



**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y FACULTAD
DE BIOTECNOLOGÍA**

Título

**Efecto de la inhibición de miR-196a-5p sobre la viabilidad y
proliferación de las células de cáncer de mama triple
negativo**

TESIS

**Para obtener el título de Maestro en
Biotecnología**

PRESENTA:

BQC Rodolfo Reyes Morales

Director:

Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez

Asesores

Dra. Karla María López Martínez

Dra. Gabriela Elizabeth Campos Viguri

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Puebla, Puebla, de



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia que más afecta a mujeres en el mundo y su origen es multifactorial. Entre los factores que tienen un papel importante en la carcinogénesis de mama, están los microRNA (miRNAs), definidos como ARNs monocatenarios no codificantes, cuya longitud es de 19-25 nucleótidos y están presentes en muchos los tejidos y fluidos corporales. La función principal de los miRNAs es regular la expresión génica a nivel postranscripcional y, por lo tanto, la síntesis de proteínas., MiR-196a-5p, es un miRNAs con expresión elevada en células y tejidos de cáncer de mama, y se ha caracterizado como un oncomirs en esta patología. A partir de estos datos, se planteó inhibir a miR-196a-5p, para evaluar cambios en la proliferación y migración de células de cáncer de mama.

Índice

RESUMEN	3
Glosario de abreviaturas.....	9
1.1 Cáncer	12
1.2 Cáncer de mama.....	12
1.3 Epidemiología	14
1.4 Clasificación molecular.....	16
1.4.1 Cáncer de mama luminal A.....	17
1.4.2 Cáncer de mama Luminal B.....	17
1.4.3 Cáncer de mama Basal	18
1.4.3 Subtipo HER2	18
1.5 Etiología y factores de riesgo	18
1.6 Tratamiento.....	20
1.7 Células madre cancerígenas.....	22
1.8 MicroRNA (miRNAs) y cáncer	23
1.9 Biogénesis de miRNAs	25
1.10 OncomiRNAs.....	26
1.11 miRNAs supresores de tumores	29
1.12 miR-196a-5p	30
2.1 Objetivos	31
2.1.1 Objetivo General	31
2.1.2 Objetivos Específicos.....	31
3.1 Planteamiento del problema	32
4.1 justificación	32
5.1 Metodología	33
5.1.1 Análisis bioinformático	33
5.2 Transfección del inhibidor de miRNA en la línea celular MDA-MB-231.....	34
5.3 Extracción de ARN por método de trizol.....	35
5.4 Cuantificación e integridad del ARN extraído	35
5.5 Síntesis de cDNA.....	36
5.6 Diseño de Primers	36
5.7 PCR para los genes HOXA7 y HOXC8.....	37
5.8 Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT.....	38

5.9 Ensayo de cristal violeta y conteo celular	38
5.10 Evaluación de la migración celular por el ensayo de cierre de herida	38
6. Resultados	39
6.1 La inhibición de miR-196a-5p modifica la viabilidad celular de células MDA-MB-231.....	39
6.2 La inhibición del miR-196a-5p modifica la migración celular de células MDA-MB-231	42
6.3 HOXA7 y HOXC8 posibles blancos de miR-196a-5p.....	44
7. Discusión.....	45
8. Conclusión y perspectivas	48
8.1 Perspectivas.....	48
9.0 Referencias.....	49
RESUMEN	3
Glosario de abreviaturas.....	8
1.1 Cáncer.....	11
1.2 Cáncer de mama	11
1.3 Epidemiología.....	13
1.4 Clasificación molecular.....	15
1.4.1 Cáncer de mama luminal A	16
1.4.2 Cáncer de mama Luminal B.....	16
1.4.3 Cáncer de mama Basal	17
1.4.3 Subtipo HER2.....	17
1.5 Etiología y factores de riesgo	17
1.6 Tratamiento.....	19
1.7 Células madre cancerígenas.....	21
1.8 MicroRNAs (miRNAs) y cáncer	22
1.9 Biogénesis de miRNAs	23
1.10 OncomiRNAs.....	25
1.11 miRNAs supresores de tumores.....	27
1.12 miR-196a-5p.....	28
2.1 Objetivos	29
2.1.1 Objetivo General	29
2.1.2 Objetivos Específicos.....	29
3.1 Planteamiento del problema	30
4.1 justificación	30

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Español (México), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

Con formato ...

<u>5.1 Metodología</u>	<u>31</u>
<u>5.1.1 Análisis bioinformático</u>	<u>31</u>
<u>5.2 Transfección del inhibidor de miRNA en la línea celular MDA-MB-231</u>	<u>32</u>
<u>5.3 Extracción de ARN por método de trizol</u>	<u>32</u>
<u>5.4 Cuantificación e integridad del ARN extraído</u>	<u>33</u>
<u>5.5 Síntesis de cDNA</u>	<u>33</u>
<u>5.6 PCR para los genes HOXA7 y HOXC8</u>	<u>34</u>
<u>5.7 Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT</u>	<u>35</u>
<u>5.8 Ensayo de cristal violeta y conteo celular</u>	<u>35</u>
<u>5.9 Evaluación de la migración celular por el ensayo de cierre de herida</u>	<u>35</u>
<u>6. Resultados</u>	<u>36</u>
<u>6.1 La inhibición de miR-196a-5p modifica la viabilidad celular de células MDA-MB-231</u>	<u>36</u>
<u>6.2 La inhibición del miR-196a-5p modifica la migración celular de células MDA-MB-231</u>	<u>39</u>
<u>6.3 HOXA7 y HOXC8 posibles blancos de miR-196a-5p</u>	<u>40</u>
<u>7. Discusión</u>	<u>42</u>
<u>8. Conclusión</u>	<u>45</u>
<u>9.0 Referencias</u>	<u>45</u>

- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Español (México), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Revisar la ortografía y la gramática
- Con formato**
- Con formato**
- Con formato**
- Con formato**
- Con formato**
- Con formato**

Índice de Figuras

Figura 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer en 10 años.	15	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 2. Proceso de maduración de un miRNA.....	26	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 3. Diferentes terapias basadas en inhibir miRNAs u oncomiRNAs.	29	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 4. Ensayo de MTT y Cristal violeta.....	40	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 5. Ensayo de cierre de herida a las 6,9,24 horas.	43	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 6. Conteo celular de ensayo de herida.	43	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 7. Sitios 8 mer del gen HOXA7 y su hibridación con el miRNA.....	44	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 8. Sitios 7mer y 8mer del gen HOXC8 y su hibridación con el miRNA.....	45	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer en 10 años.	14	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 2. Proceso de maduración de un miRNA.....	24	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 3. Diferentes terapias basadas en inhibir miRNAs u oncomiRNAs.....	27	Con formato: Fuente: Sin Negrita
Figura 4. Ensayo de MTT y Cristal violeta.	37	Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
Figura 5. Ensayo de cierre de herida a las 6,9,24 horas.....	39	Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
Figura 6. Conteo celular de ensayo de herida.....	40	Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
Figura 7. Sitios 8 mer del gen HOXA7 y su hibridación con el miRNA.....	41	Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática
Figura 8. Sitios 7mer y 8mer del gen HOXC8 y su hibridación con el miRNA.....	41	Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de defunciones por cáncer de mama en México información recolectada de (INEGI, 2020)	16
Tabla 2. miRNAs involucrados en el cáncer (Viviana et al., 2006)	24
Tabla 3. OncomiRNAs involucrados en el cáncer de mama	27
Tabla 4. miRNAs supresores de tumores en cáncer de mama	30
Tabla 5. Programa de síntesis de cDNA	36
Tabla 6. Primer para los genes HOXC8 y HOXA7	37
Tabla 7. Programa de amplificación de HOXA7 y HOXC8	37
Tabla 1. Distribución de defunciones por cáncer de mama en México información recolectada de (INEGI, 2020)	15
Tabla 2. miRNAs involucrados en el cáncer et al., 2006)	23
Tabla 3. OncomiRNAs involucrados en el cáncer de mama	26
Tabla 4. miRNAs supresores de tumores en cáncer de mama	29
Tabla 5. Programa de síntesis de cDNA	35
Tabla 6. Primers para los genes HOXC8 y HOXA7	36
Tabla 7. Programa de amplificación de HOXA7 y HOXC8	36

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Sin Negrita, Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Sin Negrita, Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Sin Negrita, Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Sin Negrita, Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Fuente de párrafo

predeter., Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo (Calibri), Sin Negrita, Revisar la ortografía y la gramática

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

Glosario de abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGO2	Proteína Argonauta 2
AKT	Proteína Quinasa B
ARN	Ácido Ribonucleico
ATM	Ataxia telangiectasia mutado
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl2/XL	Proteínas Anti-apoptoticas
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CCND1	Ciclina D1
CD24	Antígeno termoestable CD24
CD44	Antígeno CD44
CDK4	Ciclina dependiente de quinasa 4
CDK4/6	Ciclina dependiente de quinasa 4 y 6
CDK6	Ciclina dependiente de quinasa 6
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluorouracilo
DGCR8	Síndrome de diGeorge región critica 8
DICER	Ribonucleasa de la familia de las ARNasa III
E2F	Factor de transcripción E2F
E2F1	Factor de transcripción E2F1
EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial
EphA2	Receptor tirosin quinasa A2
ESR1	Receptor de estrógenos alfa
FOXA1	Forkhead Box A1
GATA3	Factor de transcripción GATA3
HER2/neu	Receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2
HOUA7	Proteína homeobox A7

HOXC8	Proteína homeobox C8
Ki-67	Proteína asociada a la proliferación celular
LAMC1	Laminina subunidad gama 1
MAP3K1	Proteína quinasa activada por mitógeno 1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MDM2	Proteína reguladora de p53
miRNA	micro RNA
MMP2	Colagenasa tipo IV de 72kDa
MMP3	Estromelisina-1
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Myt-1	Factor de transcripción de mielina 1
OMAs	Pligonucleótidos modificados anti-miRNAs
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
PDCD4	Proteína de muerte celular programada 4
PFN1	Profilina 1
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4-5-bifosfato-3-quinasa subunidad alfa
PRKCE	Proteína quinasa c tipo épsilon
Raf1	Protooncogén serina/treonina-proteína quinasa
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
RT-PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa con retro transcriptasa
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TP53	Proteína supresora de tumores p53
TPM1	Cadena de tropomiosina alfa-1
TRBP	Proteína de unión al elemento TAR
WAVE3	Miembro 3 de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich
XBP1	Proteína de unión a X-box 1
XPO5	Exportina 5

ZBTB10	Zinc finger nad BTB domain 10
Zeb1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
Zeb2	Zinc finger E-box binding homeobox 2

1.1 Cáncer

De acuerdo con el instituto nacional de cáncer en EUA (2015), el cáncer es un conjunto de enfermedades heterogéneas, entre sí, cuya principal característica es la división descontrolada de células. Esta patología puede originarse en cualquier parte del cuerpo. En condiciones normales una célula crece, se divide y muere cuando llevo a cabo su función. Sin embargo, en el cáncer, las células proliferan descontroladamente y evaden las señales de muerte.

