC). In order to identify these cells it is necessary to use specific surface markers such as ALDH1 + and CD44 + / CD24-, in addition to those that allow identification of the number of normal stem cell signaling pathways that can be operated in CSCs. Thus there may be a deregulation in the genes that modulate these pathways and cause normal to cancerous stem cell activity to be regulated by microRNAs (miRNAs), these are a family of small single-stranded RNAs not encoding 21-25 nucleotides, which regulate gene expression by inhibiting translation or inducing degradation of target messenger RNAs (mRNA). The association between miRNA expression and cancer was more evident than the large number of genes coding for miRNAs are in regions that commonly undergo chromosomal alterations in a carcinogenic process. (667 miRNAs) from a stem cell subpopulation of the MCF-7 (CD44 + / CD24- / low) breast cancer cell line and the functional analysis of the deregulated miR-583 in trunk and parental MCF-7 cells, Was analyzed as the target gene for GSK3 β , from which the expression of the protein was modified once the expression of the miRNA was restored, reason why this miRNA could be involved in the resistance to the treatment and in the maintenance of the trunk State

Key words: *cancer, microRNAs, stem cells, miR-583.*

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término utilizado para definir a un conjunto de patologías etiológicamente distintas entre sí, que se caracterizan por la pérdida del balance entre la muerte celular programada y la proliferación celular incontrolada, debido a un daño o alteración genética. Una diferencia importante es que las células cancerosas pierden la función y morfología de la célula normal de la que se originaron. Es una patología con un desarrollo a veces muy lento que puede durar varios años, desde que una célula normal adquiere mutaciones que le brindan la capacidad de proliferar de manera incontrolada hasta el estado metastásico.

El cáncer o carcinoma de mama, es una neoplasia maligna que se origina por la proliferación acelerada e incontrolada de las células epiteliales de los conductos o glandulares de lobulillos mamarios. Es una patología clonal, donde una célula individual adquiere la capacidad de proliferación incontrolada a través de una serie de mutaciones somáticas o de la línea germinal, haciendo que se produzca un tumor, el cual logra avanzar hasta la metástasis si no es tratado en un estadio temprano.

Uno de los tópicos más interesantes en relación al cáncer es el de las células troncales cancerosas. Cuando se observa un tumor bajo el microscopio, o se analizan los genes expresados en las células del tumor, se pueden notar que no todas las células del tumor son iguales. Las células en diferentes partes del tumor pueden verse y comportarse de forma diferente. Esta variedad es conocida como "heterogeneidad del tumor". Las células troncales cancerosas se definen por las siguientes propiedades: (a) la auto-renovación, (b) la capacidad proliferar continuamente y (c) una elevada tumorigenicidad a diferencia de una célula cancerosa. Además, las células troncales cancerosas presentan resistencia a los medicamentos y la metástasis. Por tanto, identificar

la célula que da origen a un tipo específico de cáncer ayudaría a entender la iniciación, prevención y tratamiento del cáncer.

Para poder identificar estas células es necesario el uso de marcadores de superficie específicos para células troncales cancerosas tales como ALDH1⁺ y CD44⁺/ CD24⁻, además de aquellos que permiten identificar el número de vías de señalización de células troncales normales que pueden estar operando en células troncales cancerosas. La señalización, que regula la biología de células troncales, se puede resumir en tres vías: señalización de Hedgehog (SHH), señalización de Notch y señalización de Wnt / β -catenina. Por lo que pudiera presentarse una desregulación en los genes que modulan estas vías y provocar que haya una actividad de las células troncales normales a cancerosas, esto puede ser regulado mediante microRNAs. Los microRNAs (miRNAs) son una familia de pequeños ARNs monocatenarios no codificantes de 21-25 nucleótidos que regulan la expresión génica al inhibir la traducción o inducir la degradación de los RNAs mensajeros (RNAm) blanco. Se estima que hay más de mil miRNAs en el cuerpo humano y que uno solo de ellos puede regular hasta 200 proteínas.

La función de los miRNAs es fundamental en todos los procesos celulares, por lo que alteraciones en la expresión de los miRNAs pueden contribuir de manera significativa en diversos procesos patológicos tales como el desarrollo del cáncer.

La asociación entre la expresión de miRNAs y el cáncer fue más evidente al determinar que un gran número de genes que codifican para miRNAs están en regiones que comúnmente sufren alteraciones cromosómicas en un proceso cancerígeno. Más de 186 genes de miRNAs se encuentran en regiones del genoma asociadas con cáncer, por lo que éstos pueden regular la función de genes supresores de tumores y oncogenes contribuyendo al desarrollo de la patología.

III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

A. CÁNCER

El cáncer puede iniciar en cualquier tejido o célula del cuerpo humano. Normalmente, las células crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, en el cáncer este proceso ordenado se descontrola y cuando las células se hacen más y más anormales no mueren e incluso, proliferan de manera rápida e incontrolada sin ser necesario, dando origen a una masa conocida como tumor o neoplasia. Eventualmente, las células tumorales pueden llegar a adquirir la capacidad de invadir tejidos vecinos (tumores invasivos) y posteriormente llegar a diseminarse hasta otros órganos y tejidos sanos del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático en un proceso conocido como metástasis. Los nuevos tumores generados por este proceso son denominados tumores secundarios o metastásicos. Finalmente, la generación de estos tumores en distintos órganos vitales provoca el mal funcionamiento de ellos, llevando a la muerte. A pesar de que la mayoría de los cánceres son generalmente asociados con la vejez, ningún grupo de edad es inmune a esta enfermedad (National Cancer Institute, 2015).

Las células cancerosas tienen la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para conseguir nutrientes y formar un microambiente adecuado para el crecimiento del tumor y eliminación de productos de desecho (National Cancer Institute, 2015).

La palabra cáncer proviene del griego karkinos (καρκίνοϛ), que significa “cangrejo”, nombre dado en la antigüedad a esta enfermedad por la forma que adopta el crecimiento tumoral (Dorland, 2005). Por otro lado, el término neoplasia significa, acorde a sus raíces etimológicas, “tejido en nueva formación”, clínicamente se le denomina así a un tumor o crecimiento irregular

sea benigno o no; aunque por lo regular se aplica a los tumores malignos sustituyendo la palabra cáncer. En la actualidad se conocen más de 100 tipos de cáncer, que toman su nombre de acuerdo al órgano donde se origina, pudiendo ser agrupados en categorías más amplias de acuerdo a su origen celular, por ejemplo cuando el cáncer se origina en células epiteliales que revisten o cubren órganos internos es denominado carcinoma, y se le da el nombre del órgano que esté afectando; cuando el carcinoma proviene de células que constituyen el lumen o revestimiento interno de las glándulas de secreción externa y poseen propiedades de secreción se denomina adenocarcinoma; es llamado sarcoma cuando se origina en células de sostén o del tejido conjuntivo o tejidos mesodérmicos como el hueso, cartílago, músculo y vasos sanguíneos, cuando el cáncer afecta células de la médula ósea es llamado leucemia, en cambio cuando se origina en membranas serosas y que pueden tener componente epitelial o mesenquimatoso es denominado mesotelioma (Dorland, 2005; Kumar y col., 2005; Ruddon, 2007; WHO, 2015).

B. ONCOGÉNESIS

El cáncer es una patología con un desarrollo a veces muy lento que puede durar varios años, desde que una célula normal adquiere mutaciones que le brindan la capacidad de proliferar de manera incontrolada hasta el estado metastásico. Cuando una célula normal se transforma en una célula maligna lo hace mediante un proceso llamado oncogénesis. Los cambios resultantes pueden interrumpir el crecimiento normal de la célula, transformando gradualmente las células normales en células cancerosas. Este proceso consta de tres etapas: inicio, promoción y progresión (Hennings y col., 1993; Ruddon, 2007).

1. Inicio

La célula adquiere a lo largo de la vida de un ser humano, una serie de mutaciones o alteraciones genéticas que le confieren un carácter de célula

“maligna”. En el cuerpo humano existe una amplia gama de ellas que van desde células que tienen mutaciones germinales y que predisponen una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer y aquellas células con mutaciones somáticas (como las inserciones, deleciones, rearrreglos, incremento o reducción del número de copias), así como eventos epigenéticos reguladores de la transcripción. Estos fenómenos varían en cada tipo de tumor y cada paciente, pero sin importar cuál sea el tipo de mutación, aquellas que no contribuyen al desarrollo tumoral se conocen como mutaciones pasajeras, mientras que aquellas que están claramente implicadas en la oncogénesis se conocen como conductoras “driver”. Estas últimas son aquellas que motivan la expansión clonal y se encuentran sometidas a una presión de selección natural ejercida por el microambiente del tejido, por lo cual pueden estar presentes o no en los estadios del tumor. Las mutaciones espontáneas que se dan en la etapa de inicio, son causadas por agentes intrínsecos (producidas generalmente por radicales libres y diversos productos del metabolismo celular) o extrínsecos, la molécula que inicia esta cascada de mutaciones es denominada como “agente iniciador”. Estos agentes pueden ser físicos, como la radiación ionizante, químicos, como el benceno o virales (Bishop, 1987; Hennings y col., 1993; Clayson y col., 1994; Kumar y col., 2005; Ruddon, 2007; Loeb y Harris, 2008; Stratton y col., 2009).

2. Promoción

Durante la segunda etapa de la oncogénesis, se lleva a cabo el crecimiento tisular, proceso que deriva en la eventual formación del tumor. Este crecimiento se ve favorecido por compuestos químicos propios del cuerpo que inducen la expansión clonal de las células afectadas. Entre estos se encuentran: el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y los factores de crecimiento transformante (TGF- β y TGF- α), entre otros. En diversos tipos tumorales ha sido evidenciada la sobreexpresión

de receptores a los diversos factores de crecimiento mencionados anteriormente. Como consecuencia de esto, la autoinducción o activación constitutiva, permite que estos receptores emitan una cascada de señalización correspondiente aún en ausencia de sus ligandos. Entre los receptores más destacados tenemos el receptor de Her2 en cáncer de mama y el EGFR en cáncer de pulmón (Kumar y col., 2005; Ruddon, 2007; Gunduz M, 2011).

Finalmente, en esta etapa de crecimiento el tumor requiere una mayor cantidad de nutrientes y de oxígeno, por lo que requiere vascularizarse (angiogénesis), acción que es promovida por los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hennings y col., 1993; Stratton y col., 2009; Gunduz M, 2011)

3. Progresión

En esta etapa, a través de cambios sucesivos en las neoplasias se generan cada vez más subpoblaciones de células más “malignas”, las cuales tienen la capacidad de invadir tejidos vecinos (tumor invasivo) o a distancia (tumor metastásico). La pérdida de las moléculas de adhesión celular, tales como integrinas, cadherinas, cateninas y anillos de actina que están relacionadas con el contacto célula-célula y célula-matriz extracelular, son degradadas por metaloproteasas de matriz (MMPS). Esto es el comienzo de un proceso conocido como transición epitelial-mesénquima, en el cual las células epiteliales tumorales se convierten en células migratorias. Durante la transición epitelial mesenquimal, se hace evidente la transcripción del gen *Twist1*, que actúa favoreciendo la sobreexpresión de MMPS y reprimiendo elementos como TIMP (proteína inhibidora de las metaloproteasas). Finalmente, las células tumorales pierden la polaridad ápico-basal lo que lleva a la desorganización de la membrana basal. A nivel microscópico las células pierden su forma característica, fenómeno que es conocido como anaplasia (Kalluri y Weinberg, 2009; Jordan y col., 2011; Martin de Civetta y Civetta, 2011; Thomson y col., 2011).

Una característica frecuente durante la progresión tumoral es la generación de estructuras con alta actividad del citoesqueleto de actina llamadas invadopodios que contienen altos niveles de MMPS, las cuales a su vez, al degradar la matriz facilitan el paso de las células migrantes por el estroma y permiten un mayor acceso a los factores de crecimiento embebidos en ella. El primer obstáculo que enfrentan las células invasoras es atravesar la membrana basal y posteriormente superar otras barreras químicas del medio ambiente ajeno como el cambio de pH, la carencia de oxígeno (hipoxia), además de ser capaces de evadir el sistema inmunológico y confrontar citocinas inhibitorias (TNF- α y TGF- β). Es entonces cuando comienza la metástasis, la cual se ve influida por el patrón de flujo sanguíneo y la presencia de factores quimioatrayentes en él, afines al conjunto de receptores expresados en la superficie de la célula tumoral (Hennings y col., 1993; Heldin y col., 2009; Kalluri y Weinberg, 2009).

C. METÁSTASIS

A medida que la progresión tumoral avanza, las células pierden su capacidad de adherencia y se separan de la masa tumoral para invadir tejidos vecinos. Estas células también entran a la sangre y linfa para ser transportadas a otros órganos o tejidos a distancia desde el sitio de crecimiento primario y poder convertirse en tumores secundarios, esto es conocido como el proceso de metástasis (Devi, 2005).

La metástasis se lleva a cabo a través de un largo proceso denominado “cascada metastásica” de la cual se identifican diversos pasos, como: crecimiento del tumor primario y división celular irregular, invasión al tejido aledaño al tumor y ruptura de la lámina basal, intravasación al sistema circulatorio o linfático, circulación y sobrevivencia de la célula tumoral en el sistema circulatorio, extravasación a un sitio distante de la lámina basal de otro tejido, proliferación del cáncer en el sitio metastásico, formación de

micrometástasis en el sitio afectado y colonización progresiva (Ruddon, 2007; Martin de Civetta y Civetta, 2011).

Actualmente no se ha determinado el por qué dependiendo del tipo de tumor, las células metastásicas invaden órganos de manera preferencial como en el caso del cáncer de próstata invade principalmente hueso, cáncer de colon a hígado y cáncer estómago a ovarios en mujeres. Con respecto a esto, la teoría de la semilla y el suelo “seed and soil” generada desde 1889, explica que las células tumorales necesitan un lugar químicamente semejante a su tejido de origen. Por ejemplo, las células tumorales mamarias suelen necesitar iones de calcio para sobrevivir, por lo que los huesos representan un ambiente propicio para asentarse. En contra parte, James Ewing propone 30 años después, que la metástasis está influenciada por rutas anatómicas y mecánicas del cuerpo. En el cáncer de mama por ejemplo, se suele invadir ganglios linfáticos regionales y axilares, lo que se conoce clínicamente como nudo positivo o enfermedad regional. Independientemente de cuál sea la explicación más adecuada al fenómeno de la metástasis, es este último proceso el que lleva a la muerte al paciente al diseminar la enfermedad en el resto del cuerpo (Fidler, 2003).

D. ANATOMÍA DE LA MAMA

Las glándulas mamarias son los órganos encargados de producir leche en mamíferos. Están presentes en ambos sexos. En el hombre se mantienen rudimentarias toda la vida, en cambio en la mujer están poco desarrolladas hasta antes de la pubertad, cuando empieza el proceso de maduración. El máximo desarrollo de estas glándulas se produce durante el embarazo y especialmente en el periodo posterior al parto, durante la lactancia (Netter, 2011).

En el humano son dos glándulas de forma hemisférica situadas en la parte anterior del tórax. Su forma varía según características personales, genéticas y

en la misma mujer acuerdo a la edad y paridad. La mayor parte de la masa de la mama está constituida por tejido glandular y adiposo. La base de la glándula mamaria se extiende, en la mayoría de los casos, desde la segunda hasta la sexta costilla, desde el borde externo del esternón hasta la línea axilar media. El área superexterna de cada glándula se extiende hacia la axila y se denomina “prolongación axilar”. La cara profunda de la mama es ligeramente cóncava y se encuentra en relación con el músculo pectoral mayor, el serrato anterior y la parte superior del oblicuo externo del abdomen. La mama está separada de estos músculos por la aponeurosis profunda. Entre ambas hay un tejido areolar laxo denominado retromamario, éste permite que la mama tenga cierta movilidad sobre la aponeurosis profunda que cubre al plano muscular. La cara superficial de la mama está cubierta por piel. Aproximadamente en el centro de esta cara se encuentra el pezón que está en relación al cuarto espacio intercostal en la nulípara. La base del pezón está rodeada por una zona de piel hiperpigmentada, de 2.5 cm. denominada areola. El pezón contiene numerosas fibras musculares lisas, en su mayoría de tipo circular, las que se contraen al estimularlo mecánicamente, originando la erección del pezón. La areola posee numerosas glándulas sebáceas, entre ellas es posible reconocer algunas que durante el embarazo y la lactancia determinan levantamientos de la piel de la areola, denominadas glándulas de Montgomery, éstas contienen estructuras histológicas similares a la parte glandular de la mama y producen una secreción grasa que lubrica el pezón y la areola. Bajo la areola se ubican las dilataciones de los conductos galactóforos llamadas senos lactíferos, que acumulan leche y el niño debe exprimir al mamar (figura 1) (SSM, 2002; Netter, 2011).

Las glándulas mamarias están compuestas por un parénquima glandular de estructuras de origen embrionario ectodérmico denominadas ácidos glandulares. Los ácidos son un conjunto de células alveolares secretoras que están organizadas formando una cavidad a la cual vierten la secreción láctea. Un conjunto de diez a cien ácidos se encuentran unidos entre sí por tejido

conectivo y vasos sanguíneos en una estructura denominada lobulillo. El lobulillo y su conducto terminal forman la unidad terminal ductal lobular. El conducto terminal se divide en dos regiones; intralobulillar y extralobulillar. Las secreciones del lumen del ácino son dirigidas a través del conducto terminal intralobulillar hasta la porción extralobulillar el cual se une con sus similares para formar el conducto lobulillar, que recoge la secreción láctea de todos los ácinos de un lobulillo mamario. Los conductos lobulillares se unen entre sí para formar el conducto interlobulillar, que al unirse con otros conductos de éste tipo, forma el conducto intralobular, que toma su nombre de la estructura formada por el conjunto de lobulillos conocida como lóbulo. Finalmente los conductos intralobulares se unen para formar el ducto mamario, estructuras tubulares, huecas y ramificadas que confluyen en los 15 a 24 conductos galactóforos (uno por cada lóbulo) que de manera independiente desembocan directamente al pezón. Antes de llegar a él, bajo el área de la areola mamaria, se dilata formando el seno lactífero, el que se angosta nuevamente al desembocar en el pezón. Este último es elemento que más sobresale de la glándula mamaria y está rodeado de una zona pigmentada y circular de la piel, llamada la areola. Los pezones están formados por fibras de músculo liso dispuestos en círculo, que comprimen los conductos galactóforos. Finalmente, por debajo de la epidermis y rodeando a la glándula mamaria se encuentra tejido de sostén o estroma, constituido por tejido conectivo fibroso y tejido adiposo que constituye en un 90% a la glándula mamaria y que ocupa los espacios interlobulares. (SSM, 2002; Netter, 2011; WHO, 2015)

Anatomía de la glándula mamaria

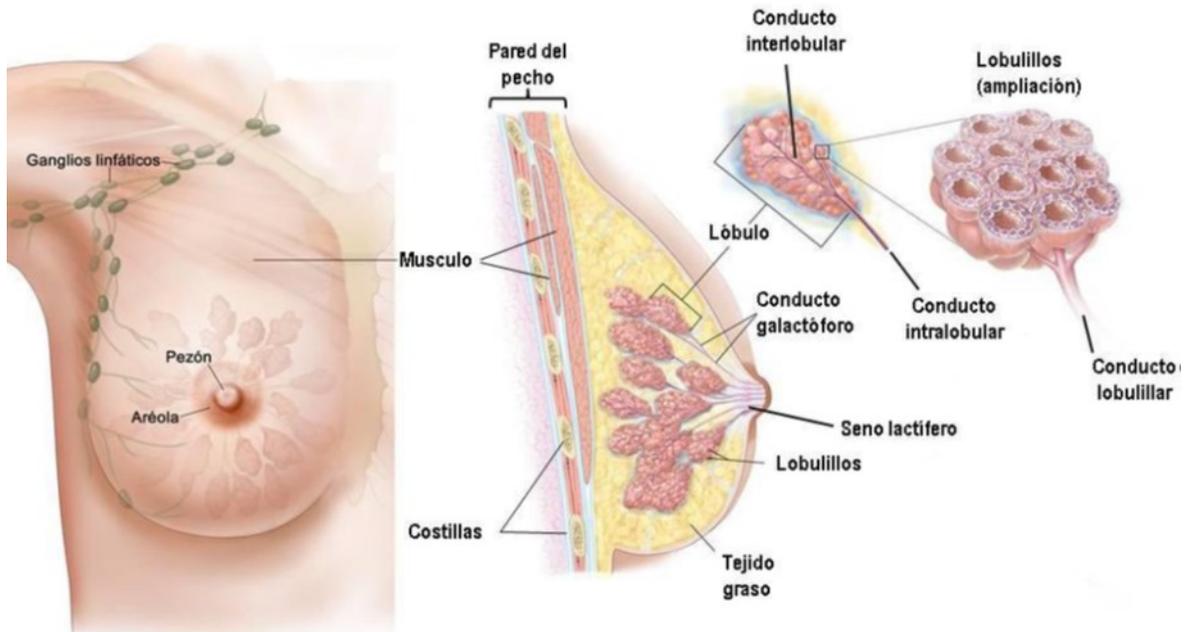


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria. El esquema muestra la organización básica de la mama. Se representan las conexiones con los vasos linfáticos de la axila y la glándula mamaria, la ubicación del pezón y la areola. La organización de los lóbulos y una ampliación del lobulillo.

E. CÁNCER DE MAMA

El término "cáncer de mama" hace referencia a un tumor maligno que se ha desarrollado a partir de células mamarias. Es una patología clonal, donde una célula individual adquiere la capacidad de proliferación incontrolada a través de una serie de mutaciones somáticas o de la línea germinal, haciendo que se produzca un tumor, el cual logra avanzar hasta la metástasis si no es tratado en un estadio temprano. Generalmente, el cáncer de mama se origina en las células de los lobulillos, que son las glándulas productoras de leche, o en los conductos, que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Con menos frecuencia, el cáncer de mama puede originarse en los tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama (Knaul y col., 2009; NCI, 2015).

Con el paso del tiempo, las células cancerígenas pueden invadir el tejido mamario sano circundante y llegar a los ganglios linfáticos de las axilas. Si las células cancerígenas llegan a los ganglios linfáticos, obtienen una puerta de acceso hacia otras partes del cuerpo. Los estadios del cáncer de mama hacen referencia a lo lejos que se han propagado las células cancerígenas más allá del tumor original. El cáncer de mama no siempre se origina por una anomalía genética. No obstante, un 5-10% de los casos son producto de una anomalía heredada de la madre o el padre. En cambio, el 85-90% de los casos de cáncer de mama tienen su origen en anomalías genéticas vinculadas al proceso de envejecimiento y el estilo de vida (NCI, 2015).

F. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

En el caso del cáncer de mama se emplean diversos tipos de clasificación. Éstas se basan en diversos elementos que incluyen desde características celulares hasta moleculares y permiten entender las características clínicas, histológicas y moleculares del tumor del paciente. Es importante mencionar que dichas clasificaciones son utilizadas en la clínica para determinar el tratamiento,

el grado de avance y hasta el pronóstico de respuesta a una terapia, por lo cual es de vital importancia comprender las diferencias entre cada una de ellas (Bishop, 1987).

Para el cáncer de mama, la clasificación de mayor utilidad es la molecular. La heterogeneidad molecular del cáncer de mama puede ser clasificada con base a sus perfiles de expresión genómica en dos grupos y cinco subtipos: i) receptor de estrógeno: RE⁺ (subtipos luminal A y B) y, ii) RE⁻ (subtipos normal breast-like, Her2/neu⁺ y basal-like). Diversos estudios han validado la utilidad clínica de la clasificación molecular evaluando la recurrencia y mortalidad distante, demostrando ser más poderosa que la histopatológica como factor predictivo de los diferentes tratamientos, lo cual resulta en un uso más selectivo de la quimioterapia, y con ello la reducción de la toxicidad y de los costos económicos (Hidalgo Miranda y G., 2009).

G. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

De acuerdo a los datos más actuales (2012), registrados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de las defunciones ocurridas en todo el mundo (13% del total). Más del 70% de las muertes por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Desafortunadamente, el número de fallecimientos por este padecimiento sigue aumentando en todo el mundo y se estima que en el año 2030 supere los 13,1 millones. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia a nivel mundial fueron el de pulmón (1,8 millones de casos, 13,0% del total), el de mama (1,7 millones, el 11,9%) y el cáncer colorectal (1,4 millones, el 9,7%). Los tipos de cáncer que provocaron un mayor número de muertes fueron los de pulmón (1,6 millones, esto es, el 19,4% del total), hígado (0,8 millones, el 9,1%) y estómago (0,7 millones, el 8,8%), siendo el cáncer de mama el que ocupa el primer lugar en el caso de las mujeres (IARC, 2012; WHO, 2015).

1. Epidemiología del cáncer de mama en el mundo

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519,000 mujeres por cáncer de mama y aunque este cáncer está considerado como una enfermedad de países de primer mundo, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo (WHO, 2015).

La incidencia varía mucho en todo el mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99,4 por 100,000 habitantes en América del Norte. Europa oriental, América del Sur, África austral y Asia occidental presentan incidencias moderadas, pero en aumento. La incidencia más baja se da en la mayoría de los países africanos, pero también en ellos se observa un incremento de la incidencia de cáncer de mama. Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos (Coleman et al., 2008).

Las bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, que hace que un alto porcentaje de mujeres acudan al médico con la enfermedad ya muy avanzada, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento (WHO, 2015).

2. Epidemiología del cáncer de mama en México

A nivel mundial la edad promedio de las pacientes con cáncer de mama es alrededor de los 65 años, esto contrasta de forma alarmante con los datos reportados en nuestro país, donde el promedio es de 55 años, es decir una década antes. Aunado a esto, hay que tomar en cuenta dos aspectos importantes que acentúan éste panorama; el primero es que la enfermedad

afecta mujeres de prácticamente todas las edades y el segundo, es que la población no sólo en México, sino a nivel mundial, se vuelve más vieja, lo que quiere decir que en un periodo no muy lejano la población femenina en edad de riesgo será alta. También es conveniente mencionar que los programas de control poblacional y planificación familiar actuales alientan la baja paridad y un aplazamiento de los embarazos, que como se ha visto es un factor de riesgo para el cáncer de mama. Esto tiene serias implicaciones en la epidemiología de la enfermedad en nuestro país (Key y col., 2001; Palacio-Mejía y col., 2009).

Además en el año 2000, la Secretaria de Salud realizó la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA-2000), la cual tuvo como objetivo indagar las condiciones de salud y los patrones de uso de los servicios de salud en la población mexicana por edad y sexo. De acuerdo con los datos arrojados por la encuesta, de los casi nueve millones de mujeres que representa la ENSA-2000, las mujeres derechohabientes que acuden a la detección de cáncer de mama tienen algún grado de escolaridad, y solo el 4.6% de ellas son analfabetas, esto sugiere que el aspecto cultural es importante debido a que existen muchas mujeres que no conocen como realizar una autoexploración, o desconocen la trascendencia real de ésta. También se encontró que de la totalidad de las pacientes atendidas, sólo el 20% de las mujeres presentaron algún tipo de molestia que las llevó a realizarse la prueba de detección de cáncer de mama, mientras que el 80% restante realizó una revisión rutinaria. Una muy baja proporción de estos casos fueron positivos (4%) y de esas mujeres, el 75% recibió tratamiento. Este último punto es realmente interesante pues se desconoce si el 25% restante recibió tratamiento privado o simplemente no lo recibió. Esto también es reflejo del limitado alcance que tienen los sistemas públicos de salud y cabe destacar que el estudio se limita sólo a derechohabientes de los sistemas de salud (INEGI, 2005)

De acuerdo a los datos reportados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) publicados en la base de datos GLOBOCAN, se reveló que el cáncer de mama es la neoplasia de mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres del mundo (Figura 2). Según a esta base de datos, durante el 2008 se diagnosticaron un aproximado de 1.38 millones de nuevos casos de cáncer (23% de todos los cánceres en mujeres), ocupando así, el segundo lugar general (10,9 %) de los cánceres diagnosticados *de novo* (Figura 3A). De acuerdo al registro CI5 I-VIII (Cancer Incidence in Five Continents), la incidencia del cáncer de mama ha aumentado en promedio, pasando de una tasa ajustada por edad o ASR=40 en 1960, a cerca de una ASR=70 en 1995 (Incidencia por cada 100,000 mujeres), por lo que se puede afirmar que la incidencia aumenta año con año en todos los países. En los últimos cinco años, el cáncer de mama se ha posicionado como la neoplasia más común en mujeres, tanto en las regiones desarrolladas, como en vías de desarrollo, con alrededor de 690,000 nuevos casos estimados en cada región. Las tasas de incidencia varían de 19,3 por cada 100,000 mujeres en el este de África a 89,7 por cada 100,000 mujeres en Europa occidental, y son altas (superiores a 80 por 100,000) en las regiones desarrolladas del mundo (excepto Japón) y bajas (menos de 40 por 100,000) en la mayoría de las regiones en desarrollo (IARC, 2012; Forman y col., 2014).

Por otra parte, aun considerando todos los tipos de neoplasia tanto en hombres como en mujeres, el cáncer de mama es el de mayor prevalencia mundial (casos existentes), con un total de 5,189,028 mujeres que han padecido esta enfermedad durante los últimos cinco años (Figura 3B) (Forman y col., 2014; WHO, 2015).

En cuanto a la tasa de mortalidad, el ASR es de 6 a 18 (por cada 100,000 mujeres) en las regiones desarrolladas y ASR=10 en las regiones en desarrollo, siendo el cáncer de mama, la causa más frecuente de muerte por cáncer en

mujeres tanto en los países desarrollados (269,000 defunciones) como en las regiones en desarrollo (189,000 muertes). Estas variantes en la tasa de mortalidad, explican por qué, a pesar de ser el segundo cáncer con más incidencia y el de mayor prevalencia, el cáncer de mama se sitúa como la quinta causa de muerte por cáncer (sin considerar el género), reportando durante el 2008 más de 458,000 defunciones. En conclusión, los datos muestran una realidad preocupante: en la mujer, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. En el año 2005 la OMS calculó que en los últimos 20 años han muerto un total de 7.6 millones de mujeres a causa de esta enfermedad (IARC, 2012; Forman y col., 2014; WHO, 2015).

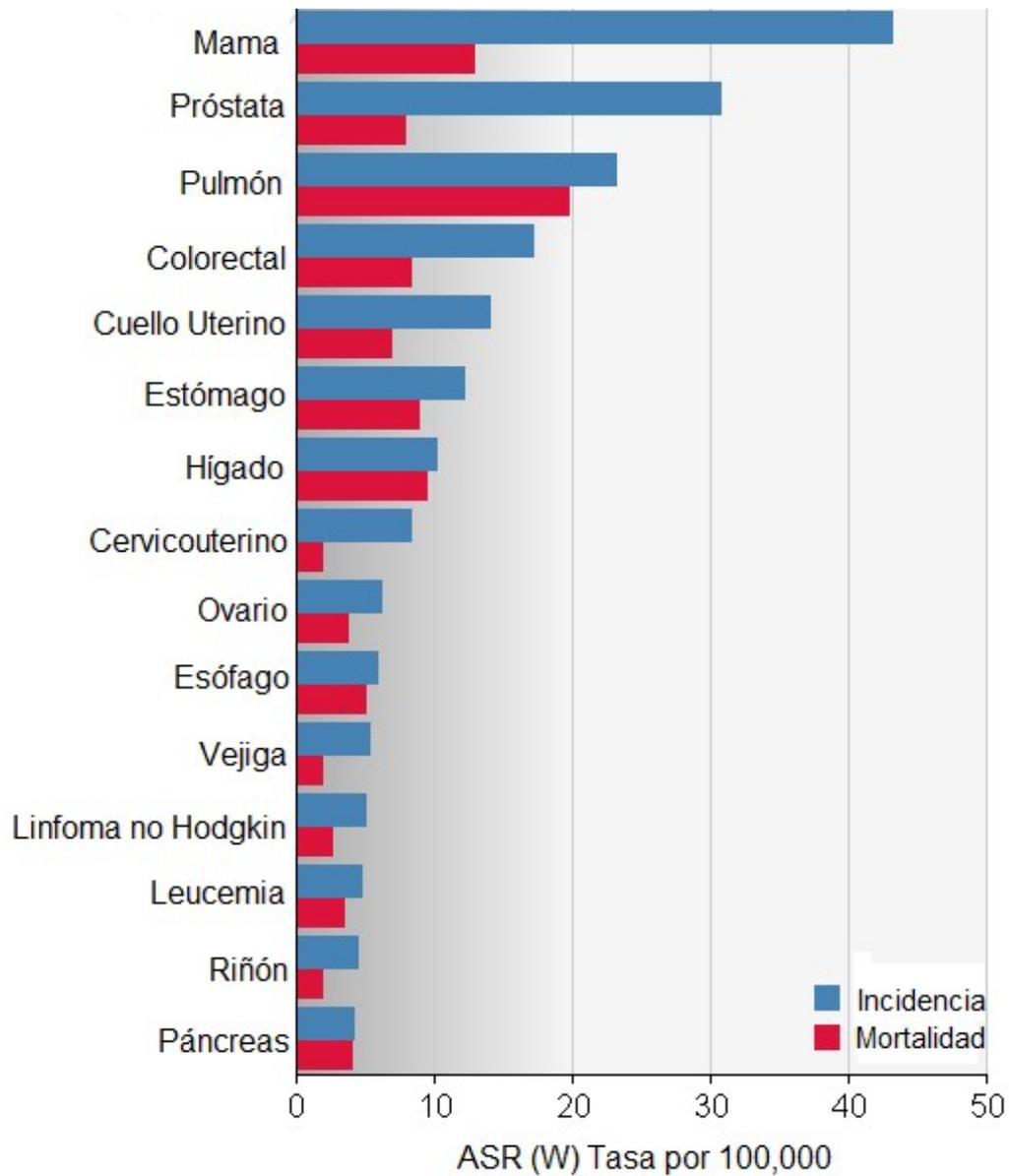


Figura 2. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial en cada género. El gráfico muestra las tasas de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer más frecuentes en hombres y mujeres alrededor del mundo. En el caso de las mujeres, es evidente que el cáncer de mama es la neoplasia con la mayor incidencia y mortalidad en ese género. Modificada de GLOBOCAN.

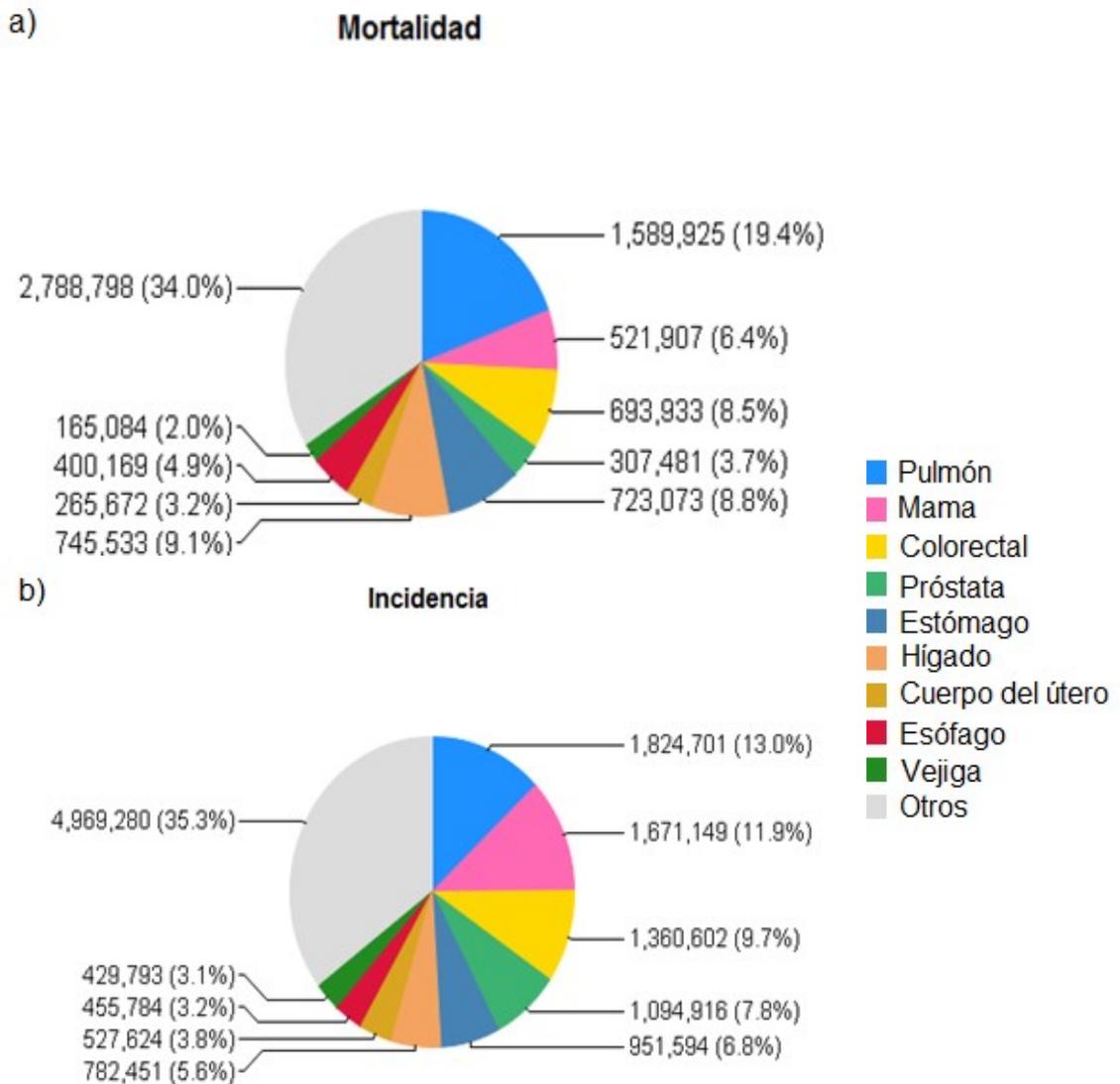


Figura 3. Incidencia y prevalencia de los distintos tipos de cáncer en ambos sexos a nivel mundial. a) La gráfica muestra la incidencia de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial, entre ellos observamos como el cáncer de mama se ha colocado como el segundo cáncer más diagnosticado en el mundo entre todos los tipos de cáncer. b) La gráfica muestra la prevalencia de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial, entre ellos observamos como el cáncer de mama es el más prevalente entre todos los tipos de cáncer. Modificada de GLOBOCAN.

En nuestro país, los datos reportados por el IMSS durante la última década posicionaron al cáncer de mama como el segundo lugar entre las causas de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, precedido por el cáncer cervicouterino. Sin embargo, las cifras brutas de defunciones por cáncer de cuello del útero muestran desde el año 2000 una tendencia decreciente constante, mientras que las causadas por cáncer de mama aumentan cada año, para el año 2006 el cáncer de mama se colocó como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas (figura 4).

Los reportes más actuales en México establecidos por la organización SIPAM (Salud Integral Para la Mujer A.C), indican que hace 10 años las muertes anuales por cáncer de mama eran de aproximadamente 3,026 mujeres y para el año 2007 hubo un promedio de 4,200 muertes por esta enfermedad; lo cual significa un aumento de un 38% en una década. Esto concuerda con las tendencias de aumento del cáncer de mama que se venían presentando con anterioridad en algunos estados de nuestro país, un ejemplo es el estado de Jalisco, en donde el cáncer de mama ocupa el primer lugar en mortalidad en mujeres desde 1997, con una tasa estandarizada de mortalidad del 15.82% por cada 100,000 mujeres. Estas diferencias regionales en la prevalencia de cáncer de mama en nuestro país, muestran una mayor frecuencia de cáncer de mama en los estados del norte y centro del país, donde las mujeres gozan de un estado socioeconómico y cultural más elevado, mientras que en los estados donde predomina la población indígena y de menor nivel socioeconómico (por ejemplo: Chiapas, Oaxaca) la frecuencia es mucho más baja, mientras que en la ciudad de México se presentan el mayor número de casos (figura 5). Estas diferencias en la mortalidad pueden deberse a varios factores como ambientales, el estilo de vida y la divergencia genética de la población mexicana (Palacio-Mejía y col., 2009).

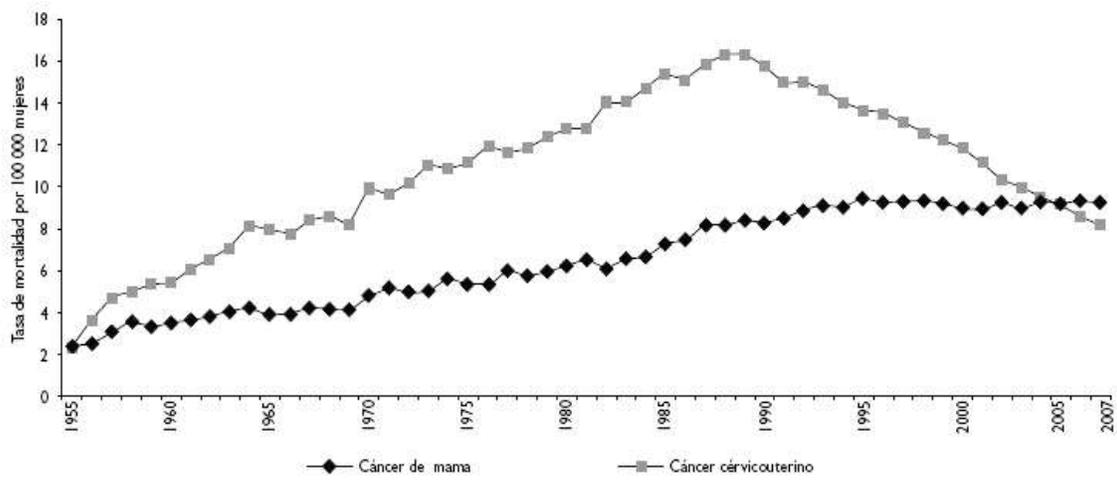


Figura 4. Tasa de mortalidad en mujeres mexicanas por cáncer cervicouterino y cáncer de mama. En la gráfica se muestra la mortalidad registrada desde 1955 al año 2007 por ambas enfermedades. Se aprecia que a partir del año 2006 el cáncer de mama se sitúa como la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país. Tomada de Anuario estadístico de INEGI



Figura 5. Tasa estandarizada de mortalidad por cáncer de mama en las regiones geográficas de México. La figura muestra las diferentes tasas de mortalidad por cáncer de mama registradas durante el año 2005 en las principales regiones geográficas de nuestro país.

Cabe señalar que los datos estadísticos proporcionados por la base de datos GLOBOCAN sobre el cáncer de mama en nuestro país, muestran que durante el año 2008 este padecimiento tuvo el primer lugar en incidencia (13,939), prevalencia (51,497) y mortalidad (5217) de todos los tipos de cáncer en mujeres mexicanas LO(IARC, 2012).

En los países más desarrollados, el número de nuevos casos de cáncer de mama es mayor que en los países pobres, pero de manera contraria el número de muertes es mayor en estos últimos. Lo anterior muestra el efecto reductor en la mortandad debido al acceso a procedimientos oportunos de detección y tratamientos presentes en los países industrializados y muy probablemente, también refleje la influencia del estilo de vida en la incidencia de cáncer de mama, como pueden ser los patrones reproductivos y de alimentación (Palacio-Mejía y col., 2009; IARC, 2012).