1.2 Cáncer de mama

Anatómicamente la mama femenina consta de tejido graso, tejido linfático y estructuras glandulares llamadas lóbulos, estos últimos están divididos en secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Un lobulillo es una glándula encargada de elaborar leche materna por medio de los acinos (Santaballa. 2020).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y hay muchos factores involucrados en su desarrollo, entre ellos, la edad, predisposición genética, factores hormonales y ambientales (Espinosa, 2016).

La clasificación histológica del cáncer de mama se basa en la anatomía de este tejido, siendo los carcinomas en los conductos lobulares los más prevalentes, clasificados en carcinoma infiltrante y carcinoma ductal *in situ*. En los carcinomas infiltrantes, las células tumorales invaden el estroma circundante y pueden realizar metástasis; mientras que en el carcinoma ductal *in situ*, las células afectadas se localizan en un punto específico, el epitelio ductal, y no invaden el estroma circulante y el tejido ganglionar. Este carcinoma evoluciona a carcinoma infiltrante en un periodo de 6 a 10 años. Tanto el carcinoma ductal *in situ* como el infiltrante se clasifican, a su vez, en carcinoma ductal o lobulillar (Arroyo Yustos *et al.*, 2017).

El carcinoma lobulillar proviene de la unión ducto-lobulillar, no se disemina a ganglios linfáticos y su periodo de evolución a un carcinoma infiltrante va de 10 a 15 años (Arroyo Yustos *et al.*, 2017).

Debido a que la mayoría de los carcinomas ductales *in situ* no se extienden a más de su sitio localizado, uno de los tratamientos más utilizados es la tumorectomía, siempre y cuando el tumor mida menos de 5 mm. Sin embargo, cuando no es tratado a tiempo, el carcinoma ductal *in situ* llega a evolucionar a un cáncer invasivo, con capacidad de extenderse localmente dentro de la mama, infiltrarse en los músculos pectorales, así como en conductos linfáticos hasta los ganglios de la axila, y eventualmente, invadir vasos sanguíneos y generar metástasis a otros tejidos y órganos distantes (Martín *et al.*, 2015).

De acuerdo con la unión internacional contra el cáncer (UICC) esta patología se divide en 5 estadios:

- Estadio 0: Tumor pequeño que está limitada a los conductos y lóbulos
- Estadio I: Tumores pequeños, sin afectación metastásica.
- Estadio II: Tumores de más de 2 cm o con afectación metastásica axilar moderada.
- Estadio III: Tumores muy grandes o con afectación en piel o músculo pectoral o con afectación axilar masiva.
- Estadio IV: Metástasis en órganos distantes.

El pronóstico de la enfermedad varía de acuerdo a su estadio. Así, la sobrevida libre de recurrencia a 5 años; es del 95% si se presenta un estadio I, del 80% en un estadio II, del 60% en un estadio III y del 25% en un estadio IV (Martín *et al.*, 2015).

De acuerdo con la American Cancer Society (ACS por sus siglas en inglés) (2018), la estadificación histológica más empleada para el cáncer de mama es la del sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC). Este sistema utiliza 7 puntos clave para la clasificación del tumor:

1. La extensión del tumor (T)
2. La propagación a los ganglios linfáticos adyacentes (N)
3. La propagación a sitios distantes (M)
4. Estado del receptor de estrógenos (ER)
5. Estado del receptor de progesterona (PR)
6. Estado de HER2
7. Grado del cáncer

Para la sub-estadificación de la categoría T (extensión del tumor primario), se utilizan números del 0 al 4 después de la letra T, que describen el tamaño del tumor. Entre mayor sea el número de T, más grande es el tumor (Martínez, 2004). En la categoría “N” se determina del 0 al 3, la cantidad de ganglios a los que se ha diseminado el cáncer. Mientras que la letra “M” determina el grado de metástasis del tumor y también está determinada del 0-1 siendo 0 sin metástasis demostrable y 1 con metástasis presente (American Cancer Society, 2018).

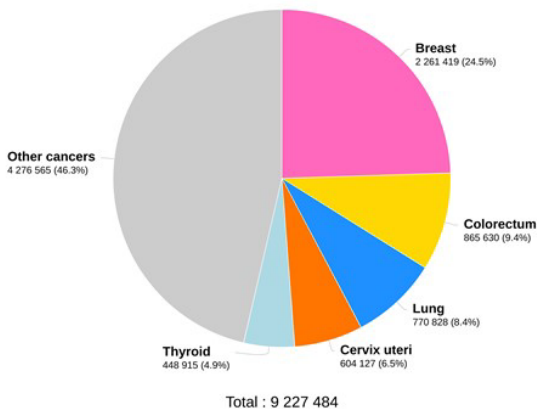
El estado de los receptores hormonales en conjunto con las demás categorías determina el estadio del tumor. El estadio 0 si la patología solo está limitada a los conductos y lóbulos. El estadio I a un tumor pequeño no invasivo y que no está diseminado a los ganglios linfáticos. El estadio II a un tumor que mide 200 mm o menos y se ha diseminado de 1 a 3 ganglios linfáticos de la axila. Estadio III a un cáncer que mide más de 50 mm y esta diseminado a un número de 4 a 9 ganglios linfáticos axilares. El estadio IV corresponde a un cáncer metastásico el cual puede ser de cualquier tamaño y ya se ha diseminado a diferentes órganos. (American Cancer Society, 2018)

1.3 Epidemiología

Mundialmente cerca de 1.7 millones de casos de cáncer de mama son diagnosticados por año, siendo de mayor incidencia en Estados Unidos con 92 casos por cada 100,000 habitantes y en menor proporción en África y Asia con 27 casos por cada 100,000 habitantes. En 2020 se reportaron 0.4 millones de muertes en el mundo y para el año 2030 se estima que a nivel mundial el diagnóstico de cáncer de mama se eleve a 3.2 millones de casos por año (International Agency for Research on Cancer, 2020).

De acuerdo con estadísticas brindadas por Internacional Agency For Research On Cancer, en el 2020, el cáncer fue la causa de muerte de más de 4.4 millones de personas a nivel mundial, de las cuales el 15.5% (684,996) fue a causa del cáncer de mama. Se ha proyectado que para el 2030, los casos de mortalidad aumentarán de 684,996 a 848,108 muertes por esta patología, como se observa en la figura 1.

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, females, all ages

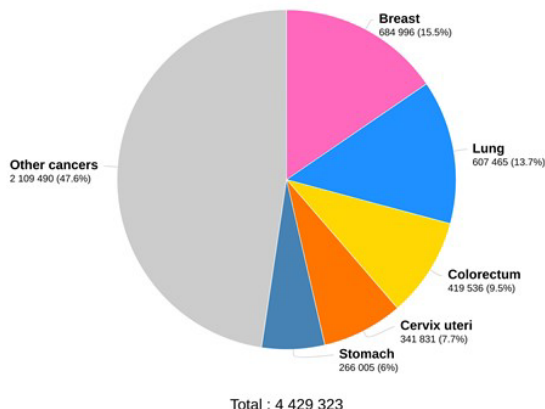


2020



684 996

Estimated number of deaths in 2020, worldwide, females, all ages



2030



848 108

= 100 000 Demographic changes

Figura 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer en 10 años. Imagen tomada de Globocan Observatory et al., 2022.

En México, en 2017 se registró que 24 de cada 100 egresos a hospitales fueron a causa de un carcinoma de mama invasivo, mientras que, en 2018, se registraron 44,164 defunciones femeninas por tumores malignos, de las cuales, 7,257 muertes fueron a causa de cáncer de mama (INEGI, 2020).

De acuerdo a los datos del INEGI (2020), en México, el 1% de las mujeres que fallecen por cáncer de mama tienen la edad de 15-29 años, el 13% tienen 30-44 años y el 38% se encuentra dentro de los 45-59 años de edad. Estos datos indican que la tasa de mortalidad debido a cáncer de mama es de 1,719 por cada 100 mil mujeres mexicanas y estas defunciones están distribuidas como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de defunciones por cáncer de mama en México información recolectada de (INEGI,2020)	
Estados	Defunciones
Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Campeche, Colima, Guerrero, Morelos, Hidalgo y Tabasco	De 9.29 a 13.64 mujeres
Tlaxcala, Puebla, México, San Luis Potosí, Veracruz, Michoacán, Guanajuato, Durango y Zacatecas	De 13.65 a 18 mujeres
Querétaro, Coahuila, Sinaloa, Sonora, Jalisco, Nuevo León, Aguascalientes, Tamaulipas y Nayarit	De 18.01 a 22.35 mujeres
Chihuahua, Ciudad de México, Baja California y Baja California Sur	De 22.36 a 26.71 mujeres

1.4 Clasificación molecular

Dado que la clasificación histológica no refleja la heterogeneidad del cáncer de mama, el estudio inmunofenotípico se ha estandarizado a fin de concertar el pronóstico y adecuar el tratamiento de los diferentes subtipos de cáncer de mama, de acuerdo a las características específicas de cada tumor, como los patrones de expresión génica propia, que permiten agrupar a los tumores según su “huella génica” (Lillo, 2014). Así, el análisis inmunofenotípico clasifica a las lesiones según su índice mitótico (ki67) y la sobreexpresión de receptores para estrógenos, progesterona o HER2/neu.

Sorlie (2003) divide el cáncer de mama en 2 grupos de acuerdo a su patrón de expresión génica. El primer grupo tiene la característica principal de expresar receptores de estrógenos, entre los cuales se encuentran el carcinoma Luminal A y Luminal B, por lo que se dice que son positivos receptores de estrógenos. En el segundo grupo, se encuentran los tipos de cáncer que no expresan receptores de estrógenos, como los subtipos Basales y los

subtipos con sobreexpresión de HER2/neu el cual es un receptor de crecimiento epidérmico que está presente en todas las células. (Imigo *et al*, 2011).

Los tumores luminales, expresan citoqueratinas luminales junto a receptores de estrógenos y sus respectivos genes activadores (LIV1 y CCND1), tienen una activación del gen P53 del 20% y se dividen en varios subtipos, siendo los más importantes Luminal A y Luminal B (Imigo *et al.*, 2011) .