H. FACTORES DE RIEGO EN CÁNCER DE MAMA

Existen elementos denominados factores de riesgo que pueden presentarse solos o en conjunto y favorecer el desarrollo del cáncer de mama. Estos factores pueden estar presentes durante largos periodos de tiempo y comprenden elementos intrínsecos (como la herencia genética) y extrínsecos (como las hábitos alimenticios y paridad) (Calderon-Garciduenas y col., 2000; Key y col., 2001; WHO, 2015).

Dentro de los factores de riesgo más conocidos se encuentran la menstruación, la menopausia y la edad avanzada. Durante el tiempo denominado ventana estrogénica comprendido entre la edad de inicio de la menstruación y menopausia, la exposición a estrógenos es continua lo cual es un factor crítico de la carcinogénesis. Esto se relaciona directamente con la edad debido a que la incidencia de cáncer de mama se incrementa duplicándose cada 10 años hasta la menopausia. Por otra parte, las mujeres que han tenido al menos un embarazo a término tienen un 25% de reducción en el riesgo de padecer cáncer

de mama. Una mujer con cinco o más niños tiene aproximadamente la mitad de riesgo que una mujer nulípara. Aunado a esto, las mujeres que han amamantado a sus hijos por un total de 25 meses o más tienen un 33% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas quienes nunca amamantaron (Calderon-Garciduenas y col., 2000).

Otro factor de riesgo es la herencia genética. Diversos estudios muestran que el riesgo de padecer cáncer de mama aumenta al doble cuando la mujer tiene familiares de primer grado afectados por esta patología. Por otra parte, en células germinales se han identificado algunas mutaciones genéticas que predisponen a la enfermedad, estas son BRCA1, BRCA2, P53, PTEN y ATM por lo que la presencia de estas variantes aumenta de forma considerable el riesgo. Finalmente, en mujeres que han tenido cáncer de mama el riesgo de recurrencia o reaparición del primer cáncer es mayor (Calderon-Garciduenas y col., 2000; Key y col., 2001; Devi, 2005).

Con respecto a los hábitos y costumbres que se asocian al riesgo de padecer cáncer de mama se encuentra el consumo de alcohol, el cual está asociado con un incremento moderado en el riesgo de padecer esta enfermedad. Por otra parte, la relación entre tabaquismo y cáncer de mama aún no ha sido claramente establecida aunque también se analiza una probable conexión. En cuestión de hábitos alimenticios, existe la hipótesis de que las dietas altas en grasa incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama. Además se ha estimado que un aumento en el índice de masa corporal incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama. En mujeres post menopáusicas, la obesidad eleva el riesgo de cáncer de mama hasta en un 50% más que en mujeres delgadas (Calderon-Garciduenas y col., 2000; Key y col., 2001).

I. TRATAMIENTO

Existe una gran variedad de tratamientos que dependen de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. La cirugía es la principal modalidad de tratamiento

local del cáncer mamario y hay varios tipos de procedimientos quirúrgicos, el más drástico es la mastectomía radical modificada que retira toda la glándula mamaria afectada, la mayoría de los ganglios linfáticos debajo del brazo, el revestimiento de los músculos pectorales y en ocasiones parte de los músculos de la pared del pecho. Sin embargo si la enfermedad es detectada en una etapa clínica temprana, se puede ofrecer un tratamiento conservador (tumorectomía), en el que la paciente puede conservar su seno sin comprometerse a recibir tratamiento oncológico radical.

La radioterapia es otro tipo de tratamiento que emplea generalmente rayos X de alta energía así como otros tipos de radiación con el fin de destruir células cancerosas o evitar su crecimiento. Actualmente son usados dos clases de tratamientos, estos dependen del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado. Estos son: i) el tratamiento de radioterapia externa, en la cual se envía radiación al área donde se encuentra el cáncer y, ii) la radioterapia interna, la cual consiste en administrar una sustancia radiactiva contenida en agujas, alambres o catéteres que se colocan directamente dentro del cáncer o cerca del mismo (NCI, 2015).

La quimioterapia es otro tipo de tratamiento que consiste en administrar medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, destruyéndolas o evitando su multiplicación. Los medicamentos son administrados vía oral, intramuscular o intravenosa. Al ingresar al torrente sanguíneo las células cancerosas son erradicadas (quimioterapia sistémica). Por otra parte, sí la quimioterapia se coloca directamente o muy cercana al tumor, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esa área (quimioterapia regional). La forma en que se administre la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando. En los últimos años hemos visto aparecer una serie de anticuerpos monoclonales como el bevacuzimab, lapatinib, gefitinib, etc., que se están probando en cáncer de

mama y que si demuestran ser útiles se sumarán a todos los fármacos antineoplásicos en uso.

Así mismo, impedir la acción de hormonas que favorecen el crecimiento tumoral es importante para inhibir el desarrollo del cáncer. El estrógeno por ejemplo, favorece el crecimiento de algunos tipos de cáncer de mama y es sintetizado en su mayor parte por los ovarios. Para impedir que los ovarios elaboren estrógeno se práctica la ablación ovárica (remoción quirúrgica de los ovarios). Finalmente, el último tipo de terapia es la hormonal que bloquea la acción de varias hormonas evitando el crecimiento de las células cancerosas. Un ejemplo de la terapia hormonal es el tamoxifeno, un químico antagonista de los receptores de estrógeno (RE) que bloquea la señal de crecimiento emitida por estos receptores y que se suministra tanto a pacientes con estadios tempranos de cáncer de mama como a pacientes con cáncer metastásico de mama. Otro tipo de terapia hormonal es aquella que se utiliza para inhibir la producción de estrógenos, ésta se realiza con anastrozol y letrozol, inhibidores de la aromatasa, los cuales disminuyen el estrógeno en el cuerpo al impedir que la enzima aromatasa convierta el andrógeno en estrógeno. Se administra a mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama que son hormona-dependientes (Key y col., 2001).

Aunque el objetivo principal de los tratamientos para cáncer es eliminar todas las células implicadas en éste, así como el tumor visible, pueden quedar ciertas células que son microscópicas, ya sea en la mama o en otra parte. En algunas ocasiones esto significa que se requiere de una cirugía adicional o algún otro tratamiento para extirpar las células cancerosas restantes. Estas células cancerosas son poco detectables, pero se cree que son las responsables de la recurrencia local y distante del cáncer. En los últimos años se ha identificado un pequeño número de células en los tumores con características de células troncales en distintos tipos de tumor, incluido el cáncer de mama. Las células

troncales tumorales, resultan de gran interés, ya que se les atribuye la capacidad de originar, mantener y expandir los tumores, así como de dar lugar a las metástasis y recidivas. Por otro lado, estas células han demostrado ser más resistentes a tratamientos convencionales utilizados en oncología, como la quimioterapia o la radioterapia; por tanto, suponen un candidato claro para la generación de recidivas. La caracterización molecular de estas células se ha convertido en uno de los campos más activos en la investigación oncológica, ya que los tratamientos dirigidos contra estas células podrían dar lugar a la eliminación completa del tumor y, por lo tanto, a la curación de la enfermedad (Eguiara y col., 2012).

Por lo tanto, muchos enfoques terapéuticos diferentes se están probando para la prevención y el tratamiento de la recurrencia del cáncer. Estos pueden incluir estrategias de tratamiento dirigido a vías de señalización que regulan las células troncales tumorales, mediante el bloqueo de las moléculas de la superficie celular, alterando los microambientes de cáncer que nutren las células troncales cancerosas, lo que induce la diferenciación de las células troncales cancerosas, la inmunoterapia basada en antígenos asociados de células troncales cancerosas, explotando metabolitos para matar células troncales cancerosas y el diseño de pequeños ARN de interferencia/moléculas de ADN, especialmente dirigidos a las células troncales. Debido al enorme potencial de estos enfoques para mejorar la gestión del cáncer, es importante identificar y aislar células troncales del cáncer para entender su funcionamiento y como ayudarían en el tratamiento (Islam y col., 2015).

J. CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales (“stem cells”) se encuentran en todos los seres humanos, desde las primeras etapas del desarrollo hasta el final de la vida. Éstas, se definen por su capacidad para someterse a la auto-renovación, así como a la diferenciación multilinaje. La auto-renovación puede ser simétrica, en el que una

célula troncal produce dos células troncales hijas, o asimétrica, en la que la célula troncal produce una célula troncal hija así como una célula que sale del nicho de células troncales a diferenciarse. Dependiendo de sus limitaciones en el proceso de diferenciación las células troncales pueden dividirse en células troncales embrionarias o adultas (Klonisch y col., 2008).

Está bien establecido que no todas las células troncales tienen el mismo potencial de generación de los distintos tipos celulares, lo que permite diferenciar entre células troncales totipotentes, pluripotentes y multipotentes. Existe una relación entre las diferentes células troncales y el estadio de desarrollo del organismo del que provienen. Así, las células troncales totipotentes se dan solo en fases muy tempranas del desarrollo embrionario y son capaces de generar las membranas y tejidos, como la placenta, que soportan el desarrollo del feto, por lo que son capaces de generar un organismo completo (Amit y col., 2000).

En fases posteriores del desarrollo embrionario las células del embrión pierden el carácter totipotente y solamente pueden producir células troncales de tipo pluripotente, capaces de originar la mayoría de células del organismo adulto, pero no de generar un organismo completo. Las células troncales pluripotentes están presentes en el embrión humano hasta el decimocuarto día después de la fertilización. Luego el embrión se diferencia en tres capas celulares, ectodermo, mesodermo y endodermo, cada una de estas está programada para generar tejidos u órganos en concreto con la consiguiente pérdida de pluripotencia de sus células constituyentes (Amit y col., 2000; Anderson y col., 2001).

K. CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Los tumores sólidos están compuestos de una mezcla heterogénea de células con diferentes características, que promueven diversas funciones en el crecimiento y desarrollo del tumor. Entre ellas, un pequeño grupo de células designadas como células troncales cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés

Cancer Stem Cell), dan lugar a la mayor parte del tumor a través de la auto-renovación y diferenciación continua, son las principales responsables del desarrollo del cáncer. De hecho, se definen por las siguientes propiedades: (a) auto-renovación, (b) capacidad para diferenciarse más rápidamente y (c) una alta tumorigenicidad en comparación con una célula cancerosa. Además, las CSC representan invasión, resistencia a los medicamentos y metástasis (T.M. Phillips y col., 2006).

Las CSC se descubrieron inicialmente en leucemias. La evidencia de CSC en tumores sólidos llegó más tarde. En relación con su origen, las CSC se hipotetizan al menos dos mecanismos diferentes: a) la transformación de las células troncales de tejidos normales o (b) las células somáticas normales sufren una reprogramación genética (es decir, transformación), que dota a las células con propiedades de células troncales (Figura 6). En otras palabras, las células troncales son inmortales y las células cancerosas pueden imitar las vías activadas de células troncales para convertirse en inmortales (Jaenisch y Young, 2008).

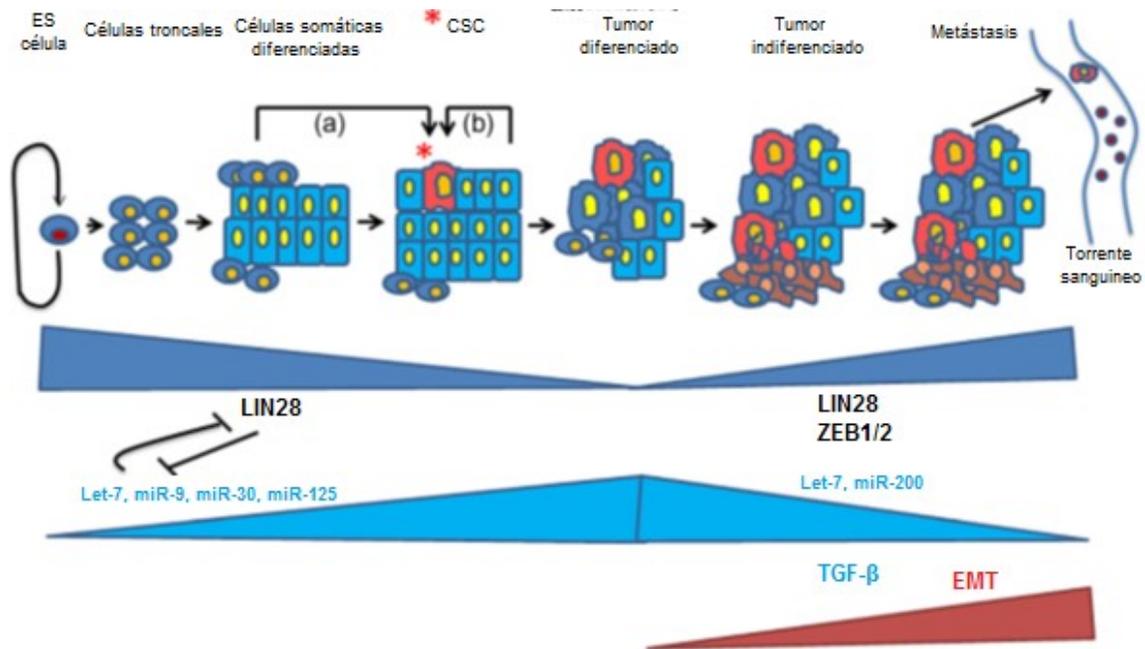


Figura 6. Evolución de una masa tumoral. (a) Células troncales carcinogénicas pueden provenir de una célula troncal madura, que ha mutado, o, alternativamente, (b) a partir de una célula somática diferenciada, en la cual las mutaciones han llevado una diferenciación. Modificada de Jaenisch y Young, 2008.

Para las células troncales de cáncer de mama (BrCSCs, Breast Cancer Stem Cell), existen dos teorías sobre su origen, la primera teoría propone que las BrCSCs son el resultado de la desregulación de las vías normales de auto-renovación y diferenciación de células normales, lo que resulta en células troncales cancerosas con capacidad de auto-renovación y diferenciación a multilinaje. La evidencia de esta teoría surge de las similitudes entre las células cancerosas y las CSC, ya que son altamente susceptibles a las mutaciones y la transformación oncogénica debido a su larga vida. Al-Hajj y col. (2003), proponen que es probable que las BrCSCs se originen desde células troncales mamarias o progenitoras debido a las similitudes entre el perfil de marcadores de superficie celular de las células troncales y las BrCSCs que ellos observaron (Al-Hajj y col., 2003; Ponti y col., 2005; Ginestier y col., 2007).

Una segunda teoría sugiere que BrCSCs se desarrollan a partir de la transición epitelio-mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT). Las células que han sido sometidos a EMT son susceptibles de transformación y tienen muchas características y comportamientos similares a una célula normal y las células troncales tumorales (Fig. 7). Las células y tejidos normales de carcinoma de mama expresan muchos genes asociados con células que han sufrido EMT, lo que sugiere un aumento de la tumorigenicidad en las células inducida por la EMT (Mani y col., 2008; Morel y col., 2008)

Las CSC de mama se originan a partir de células cancerosas con alteraciones en las vías que regulan auto-renovación y la diferenciación (Fig. 8). Las CSC mamarias son una pequeña subpoblación de células de mama cancerosas (0.1-1%), pero tienen un alto potencial de auto-replicarse y puede promover la carcinogénesis (Klonisch y col., 2008).

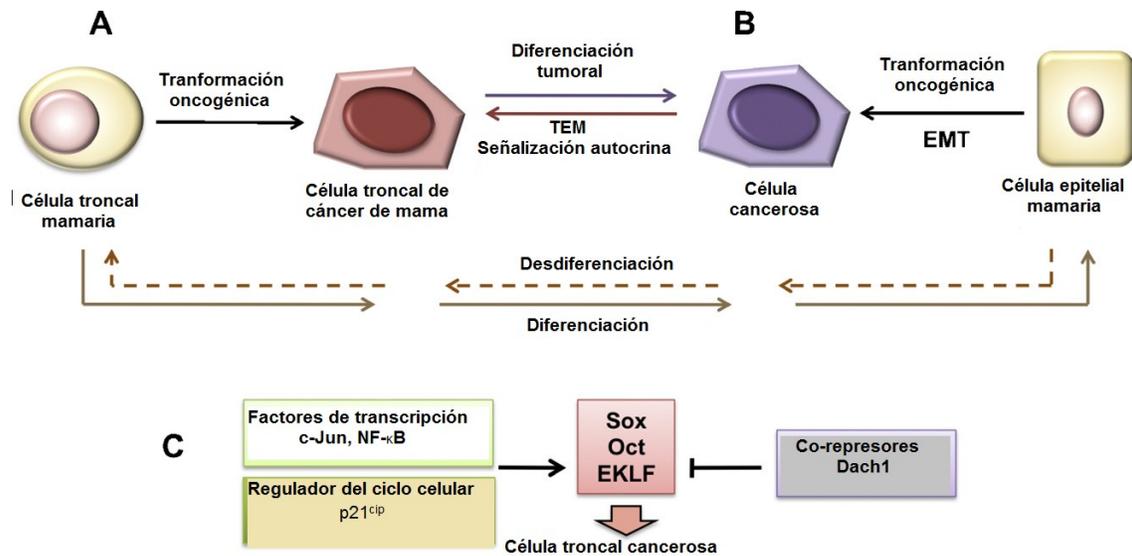


Figura 7. Origen de las células troncales de cáncer de mama. Las BCSCs pueden surgir de células mamarias normales (A) o de la falta de células troncales que han ganado la capacidad de auto-renovación (B) por la EMT y la transformación oncogénica, ambas hipótesis consideran que el fenotipo BCSCs es causado por alteraciones genéticas en la EMT. Como resultado las BCSCs, regulan las alteraciones en las rutas de señalización que controlan el ciclo celular, diferenciación y supervivencia celular (C). Modificada de Velasco-Velázquez, 2012.

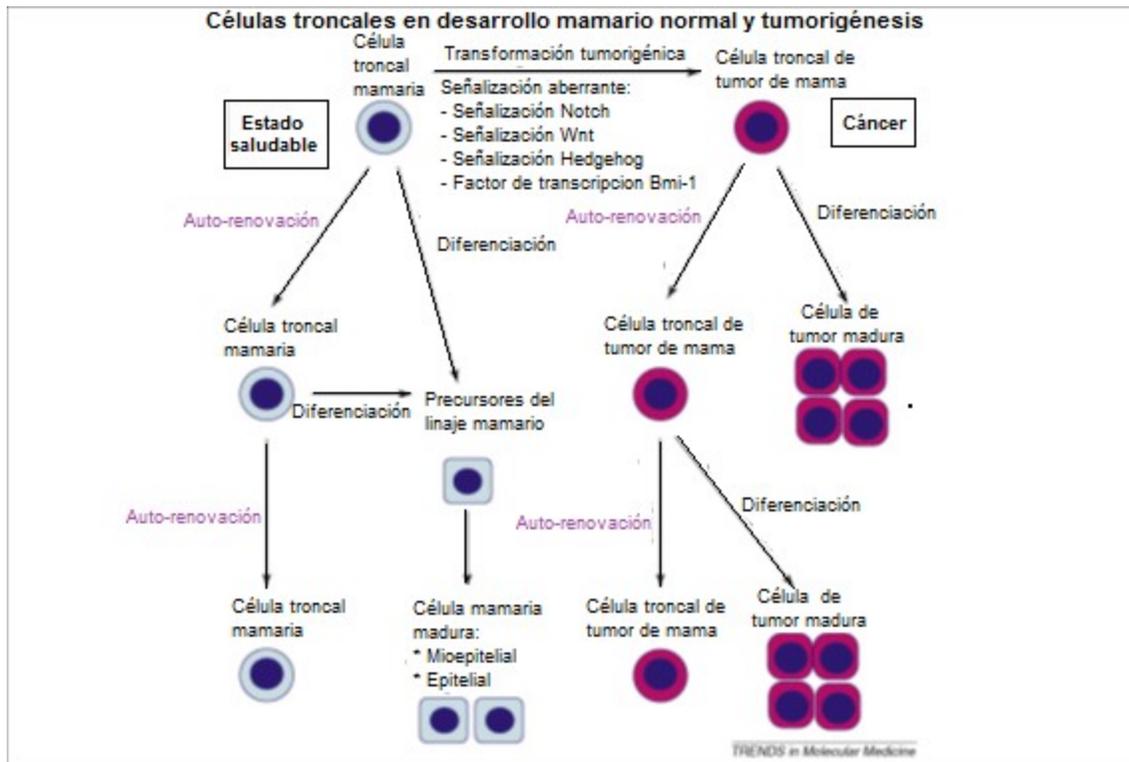


Figura 8. Implicación de las células madre en el desarrollo mamario y la tumorigénesis de mama. Las células troncales de mama normal se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y diferenciación, lo que conduce a la formación de una glándula mamaria normal. Las BCSCs se originan a partir de células madre/progenitoras de mama que han sido objeto alteraciones genéticas, pero han conservado su capacidad de auto-renovación y diferenciación. Modificada de Klonisch y col., 2008.

1. Marcadores moleculares en células troncales carcinogénicas

Se han identificado marcadores moleculares que son reguladores maestros de pluripotencia e intervienen en estas vías, los principales marcadores son: proteína de unión a octámero-4 (Oct4), factor de transcripción homeobox Nanog (Nanog), proteínas como el proto-oncogen myc (c-Myc), factor de like-krueppel-4 (Klf4), el factor de transcripción de SOX-2 (Sox2), factor de transcripción E2-alfa (TCF3), alta movilidad del grupo AT-hook de la proteína 2 (HMGA2) y lin-28A (Lin28), que están presentes en las células troncales embrionarias o células similares (Ivanova y col., 2002; Liu y col., 2006; Marson y col., 2008).