1.4.1 Cáncer de mama luminal A

El 67% de los tumores de mama son de subtipo luminal A, siendo este subtipo el más frecuente (Imigo *et al.*, 2011). El subtipo luminal A, expresa receptores de estrógenos y tiene una alta expresión de receptores de progesterona, es negativo a los receptores HER2 y presenta una baja expresión de Ki-67 de solo el 14%. La expresión de Ki-67 es importante ya que es utilizada para diferenciar entre el subtipo luminal A y luminal B (Fragomeni *et al.*, 2018). Ki-67 es un inmuno marcador de proliferación celular, utilizado como un biomarcador en cáncer de mama, ya que está expresado en todas las fases del ciclo celular, pero no en células senescentes o en la fase G0 (Luporsi *et al*, 2012).

A nivel genómico, el subtipo luminal A se caracteriza por mutaciones en los genes PIK3CA, MAP3KI, GATA3, FOXA1 (Inserción en 1q y 8q y deleciones en 8p y 16q respectivamente) así como también por una alta expresión en los genes ESR1, XBP1 (Fragomeni *et al.*, 2018).

1.4.2 Cáncer de mama Luminal B

Este subtipo representa un 20-30% de todos los tipos de cáncer invasivos de mama, es similar al subtipo luminal A, ya que también es positivo a la expresión de receptores de estrógenos y progesterona, puede ser negativo o positivo a los receptores HER2, y presenta una expresión elevada de los genes Bcl-2. diferencia del subtipo luminal A, el subtipo luminal B tiene una expresión de Ki-67 mayor al 14% (Imigo, *et al*, 2010).

El subtipo luminal B se caracteriza por mutaciones en los genes TP53, PIK3CA, una expresión aumentada de CCND1, MDM2, y la pérdida de la expresión del gen ATM (Fragomeni *et al.*, 2018).

1.4.3 Cáncer de mama Basal

También llamado cáncer de mama triple negativo, debido a que es negativo a la expresión de receptores de estrógenos, progesterona y a HER2. Suele ser más agresivo que los subtipos luminales A y luminal B. El cáncer de mama de subtipo basal se caracteriza por su alta probabilidad de generar metástasis (Zaharia & Gómez, 2014).

Este subtipo se divide a su vez en cáncer triple negativo basal1 (BL1), basal2 (BL2), Inmunomodulatorio (IM), Mesenquimal (M) y luminal con receptor de andrógenos (LAR) (Fragomeni *et al.*, 2018).

1.4.3 Subtipo HER2

El subtipo HER2 representa aproximadamente el 20% de los carcinomas mamarios. Este subtipo molecular tiene la característica de que el oncogén HER2 está sobre expresado y en consecuencia, aumenta la señalización de la cascada de las MAP cinasas, estimulando la proliferación celular. Normalmente las células expresan en su membrana alrededor de 30,000 receptores HER2 cada una, mientras que las células de cáncer de mama subtipo HER2 pueden expresar en su membrana hasta 1,000,000 receptores cada una. (Colomer *et al.*, 2001).

La vía de MAPKS empieza con la fosforilación de los receptores HER reclutando a la proteína RAS y activándose al cambiar de GDP a GTP. Una vez que activa la proteína RAS se une a la proteína RAF y la activa con ayuda de la proteína SRC. Después las proteínas ERK y EMK son activadas con proteínas de andamiaje a RAF. Por último la proteína ERK es llevada al núcleo donde activara la proteína MYC el cual está involucrado en varias regulaciones de diferentes genes. (Colomer *et al.*, 2001).

1.5 Etiología y factores de riesgo

La etiología del cáncer de mama es multifactorial. La obesidad es considerada un factor de riesgo, dado que una masa corporal elevada, compromete la función de los adipocitos localizados en la glándula mamaria y en los que, los precursores de estrógenos se transforman en estrógenos. Además, se ha observado que en mujeres con premenopausia o

postmenopausia, la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Salud, 2016).

Las mujeres con menarquia precoz tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, ya que los acinos glandulares (glándulas donde se encuentran las células productoras de leche) van en aumento en número de células en cada ciclo menstrual hasta aproximadamente los 35 años. Indicando que, al haber más ciclos menstruales habrá más células de este tipo y mayor producción de estrógenos (Bazar *et al.*, 2020).

Otro factor de riesgo muy común es el tabaquismo. El humo de tabaco contiene 470 químicos, de los cuales, 43 se han clasificado como carcinogénicos, entre ellos, el benzopireno, aminas aromáticas heterocíclicas y la nitrosamina. Estos químicos inducen mutaciones en el ADN y generan susceptibilidad al desarrollo de diferentes tipos de cáncer, incluyendo, cáncer de mama (Bazar *et al.*, 2020).

Algunas alteraciones genéticas, como mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, se han asociado a fenotipos tumorales con alta probabilidad de infiltración y de realizar metástasis (Arroyo Yustos *et al.*, 2017).

Los genes BRCA1 y BRCA2 son supresores de tumores y se localizan en el cromosoma 17 y 13, respectivamente. El gen BRCA1 es autosómico dominante esto quiere decir que si el paciente tuvo antecedentes familiares con dicho gen mutado este será heredado y será expresado, aumentando el riesgo de padecer cáncer de mama de un 37 a 85%. Además las mutaciones en este gen, no solo están relacionados con cáncer de mama, sino también a otras neoplasias como cáncer de páncreas, ovario, próstata, entre otros (Arroyo Yustos *et al.*, 2017).

El gen BRCA2 es autosómico dominante y si este gen mutado es heredado, se presentará un síndrome llamado “Síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario”, el cual aumenta el riesgo de padecer alguno de estos tipos de cáncer; también está asociado a otros tipos de carcinoma como de páncreas y melanoma (Arroyo Yustos *et al.*, 2017).

1.6 Tratamiento.

Como es sabido el tratamiento para el cáncer de mama depende mucho del tipo o subtipo de cáncer que se presente, así como también dependerá de la localización de la patología (Tumores en la mama o en ganglios regionales) o su estadio de avance (Tumores metastásicos)., Generalmente el tratamiento se basa en una terapia integral, en la que se pueden combinar cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y tratamiento dirigido a dianas específicas (center for disease control and prevention, 2020).

La radioterapia está indicada después de una cirugía conservadora, la cual consiste en la extirpación del tumor cuando no es mayor de 5 mm y hay tejido sano a su alrededor, y también después de una mastectomía, si se presentó un tumor mayor a 5 cm. Para estos casos, la radioterapia más utilizada es de 46-50 Grays (GY) en toda la mama por 4.5-5.5 semanas (De Juan *et al.*, 2018).

La quimioterapia se lleva a cabo en dos modalidades, dependiendo de si ya se realizó una intervención quirúrgica o no, y se divide en quimioterapia adyuvante y neoadyuvante (De Juan *et al.*, 2018). La quimioterapia adyuvante se utiliza como tratamiento postoperatorio, en pacientes con subtipo Luminal A+, no son necesarias. Entre las principales quimioterapias adyuvantes están los Taxanos y las antraciclinas (Arce *et al.*, 2006).

Las antraciclinas se han convertido en el tratamiento más estudiado contra el cáncer de mama. En una comparación con la ciclofosfamida, metotrexato, 5FU-(CMF), la supervivencia fue del 57% comparado con el 54% de la CMF (Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluorouracilo). El otro antineoplásico son los Taxanos que se utilizan junto a las antraciclinas, se administran cuando el carcinoma no ha invadido los ganglios y tienen un bajo riesgo de muerte (18-23%) y un 5% de que el paciente no tenga una recidiva. (Arce *et al.*, 2006)

En cuanto la quimioterapia neoadyuvante se utiliza en una instancia preoperatoria; su principal función es controlar la enfermedad, hacer un tumor inoperable operable, mediante la reducción del tamaño del tumor. En un estudio donde se comparaban ambos tipos de quimioterapia se observó que el uso de quimioterapia neoadyuvante aumentó el porcentaje

de respuesta (80%), respuesta clínica completa (36%) y respuesta patológica completa (13%).(Velasco Capellas et al., 2012).

En cuanto al uso de hormonoterapia, depende del subtipo molecular que el paciente presente, ya que no se le puede administrar un fármaco supresor de estrógenos si el cáncer es negativo a esta hormona.

Para el caso de los subtipos luminal A y B como ambos son positivos a receptores de estrógenos y progesterona, se utilizan fármacos que bloqueen o inhiban dichas vías, como el tamoxifen, que bloquea los receptores de estrógenos, o el anastrozol el cual inhibe la aromataasa, por lo cual interrumpe un paso muy importante en la síntesis de estrógenos (Tong et al., 2018).

A lo largo de los años se han desarrollado nuevas terapias a células dianas para combatir estos dos subtipos de cáncer, por ejemplo los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasa 4 y 6 (CDK4/6) (Tong et al., 2018).

En pacientes con HR+/HER2 -, se presenta un aumento del 29% de la ciclina D1 y un 14% de CDK4. El uso de CDK4/6-ciclina D1 es importante ya que los tumores las necesitan para su proliferación. Los inhibidores de CDK4/6 actúan al bloquear la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, en la cual baja la expresión del gen E2F que está involucrado en el control del ciclo celular (Tong et al., 2018).

Para pacientes con el subtipo con una sobreexpresión de HER2, se administra el fármaco trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que se une a una porción de HER2 para suprimir su actividad y por consiguiente la detención del ciclo celular y la reducción de la angiogénesis (Baselga, 2010). Otro fármaco utilizado es el Lapatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa (TKIs). Este fármaco se une en el sitio del ATP en el receptor HER2, previniendo la señalización tanto los genes ras/Raf1 MAPK como PI3K/Akt los mismos que incrementan la apoptosis así como también disminuye la proliferación celular (Baselga, 2010).

Con respecto al subtipo triple negativo es más complicado el utilizar alguna hormonoterapia, al ser negativo a estrógenos, progesterona y a HER2 el único tratamiento es el uso de quimioterapia. El uso de inhibidores de PARP está en ensayos clínicos para su uso en este subtipo de cáncer, ya que se ha encontrado que algunos subtipos triples

negativos comparten la característica de tener mutado el gen BRCA1/2. Algunos fármacos que están en fase III del ensayo son Olaparib, Talazoparib y Veliparib. (Tong et al., 2018)

1.7 Células madre cancerígenas.

Las células madre (stem cells) son un tipo de células, que en tejidos normales mantienen la homeostasis y regeneración tisular, al ser capaces de diferenciarse, auto renovarse y tener altos niveles de proliferación. La primera evidencia de la presencia de células madres cancerígenas (CSCs por sus siglas en inglés) se obtuvo en ratones NOD/SCID, cuyos tumores contenían una población de células que expresaban de manera específica los marcadores de membrana EpCAM y CD44 y baja o nula expresión del marcador CD24 (Eguiara *et al.*, 2012). El marcador EpCAM está implicado en la señalización celular, migración y diferenciación. El marcador CD44 y CD24 está presente en las células madre cancerígenas.