Las proteínas marcadoras de superficie en las membranas definen tipos de células. Del mismo modo, las BrCSCs, se identifican por la presencia de proteínas de superficie celular como CD44, CD47 y CD133, así como la ausencia o baja expresión de CD24, todos estos marcadores son moléculas de adhesión, Lin28 y B38, son marcadores específicos de cáncer de mama o de ovario. También se utiliza como marcador de superficie para BrCSCs a ALDH1, su presencia está relacionada con la malignidad del tumor, así como las propiedades de auto-renovación de células troncales cancerosas. Vimentina (VIM) se relaciona con la EMT y también se asocia con el potencial metastásico del cáncer. Además se utiliza como marcador recientemente EpCAM⁺, la cual se ha relacionado con el pronóstico y desarrollo del cáncer de mama (cuadro 1) (Gangopadhyay y col.; Klonisch y col., 2008; Wang y col., 2013).

Durante la última década, varios estudios se han centrado en las CSC y su aislamiento de diferentes tumores. Las CSC generalmente se localizan agrupadas en el centro del tumor. Es importante destacar que cuando se aísla una CSC humana y se inyectan en ratones para formar tumores, éstos recapitulan, al menos parcialmente a la biología de las células humanas cuando el cáncer está proliferando en los pacientes (Mehra y col., 2006).

Actualmente, las CSC se han descrito en mama, colon, páncreas, en cánceres de cabeza y cuello, próstata, ovario, hígado, melanoma y en tumores pediátricos (incluyendo tumores cerebrales). Es notable que un gran número de células troncales cancerosas de diversos tipos de cáncer se han aislado utilizando la molécula de adhesión CD44 (células CD44⁺) sola o en combinación con otros marcadores de superficie celular. El potencial de biomarcadores en células troncales cancerosas incluye otro marcador asociado con el aumento de expresión en CSC de una gran variedad de tumores malignos humanos, este es CD133 (Prominin-1). Otros marcadores incluyen CD34, CD24 y el antígeno específico epitelial (ESA) (Mehra y col., 2006).

Un método diferente para el aislamiento de CSC se basa en el fenotipo SP (población lateral), lo que resulta en una sobretinción del Hoechst. El fenotipo SP se cree que surge de un mayor flujo celular debido a expresión de transportadores de unión a ATP, una proteína responsable de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) y xenobióticos del cáncer celular. Poblaciones de CSC se han aislado sin afectar la viabilidad celular debido a que ambos enfoques se basan en marcadores de superficie, que no comprometan las propiedades de las CSC (Grichnik y col., 2006; Mehra y col., 2006; Boman y Huang, 2008).

Cuadro 1. Marcadores comúnmente usados para identificar células troncales cancerosas de mama.

Nombre del marcador	Función normal	Tipo de cáncer donde se encuentra
ALDH	Conversión de aldehído a ácido carboxílico	Mama, colon, hígado, páncreas y piel
CD44	Adhesión y migración celular, interacción célula-célula y señalización celular	Mama, colon, estomago, hígado, ovario y próstata
CD24	Maduración y proliferación de células B	Mama, estómago y páncreas
A ₆ -integrina	Adhesión celular y señalizador de superficie celular	Mama, próstata y cerebro
β-catenina	Regulador transcripcional y adhesión célula-célula	Colon, hígado, ovario, mama, pulmón y cerebro
CD29	Adhesión celular y transición epitelial mesenquimal	Mama
CD133	Regulador de la membrana celular	Cerebro, colon, pulmón, próstata y mama
C-met	Regula el crecimiento invasivo	Páncreas y mama
BMI-1	División celular y renovación de células troncales	Piel, próstata, ovario y mama
OCT-3/4	Mantener la pluripotencia de células troncales	Vejiga y mama

Modificada de Islam y col., (2015)

L. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN AFECTADAS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Un factor importante en las CSC es la adquisición de la resistencia al tratamiento y la recurrencia del cáncer a través de diferentes vías que llevan a cabo su activación. Estas vías de señalización son Notch, Wnt/ β -catenina y TGF- β , Hedgehog. Estas vías también pueden estar operando en células cancerosas que no son troncales (Islam y col., 2015).

Una de las principales vías que se ha visto que se afecta es la señalización de Wnt, la cual se lleva a cabo a través de la secreción de una familia de glicolipoproteínas, las cuales participan en mecanismos fundamentales como la proliferación celular, la polaridad celular y la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis del tejido. Se ha encontrado que aberraciones en esta vía están involucradas en la patogénesis de diferentes tipos de cáncer y su resistencia a las quimioterapias y radiación. Heidel y colegas demostraron que una inactivación genética o modulación farmacológica de β -catenina (un objetivo de la vía de Wnt) aumentó notablemente la sensibilidad de las células madre hematopoyéticas a la quimioterapia. Del mismo modo, Yeung y colaboradores, mostraron que la intervención en las vías de Wnt (por eliminación β -catenina) en las células troncales de leucemia de linaje mixto podía hacer que las células dejaran de comportarse de manera oncogénica. Además, esta eliminación hace que las células con leucemia sean altamente sensibles a la quimioterapia a través de GSK3 β . Otras vías como PI3K/Akt/mTOR y JAK/STAT, también contribuyen a las propiedades de resistencia a la terapia de CSC. Por lo tanto, las CSC pueden ser reguladas por la modulación de diferentes vías génicas y esto a su vez contribuye a la resistencia a la terapia en este tipo de células (Marson y col., 2008; MacDonald y col., 2009).

De acuerdo a lo que ya está reportado, el aumento o disminución en la regulación de microRNAs, pueden jugar un papel importante en la regulación de los genes que modulan e intervienen en las rutas de señalización para formar CSCs, así como los que participan en la EMT (Wang y col., 2013).

M. miRNAS

Los miRNAs son una familia de pequeños RNAs monocatenarios no codificantes de 21-25 nucleótidos que regulan la expresión génica al inhibir la traducción o inducir la degradación de los RNAs mensajeros (RNAm) blanco. Fueron descubiertos en 1993 por Víctor Ambros en el organismo *Caenorhabditis elegans*. Han sido identificados en vertebrados, artrópodos, plantas y organismos unicelulares. A diferencia de otras moléculas de silenciamiento como los RNAi, éstos actúan como elementos de defensa contra ácidos nucleicos exógenos, la principal función de los miRNAs es la regulación transcripcional. Además, los miRNAs son transcritos en horquillas, mientras que los RNAi son RNA dúplex y sólo son capaces de silenciar el mismo transcrito del cual se generaron, mientras que los miRNAs tienen capacidad de regular la expresión de un número variable de mensajeros que pueden ser distintos al mensajero del cual se originaron. Estimaciones del número total de miRNAs humanos calculan más de 1,000 distintas moléculas y en el año 2005 se consideró que un solo miRNA puede influir en la producción de al menos 200 proteínas distintas. De acuerdo a la potencialidad de los miRNAs para regular la expresión de múltiples genes celulares, no es ninguna sorpresa que desempeñen un papel importante en diversos procesos biológicos tales como el desarrollo, la diferenciación, proliferación, apoptosis, respuesta a estrés, el metabolismo de ácidos grasos y la secreción de insulina (Lee y col., 1993; Ambros, 2004; Bartel, 2004; Berezikov y col., 2005; Lewis y col., 2005; Molnar y col., 2007; Shabalina y Koonin, 2008).

La importancia de la regulación en la expresión de los miRNAs, ha quedado evidenciada al encontrar que cambios en la modulación de estos genes se relacionan con el cáncer y diversos padecimientos. Estas alteraciones, encontradas a través de perfiles de expresión en biopsias y la reciente descripción de miRNAs en plasma y suero humanos, demuestran su gran potencial para ser utilizados como una nueva clase de biomarcadores en el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades. (Pritchard y col., 2012; Velu y col., 2012; Zhang y col., 2012).

1. Biogénesis de los miRNAs

Para comprender cómo los miRNAs llevan a cabo su función de reguladores de la expresión génica, es necesario conocer la biogénesis de estas moléculas. Los genes que codifican a los miRNAs se localizan en regiones diferentes del genoma y su transcripción puede estar regulada independientemente por promotores específicos. Sin embargo, la mayoría de los precursores de miRNAs están presentes en intrones y tienen la misma orientación del gen hospedero, por lo que son co-transcritos como parte del RNAm. En algunos casos, los miRNAs se traslapan o están integrados con exones de los transcritos, en estos casos, están siempre en la misma orientación de transcripción y se pueden encontrar también en las regiones no-codificantes 5'- o 3'-UTRs. El resto de los miRNAs (una tercera parte de ellos) se encuentran dentro de regiones intergénicas en clústers codificados como un transcrito policistrónico, lo que hace suponer una acción coordinada en diversos procesos. Los miRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II en transcritos de 1,000 nucleótidos hasta varias kilobases, además de poseer CAP 5' y ser poliadenilados en su extremo 3'. Estos transcritos conocidos como pri-miRNAs pueden ser policistrónicos conteniendo dos o más miRNAs. El pri-miRNA contiene regiones que tienen la capacidad de formar una estructura bicatenaria de tallo burbuja de aproximadamente 80 pares de bases que dará origen al miRNA. Esta estructura es reconocida y liberada por el complejo microprocesador conformado por

Drosha, una enzima RNasaIII y la proteína DGCR8 generando precursores de 70-100 pares de bases llamados pre-miRNAs. La formación de los pre-miRNAs ocurre después de que el intrón ha sido separado del gen hospedero mediante el proceso de “splicing” (figura 9) (Denli y col., 2004; Gregory y col., 2004; Lee y col., 2004; Zhou y col., 2007).

El pre-miRNA es una secuencia conformada por una estructura de tallo burbuja con una prolongación introducida por Drosha de dos nucleótidos en su extremo 3', a la cual se le adjudican las funciones de indicar cuál es la cadena guía o de señalar la presencia de un ARN de doble cadena como elemento celular propio o bien servir como motivo de reconocimiento para la exportina 5. Estos pre-miRNA son transportados al citoplasma, mediante la exportina 5 y el cofactor Ran-GTP. En el citoplasma el pre-miRNA es procesado por DICER, otra enzima del tipo RNasaIII, que en conjunto con la proteína TRBP (Transactivating response RNA- Binding Protein) recorta por fuera de la horquilla y genera un RNA de doble cadena imperfecto (miRNA/miRNA*) (Sapre y Selth, 2013).

Posteriormente TRBP recluta la proteína argonauta 2 (AGO2) al complejo miRNA/miRNA*-DICER, formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). La cadena complementaria o estrella (*) del dúplex miRNA/miRNA* es liberada por AGO2. La estabilidad termodinámica en el extremo 5' del miRNA determina qué cadena es guía y cuál es la complementaria. Mientras la cadena pasajera es rica en C y U, la cadena guía es abundante en A y G, lo que favorece la generación de estructuras secundarias que facilitan su incorporación al complejo proteico RISC, el cual une el miRNA a su RNAm blanco, localizándolo por escaneo del transcrito. La unión del miRNA con su blanco depende de la hibridación exacta de la “región semilla” con el mensajero. Esta región comprende los nucleótidos 2-7 en la porción 5' del miRNA. Una base no apareada de forma correcta en la región semilla impide la unión del miRNA con el RNAm. Si el miRNA es unido al RNAm

de forma correcta, la regulación en la expresión se propicia con base a la complementariedad del resto de la secuencia del mRNA. Si ésta es complementaria al 100%, el RNAm blanco es degradado. Si no es así, se genera una estructura conformacional en forma de "A" que no permite que AGO2 entre en contacto directo con el RNAm, por lo cual no se lleva a cabo la degradación del transcrito pero sí la represión traduccional. Finalmente, los miRNAs podrían silenciar los RNAm mediante un mecanismo ligado al secuestro del mensajero hacia los complejos citoplásmicos denominados P-bodies o cuerpos de procesamiento donde los transcritos pueden ser degradados o almacenados (Chendrimada y col., 2005; Jakymiw y col., 2005; Rand y col., 2005).

2. Función

En general, la mayoría de los miRNAs actúan como reguladores negativos de la expresión génica, mediante represión traduccional o la degradación del ARNm a través de su unión con sus sitios blanco en la región 3' no codificante de los ARNm. De manera más específica, diversos estudios en modelos animales han revelado funciones esenciales de los miRNAs en el control del desarrollo. Algunos miRNAs exhiben un patrón de expresión temporal o tejido específico, lo cual sugiere que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de los tejidos y órganos, así como en su función y mantenimiento. (Hutvagner y Zamore, 2002; Johnston y Hobert, 2003; Chen y Lodish, 2005; Chen y col., 2006).

N. REGULACIÓN DE miRNAs

La desregulación de los miRNAs puede ocurrir en varios niveles, por ejemplo, a nivel transcripcional, donde un aumento en la transcripción de los genes del miRNA puede ser ocasionado por un incremento en el número de copias de estos genes, así como en el caso contrario, donde una alteración de los genes de miRNAs provoca una expresión disminuida. Así mismo, el estado de

metilación de los genes de miRNAs y cambios en la actividad de los factores transcripcionales que regulan su transcripción, pueden ser tan sólo algunas causas por las cuales los niveles de expresión de los miRNAs pueden verse afectados. Los miRNAs también pueden ser desregulados como resultado de anomalías específicas o globales de su maduración, principalmente por alteraciones en las proteínas AGO2 y DICER (Scott y col., 2006; Zhang y col., 2007; Ma y Weinberg, 2008).

O. miRNAs Y CÁNCER

Más de 186 genes de miRNAs se encuentran en regiones del genoma asociadas con cáncer, por ejemplo las regiones mínimas de pérdida de heterocigosidad, las regiones mínimas de amplificación y con menos frecuencia, las regiones cromosómicas de ruptura, lo que sugiere que las alteraciones genómicas, en particular la amplificación génica o eliminaciones, pueden ser un mecanismo importante que explica la desregulación en la expresión de miRNAs en esta patología (Calin y col., 2004)

P. miRNAs COMO ONCOGENES Y SUPRESORES DE TUMOR

Independientemente de la causa que origine la alteración en la expresión de un miRNA, aquellos miRNAs asociados con el desarrollo tumoral son conocidos como oncomirs. Estos pueden funcionar regulando genes que pueden actuar como oncogenes o bien como supresores de tumor. En el caso de un miRNA funcionando como oncogen podemos mencionar el caso del miR-21, el cual regula la expresión de la proteína PDCD4, cuya función es inducir la muerte celular programada. La sobreexpresión del miR-21 por una ampliación génica tiene como consecuencia la disminución de la proteína PDCD4 por lo que las células tumorales son capaces de evitar el proceso de apoptosis y favorecer la oncogénesis (Frankel y col., 2008).

Por el contrario, la baja expresión de un miRNA que funciona como supresor de tumor controlando la expresión de un proto-oncogen puede conducir a la

acumulación excesiva de su blanco favoreciendo la oncogénesis. Por ejemplo la represión del hsa-miR-17 en tumores pulmonares, tiene como consecuencia el incremento en la expresión de la proteína RAS, lo que conlleva a un incremento en la proliferación celular (Johnson y col., 2005).

Los miRNAs juegan un papel importante en los procesos de diferenciación y auto-renovación de las CSCs, puede regular la diferenciación o bien pueden suprimir directamente el estado de auto-renovación mediante la supresión de los marcadores de pluripotencia como NANOG, OCT4, Klf4 y SOX2. Nuevas terapias contra el cáncer se basan en la manipulación de miRNAs oncogénicos o supresores de tumores mediante la reducción o el aumento de sus niveles de expresión, respectivamente (Garg, 2015).

En resumen, los desequilibrios en los proto-oncogenes o supresores de tumor causados por alteraciones en miRNAs, pueden promover procesos fundamentales en la formación de tumores. Además los miRNAs con una expresión aberrante y su implicación en la regulación de células troncales cancerosas mediante el control de la división celular asimétrica, resistencia al tratamiento y la metástasis hacen a los miRNAs una herramienta de gran potencial terapéutico contra el cáncer (Zhang y col., 2007; Frankel y col., 2008; Garg, 2015).

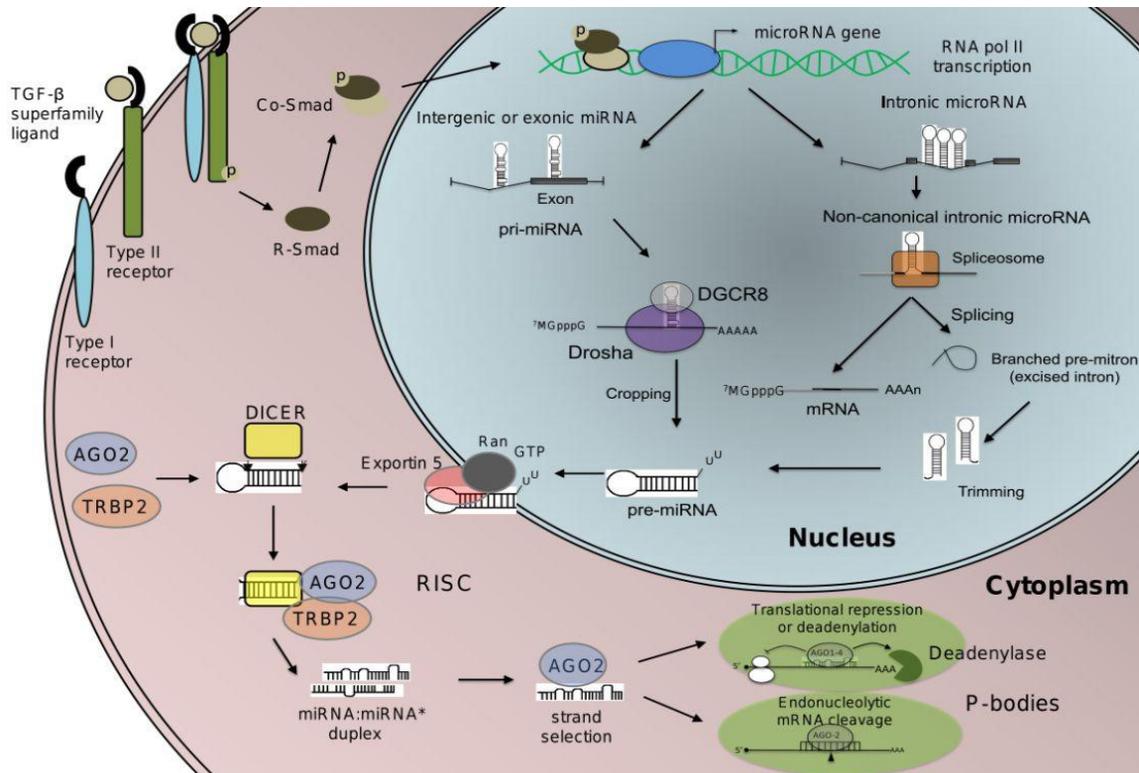


Figura 9. Biogénesis de miRNAs. A) La transcripción de los genes de miRNA podría ser regulada por factores transcripción, en respuesta a múltiples señales por ejemplo por la citocina TGF-β. B) Los microRNAs primarios (pri-miRNAs) son transcritos por la RNA polimerasa II. Los pri-miRNAs pueden ser poliadenilados y poseer CAP. C) Los pri-miRNAs son procesados por Drosha, una enzima RNasa III y convertidos a pre-miRNAs de ±70 nucleótidos, que se caracterizan por tener una estructura dúplex imperfecta. D) Los pre-miRNAs son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina-5 y Ran-GTP. E) En el citoplasma, los pre-miRNAs son transformados por Dicer F) La unión de las proteínas AGO2 y TRBP2 al complejo DICER-miRNA/miRNA* forma el complejo RISC. En este momento la proteína AGO2 libera el miRNA*. El miRNA dirige la asociación de RISC a sitios específicos en la región 3' no traducida del RNAm blanco. G) Cuando el apareamiento de bases entre el miRNA y su RNAm blanco es perfecto, la función endonucleolítica de la Argonauta 2 rompe el RNAm, llevándolo a su rápida destrucción. La complementariedad imperfecta lleva a la represión traduccional o causa inestabilidad del RNAm mediante un mecanismo de adenilación. Los mensajeros pueden ser degradados o almacenados en las estructuras denominadas P-bodies. Modificada de Fonseca-Sanchez, et al., 2013

Q. ANTECEDENTES

En 2012, se evaluó el miRNA 21 en CSC con marcadores de superficie ALDH1⁺/CD44⁺/CD24^{-low} y células parenterales de la misma línea celular MCF-7, encontrando que promueve la EMT y una sobreexpresión de HIF-1 α , ambos regulados por el miR-21 (Han y col., 2012).

En el año 2013, se analizó el miRNA let-7, encontrando que actúa como un supresor de tumores mediante la inhibición mediada por receptor de estrógenos (RE) en el crecimiento maligno celular en las células troncales del cáncer de mama RE-positivos. La supresión de RE por la regulación al alza de la expresión de let-7 puede ser una estrategia prometedora para la inhibición de la vía de señalización de RE y para la eliminación de las células troncales del cáncer, ayudando así en el tratamiento de cáncer de mama (Sun y col., 2013).

Lim y col en 2013, estudiaron la familia de miR-200, demostrando que juega un papel crucial en la transición entre fenotipos de células troncales y no troncales mediante el silenciamiento del grupo miR-200b-200a-429, principalmente a través de modificaciones de las histonas mediada por Polycomb mientras que el grupo miR-200c-141 fue reprimido por la metilación del ADN, mostrando así que mediante epigenética se puede regular cada gen blanco a través de la familia de miR-200 (Lim y col., 2013)

En 2014, se evaluó el miR-140 en carcinoma ductal invasivo, observando que es fundamental para la auto-renovación de las CSC y la formación de tumores *in vivo*, también se encontró que con terapias dirigidas y la restauración del miR-140 se logra disminuir el riesgo de carcinoma ductal, además se encontraron que los genes SOX9 y ALDH1 son blancos directos de éste (Li y col., 2014)

En el año 2014, se analizó el miR-7 en la líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se observó una sobreexpresión relacionada con la invasión y metástasis

de células inhibidas, demostrando que el miR-7 es un supresor de tumores y que la sobreexpresión de miR-7 pueden emplearse como una buena estrategia para el tratamiento de cáncer de mama invasivo (Zhang y col., 2014).

En 2014, se evaluaron los niveles de expresión de la familia miR-200, miR-9 y miR-155 mediante qRT-PCR. Se estudiaron células troncales cancerosas de diferentes subtipos con el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ y ALDH1⁺, la expresión de marcadores de transición epitelial mesenquimal (EMT), expresión de vimentina y pérdida de E-cadherina, fueron evaluados por inmunohistoquímica. El miR-9 fue mayormente expresado en los subtipos HER2⁺ y triple negativo que en los subtipos luminales. Su nivel de expresión fue significativamente mayor en los tumores con la etapa alta, grado histológico alto, la sobreexpresión de p53 y alto índice de proliferación. La expresión de miR-9 también fue mayor en los tumores que tienen células que muestran el fenotipo CD44⁺/CD24⁻, la expresión de vimentina y la pérdida de expresión de E-cadherina. Mostrando así que la sobreexpresión de miR-9 se encuentra en los tumores con fenotipos agresivos y se asocia con un mal pronóstico en cáncer de mama, lo que sugiere que puede servir como un biomarcador potencial para la progresión del cáncer de mama y un objetivo para el tratamiento (Gwak y col., 2014).

Shang y col., en el 2014, estudiaron el miRNA-100 y su papel en la auto-renovación de las células troncales cancerosas. Se encontró que los niveles de expresión se relacionan con miR-100 en el estado de diferenciación celular. Utilizando un lentivirus inducible por tetraciclina para elevar la expresión de miR-100 en las células humanas, se encontró que los niveles crecientes miR-100 disminuyeron la producción de BrCSCs. Este efecto se correlacionó con una inhibición de la proliferación de células cancerosas *in vitro* y en xenoinjertos tumorales de ratón, debido a que disminuyó la expresión de los genes reguladores de CSC como SMARCA5, SMARCD1 y BMPR2. miR-100 bloqueó

completamente el crecimiento tumoral y la formación de metástasis (Deng y col., 2014).

En 2014, se analizó el miR-142 y miR-150 que se encuentra en BrCSCs humanas y se comparó con las células de cáncer de mama no tumorigénicas. En este estudio, se mostró que el miR-142 recluta de manera eficiente el ARNm de APC a un complejo de silenciamiento inducido por ARN, activando la vía de señalización Wnt en una forma dependiente de la represión de APC y así se activa la expresión de miR-150. Estos resultados sugieren que en algunos tumores, miR-142 regula las propiedades de BrCSC, al menos mediante la activación de la vía de señalización de Wnt y la expresión de miR-150 (Isobe y col., 2014).

En el año 2015, se confirmó que el miR-34a está directa y funcionalmente dirigiendo la vía de señalización Notch1 en células MCF-7. Se mostró que el miR-34a regula negativamente la proliferación celular, la migración y la propagación de células así como la invasión en células troncales de cáncer de mama por la sobreexpresión de Notch1. Esto indica que miR-34a inhibió a las CSC y aumentó la quimiosensibilidad a paclitaxel (PTX) parcialmente por regulación negativa de la vía de Notch1, lo que sugiere que miR-34a/Notch1 juegan un papel importante en la regulación de las células troncales de cáncer de mama (Kang y col., 2015)

En 2015, estudiaron al miRNA-125a en la línea celular MCF-7 y se determinó que regula indirectamente TAZ, una molécula efectora en la vía de Hippo, a través del receptor del factor inhibidor de la leucemia (LIFR). La inhibición de miR-125a en células de cáncer de mama condujo a una reducción significativa en las CSC. Por el contrario, la mayor expresión de miR-125a en células malignas epiteliales de mama resultó en una expansión significativa de células madre. La ganancia y pérdida de función de LIFR está directamente correlacionada con la inhibición y la sobreexpresión de miR-125a,

respectivamente. La modulación de miR-125a condujo a un cambio en la actividad de TAZ y su localización subcelular. Además, se demostró que miR-125a está influenciando a las células troncales mediante la regulación de la señalización a través Hippo-LIFR, para su conversión a células de cáncer de mama (Nandy y col., 2015).

L. Wang y col., en 2015, analizaron la proteína Bmi-1, que está desregulada en el cáncer de mama y el efecto de miR-495 en la progresión de este cáncer, en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se encontró que el miR-495, es un regulador previsto de Bmi-1, ya que disminuye su expresión con frecuencia en las células y tejidos de mama malignos. En cambio la sobreexpresión de miR-495 suprime significativamente la proliferación de células de cáncer de mama y tumorigenicidad mediante arresto en la fase G1-S. Un análisis más detallado reveló que el miR-495 dirigido por Bmi-1 a través de su región no traducida 3' podría neutralizar el efecto supresor de miR-495 en la proliferación celular y la tumorigenicidad de cáncer de mama *in vivo* y la supresión de Bmi-1 en cáncer de mama Wang y col., (2015).

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, donde el cáncer de mama es la neoplasia de mayor incidencia y mortalidad entre mujeres del mundo. Los miRNAs como reguladores negativos de la expresión génica han adquirido gran relevancia en el estudio del cáncer. Regulan la progresión tumoral, apoptosis, resistencia al tratamiento, senescencia, ciclo celular, reparación de ADN, diferenciación, proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis. En particular, la apoptosis, resistencia al tratamiento, reparación de ADN y senescencia representan un proceso mediante el cual las células carcinogénicas logran sobrevivir evadiendo estos mecanismos, lo cual promueve el crecimiento tumoral. Por lo cual, son un punto clave en la resistencia a terapias para atacar dicha enfermedad. Sin embargo, el papel de los miRNAs en dichos procesos en células troncales cancerosas no ha sido bien establecido, por lo que sigue siendo un tópico de interés en oncología molecular. En el presente trabajo proponemos analizar la expresión de 667 microRNAs en una subpoblación celular con un inmunofenotipo CD44⁺/CD24^{-low} de cáncer de mama que posee propiedades de células troncales. El análisis de uno de los genes blanco de los miRNAs desregulados nos permitirá establecer su participación en el mantenimiento del fenotipo troncal y definir posibles bancos terapéuticos.

V. HIPÓTESIS

El mantenimiento del fenotipo troncal en la subpoblación de células troncales cancerosas (CD44⁺/CD24^{-/low}) aisladas a partir de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama es regulado por cambios de expresión de microRNAs.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Identificar microRNAs desregulados en las células troncales MCF-7 (CD44⁺) de cáncer de mama.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar células troncales cancerosas CD44⁺/CD24^{-low} a partir de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.
2. Analizar la expresión del miRNAoma (667 miRNAs) de las células CD44⁺/CD24^{-low} y la línea celular parental MCF-7.
3. Definir mediante análisis bioinformático los procesos y rutas celulares modulados por los microRNAs alterados.
4. Realizar el estudio de 1 miRNA desregulado en las células MCF-7 con potencial función en el mantenimiento del fenotipo troncal.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA MCF-7 Y CÉLULAS CD44⁺/CD24^{-low}

Las células MCF-7 fueron cultivadas con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies), suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂, para el mantenimiento del cultivo celular se realizaron pases cuando la confluencia alcanzaba el 90%. Para esto, se desechaba el medio de cultivo, lavando con 2 mL de PBS frío a pH 7.0 y se despegaron las células con 1.5 mL de PBS pH 7.0 adicionado con EDTA 0.2% estéril, a las cuales se les agregaban 64 µL de tripsina al 0.25%. Se incubaron a 37°C por 3 min y se despegaron las células de la caja con golpes suaves, para después disgregarse con la pipeta y cuantificar el número de células. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio de cultivo DMEM complementado a 37°C inoculando nuevamente en botellas de cultivo desechables de 25 cm². Para los distintos ensayos realizados en este proyecto, las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 90%.

B. AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES A PARTIR DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7

Se partió de un cultivo celular *in vitro* de la línea celular MCF-7, la cual fue cultivada en medio DMEM con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 1% penicilina/estreptomicina. A una temperatura de 37°C y una atmósfera con CO₂ al 5%. Las células no adherentes se eliminaron después de 5-7 días, eliminando el medio cada 3 días. Cuando el cultivo alcanzó el 90% de confluencia, las células se recuperó utilizando 0.125% de tripsina/PBS-EDTA y otras se sembrarán a 5x10⁴ células/cm² para expandir los cultivos.

1. Citometría de flujo y clasificación celular

Después de la separación usando 0.125% de tripsina/EDTA, las células troncales se lavaron una vez con 0.2% de BSA y 0.1% NaN₃-PBS. Esta suspensión celular fue teñida con los siguientes anticuerpos: CD24 conjugado con APC y CD44 con ficoeritrina (PE), para identificar las poblaciones, para hacer la selección se realizó un gráfico de puntos de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC). Los controles de isotipo apropiados para cada anticuerpo se utilizaron para eliminar cualquier unión no específica. Las células se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad y luego se fijaron con paraformaldehído para ser adquiridas con un citómetro de flujo BD FACS Aria, empleando el Software FlowJo para el análisis de los datos (Árbol Star, Inc.).

Las células muertas, restos celulares, dobletes y agregados se excluyeron por adelante y dispersión lateral, la anchura del impulso gating e isotipo de los controles se aplicarán en paralelo. Las células aisladas se expandieron para obtener células adecuadas para los ensayos posteriores.

C. EXTRACCIÓN DE ARN DE LA SUBPOBLACIÓN MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} Y MCF-7 PARENTAL

Para la extracción de ARN total de líneas celulares, cultivadas en frascos de 25 cm², se esperó a que estas llegaran a un 80% de confluencia, una vez que se observó esto, se despegaron las células adicionando al frasco 1.5 ml de PBS-EDTA pH 7.0 y 64 µL de tripsina 0.25 % (Gibco), se incubaron durante 5 min a 37°C, pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1,200 rpm a 4°C durante 5 minutos posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 ml de PBS pH 7.0, se centrifugó nuevamente a 1,200 rpm a 4°C durante 5 minutos y se tiró el sobrenadante. A la pastilla de células obtenida se le agregó 1mL de TRIzol y se mezcló por pipeteo posteriormente se recuperó el lisado celular en un micro tubo cónico de 1.5 ml y se incubó durante

5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 μL de cloroformo por cada mL de trizol utilizado y se mezcló por agitación vigorosa durante 15 segundos, posterior a esto se incubó el microtubo durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,500 rpm por 25 min a 4°C. Después de la centrifugación, se recuperaron alrededor de 400-450 μL de la fase acuosa superior mediante pipeteo evitando mezclar con las otra fases y se añadieron a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se adicionaron 500 μL de isopropanol para precipitar el ARN y se incubó en hielo durante 20 minutos, luego se realizó una centrifugación a 12,500 rpm durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 75% y se resuspendió la pastilla, finalmente se realizó otra centrifugación a 12,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante un lapso de 5-10 minutos. Una vez que se obtuvo la pastilla el ARN fue resuspendido en un volumen de 20 μl de agua libre de nucleasas que previamente fue calentada a 55°C. El ARN obtenido fue dividido en 2 alícuotas cuantificado y almacenado a -80°C hasta su análisis.

D. CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN TOTAL PURIFICADO.

La cuantificación del ARN total se realizó en un equipo nanodrop. Las moléculas de ARN tenían una relación de densidad óptica 260/280 mayor de 1.8 lo cual indica que el ARN se encuentra libre de proteínas que pudieran interferir con nuestros análisis o afectar la estabilidad del ARN. A partir de los datos obtenidos se calcularán las concentraciones en ng/ μL por medio de la fórmula (1).

$$(1) \quad \text{Conc. de ARN [ng/\mu L]} = (A_{260 \text{ nm}})(FD)(FC)$$

Siendo el FD el factor de dilución de 50 y FC el factor de conversión de 40 ng/ μL para una unidad de absorbancia de ARN.

Las purezas de las muestras se determinaron con la fórmula (2), tomándose como pureza aceptable para nuestros fines de estudio, valores superiores a 1.8 e inferiores a 2.3.

$$(2) \quad \text{Pureza} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}}}$$

La integridad se verificó en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con Gel-Red 0.5 X resueltos a 100 V por 30 min.

E. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDAD

1. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit ImProm Reverse Transcription System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, el sistema de transcripción inversa se realizó en un tubo de Eppendorf de 1,5 mL estéril sobre hielo. Se mezclaron 4 μL del buffer ImProm-II™ 5X, 1.2 μL de MgCl_2 1.5 mM, 0.25 μL de cada dNTP's 0.5 mM cada uno, 1 μL de la enzima transcriptasa reversa ImProm-II™ y se llevó a un volumen final de 15 μL la reacción con agua libre de nucleasas, adicionar al final 5 μL de RNA para obtener un volumen final de 20 μL por reacción. Se incubó a 25 °C durante 5 min, posteriormente se mantuvo a 42 °C durante 1 hora, la transcriptasa inversa debe inactivarse térmicamente antes de la amplificación. Para esto se incubaron los tubos de reacción en una temperatura de 70 °C durante 15 minutos, el cDNA se almacenó a -20 °C.

2. Cuantificación de la expresión de los genes de pluripotencialidad

Para realizar la amplificación se utilizaron 250 ng de cDNA, 10 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl_2 , 10 picomoles de cada iniciador y 0.5 U/mL de polimerasa Taq DNA (Promega). El volumen de reacción se llevó a 25 mL con agua tratada con DEPC. La reacción se realizó en un termociclador Maxy-génica con Iso-temp cubren (Stuart Scientific), y se llevaron a cabo programas

de PCR de acuerdo con las especificaciones de los iniciadores y utilizando el esquema de amplificación estándar de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30-35 ciclos de 95°C durante 30s, una temperatura específica de fusión durante 30 s, 72°C durante 30s y una elongación final a 72°C durante 5 min. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se observaron en un transiluminador UV. El gen GAPDH se amplificó como un control interno. Las relaciones representan la expresión de cada ARNm.

3. Análisis de la expresión proteínica de genes específicos de pluripotencialidad

a) Extracción de proteínas

Las células se lavaron con PBS frío y después se lisaron a temperatura ambiente durante 10 min en 1 mL de Tampón RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1 mM de EGTA, 1% NP-40, 1% de desoxicolato de sodio, 2,5 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de b-glicerofosfato, 1 mM de Na₃VO₄, y 1 mg / ml de leupeptina) que contiene el kit Complete Protease Inhibitor™ (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM, 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml de aprotinina, 5 mg/ml de pepstatina, 10 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja, y 0,5 mM de ditiotreitól; ROCHE, Molecular Biochemicals).

b) Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos totales, se utilizó el método de Bradford. La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (1 mg/ml). Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se obtuvieron sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras en la ecuación de la recta elaborada a partir de los valores de la curva estándar. La ecuación es: $y = m x + b$, donde y es la absorbancia 595 nm, m es la pendiente, x es la concentración de proteínas y b es la ordenada al origen.

c) Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó a una concentración de acrilamida del 12% en el gel separador y al 5% en el gel concentrador. Para correr el gel se empleó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

d) Ensayo de western blot para las proteínas SOX2, NANOG y OCT3/4

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad). Los geles, membranas, papeles Whatman y esponjas se incubaron 15 min en solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y, 20 % de metanol). Posteriormente se armó el cassette y sumergió en solución de transferencia y se transfirió 100 mA durante 1 h en hielo. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó la tinción con rojo Ponceau y se lavó la membrana con PBS 1x pH 7.4.

Las membranas se secaron y bloquearon durante 60 min a temperatura ambiente con TBST-1x que contiene 5% de BSA (Sigma-Aldrich) y después se incubaron durante la noche a 4 °C con SOX2 de ratón anti-humano (Santa Cruz; 1: 300), NANOG de ratón anti-humano (Santa Cruz; 1: 300), OCT3/4 de ratón anti-humano (Santa Cruz; 1:300) y actina de ratón anti-humano (Santa Cruz; 1:300). Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces en TBST-1X y se incubó con un anticuerpo de cabra antiratón en una dilución 1:20,000 (BioRad). El anticuerpo unido se detectó mediante la emisión de luz usando quimioluminiscencia mejorada Hyperfilm (GE Healthcare) en un equipo ChemiDoc.

F. ANÁLISIS DEL MICRORNAOMA

1. Transcripción reversa (RT) de miRNAs.

Para obtener los perfiles se realizaron RT-PCRs de miRNAs de ARN obtenido de células troncales y no troncales de la línea celular MCF-7, mediante el uso del pool de primers stem-loop RT Megaplex (Applied Biosystems), que permitió la conversión a cDNA de cientos de miRNAs maduros en una sola reacción. De manera inicial, 3 μL (60-100 ng/l) de ARN total, fueron sumados a la mezcla que contenía: 0.80 μL de primers RT Megaplex 10X; 0.20 μL de dNTP's con dTTP (100mM); 1.5 μL de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/l); 0.80 μL de buffer RT 10X; 0.90 μL de MgCl_2 (25 mM); 0.10 μL de inhibidor de RNasa (20 U/l) y 0.20 μL de H_2O libre de RNasa, que en total suman 7.5 μL por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se dejó incubar por 5 min en hielo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems), programando 40 ciclos de tres temperaturas a 16°C por 2 min; 42°C por 1 min; 50°C por 1 s; seguido de un paso de 85°C por 5 min y un paso final a 4°C.

2. Preamplificación del producto de RT.

Con el fin de detectar miRNAs que presenten un nivel muy bajo de expresión, así como de minimizar la cantidad de muestra requerida, se realizó una preamplificación previa a la detección por PCR en tiempo real. Esta consiste en una mezcla de reacción que contiene: 12.5 μL de la master mix TaqMan PreAmp (2X); 2.5 μL de los primers Megaplex PreAmp (10X); 7.5 μL de H_2O libre de nucleasas y 2.5 μL del producto de reacción, dando un volumen final de 25 μL por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se dejó incubar por 5 min en hielo. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp System 9700, programando tres pasos a 95°C por 10 min; 55°C por 2 min; 72°C por 2 min; seguido de 12 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 4 min, posteriormente continuó un paso de 99.9°C por 10 min y finalmente un paso de

4°C. El producto de la preamplificación fue diluido con 75 µL de TE pH 8.0 y analizado mediante PCR en tiempo real.

3. Perfiles de expresión de miRNAs.

Se analizó la expresión de miRNAs mediante el arreglo TaqMan MicroRNA Array v.3.0 A+B de baja densidad, (TLDA, TaqMan Low Density Array) el cual contiene dos placas con sondas TaqMan conteniendo 667 miRNAs humanos más ocho controles internos, lo que permitió evaluar de manera confiable la expresión conjunta de los miRNAs en un solo experimento. Las sondas corresponden a secuencias de miRNAs reportados en la base de datos mirBASE v10.0 de humano (<http://microrna.sanger.ac.uk./sequences/>). Para esto, 9 µL del producto diluido de la preamplificación se mezclaron con 441 µL de agua libre de RNAsas más 450 µL del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2X). El análisis se realizó en un equipo 7900 FAST de Applied Biosystems, el cual posee un bloque especial de 386 pozos para PCR en tiempo real. La reacción se llevó a cabo programando un paso a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 1 min.

4. Análisis estadístico

Los resultados se procesaron en los programas RQ Manager 1.2.1 (para realizar la conversión de datos en un archivo de texto) y DataAssist 2.0 ambos de Applied Biosystems. Este último nos permitió generar la lista de miRNAs con expresión diferencial utilizando el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los parámetros del programa se ajustaron a una Ct máxima de 35 lo que nos permitió hacer más astringentes los resultados obtenidos, utilizando además el método de normalización con la media geométrica, que considera todos los valores de distribución y es menos sensible a valores extremos. La tasa de valor de cambio o Fold Change fue representado mediante la expresión $\log_2 RQ$ lo que nos permitió interpretar de forma más clara la reducción o aumento en la

expresión de un miRNA. Se consideró como miRNAs con expresión diferencial aquellos que tenían una tasa de valor de cambio de ± 2 con respecto al control (que expresado en \log_2 , equivale a $\log_2 RQ \pm 1$) y que poseían una confianza estadística o valor de $p \leq$ de 0.5.

G. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para la actualización de los nombres de los miRNAs “estrella” se utilizó el software miRDataBase (<http://mirdb.org/miRDB/>), en la búsqueda de los blancos predichos para los miRNAs se empleó el software TargetScan Versión 5.2 (<http://www.targetscan.org>), así como la base de datos miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>), en ellos se utilizaron los parámetros que los programas generan por defecto.

La búsqueda de las vías de señalización en las cuales participan los blancos predichos se hizo con el software Diana-mirPath (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>), utilizando como parámetros la base de humanos, la predicción de TargetScan5 y realizando análisis individuales o de múltiples miRNAs según se requiera.

H. TRANSFECCIÓN DEL PRECURSOR DEL miR-583

La línea celular MCF-7 fue transfectada en placas de 6 pozos con el precursor del miR-583. Se preparó una mezcla de 150 μL de medio Opti-Mem con 9 μL del agente de Lipofectamine RNAimax™ Amine (Life Technologies) por cada pozo a transfectar y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se adicionó el pre-miRNA (30 nM) previamente diluido en 150 μL de medio Opti-Mem. La mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (2.183 mL de medio y 317 μL de la mezcla de transfección). Se transfectó como control la secuencia scramble recomendada por el fabricante bajo las mismas condiciones. La expresión relativa del miRNA de interés fue evaluada a las 48 h, mediante qRT-PCR en tiempo real utilizando el Stem-loop RT MicroRNA assay para el miRNA y como normalizador el sn/snoRNA RNU44.