Posteriormente, se determinó que estas células madre cancerígenas tienen las mismas características que una célula madre sana, lo que les brinda la capacidad de generar un crecimiento constante de células parecidas al tumor original (Najafi *et al.*, 2019):

- **Capacidad de autorrenovación:** Las CSCs tienen la capacidad de auto renovarse y al momento de la división dar lugar a otra CSC esto gracias a las vías Wnt/ β -catenina, Notch y Sonic Hedgehog (Aldaz, 2017).
- **Elevada actividad de reparación del DNA:** La resistencia a la radio y quimioterapia que aportan las CSC a los tumores se debe a que en estas células la actividad de la maquinaria de reparación del DNA es elevada (Aldaz, 2017).
- **Alta expresión de proteínas Anti-apoptóticas y baja expresión de proteínas Pro-apoptóticas:** La sobre expresión de los genes BCL-2, y BCL-XL, así como la baja expresión de la caspasa 8, son características de las CSC (Aldaz, 2017).

Debido a estas características, las CSCs provocan recidivas a los tratamientos convencionales y su presencia se asocian a fenotipos tumorales más agresivos que generan metástasis a otros órganos (Eguiara *et al.*, 2012).

De acuerdo con Najafi y colaboradores, (2019) el origen de las CSCs es debido a 3 eventos
1) cambios en la epigenética de la célula; 2) la reprogramación espontánea de un oncógeno

en una célula somática; y 3) la activación del microambiente tumoral por señales extracelulares.

Entre las vías de señalización afectadas en las CSCs están WNT/ β -catenina, PTEN, TGF- β , Hedgehog, Notch y Bmi-1 (Eguiara *et al.*, 2012), por lo que han sido objetivo de estudio para el desarrollo de nuevas terapias (Ramírez, 2014).

- **Terapia dirigida a la vía Hedgehog:** Estudios *in vivo* han demostrado que la genisteína inhibe la tumorigenesis de CSCs mediante la modulación de la vía Hedgehog-Gli. Además, se han desarrollado inhibidores otros sintéticos para esta vía, como SANT1, Cur-61414 o AZD8542 (Ramírez, 2014).
- **Terapias dirigidas a la vía Notch:** El principal objetivo es la inhibición de la actividad γ -secretasa en la vía Notch, y actualmente, Pfizer está desarrollando la molécula PF-03084014, con potencial de bloqueo de la activación proteolítica de los receptores Notch (Ramírez, 2014).

La transformación maligna es un proceso donde las células adquieren diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas. En este proceso las células adquieren diferentes alteraciones que favorecen su supervivencia celular y crecimiento. Uno de los genes que esta presente en esta transformación es p53 el cual monitoriza el ciclo celular y en células cancerígenas esta ausente o mutado. Otra molécula que esta presente son los miRNAs (Tume, Cisneros et al, 2016). El miR-21 es un miRNA oncogénico mas conocido que regula la expresión de diversos genes diana como son HOXA1, TP53, WNT1 y se ha reportado que están elevados en pacientes con cáncer de mama, pulmón y gástrico. (Si, Sun, et al, 2013).

1.8 MicroRNA (miRNAs) y cáncer

Los microRNA (miRNAs) son moléculas pequeñas de RNA no codificante de 19-20 nucleótidos, los cuales se incorporan a un complejo silenciador (RISC) para regular la

expresión de genes específicos. Algunos miRNAs involucrados en el cáncer se muestran en la tabla 2.

Tabla2 miRNAs involucrados en el cáncer (Viviana et al., 2006)		
Características en cáncer	Funciones de los miRNAs	miRNAs
Resistencia a señales anti proliferativas e independencias a factores exógenos de crecimiento	Pro-proliferativos	miR-21, Familia miR-17, miR-221, miR-222
Evasión de apoptosis	Anti-proliferativo Pro-apoptoticas Anti-apoptoticas	Let-7, miR-519, miR-146a Familia miR-34, miR-29, miR-15, miR-16 Familia miR-17-92, miR-21
Potencial limitado de replicación	Regulación de inmortalización o senescencia	miR-290, miR-24, miR-34a
Inducción de angiogénesis	Pro-angiogenico Anti-angiogenico	Familia miR-17-92, miR-378, miR-296, let-7f, miR-27b, miR-130, miR-126 miR-15, miR-16, miR-20a, miR-20b
Evasión del sistema inmune	Escape a inmunovigilancia	miR-155, Familia miR-17-92, mir-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373, miR-520c, hcmv-miR-UL112
Invasión de tejidos y metástasis	Pro-metastasicos Anti-metastasicos	miR-10b, miR-21, miR-373, miR-520c, miR-155 Let-7, miR-335, miR-206, miR-126, miR-146a, miR-101, miR-200
Inestabilidad genómica	Promotor de	Delección o regulación a la baja de miRNAs

	inestabilidad genómica	como miR-17, miR-20a, miR-15, miR-16 o let-7
--	------------------------	--

1.9 Biogénesis de miRNAs

La mayoría de los miRNAs se localizan en zonas intrónicas e intergenicas en el genoma. Cuando los miRNAs se encuentran en una zona intrónicas, son transcritos como parte del mRNA que los aloja por la enzima RNA polimerasa II (la misma que transcribe el DNA en mRNA) en su mayoría, sin embargo, también pueden ser transcritos por la RNA polimerasa III, la cual sintetiza RNA que está vinculado a la regulación del ciclo celular. Los miRNAs se originan a partir de una región de 60-70 nucleótidos de una doble hélice de RNA en forma de horquilla (MacFarlane & R. Murphy, 2010), la cual se le denomina miRNA primario bicatenario (pri-miRNA) (López-Camarillo *et al.*, 2014).

Este pri-miRNA es procesado por un complejo microprocesador formado por la enzima Droscha y la proteína DGCR8. La enzima Droscha es una RNAsa tipo III que reconoce al pri-miRNA y lo clava, generando un precursor de aproximadamente 70-90 nucleótidos llamado miRNA precursor (pre-miRNA) (López-Camarillo *et al.*, 2014).

El pre-miRNA es exportado al citoplasma por medio de la enzima XPO5; y ahí, la enzima DICER junto a la proteína TRBP recortan la horquilla del pre-miRNA resultando un RNA de doble cadena (miRNA dúplex), que posteriormente formará el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), junto a la proteína TRBP y la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2). La cadena complementaria del miRNA dúplex es degradada por AGO2, mientras que la cadena del miRNA funcional, reconoce y se hibrida parcial o totalmente, a una secuencia dentro de la región 3'-UTR (región 3' no traducida) de un mRNA blanco específico (López-Camarillo *et al.*, 2014). En la figura 2 se puede observar el proceso de la maduración de un microRNA.

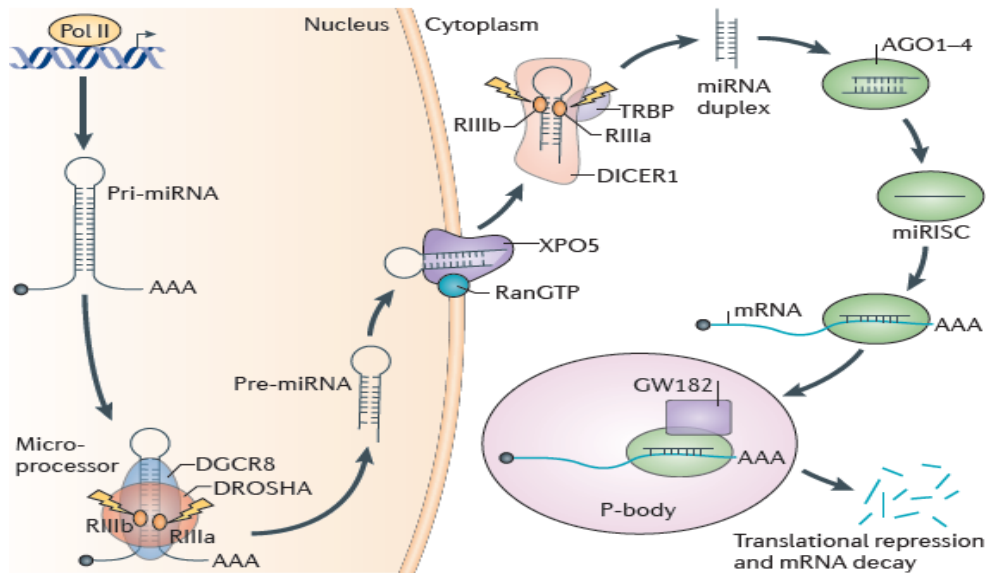


Figura 2. Proceso de maduración de un miRNA. Imagen tomada de Lin & Gregory, (2015).

La importancia de los miRNA en el cáncer es que estos pequeños RNA son capaces de silenciar o aumentar la expresión de oncogenes. Un claro caso es el clúster miR-17-92, el cual incluye 6 miRNAs maduros (miR-17, miR-18a, miR19a, miR19b-1, miR20a, mir-92-1), que se localizan en el loci 13q31.3. La sobreexpresión de este clúster está asociado a cáncer de pulmón, colon, próstata y páncreas. (Frontela Noda, 2012) En la biogénesis de los miRNAs, cuando ocurre una mutación en alguno de las enzimas o proteínas como Drosha, DICER1 y XPO5 promueve a la formación de oncomiRNAs y por ende la carcinogénesis.(Frontela Noda, 2012).

Dependiendo de la función que realice el miRNA puede estar categorizado con un oncomiRNAs o un miRNA supresor de tumores

1.10 OncomiRNAs

Los oncomiRNAs (oncomirs), son miRNAs que promueven el desarrollo de tumores, mediante la regulación o inhibición de genes supresores de tumores, cuya función es importante procesos como la diferenciación celular y la apoptosis. Algunos oncomirs involucrados en el cáncer de mama se muestran en la tabla 3. Un miRNA involucrado en el

cáncer de mama es el miR-27a, el cual regula el gen ZBTB10, un represor de proteínas oncogénicas específicas (SP) (Viviana *et al.*, 2006).

Tabla 3. OncomiRNAs involucrados en el cáncer de mama

Tomado de Aguirre, 2017

Oncomirs	Objetivos celulares	Función en cáncer de mamá triple negativo	Línea celular
miR-181	BIM	Inhibición de la anoikis	MDA_MB_231
miR-146a	BRCA1	Control y proliferación celular	MDA_MB_231
miR-182	PFN1	Inducción de apoptosis	MDA_MB_231
miR-146b	BRCA1	Control de BRCA1	MDA-MB-231

Dado el comportamiento de los miRNAs y sus diferentes funciones en el cáncer, se han analizado como posibles biomarcadores, para indicar el estado de la patología y su progresión. Una gran ventaja que tienen los miRNAs es su gran estabilidad y su sencilla obtención a partir de biopsias o fluidos corporales como suero o saliva (Frontela Noda, 2012).

Se han identificado 9 miRNAs (miR-210, miR-181a, let-7, miR-221, miR-10b, miR-126, miR-218, miR-335-5p y miR-143), que están involucrados en la evolución del carcinoma ductal *in situ* a carcinoma ductal invasivo, así como en la evolución del carcinoma lobulillar *in situ* a carcinoma lobulillar invasivo. Entre estos miRNAs, hay evidencia de que el miR-155 promueve proliferación, angiogénesis y migración, por lo que su sobreexpresión en tumores de mama se relaciona a un mal pronóstico de supervivencia (Aguirre, 2017).

Otro miRNA que se encuentra sobre expresado en cáncer de mama metastásico, es miR-21, que inhibe a los genes supresores de tumores tropomiosina-1(TPM1) y PDCD4, promueve el crecimiento tumoral y aumenta la expresión de HER2, MMP2 y MMP3 proteínas involucradas en el proceso metastásico (López et al., 2014).

En respuesta a la expresión y función aberrantes de miRNAs en patologías como el cáncer, se han sintetizado oligonucleótidos modificados, denominados anti-miRNAs (OMAs) así como “antagomirs”. La función de los antagomirs es la de inhibir miRNAs específicos endógenos (Frontela Noda, 2012), mediante complementariedad de bases. Los OMA por su parte, bloquean las interacciones entre miRNAs y mRNA por competencia o previniendo la traducción del mRNA, a través de un mecanismo de bloqueo estérico o una hibridación con un miRNA (Aguirre, 2017).

En un estudio realizado en células MCF7, se utilizó el anti-miR-21 y el resultado fue la supresión del crecimiento tumoral. Entre los OMA modificados está el 2'-O-metil oligonucleótidos que esta conjugado a colesterol y ácidos nucleicos bloqueadores.

Otro tipo de modificación a los OMA son que, un solo OMA puede actuar en múltiples miRNAs silenciándolos. Por ejemplo, el OMA de diana múltiple el cual silencia al miR-21, miR-155 y miR-17-5p en células MCF-7. Otra manera de inhibir la expresión de un oncomirs es a través de las esponjas y máscaras de miRNAs (miR-mask). Las esponjas de miRNAs son transcritos para un miRNA específico y se forman insertándose entre los sitios de unión de miRNAs en posición escindida por la enzima Argonauta2. Estas esponjas tienen como función reprimir las dianas de los miRNAs de interés. Las máscaras de miRNAs es una molécula de cadena simple 2-O-metil-modificada, cuya diana es un mRNA, el cual se une por hibridación complementaria en la región 3'-UTR (Aguirre, 2017). En la imagen 3 se puede observar algunas estrategias de represión de oncomiRNAs previamente descritas.

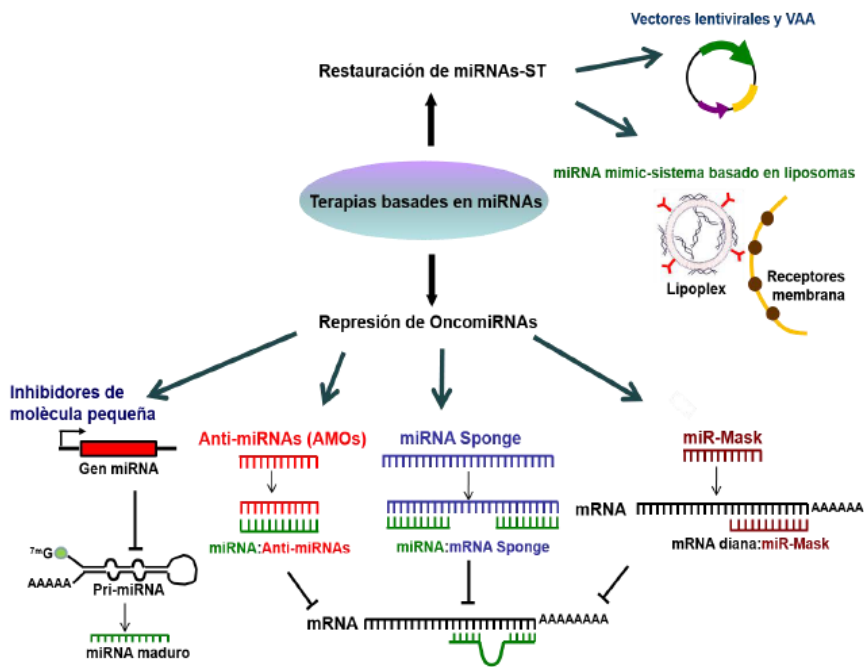


Figura 3. Diferentes terapias basadas en inhibir miRNAs u oncomiRNAs. Imagen tomada de Aguirre, 2017.

1.11 miRNAs supresores de tumores

Cuando en un tumor la expresión de un miRNA esta disminuida y se ha determinado que sus objetivos moleculares tienen funciones oncogénicas, se considera que es un miRNA supresor de tumoral. Este tipo de miRNAs se encargan de evitar el desarrollo de tumores al inhibir negativamente los oncogenes y / o genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis entre otros procesos moleculares (B. Zhang *et al.*, 2007). En la tabla 4 están algunos miRNAs supresores de tumores.

Tabla 4. miRNAs supresores de tumores en cáncer de mama

Tabla tomada de Zhang et al., 2007.

miRNA supresores tumorales	Objetivos celulares	Función en cáncer de mamá triple negativo	Línea celular
miR-200a	Zeb1/Zeb2, EphA2	Estimulación y diferenciación en tejido epitelial mamario	MDA-MB-231
miR-205	E2F1, LAMC1	Reducción de proliferación, ciclo celular y crecimiento de tumor	MCF-7
miR-31	WAVE3, PRKCE	Inducción de apoptosis y sensibilidad a quimio/radioterapia	MCF-7

1.12 miR-196a-5p

La familia de miR-196 comprende a miR-196a y miR-196b, estos miRNAs se localizan en 2 loci situados en los genes HOXC (miR196A2) y HOXB (MIR196A1) (Xiong, 2021). miR-196a-5p se ha encontrado expresado en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal y de mama. Este miRNA regula la expresión de estrógenos en tejidos de cáncer de mama que expresan estas hormonas (Xin *et al.*, 2019); por otro lado se ha visto que es un regulador del gen UBE2C, que codifica para la proteína ubiquitina E2 C, involucrada en procesos de degradación de proteínas anormales en células que entran en apoptosis. Debido a su elevada expresión y a sus blancos moleculares, miR196a-5p se ha propuesto como un oncomirs (Cheng, 2018). Un estudio de Papaconstantinou en el 2012 y de Jiang en el 2018 determinaron que el miR-196a tiene un efecto en el crecimiento diferenciación y metástasis del tumor al regular genes específicos como son Bcl2.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo General

Analizar el efecto de la inhibición de miR-196a-5p sobre la viabilidad y migración en células de cáncer de mama triple negativo.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la inhibición del miR-196a-5p sobre la viabilidad en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) por el ensayo de MTT y cristal violeta.
- Determinar el efecto de la inhibición de miR-196a-5p sobre la migración de células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) por el ensayo de “cierre de herida”.
- Analizar bioinformáticamente los principales blancos moleculares de miR-196a-5p y relacionarlos con procesos alterados en cáncer de mama.

3.1 Planteamiento del problema

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células que han adquirido la capacidad de evadir todos los mecanismos de muerte celular, y de proliferar en ausencia de factores de crecimiento. Los tratamientos para esta patología dependen del tipo molecular de cáncer, así como el estadio o etapa de avance en que se encuentra el tumor. El cáncer de mama es la patología con mayor mortalidad en mujeres a nivel global, debido al diagnóstico tardío de la enfermedad, la resistencia a los tratamientos convencionales y a la recurrencia tumoral. El cáncer de mama triple negativo representa el tipo menos frecuente de cáncer de mama, pero el más agresivo. Se ha observado que en tejidos de cáncer de mama hay expresión aberrante de genes, incluyendo de miRNAs, pequeños RNA no codificantes que regulan a nivel postranscripcional la expresión de genes y su traducción a proteínas. La expresión y actividad aberrante de estas moléculas cáncer, les ha conferido funciones de oncogenes (oncomiRs) o de miRNAs supresores de tumores. Dichas características, convierte a los miRNAs en objetivos atractivos de estudio para comprender el desarrollo y establecimiento de la patología y proponer potenciales blancos terapéuticos.

Por lo tanto, en este trabajo se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿La inhibición del hsa-miR-196a-5p disminuirá la proliferación, migración y viabilidad de células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231)?

4.1 justificación

El cáncer es una enfermedad multifactorial y entre los factores que influyen en su desarrollo y establecimiento está la expresión aberrante de microRNA oncogénicos y supresores de tumores (Aguirre, 2017).

En este contexto interesantemente se ha propuesto al miR-196a-5p como un oncomiRs ya que en cáncer de mama subtipo luminal A ya que los estrógenos promueven la viabilidad celular al incrementar la expresión del miR-196a-5p (Zhu, Thang, 2022). En cáncer

colorrectal la sobreexpresión del miR-196 regula al alza la M-cadherina y fibronectina (Xin, Wang, 2019).

Por otro lado se ha reportado que miR-196a-5p se encuentra sobre expresado en cáncer de mama triple negativo, el tipo de cáncer más agresivo y letal de los tipos de cáncer de mama esto debido a la elevada recurrencia y a la frecuente resistencia a múltiples tratamientos (Fragomeni *et al.*, 2018).

Dado que miR-196a-5p es un oncomirs que regula los genes homeobox (HOX) y éstos a su vez, están involucrados en la migración, diferenciación celular y organogénesis, se estudiara la inhibición de miR-196a-5p brindando información de las actividades biológicas de este miRNA sobre procesos de viabilidad y migración celular en cáncer de mama triple negativo, además de proponer la vía de señalización involucrada en la regulación de estos procesos biológicos.