Para ello se aisló el ARN total de las células transfectadas y controles utilizando el método estándar de Trizol. Se utilizaron 100 ng de ARN total para las reacciones de transcripción reversa y amplificación.

I. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

1. Extracción de proteínas de células transfectadas con el pre-miR-583

Para la obtención de extractos proteicos de células transfectadas con el pre-miR-583, con la secuencia Scramble y con el agente transfectante (controles), se despegaron las células de los pocillos de cultivo celular con tripsina 0.25%/PBS-EDTA como se describió anteriormente hasta obtener una pastilla de células, la cual se lavó una vez con PBS frío, y se resuspendió en el buffer de lisis TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA) suplementado con un cóctel de inhibidores de serínproteasas, cisteínproteasas y metaloproteasas 15X (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) (960 μ L de buffer más 40 μ L de inhibidor de proteasas) a 4°C durante 15 min en agitación. Posteriormente, se centrifugó la suspensión de células-buffer a 12,500 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante del cual se hicieron alícuotas y almacenaron a -80°C hasta su cuantificación y análisis.

J. Ensayos de inmunodetección

Los cambios en la expresión de la proteína GSK3 β , se evaluó mediante ensayos Western Blot. Para ello 50 ng de los extractos obtenidos por la lisis de las células transfectadas fueron cargados en geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras previamente calentadas a 100°C y diluidas en buffer de carga 1X con β -mercaptoetanol, se sometieron a electroforesis a una velocidad inicial de 60 volts (hasta alcanzar el gel stacking) y posteriormente a 150 volts. Los geles se equilibraron durante 10 min, posteriormente se transfirieron en pares a membranas de PVDF (Bio-Rad), empleando la cámara semi-húmeda (Bio-Rad) con voltaje de 25 volts durante 40 min. Las membranas donde fueron

transferidas las proteínas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4) durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con PBS 1x-Tween20 (0.05%) durante 5 min, tres veces, luego se agregó el anticuerpo primario GSK3 β de conejo anti-humano (Santa Cruz) en una dilución 1:2500 en PBS 1x-Tween20 0.05% y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS 1x- Tween20 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa diluido a 1:2500 en PBS 1X-tween 20 al 0.05% y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Posterior a la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron cinco veces durante 3 min con PBS 1x y se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 5 min con el reactivo ECL (Amhersham Pharmacia Biotech, USA). Posteriormente cada membrana fue leída en un equipo ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). A las bandas detectadas en las membranas se les realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo Cientific).

K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los experimentos se expresaron como un promedio \pm de su error estándar. Se utilizó la prueba estadística T-Student, con el software IBM SPSS v.20 tomando como significativos los valores con una $p \leq 0.05$.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS MCF-7 CD44⁺/CD24^{-/low}

Mediante el uso de FACS, se identificó una pequeña subpoblación de células, a través de un análisis de escala lineal para SSC/FSC, se obtuvieron primeramente 2 subpoblaciones claramente identificadas: las células más pequeñas con una baja granularidad y células de mayor tamaño con una mayor granularidad.

Al analizar la presencia de marcadores de células troncales sobre las células., y basados la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD24 característicos de células troncales normales de epitelio mamario, observamos que sólo el 12.3% de la antígenos CD44 está presente en las población de células de tamaño pequeño y que el 87.7% no expresa CD44 en su superficie (CD44⁻). En cuanto a la población mayor, se determinó que tenía un 73.8% de fenotipo CD24^{-/low} y el 26.2 % expresaron el marcador CD24⁺ (Figura 10).

Del total de la línea celular sólo un 1.7% de las células presentaban un fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low}, adicionalmente se analizó la expresión de CD34, el cual es un marcador de células troncales hematopoyéticas para asegurar aún más que presentaban un fenotipo troncal las células aisladas, las células troncales cancerosas obtenidas mostraron un fenotipo CD34⁻, por lo cual son células troncales pero no comparten características de células troncales hematopoyéticas.

La subpoblación de células que se obtuvo al realizar el sorting celular a la línea MCF-7, presentaba una mayor adherencia al plástico a diferencia de la línea parental MCF-7, esto es una característica de células troncales, además presentaban una proliferación mayor, por lo cual alcanzaban una confluencia

del 80% más rápidamente. Además ambos tipos de células mostraron una morfología muy similar, por lo cual basados en esta característica no es posible identificarlas (Figura 11).

De acuerdo a lo reportado por Shang y col (2014), en líneas celulares de cáncer de mama existen pequeñas subpoblaciones de células troncales cancerosas, que pueden ser aisladas mediante marcadores de superficie, algunos de éstos son específicos, es decir dependen del tipo de células cancerosas con las que se esté trabajando. De manera similar a lo observado en nuestro estudio, Shang y col aislaron una pequeña subpoblación de células troncales cancerosas de mama de la línea celular MCF-7 con un fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low}.

Nuestros resultados también concuerdan con lo reportado por Han y col. (2012), ya que también aislaron CSCs con marcadores de superficie CD44⁺/CD24^{-/low} de la línea celular MCF-7.

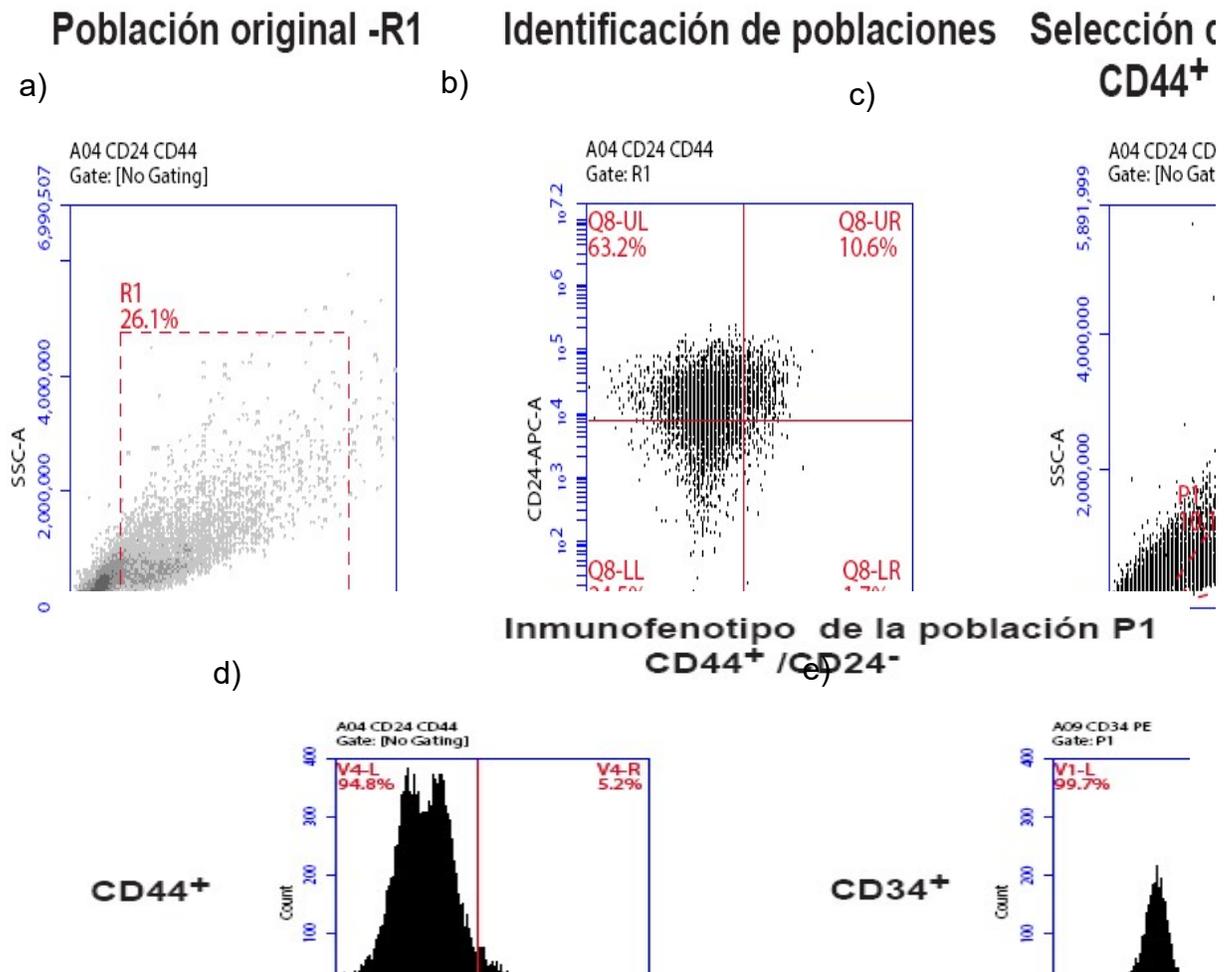


Figura 10. Análisis de puntos en una escala lineal de la línea celular MCF-7. a) El recuadro rojo de línea punteada indica la población principal. b) Se identifican las dos poblaciones celulares una pequeña con una baja granularidad y la segunda grande con alta granularidad. c) Se observa la población celular que expresa los marcadores CD44 y CD24, solo el 1.7%, en el cuarto recuadro d) se observa la población que expresa solo CD44 y e) La subpoblación que no expresa CD34.

Células MCF-7



Células troncales CD24⁺/CD24^{-low}



Figura 11. Cultivo celular de la línea MCF-7 de cáncer de mama y células troncales MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}.

B. MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDAD EN CÉLULAS MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}

Los factores de transcripción OCT3/4, NANOG, SOX2 y FOXD3 juegan un papel crítico en mantenimiento de la pluripotencia; por lo tanto, se analizaron sus niveles de expresión a las células MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} y parentales través de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Nuestros resultados demostraron que la expresión del ARNm de NANOG disminuía en células troncales en comparación con las células parentales, al igual que la expresión del ARNm de OCT3/4 sin embargo, la expresión del ARNm de SOX2 se mantuvo constante en ambos tipos de células (figura 12). Una vez realizado la PCR, se realizó un análisis de densitometría a las bandas obtenidas para cuantificar los niveles de expresión de los factores de transcripción y no se observó diferencia significativa en la expresión de genes asociados a troncalidad (Figura 13).

Para establecer si los niveles de expresión de ARNm detectados de los genes de OCT3/4, NANOG y SOX2 estaban correlacionados con sus niveles de expresión de proteína se realizó Western blot de extractos de proteínas totales. Como se muestra en la figura 14, la expresión de la proteína de OCT3/4 es un poco mayor la expresión en células MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} que en células parentales pero aún así no se observó una diferencia estadísticamente significativa. En el caso de la expresión de la proteína NANOG se mantuvo de igual manera que en la expresión del ARNm, es decir, menos expresión de proteína en células MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} que en parentales, de igual manera no se mostró una diferencia estadísticamente significativa. Respecto a la proteína de SOX2, se observó una expresión igual al ARNm, manteniendo sus niveles de expresión en ambos tipos de células. Para determinar si había diferencia estadística entre ambos tipos de células se realizó un análisis de densitometría a las bandas obtenidas por western blot. Además se realizó un análisis de densitometría a las bandas obtenidas para cuantificar la expresión

de proteínas de factores de transcripción, donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre células troncales y células parentales (Figura 15).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Shanshan y col. (2013), en los cuales no se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión entre células troncales cancerosas y células parentales de genes maestros encargados de mantener el fenotipo troncal como SOX2, NANOG y OCT3/4. Cabe mencionar que el análisis del grupo de investigación de Shanshan se realizó en varias líneas celulares.

Respecto a la expresión de la proteína OCT3/4 Fei y col. (2012) reportaron una diferencia mínima de la expresión de esta proteína en células troncales y células parentales por lo cual esta diferencia no resulta significativa, lo cual coincide con nuestros resultados.

Klonisch y col. (2008), donde ellos encontraron que la expresión de los factores de transcripción NANOG, SOX2 y OCT3/4 es diferente en células troncales cancerosas y células no troncales pero si cancerosas, lo cual difiere a lo observado en nuestro estudio.

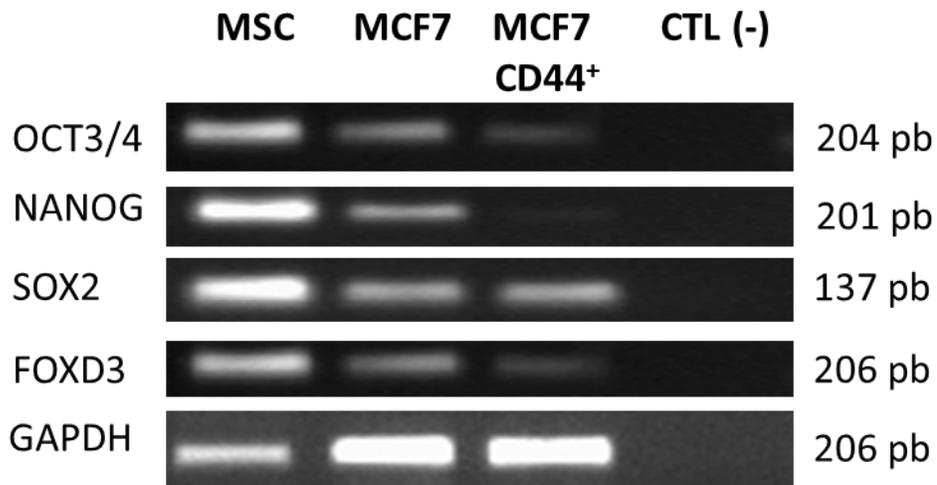


Figura 12. Expresión de factores de transcripción en la subpoblación mcf7 CD44⁺/CD24^{-low}. Se analizó mediante RT-PCR punto final la expresión de los factores de transcripción OCT3/4, NANOG, SOX2 y FOXD3 en la subpoblación CD44⁺/CD24^{-low} y la línea celular parental MCF7, normalizando los valores con la expresión de GAPDH. Se muestra como control positivo la expresión en células troncales mesenquimales (MSC) y el control negativo (CTL (-)). Del lado derecho se señala el tamaño de los fragmentos obtenidos de acuerdo a lo esperado.

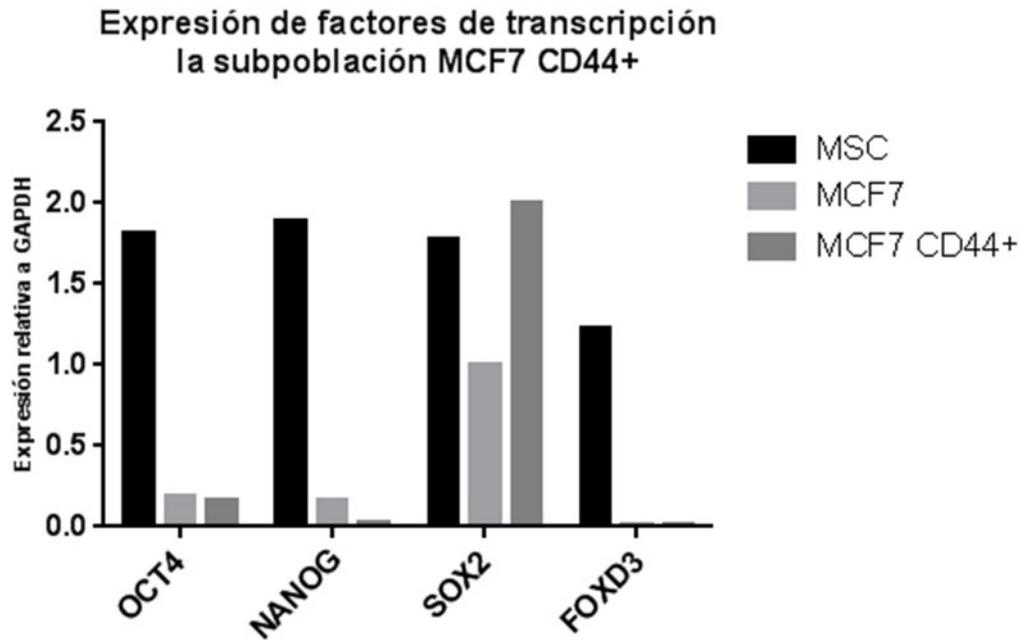


Figura 13. Valores normalizados de densitometría de la expresión de factores de transcripción en la subpoblación MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}. No se observó una diferencia en la expresión entre células MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} y MCF-7 parental. Se utilizó como control positivo de expresión de los factores de transcripción células mesenquimales.

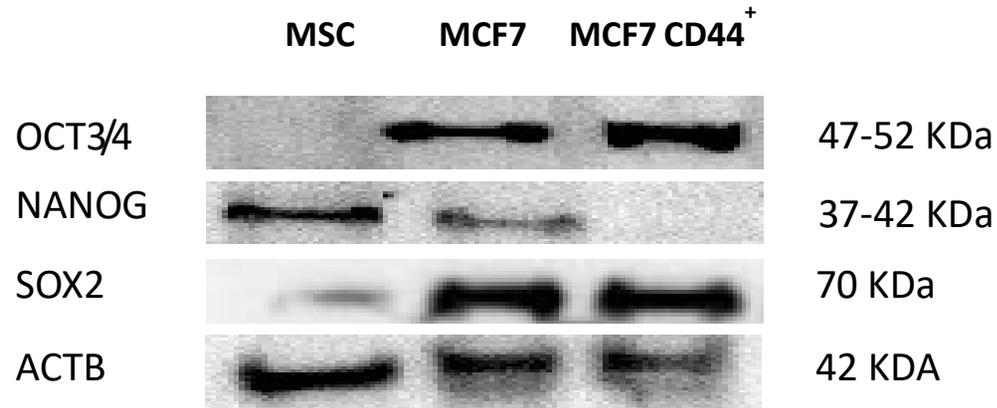


FIGURA. Expresión de proteínas en la subpoblación MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}. Se analizó mediante western blot la expresión de proteínas de los factores OCT3/4, NANOG y SOX2 en la subpoblación CD44⁺ y la línea celular parental MCF7, normalizando los valores con la expresión de beta actina. Se muestra como control positivo la expresión en células troncales mesenquimales (MSC). Del lado derecho se señala el tamaño de los fragmentos obtenidos de acuerdo a lo esperado.

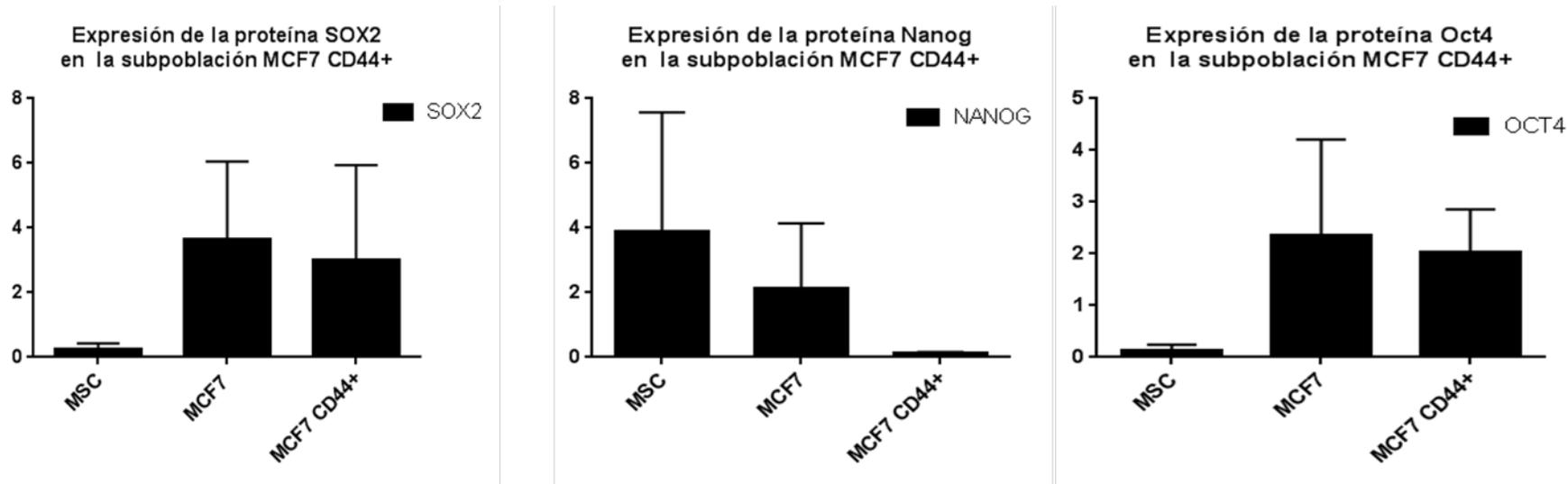


Figura. Valores normalizados de densitometría de la expresión de las proteínas de factores de transcripción en la subpoblación MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}. No se observa una diferencia en la expresión entre células MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} y MCF-7 parental. Se utilizó como control positivo de expresión de los factores de transcripción células mesenquimales (MSC).

C. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MIRNAS EN CÉLULAS MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} Y CÉLULAS MCF-7

Los 42 miRNAs que presentaron cambios significativos en su expresión fueron visualizados a través de un gráfico de volcán. Este es la representación de la tasa de valor de cambio expresada en (\log_2 RQ) en relación con el valor de P (expresado en \log_{10}), lo que nos permite observar los miRNAs que modulan su expresión por arriba de línea de corte que en este caso fue de $p=0.05$. Con este tipo de gráfico visualizamos la totalidad de los miRNAs que se modularon en el perfil de expresión y los 41 miRNAs que superan la línea de corte con una tasa de valor de cambio ± 2 y un valor de $p=0.05$ (figura 16). Con este tipo de gráfico visualizamos la totalidad de los miRNAs que se modularon en el perfil de expresión y los 42 miRNAs que superan la línea de corte con una tasa de valor de cambio ± 2 y un valor de $p \leq 0.05$.

Entre los miRNAs modulados significativamente figuran algunos previamente reportados en cáncer de mama tales como miR-100, miR-145, miR-543, miR-125b y miR-18b. La lista de los 42 miRNAs modulados en células troncales MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} se muestra en la tabla 1. En ella se puede apreciar el nombre del miRNA, su tasa de valor de cambio (Fold Change= \log_2 RQ) y el valor de p .

En diversos grupos de investigación se han analizado perfiles de miRNAs para determinar la función de alguno de ellos en células troncales cancerosas, tal es el caso de Liu y col. (2015), que analizaron un perfil de miRNAs en células troncales CD44⁺/CD24^{-low} provenientes de la línea celular MCF-7 y al igual que nuestros resultados se muestra que la mayoría de los miRNAs desregulados presentan una baja expresión.

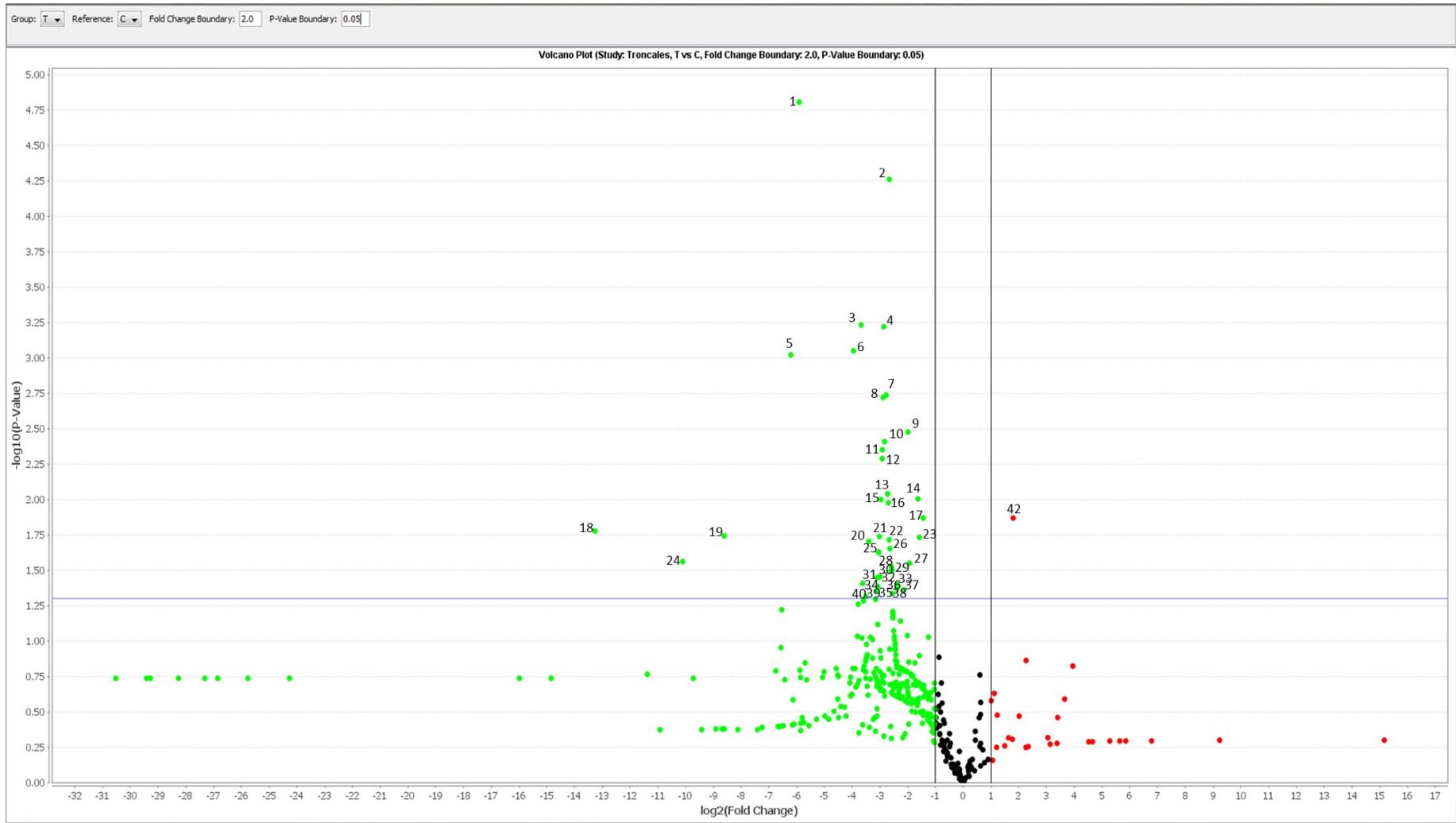


Figura 16. Expresión diferencial de miRNAs en células troncales CD44⁺/CD24^{-low}. La figura muestra las representaciones gráficas del perfil de expresión de miRNAs. El gráfico volcán que muestra la totalidad de miRNAs en el perfil de expresión y las líneas de corte de tasa de cambio ($\log_2 \pm 1 = \text{Fold change } 2$) y valor de P ($-\log_{10} \text{ P-value}$).

Tabla 1. MicroRNAs modulados en la subpoblación de células troncales MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} analizados por TLDA.

miRNAs reprimidos en células troncales cancerosas MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}					
miR-409-3p	miR-583	miR-221-5p	miR-212-3p	miR-18b-5p	miR-138-5p
miR-181a-2-3p	mir-181a-1	miR-520D-3p	miR-1227-5p	miR-105-3p	miR-17
miR-770-5p	miR-488-5p	miR-210	miR-628-5p	miR-564	miR-21-3p
miR-543	miR-490	miR-100-5p	miR-541-5p	miR-376b-3p	miR-424-3p
let-7b-3p	miR-125b-5p	let-7C-3p	miR-302a-5p	miR-15a-3p	miR-22-5p
miR-222-5p	miR-100-3p	miR-609	miR-621	miR-517-5p	miR-33a-3p
miR-18a-3p	miR-145-5p	miR-148a-5p	miR-572	miR-575	
miRNAs sobreexpresados en células troncales cancerosas MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low}					
let-7e-5p					

D. BLANCOS PREDICHOS Y VALIDADOS DE LOS MIRNAS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN

Existen diversos programas que pueden predecir los blancos potenciales de los miRNAs y cada uno de ellos se basa en distintos algoritmos generando blancos muy variables. Un ejemplo de ellos es el programa TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_50/) que arroja 5389 posibles blancos del miR-583, debido a que TargetScan considera el contenido de uracilos y adeninas en la secuencia, así como la proximidad de clusters y la conservación de la secuencia en diversas especies animales. En este estudio realizamos la predicción de blancos con el software TargetScan y miRDataBase, este último para la corrección de nombre de los miRNAs “estrella”.

Los resultados muestran una gran variabilidad en el número de blancos predichos para cada miRNA, por ejemplo el miR-145-5p posee 891 blancos potenciales, mientras que para el miR-17 se estiman 1,384 blancos, en el caso del miR-100 sólo se predicen 59 blancos. La totalidad de los blancos predichos para cada uno de los miRNAs fue registrada en una hoja de cálculo obteniendo un total de 104,794 blancos potenciales que pueden ser regulados por uno o más de los 42 miRNAs modulados.

En el caso de los blancos validados estos fueron obtenidos con el programa miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>). Esta base de datos considera como blancos validados sólo aquellos genes que experimentalmente han sido analizados mediante estudios de interacción entre la región semilla y su respectivo blanco. Los resultados arrojados por el programa miRecords muestran que de los 42 miRNAs modulados diez poseen blancos validados. Estos son los miRNAs miR-222-5p con dieciséis blancos validados, miR-18a-3p con uno, miR-125b-5p con sesenta y cinco, miR-145-5p con diecinueve, miR-221-5p con veinte, miR-210 con cuatro, miR-100-5p con cinco, miR-148a-5p con siete, miR-22-5p con siete y let-7e-5p con cinco. El cuadro 2 es un ejemplo

de algunos datos que fueron recopilados con estos programas y que nos permitieron crear una matriz con la totalidad de blancos predichos, misma que se tomó como base para realizar los análisis posteriores.

Se han llevado a cabo diversos análisis bioinformáticos para determinar cuáles pueden ser los posibles genes blancos de un miRNA y en qué vías de señalización participan dichos genes. Liu y col. (2015), realizaron una búsqueda y encontraron que los genes Frizzled 7 y TNKS2 podrían ser blancos del miR-1, estos genes están presentes al inicio de la ruta de Wnt/ β -Catenina, lo cual concuerda con nuestro análisis, ya que también nuestros miRNAs desregulados tienen varios genes como posibles blancos que intervienen en dicha ruta o en algunas otras que también son importantes.

Cuadro 2. Blancos predichos y validados de los miRNAs modulados en células MCF-7.

miRNA	Blanco predicho	Blanco validado
miR-543	FOXD3, TCF4, RAB5A, KDR, PAX6, GATA6, CDX2, TGIF2, NAALAD2, TNC, BAMBI, GNG10	-----
miR-145-5p	PIK3, PIK3CA, TWIST, CDH2, EPHA4, SERPING1, ABCA1, NRIP3, FGFR3, ORC1L,	MYC, IRS1, MUC1, IGF-IR, SOX9, KRT7, CCDC25
miR-138-5p	VIMENTIN, AKT1, PTCH1, LEF1, DDR2, DACH1, PBXO41, SRC, FRS2A, ZXH2, MAP2K2	-----
let-7b-3p	CD44, SOX2, FOXD3, SFRP2, TCF4	-----
miR-221-5p	OCT3/4, NANOG, FRAT2, PAX6, GATA6, CDX2, TGIF2, PIP5K1C	FOS, BIM, PIK3R1, PTEN, CDKN1C, BMF, DDIT4
miR-148a-5p	BAMBI, CDD44, ABCB5, C-MET, ITGA6, FZD4, NOTCH3	DNMT3B, NR1L2, DNMT1, MSK1, CDNK1B
miR-100-5p	LIF, mTOR, RAC1, FOXO3, FGFR3, BMP2, IGFR1	mTOR, IGF-IR, RPTOR, FGFR3, PLK1

1. Selección de un miRNA para su estudio funcional.

Los resultados obtenidos previamente mostraron la existencia de 42 miRNAs modulados de manera diferencial. Para determinar cuáles de ellos podrían estudiarse funcionalmente se utilizaron dos criterios de selección. El primer criterio fue la información existente de cada miRNA, por ejemplo, en el caso del miR-145-5p ha sido ampliamente estudiado en cáncer de mama, mientras que del let-7C-3p no existe ningún reporte en la base de datos de PubMed, por lo que es interesante estudiar algún miRNA que no estuviera reportado para aportar nueva información. El miRNA seleccionado, no ha sido reportado previamente en algún tipo de cáncer o se desconoce su función en cáncer de mama (cuadro 3). El segundo criterio fue considerar las rutas de señalización que potencialmente puede regular cada miRNA, por ejemplo el miR-770-5p esta reprimido en las células troncales de cáncer de mama y no ha sido reportado previamente en este tipo de cáncer. Sin embargo al considerar las rutas de señalización en las que están implicados sus blancos celulares tales como regulación del citoesqueleto de actina, uniones estrechas, interacción con la matriz extracelular y señalización de la vía del calcio, resultaría más interesante estudiar algunos miRNAs como el miR-543, el cual tiene las mismas consideraciones que el miRNA anteriormente mencionado pero que además puede modular vías tradicionalmente asociadas al desarrollo del cáncer tales como IGF-IR, Wnt/ β -Catenina, y BMP. Considerando estos criterios, se seleccionó el miR-583 para su análisis funcional.

De acuerdo al programa TargetScan V7.1, el miR-583 puede regular de manera potencial la expresión de 5389 genes, entre ellos destacan algunos como: FOXD3, TCF4, NAALAD2, SSBP2, PIP5K1C, BAMBI, CD44, CDH11, CLDN1, EGFR, ESR1 EGFR, ADAM12, PIK3, PIK3CA, GSK3 β , LIF, CDH1, ZEB2, ALCAM, CDH2, CDC42, RDH10, ABCA1, ABCBG2, CTNNB1, WNT11, PTCH1, PTEN, KLF4 y APC que son genes que participan en el desarrollo del cáncer y mantener el fenotipo troncal de las células (tabla 2). Hasta el momento este

miRNA no ha sido reportado en cáncer de mama. Entre las rutas que este miRNA puede regular potencialmente se encuentran IGF-IR, Wnt/ β -Catenina, y BMP, pero regulando un mayor número de genes importantes en la ruta de Wnt, como β -Catenina, AXIN, APC Y GSK3 β , el cual se encarga de la fosforilación de β -Catenina, para que la cascada de señalización ocurra (figura 17).

Cuadro 3. miRNAs desregulados en células MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} analizados en cáncer.

miRNAs	Función	Blancos validados	Referencia
miR-409-3p	Inhibir crecimiento, induce apoptosis, reduce migración e invasión	C-MET	(Wan y col., 2014)
	Funciona como un supresor de tumor en cáncer colorectal	GAB1	(Bai y col., 2015)
miR-125b	Modulador de apoptosis	BCL-2	(Chen y col., 2015)
	Regula la migración celular en cáncer	PAR2 y GAB2	(Yang y col., 2015)
miR-490	Regula proliferación celular y apoptosis en osteosarcoma	HMGA2	(Liu y col.)
miR-145	Inhibe proliferación e invasión de carcinoma de células de esófago	c-Myc	(Wang y col., 2013)
miR-138	Inhibición del crecimiento e invasión en células cancerosas	FOXP4	(Yang y col., 2015)
miR-18a-3p	Desconocido	Desconocido	(Zheng y col., 2013)
miR-145	Inhibe el crecimiento celular en cáncer papilar humano	DUSP6	(Gu y col., 2015)
	Inhibe proliferación celular en cáncer de próstata	SOX2	(Ozen y col., 2015)
	Funciona como supresor de tumor en cáncer colorectal	IGF1R	(Zheng y col., 2014)
miR-100-5p	Inhibe el mantenimiento y expansión de BrCSCs	Plk1	(Petrelli y col., 2014)

Tabla 2. Genes modulados por el miR-583 en células MCF-7 que participan en mantener el fenotipo troncal

Genes involucrados en mantener el fenotipo troncal							
FOXD3	TGIF2	CD38	ADAM12	CDH1	RDH10	KLF4	LRP6
TCF4	NAALAD2	ERBB2	PIK3	ZEB2	ABCA1	LEF1	FGF1
DKK1	SSBP2	FZD4	PIK3CA	ALCAM	ABCG2	APC	SRC
TDGF1	PIP5K1C	NOTCH3	GSK3B	CDH2	CTNNB1	DDR2	FRS2A
KDR	BAMBI	CDH11	PIK3R1	RARA	WNT11	SPRF1	RASA1
FAK	GNG10	CLDN1	PDGFRB	RAC1	PTCH1	CSKN1A1	MAP2K1
GATA6	CD44	EGFR	LIF	CDC42	PTEN	UBE2D1	SMO

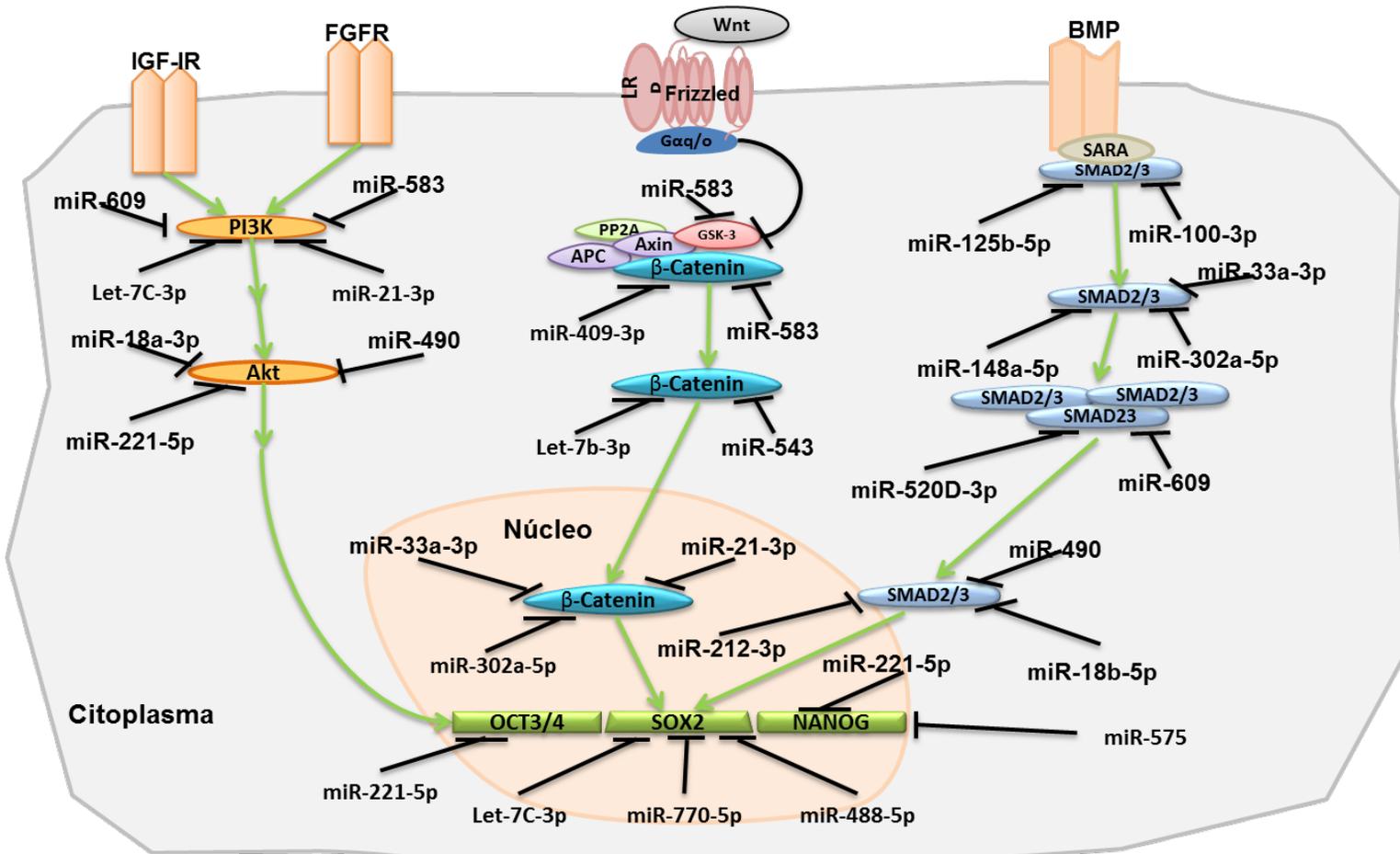


Figura 17. Vías de señalización potencialmente afectadas por miRNAs en células troncales cancerosas. Esquema representativo de genes que pueden afectarse en las principales vías de señalización que mantienen el fenotipo troncal, esto por miRNAs desregulados en las células analizadas.

E. MIR-583 SE ENCUENTRA APAGADO EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 DE CÁNCER DE MAMA.

Para evaluar el efecto celular de la represión del miR-583, se eligió como modelo celular la línea MCF-7. La elección se realizó considerando que la línea celular MCF-7 mostró una nula expresión del miR-583, lo que sugiere que un aumento en su expresión podría tener un efecto celular evidente que permita inferir la función del miRNA. Además, mediante una revisión de la literatura y análisis de marcadores de pluripotencialidad se encontró que la línea celular MCF-7 y las células troncales MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} presentan algunas semejanzas, por ello el miR-583 puede influir en mantener el fenotipo troncal en ambos tipos de células. Esta hipótesis se sustenta al considerar los resultados de predicción de blancos y rutas afectadas por el miR-583, los cuales muestran las posibles vías afectadas que están encargadas de mantener el fenotipo troncal. Finalmente, una de las características importantes de la línea celular MCF-7, es su capacidad de formar mamoesferas, lo cual correlaciona a las células MCF-7 con las células troncales cancerosas, por lo cual decidimos evaluar el efecto del aumento de este miRNA en este proceso de mantener el fenotipo troncal.

La expresión del miR-583 fue evaluada en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron que el miR-583 no se encuentra expresado en células MCF-7. Pero una vez realizada la transfección del precursor del miR-583 en células MCF-7, se logró restaurar la expresión de éste, lo cual nos indica que se podría apagar o disminuir la expresión de algún gen que posiblemente sea blanco de miRNA, esto según lo arrojado por los análisis bioinformáticos anteriores (Figura 18).

Para realizar el análisis estadístico y correlacionar los valores de expresión del miR-583 en células sin transfectar y en células transfectadas, se utilizó la

prueba estadística T-Student, con el software IBM SPSS v.20 tomando como significativos los valores con una $p \leq 0.05$ (Tabla 3).

Se han realizado algunos estudios de la expresión de miRNAs asociados a células troncales. Gwak y col. (2014) estudiaron los niveles de expresión de la familia miR-200, miR-9 y miR-155 mediante qRT-PCR en células troncales cancerosas de diferentes subtipos con el fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low}. Contrario a lo observado en ese estudio, nuestros resultados muestran que la expresión de del miR-583 está reprimida.

Yun y col. (2014) estudiaron antes el miR-583 y su relación entre células NK e IL-2. Es el único análisis anterior que existe de este miRNA, ya que en cáncer no hay estudios previos donde se haya evaluado la expresión del miR-583. Por lo cual resultó ser un miRNA interesante de estudiar en células troncales cancerosas.