Debido a que miR-196a-5p es un miRNA con expresión elevada en cáncer de mama y se ha observado que podría modular procesos como migración y viabilidad celular, se evaluara si su inhibición, compromete la migración y proliferación de células de cáncer de mama subtipo triple negativo en la línea celular MDA-MB-231. Esto podría ayudar a comprender mecanismos moleculares del miR-196a-5p en el cáncer de mama.

5.1 Metodología

5.1.1 Análisis bioinformático

Para realizar la búsqueda de los genes objetivo del miRNA se utilizaron las bases de datos miRDB, (<http://www.mirdb.org>), TargetScanHuman8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/) y miRBase (<https://www.mirbase.org>). Cada una de estas bases de datos reportan los diferentes genes que regula el miR-196a-5p.

5.1.1.1 miRBase

miRBase es una base de datos de secuencias de miRNAs publicados. Cada resultado da una predicción de la horquilla que forma el miRNA junto con su secuencia y localización del miRNA maduro (Kozomara & Birgaoanu, 2019). En miRBase se buscó el miR-196a-5p y se obtuvo la horquilla que forma, así como también la secuencia madura del miRNA. Se utilizó la opción con más evidencia científica como el miRNA funcional

5.1.1.2 miRDB

MiRDB es una base de datos de libre acceso que predice los blancos de diferentes microRNA. Este software brinda una puntuación predictiva de 50-100 asignada por miRtarget para todos los objetivos de los miRNAs ingresados (Liu & Wang, 2019). Entre mayor es la calificación que se le otorga al blanco, mayor es la confianza y probabilidad que se tiene en éste (Chen & Wang, 2020).

5.1.1.3 TargetScanHuman 8.0

TargetScanHuman 8.0 es una base de datos que predice los blancos dianas de diferentes miRNAs. Las predicciones se basan en la presencia de sitios altamente conservados (6mer, 7mer, 8mer) en las regiones 3'-UTR de mRNAs blanco y que hibridan con el miRNA ingresado (Lewis *et al.*, 2005). Esta plataforma también arroja sitios que son muy poco conservados como opción de predicción.

5.2 Transfección del inhibidor de miRNA en la línea celular MDA-MB-231

Veinticuatro horas previas a la transfección, 1.4×10^4 células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 60 mm. Las células fueron transfectadas con [10nM] de un inhibidor específico para miR-196a-5p para inhibir su expresión, usando lipofectamina 3000 (ThermoFisher), siguiendo el protocolo de manufactura. La misma línea celular fue transfectada solo con lipofectamina 3000 sin el inhibidor de miRNA para que ambas líneas celulares tuvieran las mismas condiciones y poder usarlas como control.

5.3 Extracción de ARN por método de trizol

Transcurridas 48 horas de la transfección, se extrajo el ARN de las células usando el reactivo trizol. Brevemente, se lavaron las células 2 veces con PBS 1x pH 7.4, se agregó 1 ml de trizol y se incubaron 3 minutos en hielo. Se agregaron 260 μ l de cloroformo absoluto y se incubaron en hielo por 5 minutos, después se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a 4° C. La fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo y se agregaron 500 μ l de isopropanol absoluto y se incubó toda la noche a -20°C. Al día siguiente, el precipitado se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4° C, el sobrenadante fue eliminado y se lavó el botón de ARN con 800 μ l de etanol al 75%. Los tubos fueron centrifugados a 12,000rpm por 5 min a 4° C, el sobrenadante se decantó y las muestras se secaron por 10 minutos hasta evaporar el etanol. Finalmente, los ARNs se resuspendieron en 30 μ l de agua grado biología molecular y se conservaron a -80°C hasta su uso.

La extracción de RNA total con trizol utiliza un trireagente que contiene tiocianato de guanidinio el cual es un potente desnaturizante de proteínas y fenol un disolvente orgánico y una solución tampón (que mantiene la integridad del RNA) rompe células y desnaturaliza las proteínas (Chomczynski, Sacchi.1986).

El lisado se centrifuga para separar las macromoléculas (proteínas, DNA y RNA) de los desechos celulares. La separación se da según su densidad. El RNA polar permanecerá en la fase polar superior, el DNA se acumulará en la interfase y las proteínas desnaturizadas se disolverán en la fase orgánica inferior (Nicholl, and Cambridge University Press,2015).

5.4 Cuantificación e integridad del ARN extraído

El ARN obtenido de la extracción se cuantifico utilizando el equipo Nanodrop (ThermoFisher), y se evaluó su pureza de acuerdo a la relación 260/280 y 260/230. La integridad de los ARNs fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

5.5 Síntesis de cDNA

Una vez que se tiene el RNA es necesario sintetizar cDNA con él. Se utiliza la enzima transcriptasa reversa la cual utiliza como molde el RNA y un pequeño fragmento de DNA que actúa como primer (oligo-dT). La retro transcriptasa inversa copiará solo los mRNA ya que son los únicos en poseer una cola de poliA y lo hará en sentido 3'-5' (Hernández, Vasallo, 2000)

La máster mix que se utilizó para realizar la síntesis de cDNA fue el siguiente:

5mg de la muestra de RNA, 0.5ul de oligo dT, 1ul de dNTPs, 0.5 ul del inhibidor de RNAsa y 4ul del buffer de retro transcripción. La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa, a partir de 5 µg de ARN previamente obtenido en la extracción. El programa de síntesis de cDNA se muestra en la tabla 5.

Paso	Temperatura	Tiempo
Alineamiento de primer	42°C	10 minutos
Síntesis del cDNA	50°C	60 minutos
desnaturalización del cDNA	70°C	10 Minutos

El cDNA obtenido se usó en ensayos de PCR para comprobar la presencia de los genes HOXA7 y HOXC8

5.6 Diseño de Primers

Los primers fueron diseñados en el primer designing de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se diseñó primers para los genes HOXA7 y HOXC8 como se muestra en la tabla 6. Una vez diseñado los primers se verificó que las Tm no fueran muy grandes y la concentración de %G/C estuviera dentro del rango óptimo. Se verificó igual que los primers no formen una horquilla ni que formen dímeros de primers.

Tabla 6 Primer para los genes HOXC8 y HOXA7					
Homo Sapiens Homeobox C8(HOXC8), mRNA					
	Primer	Tm	Producto	%G/C	
Forward	TCCCTGGAACCGGCCTATTA	60.03	229	55%	
Reverse	GCGCCTCGTAGCCATAGAAT	60.04	229	55%	

Homo Sapiens Homeobox A7(HOXA7), mRNA					
	Primer	Tm	producto	%G/C	
Forward	CTGAGGCCAATTTCCGCATC	59.62	245	55%	
Reverse	CGGACCTTCGTCCTTATGCT	59.54	245	55%	

5.7 PCR para los genes HOXA7 y HOXC8

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica para sintetizar muchas veces un fragmento de DNA utilizando una polimerasa que puede trabajar a altas temperaturas. Una PCR simula el proceso de síntesis de DNA y para que esto suceda se necesita: una polimerasa, el DNA del fragmento que se quiere sintetizar, primers necesarios para que inicie la transcripción y dinucleótido todos en las condiciones adecuadas para que la enzima trabaje. (Asuar,2000)

Para comprobar la presencia de los genes HOXA7 y HOXC8 se hizo una PCR punto final. La máster mix que se utilizó fue la siguiente

5ul de PCR Maste Mix de Thermo Fisher, 0.375 ul de el primer forward, 0.375 ul del primer reverse, 1ul de muestra de DNA y 4.5 ul de agua grado biología molecular. Los genes HOXA7 y HOXC8, fueron amplificados siguiendo el programa plasmado en la tabla 7. La PCR que se utilizó fue de punto final y para comprobar los productos de PCR se utilizó un gel de electroforesis al 2%

Tabla 7 Programa de amplificación de HOXA7 y HOXC8			
Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95° C	3 min.	x1

Desnaturalización	95° C	30 seg.	x 40
Alineamiento	60°C	45 seg.	
Extensión	72° C	30 seg.	
Extensión Final	72° C	5 min.	

5.87 Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT

El ensayo de viabilidad por MTT evalúa la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias celulares. Esta enzima reduce el reactivo MTT a formazan mediante una reacción colorimétrica.

Brevemente, 1.4×10^4 células MDA-MB-231 fueron transfectadas con [10ng] del inhibidor de miR-196a-5p. La viabilidad de las células fue evaluada 24 y 48 h posteriores a la transfección con el inhibidor. Brevemente 25 ul de reactivo MTT fue adicionado a las células y se incubaron 2 h a 37°C en ausencia de luz. Posteriormente, el medio fue retirado y los cristales de formazan fueron disueltos en DMSO al 100%, este producto fue dispuesto en placas de 96 pozos y las absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 540 nm. Células sin transfección fueron usadas como control negativo del ensayo. El ensayo se realizó por triplicado en tiempos independientes.

5.98 Ensayo de cristal violeta y conteo celular

Se realizó el ensayo de cristal violeta para comprobar también la viabilidad celular siguiendo el siguiente protocolo; se retiró el medio de las células y se agregó 500ul de para formaldehído por 5 min. Se lavó con agua inyectable y se agregaron 500ul de cristal violeta y se incubó por 30 segundos. Por último se realizaron lavados con agua inyectable.

El conteo celular se realizó después de teñir las células con cristal violeta, tomando 4 campos diferentes.

5.109 Evaluación de la migración celular por el ensayo de cierre de herida

La migración de células transfectadas con el inhibidor de miR-196a-5p fue evaluada mediante el ensayo de cierre de herida de acuerdo al protocolo realizado por Rodríguez *et al.*, (2005).

El ensayo se realizó a las 24 y 48 h después de la transfección con [10ng] del inhibidor de miR-196a-5p. Una vez que los cultivos alcanzaron el 90-100% de confluencia, se realizó un barrido o “herida” sobre el monocapa celular. La migración de las células al centro de la herida fue monitoreada por 24 horas mediante microfotografías tomadas cada 3 h. Células sin transfección fueron usadas como control negativo del ensayo. El porcentaje de migración se obtuvo por la medición de la herida. El ensayo se realizó por triplicado en tiempos independientes.

6. Resultados

6.1 La inhibición de miR-196a-5p modifica la viabilidad celular de células MDA-MB-231

Con formato: Fuente:
(Predeterminado) Times New Roman

Los valores obtenidos en el ensayo de MTT fue de una viabilidad de del 20% de las células que fueron transfectadas con el inhibidor del miRNA, no presentaron una diferencia significativa entre el control y la inhibición del miRNA a las 24 horas de transfección ($p=0.4029$), sin embargo, si se presentó una diferencia entre el control y la inhibición del miRNA a las 48 horas de la transfección ($P=0.0068$) como se muestra en la figura 4A.

En cuanto al ensayo de cristal violeta, realizado a las 48 horas de transfección, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las células control (sin el inhibidor de miR-196a-5p) comparadas con las células transfectas con el inhibidor del miRNA como se observa en la figura 4 B.

Se realizo un conteo celular de las células que fueron teñidas con cristal violeta y al graficarlas estas presentaron una diferencia significativa entre las células tratadas con el inhibidor de miRNA y las células control ($P < .0001$) (Figura 5) la cual pudo ser observada en las microfotografías mostradas en la figura 6

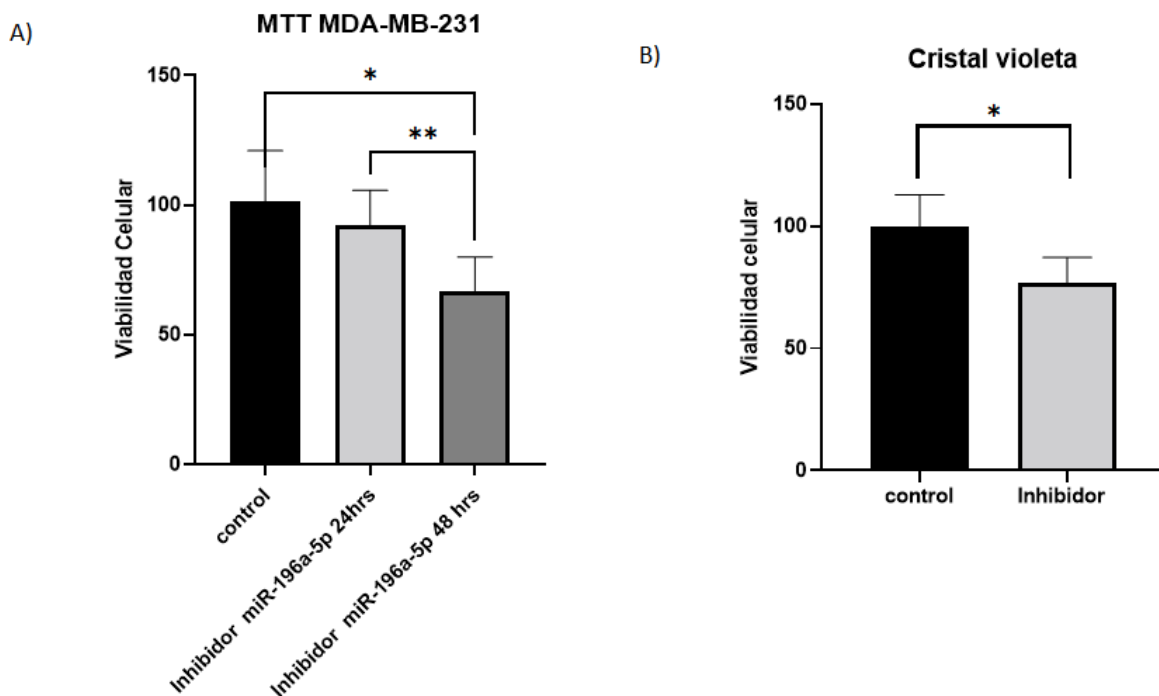


Figura 4. Ensayo de MTT y Cristal violeta. (A) Ensayo de MTT en células transfectadas con inhibidor de miR-196a-5p a 24 y 48 horas. Se puede observar que hay una diferencia significativa entre las células sin transfectar y las células con el inhibidor de miRNA (* P=0.0068, ** P=0.114). (B) Ensayo de cristal violeta a las 48 horas de transfección con el inhibidor de miR-196a-5p. Se pudo observar una diferencia significativa entre las células sin transfectar el inhibidor (control) de las células con el inhibidor de miR-196a-5p. (* P= 0.0001). Ambos análisis se realizaron con ANOVA post Tukey.

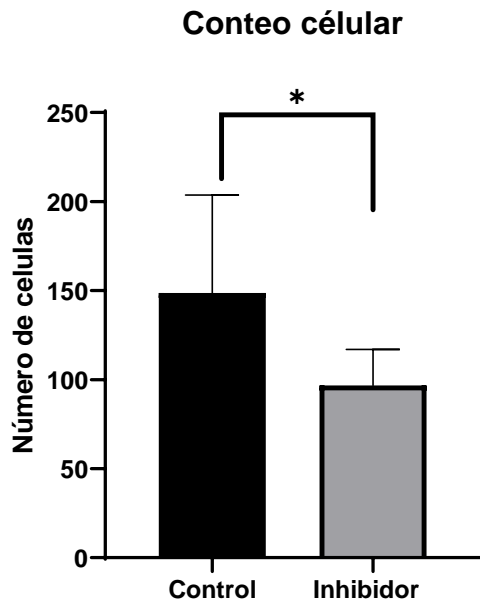


Figura 5. Evaluación del número de células después de la inhibición de miR-196a-5p. Grafica del conteo celular realizado con cristal violeta. Como se puede observar si hay una diferencia estadísticamente significativa entre las células control y las células tratadas con el inhibidor. Este análisis se realizó por medio de una prueba t de student (*P=0.0012) Este análisis de realizo por medio de las microfotografías tomadas en la Figura 6

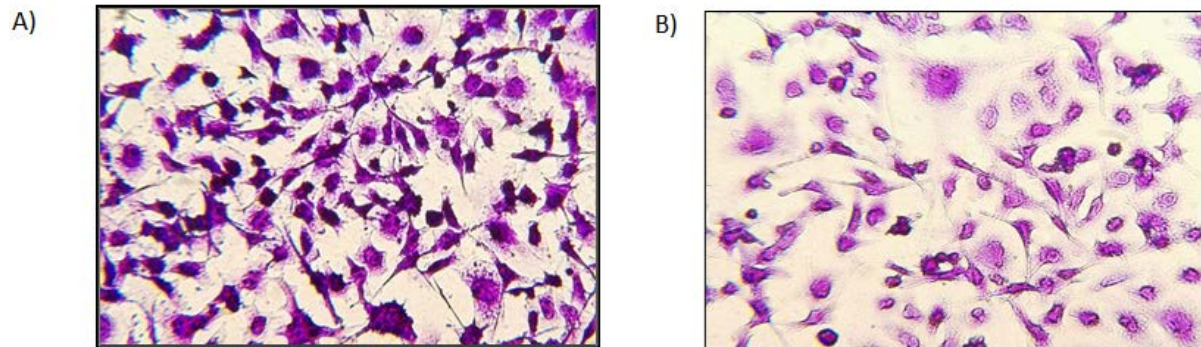


Figura 6. Células teñidas con cristal violeta. (A) Células teñidas con cristal violeta sin el inhibidor de miR-195a-5p observadas en el microscopio invertido con objetivo 40X. (B) Células teñidas con cristal violeta con el inhibidor de miRNA observadas en el microscopio invertido con objetivo 40X.

6.2 La inhibición del miR-196a-5p modifica la migración celular de células MDA-MB-231

Los resultados del ensayo de migración fueron comparados entre el control y el tratamiento con el inhibidor de miR-196a-5p a las 6, 9 y 24 horas, observando que a las 24 horas las células control si lograron cerrar la herida realizada, mientras que las células transfectadas con el inhibidor del miRNA, no lograron cerrarlas por completo como se observa en la figura 7.

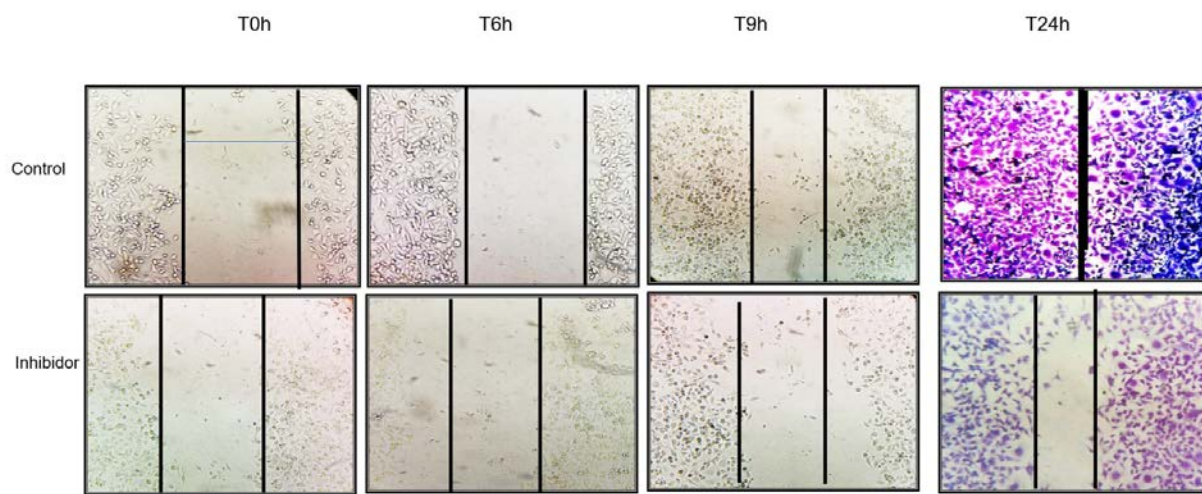


Figura 5. Ensayo de cierre de herida a las 6,9,24 horas.

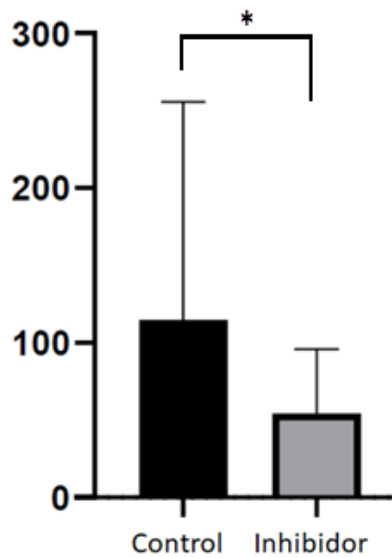


Figura 6 **Conteo celular de ensayo de herida.** Con los resultados obtenidos del ensayo de herida se realizo un conteo celular y se observó que hay una diferencia significativa entre las células contadas del control y las células tratadas con el inhibidor de miRNA. (P=0.0075) Se realizo un análisis ANOVA

6.3 HOXA7 y HOXC8 posibles blancos de miR-196a-5p

La búsqueda para miR-196a-5p dio varios posibles genes blanco del miR-196a-5p y se tomaron los genes con sitios altamente conservados (presencia de sitios 7mer y 8mer). Se utilizaron los genes HOXA7 y HOXC8 debido a sus sitios altamente conservados con 2 sitios 7mer y 4 sitios 8mer. Esta base de datos igual nos dio los sitios poco conservados.