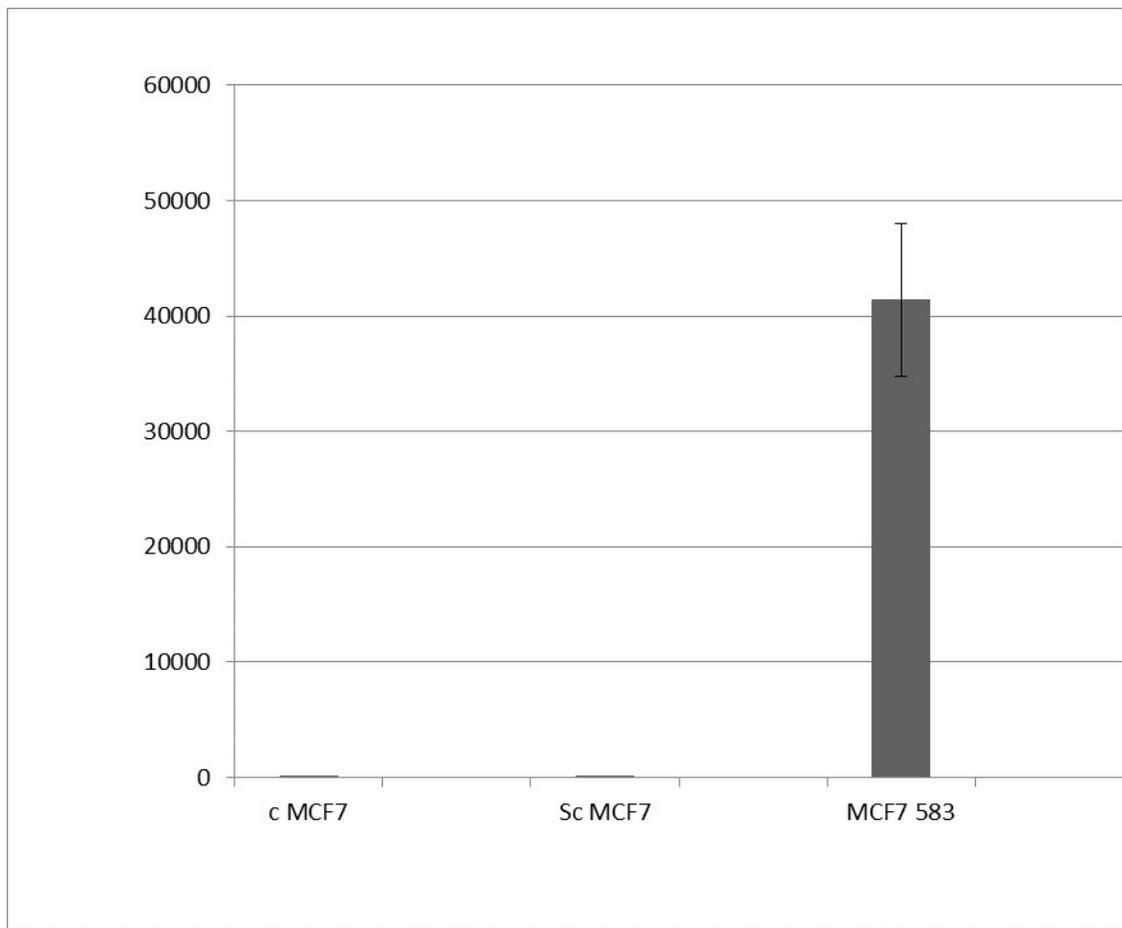


Figura 18. Expresión del miR-583 en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. cMCF7, son células sin transfectar; Sc MCF7, son células transfectadas con una secuencia scramble y MCF7 583, son células transfectadas con el pre-miR-583. La expresión se analizó mediante qRT-PCR, los valores fueron normalizados con base a la expresión de RNU-44.

Tabla 3. Análisis estadístico de la expresión del miR-583

Experimento	Media	SD	<i>p</i>≤0.05
MCF7 control	1.63	1.82	
MCF7 Scramble	1.02	0.17	0.685
MCF7 miR-583	41402.25	6581.32	0.012

F. LA EXPRESIÓN DEL MIR-583 INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GSK3B

De acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados, el miR-583 podría tener como blanco algún gen que esté implicado en vías de señalización que mantienen el fenotipo troncal de las células. Una de las principales rutas en mantener este fenotipo es la ruta de Wnt/ β -Catenina, donde intervienen genes claves como β -Catenina, APC, AXIN y GSK3 β , GSK3 β es importante ya que lleva a cabo la fosforilación de β -Catenina para que continúe la cascada de señalización y puedan activarse factores de transcripción encargados de mantener el fenotipo troncal. Tomando como referencia los análisis realizados, se utilizó un anticuerpo contra la proteína que participa en la fosforilación de genes en la ruta de Wnt. A través de ensayos western blot, encontramos que la expresión del miR-583 aumenta mientras que disminuye la la expresión de la proteína GSK3 β (figura 18).

No se han reportado estudios en los cuales donde se evalúe algún gen que pudieran ser blanco del miR-583. Por ello, nos enfocamos en algunos genes que tuvieran participación en una de las vías de señalización encargadas de mantener el fenotipo troncal de las células y que según los datos obtenidos previamente, puede ser blanco de este miRNA.

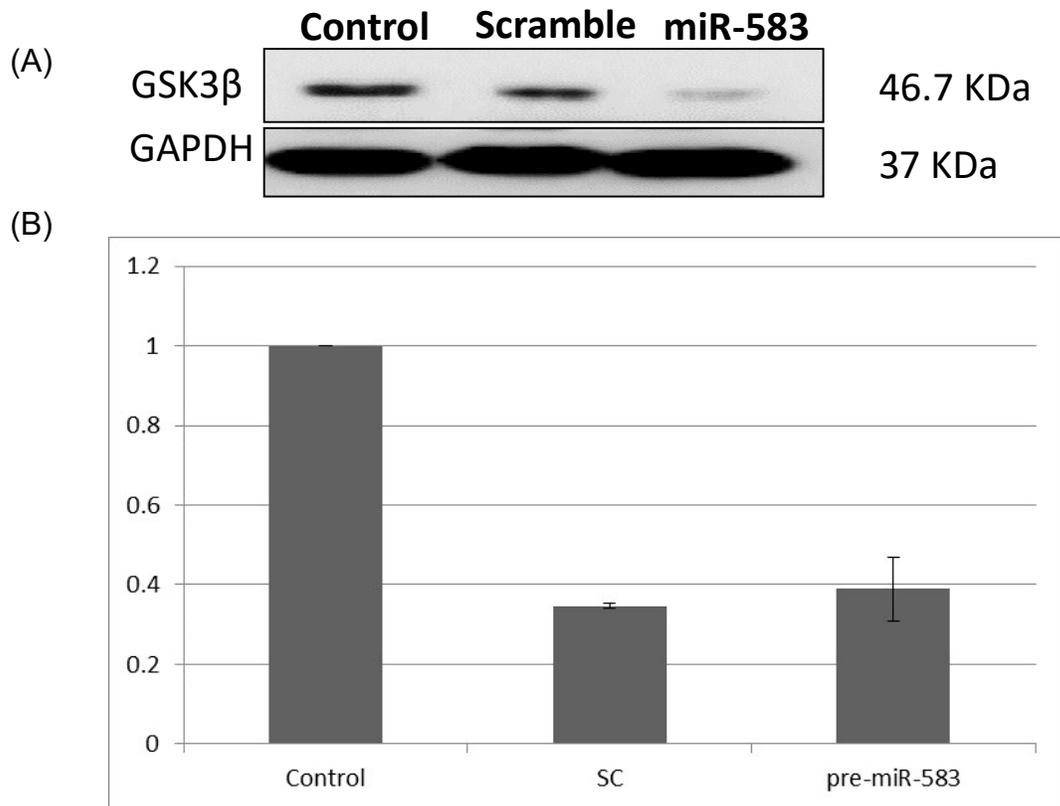


Figura 18. El miR-583 modula la expresión de la proteína GSK3 β . Se muestra el efecto de la expresión del miR-583 en la expresión de la proteína GSK3 β . Células MCF-7 control y tranfectadas con 30 nM del pre-miR-583 fueron lisadas a las 48 horas post-transfección. 50 μ g de las proteínas fueron sometidas a electroforesis y transferidas a membranas de PVDF para realizar los ensayos western blot. Los resultados de estos ensayos fueron analizados mediante densitometría y normalizados con base en la expresión del control de carga GAPDH. (A) Ensayos western blot para la proteína GSK3 β (B) Valores normalizados de densitometría correspondiente a los resultados en el panel A.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestros resultados se observa que dentro de la línea celular MCF-7 se encuentra una pequeña subpoblación de células con un inmunofenotipo CD44⁺/CD24^{-low}. Este fenotipo se ha utilizado para aislar células troncales del epitelio mamario normal humano. Este fenotipo parece ser conservado durante el proceso de la carcinogénesis y por lo tanto es una herramienta importante para estudiar la progresión del cáncer de mama.

Se identificaron cuarenta y dos miRNAs (FC ± 2.0 $p \leq 0.05$) modulados diferencialmente entre células troncales MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} y células parentales. Del total de los miRNAs cuarenta y uno de ellos se encuentran reprimidos y solo uno se encontró sobre-expresado.

Los cuarenta y dos miRNAs desregulados en las células troncales pueden regular procesos y vías de señalización involucradas en cáncer y sobre todo vías implicadas en mantener el fenotipo troncal como la ruta de TFG- β y Wnt/ β -Catenina, ente otras.

La expresión del miR-583 se encontró reprimida tanto en células troncales MCF-7 CD44⁺/CD24^{-low} y en la línea celular parental.

La transfección del miR-583 provocó una disminución en la expresión de la proteína GSK3 β , por lo cual podría verse afectada la vía de señalización de Wnt/ β -Catenina y así conducir a una célula troncal a que pierda su fenotipo de troncalidad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ y Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(7): 3983-3988.
- Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431(7006): 350-355.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP y col. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 227(2): 271-278.
- Anderson DJ, Gage FH y Weissman IL. 2001. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*. 7(4): 393-395.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2): 281-297.
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RHy col. 2005. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*. 120(1): 21-24.
- Bishop JM. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science*. 235(4786): 305-311.
- Boman BM y Huang E. 2008. Human Colon Cancer Stem Cells: A New Paradigm in Gastrointestinal Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 26(17): 2828-2838.
- Calderon-Garciduenas AL, Paras-Barrientos FU, Cardenas-Ibarra L, Gonzalez-Guerrero JF, Villarreal-Rios Ey col. 2000. Risk factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Publica Mex*. 42(1): 26-33.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch Ey col. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(9): 2999-3004.
- Clayson DB, Mehta R y Iverson F. 1994. Oxidative DNA damage — The effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 317(1): 25-42.
- Chen CZ y Lodish HF. 2005. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol*. 17(2): 155-165.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TEy col. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 38(2): 228-233.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch Ny col. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 436(7051): 740-744.

- Deng L, Shang L, Bai S, Chen J, He Xy col. 2014. MicroRNA100 inhibits self-renewal of breast cancer stem-like cells and breast tumor development. *Cancer Res.* 74(22): 6648-6660.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF y Hannon GJ. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 432(7014): 231-235.
- Devi PU. 2005. Basics of carcinogenesis *Health Administrator.* 17: 16-24.
- Dorland WAN. 2005. Dorland Diccionario enciclopédico ilustrado de medicina: Más de cien años de historia, McGraw-Hill Interamericana de España.
- Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R y García Martín Á. 2012. Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria.* 25(03): 107-115.
- Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3(6): 453-458.
- Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler By col. 2014. Cancer Incidence in Five Continents. *IARC.* X: 1436.
- Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh Ay col. 2008. Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA miR-21 in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 283(2): 1026-1033.
- Gangopadhyay S, Nandy A, Hor P y Mukhopadhyay A. Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. *Clinical Breast Cancer.* 13(1): 7-15.
- Garg M. 2015. Emerging role of microRNAs in cancer stem cells: Implications in cancer therapy. *World Journal of Stem Cells.* 7(8): 1078-1089.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher Jy col. 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell.* 1(5): 555-567.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj By col. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432(7014): 235-240.
- Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, Shan S, Liu Jy col. 2006. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol.* 126(1): 142-153.
- Gunduz M GE. 2011. Breast Cancer – Carcinogenesis, Cell Growth and Signaling Pathways. In Tech. 711.
- Gwak JM, Kim HJ, Kim EJ, Chung YR, Yun Sy col. 2014. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 147(1): 39-49.
- Han M, Wang Y, Liu M, Bi X, Bao Jy col. 2012. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1alpha expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells. *Cancer Sci.* 103(6): 1058-1064.

- Heldin CH, Landstrom M y Moustakas A. 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* 21(2): 166-176.
- Hennings H, Glick AB, Greenhalgh DA, Morgan DL, Strickland JE y col. 1993. Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 202(1): 1-8.
- Hidalgo Miranda A y G. JS. 2009. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. 51: 197-207.
- Hutvagner G y Zamore PD. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 297(5589): 2056-2060.
- IARC IAfRoC. 2012. "Cancer Mondial." from <http://www-dep.iarc.fr/>.
- INEGI AEdIEUM. 2005. 1999-2005. from <http://www.inegi.gob.mx/>.
- Islam F, Gopalan V, Smith RA y Lam AK. 2015. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res.* 335(1): 135-147.
- Islam F, Gopalan V, Smith RA y Lam AKY. 2015. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Experimental Cell Research.* 335(1): 135-147.
- Isobe T, Hisamori S, Hogan DJ, Zabala M, Hendrickson DG y col. 2014. miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway. *Elife.* 3.
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA y col. 2002. A stem cell molecular signature. *Science.* 298(5593): 601-604.
- Jaenisch R y Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 132(4): 567-582.
- Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M y col. 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol.* 7(12): 1267-1274.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R y col. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 120(5): 635-647.
- Johnston RJ y Hobert O. 2003. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 426(6968): 845-849.
- Jordan NV, Johnson GL y Abell AN. 2011. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle.* 10(17): 2865-2873.
- Kalluri R y Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6): 1420-1428.
- Kang L, Mao J, Tao Y, Song B, Ma W y col. 2015. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci.* 106(6): 700-708.
- Key TJ, Verkasalo PK y Banks E. 2001. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2(3): 133-140.

- Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg Sy col. 2008. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med*. 14(10): 450-460.
- Knaut FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer Ay col. 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*. 51: s335-s344.
- Kumar V, Abbas AK y Fausto N. 2005. Patología estructural y funcional: Robbins y Cotran, Elsevier España.
- Lee RC, Feinbaum RL y Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5): 843-854.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee Sy col. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j*. 23(20): 4051-4060.
- Lewis BP, Burge CB y Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120(1): 15-20.
- Li Q, Yao Y, Eades G, Liu Z, Zhang Yy col. 2014. Downregulation of miR-140 promotes cancer stem cell formation in basal-like early stage breast cancer. *Oncogene*. 33(20): 2589-2600.
- Lim YY, Wright JA, Attema JL, Gregory PA, Bert AGy col. 2013. Epigenetic modulation of the miR-200 family is associated with transition to a breast cancer stem-cell-like state. *J Cell Sci*. 126(Pt 10): 2256-2266.
- Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NSy col. 2006. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*. 66(12): 6063-6071.
- Loeb LA y Harris CC. 2008. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer research*. 68(17): 6863-6872.
- Ma L y Weinberg RA. 2008. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 24(9): 448-456.
- MacDonald BT, Tamai K y He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 17(1): 9-26.
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan Ay col. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133(4): 704-715.
- Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink Ty col. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*. 134(3): 521-533.
- Martin de Civetta MT y Civetta JD. 2011. [Carcinogenesis]. *Salud Publica Mex*. 53(5): 405-414.
- Mehra N, Penning M, Maas J, Beerepoot LV, van Daal Ny col. 2006. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res*. 12(16): 4859-4866.

- Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC y Baulcombe DC. 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*. 447(7148): 1126-1129.
- Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau Sy col. 2008. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*. 3(8): e2888.
- Nandy SB, Arumugam A, Subramani R, Pedroza D, Hernandez Ky col. 2015. MicroRNA-125a influences breast cancer stem cells by targeting leukemia inhibitory factor receptor which regulates the Hippo signaling pathway. *Oncotarget*. 6(19): 17366-17378.
- National Cancer Institute I. 2015. 2015, from <http://www.cancer.gov/>.
- NCI NCI. 2015. "Breast Cancer ", 2015, from <https://www.nih.gov>.
- Netter FH. E. S. Masson. 2011. *Atlas de Anatomía Humana*. 5ta Edición.
- Ozen M, Karatas OF, Gulluoglu S, Bayrak OF, Sevlí Sy col. 2015. Overexpression of miR-145-5p inhibits proliferation of prostate cancer cells and reduces SOX2 expression. *Cancer Invest*. 33(6): 251-258.
- Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B y Hernández-Ávila M. 2009. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública de México*. 51: s208-s219.
- Petrelli A, Carollo R, Cargnelutti M, Iovino F, Callari My col. 2014. By promoting cell differentiation, miR-100 sensitizes basal-like breast cancer stem cells to hormonal therapy.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini Gy col. 2005. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Research*. 65(13): 5506-5511.
- Pritchard CC, Cheng HH y Tewari M. 2012. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 13(5): 358-369.
- Rand TA, Petersen S, Du F y Wang X. 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 123(4): 621-629.
- Ruddon RW. 2007. *Cancer Biology*, Oxford University Press, USA.
- Sapre N y Selth LA. 2013. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Prostate Cancer: The State of Play. *Prostate Cancer*.
- Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC y Benz CC. 2006. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. 66(3): 1277-1281.
- Shabalina SA y Koonin EV. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in ecology & evolution*. 23(10): 578-587.
- SSM SdSM. 2002. *Compendio de anatomía patológica de la glándula mamaria*. 1ra Edición. 125.
- Stratton MR, Campbell PJ y Futreal PA. 2009. The cancer genome. *Nature*. 458(7239): 719-724.
- Sun X, Qin S, Fan C, Xu C, Du Ny col. 2013. Let-7: a regulator of the ERalpha signaling pathway in human breast tumors and breast cancer stem cells. *Oncol Rep*. 29(5): 2079-2087.

- T.M. Phillips WHM, F. Pajonk, The response of CD24(-/low)/CD44+, breast cancer-initiating cells to radiation JNCI y 1785. 2006. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation, 1785.
- . *J. Natl Cancer Inst.* 98 1777-1935.
- Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean Jy col. 2011. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis.* 28(2): 137-155.
- Velu VK, Ramesh R y Srinivasan AR. 2012. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 6(10): 1791-1795.
- Wang L, Liu JL, Yu L, Liu XX, Wu HMy col. 2015. Downregulated miR-45 Inhibits the G1-S Phase Transition by Targeting Bmi-1 in Breast Cancer. *Medicine (Baltimore).* 94(21): e718.
- Wang X, Zhu Y, Ma Y, Wang J, Zhang Fy col. 2013. The role of cancer stem cells in cancer metastasis: New perspective and progress. *Cancer Epidemiology.* 37(1): 60-63.
- WHO WHO. 2015. from <http://www.who.int/es>.
- Yang L, Ma Y, Han W, Li W, Cui Ly col. 2015. Proteinase-Activated Receptor 2 Promotes Cancer Cell Migration Through RNA Methylation-Mediated Repression of MiR-125b. *J Biol Chem.*
- Zhang H, Cai K, Wang J, Wang X, Cheng Ky col. 2014. MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *Stem Cells.* 32(11): 2858-2868.
- Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu Ly col. 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 22(1): 107-126.
- Zhang W, Dahlberg JE y Tam W. 2007. MicroRNAs in Tumorigenesis : A Primer. *The American Journal of Pathology.* 171(3): 728-738.
- Zheng T, Yin D, Lu Z, Wang J, Li Yy col. 2014. Nutlin-3 overcomes arsenic trioxide resistance and tumor metastasis mediated by mutant p53 in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cancer.* 13(1): 133.
- Zhou X, Ruan J, Wang G y Zhang W. 2007. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol.* 3(3): e37.

XI. ANEXOS

Anexo A. Soluciones y reactivos.

Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Gel separador		Concentrador	
Soluciones	12%	Soluciones	5%
Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	4.5 mL	Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	4.5 mL
Tris pH 8.8	2.8 mL	Tris pH 8.8	2.8 mL
H₂O	3.75 mL	H₂O	3.75 mL
SDS 10%	0.35 mL	SDS 10%	0.35 mL
PSA 10%	0.35 mL	PSA 10%	0.35 mL
TEMED	25 µL	TEMED	25 µL

1. Tris-Glicina 10X

- Tris-Glicina → 30 g
- Glicina → 144 g
- Aforar a un litro con agua desionizada y filtrar

2. Buffer de corrida SDS-PAGE

- Tris-Glicina 10X → 100 mL
- SDS 10% → 10 mL
- Aforar a un litro con agua desionizada

3. Buffer de transferencia

- Tris-Glicina 10X → 100 mL
- Metanol → 200 mL
- Aforar a un litro con agua desionizada

4. Buffer de carga para proteínas

- Tris-Cl 0.125 M pH 6.8
- SDS 4%
- Glicerol 20%
- Azul de bromofenol 0.02

5. Solución de tinción de geles de proteínas

- Azul de Coomasie R-250 0.025%,
- Ácido Acético 7%
- Metanol 40%

6. PBS 1X

- NaCl (MERCK) 8g
- KCl 8g
- Na₂HPO₄ 0.65g
- KH₂PO₄ 0.2g

Se ajusta el pH a 7.4

7. PBS – EDTA 0.2%

- PBS 1X p 7.0 500 ml
- EDTA 1g

Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave 121°C/ 20 min

8. Buffer para extracción de proteínas TNTE (Tris-NaCl-Triton-EDTA)

- Tris 50 mM (pH 7.4)
- NaCl 150 mM
- Triton 0.1% al 0.5%
- EDTA 1mM