En el sitio de TargetScanHuman 8.0 se buscó el miR-196a-5p y sus posibles dianas blanco y una vez obtenido esos blancos se seleccionó a HOXA7 y HOXC8, por sus zonas altamente conservadas debido a sus 4 sitios 8mer.

Cuando se realizó la consulta de la base de datos en miRDB se buscó también el miR-196a-5p y al igual que en TargetScan, se seleccionaron los genes HOXA7 y HOXC8, ya que se obtuvo una puntuación de 100. También de esta búsqueda se obtuvo la secuencia 3'UTR y los lugares donde se une el miRNA.

En la figura 7 se pueden observar los sitios 8mer y 7mer del gen HOXA7 y en la figura 8 los sitios 7mer y 8mer del gen HOXC8

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type
Position 302-309 of HOXA7 3' UTR hsa-miR-196a-5p	5' ...UGGCGCGUCCAAAUAACUACCUA... 3' GGGUUGUUGUACUUUGAUGGAU	8mer
Position 339-346 of HOXA7 3' UTR hsa-miR-196b-5p	5' ...UCGAGGCACCCCAAACUACCUA... 3' GGGUUGUUGUCCUUUGAUGGAU	8mer
Position 454-461 of HOXA7 3' UTR hsa-miR-196a-5p	5' ...AAAGUGAAUCU CACUACUACCUA... 3' GGGUUGUUGUACUUUGAUGGAU	8mer
Position 472-479 of HOXA7 3' UTR hsa-miR-196a-5p	5' ...ACCUACUCCCUAAAACUACCUA... 3' GGGUUGUUGUACUUUGAUGGAU	8mer

Figura 7 Sitios 8mer del gen HOXA7 y su hibridación con el miRNA

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type
Position 128-134 of HOXC8 3' UTR hsa-miR-196a-5p	5' ...ACACUCACAACUCUA-ACUACCUG... 3' GGGUUGUUGUACUUGAUGGAU	7mer-m8
Position 864-871 of HOXC8 3' UTR hsa-miR-196b-5p	5' ...AUAAAUCUUAACAU---ACUACCUA... 3' GGGUUGUUGUCCUUUGAUGGAU	8mer
Position 1004-1011 of HOXC8 3' UTR hsa-miR-196b-5p	5' ...CCAGCGUAUUUUAUCACUACCUA... 3' GGGUUGUUGUCCUUUGAUGGAU	8mer

Figura 8 Sitios 7mer y 8mer del gen HOXC8 y su hibridación con el miRNA

7. Discusión

El objetivo de estudio fue el analizar el efecto de la inhibición de miR-196a-5p sobre la viabilidad y migración en células de cáncer de mama triple negativo.

Para abordar este tema se utilizó el ensayo de viabilidad celular siguiendo el protocolo de la casa comercial Sigma-Aldrich como también se utilizó el ensayo de cierre de herida con el protocolo de Rodríguez et al., (2005).

La discusión se divide en tres principales secciones: el efecto de la inhibición del miR-196a-5p sobre la viabilidad celular en células MDA-MB-231, el efecto de la inhibición del miR-196aa-5p sobre la migración en células de cáncer de mama subtipo triple negativo y posteriormente el analizar bioinformáticamente los posibles blancos terapéuticos del miR-196a-5p.

La inhibición del miR-196a-5p modifica la viabilidad en células MDA-MB-231

El resultado obtenido de acuerdo a los ensayos de MTT fue que la inhibición del miR-196aa-5p afecta a la viabilidad en células de cáncer de mama subtipo triple negativo (MDA-MB-231)

El miR-196a actúa como un oncogén teniendo múltiples funciones en la carcinogénesis y progresión del cáncer. La inhibición del miR-196a disminuye la proliferación e invasión en cáncer de mama (Xiong,2021). En cáncer de mama, miR-196a está regulado transcripcionalmente por la unión de los receptores de estrógenos y la metilación del DNA en el locus de HOXC.

De acuerdo a Cheng *et al.*, (2018) en cáncer de mama hay sobreexpresión de miR-196a-5p, y este miRNA regula los receptores de estrógenos en esta patología. Además, en este estudio se evidenció que la inhibición de miR-196a reduce la proliferación de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

Liu y Fan en el 2020 comprobaron que el miR-196a-5p inhibe la proliferación celular de las células NT-2 esto al comprobarlo por el ensayo de MTT después de 72 horas de transfección un mimic miRNA. El gen que utilizaron para comprobar esto fue el gen NR6A1 el cual está presente en la gametogénesis y una expresión aberrante produce carcinoma embrionario.

Liu y colaboradores demostraron que la inhibición del miRNA-196a en tejido canceroso de pulmón reduce la viabilidad, crecimiento, autorrenovación al activar el glutatión peroxidasa 3(GPX3) (Liu et al, 2019).

Se ha demostrado que E2 promueve la viabilidad celular al incrementar las expresiones de miR-196a-5p en la línea celular y en ECC-1(Zhu, Thang, 2022). Los miRNAs (miR-196a-5p y miR-4472) no han sido investigados sistemáticamente en cáncer de mama subtipo triple negativo, el primer reporte de estos miRNAs fue en el artículo “Bioninformatic identification of chemoresistance-associated microRNAs in breast cancer microarray data” de Ya-Wen Wang.

En un estudio realizado por Takkar y Sharma en el 2021 demostraron que el miR-196a inhibe la apoptosis esto al medir la actividad de las caspasas 3/7. Observaron que las células

que sobre expresan el miR-196aa-5p tiene una actividad menor de las caspasas 3/7. Esto lo comprobaron con un western blot.

En este trabajo se realizó la inhibición del miR-196a-5p con un inhibidor de miRNA y se demostró que en la línea celular MDA-MB-231, hay disminución en su viabilidad celular evaluado en los ensayos de MTT, cristal violeta lo que concuerda con lo encontrado por Cheng et al., 2018.

El estudio de miRNAs con funciones en cáncer representa una oportunidad para proponer potenciales objetivos terapéuticos para pacientes con tipos de cáncer quimio resistentes o que han sufrido alguna recaída. El miRNA miR-196a-5p ha demostrado tener un papel importante en el cáncer de mama triple negativo al estar sobre expresado y regular varios genes como los HOX los cuales juegan un papel en diferentes procesos como metabolismo, regulación biológica proliferación y uniones intracelulares entre membranas

La inhibición del miR-196a-5p frena la migración de células MDA-MB-231

El resultado obtenido por el ensayo de cierre de herida fue que la inhibición del miR-196a-5p disminuye la migración en células de cáncer de mama subtipo triple negativo (MDA-MB-231)

La sobreexpresión del miR-196a-5p regula al alza la N-cadherina y fibronectina mientras que regula a la baja la E-cadherina en células colorrectales (Xin, Wang, 2019). Las cadherinas son glicoproteínas mediadoras de la adhesión célula-célula. La E-cadherina y la N-cadherina participan en las uniones intercelulares de tipo adherente.

En el estudio realizado por Xin y Wang (2019) demostraron que el miR-196aa-5p promueve la transición epitelio mesénquima (EMT) y motilidad al regular la expresión de IkBa esto lo realizo por medio de un ensayo de lucíferasa. Este ensayo demostró que la expresión del miR-196a-5p regula a la baja IkBa en el mRNA como en los niveles de la proteína.

Genes HOXA7 y HOXC8 como posibles blancos de miR-196a-5p

Los genes HOX son importantes por poseer el homeodominio en su estructura. Esta unida al DNA y está constituida por 61 aminoácidos. miR-196a inhibe la proliferación y metástasis al regular negativamente a HOXC8, por lo que después del análisis bioinformático en las bases de datos miRBase, miRDB y Target Scan Human 8.0 se tomaron los genes HOXA7 y HOXC8 como blancos del miR-196a-5p, esto por los 3 sitios 8mer que presentan y por su papel en varios procesos como la apoptosis, diferenciación, motilidad y angiogénesis.

El miR-196a-5p delimita la expresión de HOXB8 como también puede delimitar los genes HOXC8, HOXD8 y HOXA7, lo que apunta a un control postranscripcional en el clúster de genes HOX (Yekta, Shih,2004).

En células de cáncer colorrectal (SW480 y SW620) se demostró que a bajas concentraciones de miR-196a (20nmol/L) bloqueaban el mRNA de HOXB8. A altas concentraciones (240nmol/L) disminuye los niveles de mRNA de HOXA7. Esto verifica que los genes HOX son dianas del miR-196a pero que son dependientes de las concentraciones de este. (Schimanski, Frerichs, et al, 2010).

8. Conclusión y perspectivas

En este estudio se demostró que la inhibición de la expresión del hsa-miR-196a-5p, disminuye la viabilidad y migración celular en la línea MDA-MB-231, tratada con un inhibidor miRNA en comparación con células control no transfectadas, evaluadas mediante los ensayos de MTT, Cristal violeta y ensayo de la herida.

8.1 Perspectivas

En las próximas líneas de investigación se planea determinar el efecto del inhibidor de miR-196a-5p sobre la expresión de los genes HOXA7 y HOXC8 así como determinar si son genes blancos al clonar un sitio 8MER en un plásmido psiCHECK 2 Biosensor de

Promega el cual ha sido utilizado para expresar este inhibidor de miRNA en el gen de la luciferasa.

9.0 Referencias

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual, Md, 1–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- , M. (2018). The versatile nature of miR-9/9* in human cancer. *Oncotarget*, 9(29), 20838–20854. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24889>
- Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>
- D’Ippolito, E., & Iorio, M. V. (2013). MicroRNAs and triple negative breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 22202–22220. <https://doi.org/10.3390/ijms141122202>
- Wu, G., Zhou, W., Pan, X., Sun, Y., Xu, H., Shi, P., Li, J., Gao, L., & Tian, X. (2018). MiR-100 Reverses cisplatin resistance in breast cancer by suppressing HAX-1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(5), 2077–2087. <https://doi.org/10.1159/000491476>
- Sánchez-Suárez, P., & Benítez-Bribiesca, L. (2006). Estudio de la resistencia a drogas. *Unidad de Investigación Médica En Enfermedades Oncolo*, 1, 187–199.
- Ramirez Rivera, A. (2014). Universidad de jaén.
- Aldaz, P. (2017). Identificación de la función y el mecanismo molecular del factor de transcripción SOX9 como regulador de las células madre tumorales. *Perspectivas terapéuticas*. 2017(c), 91–93. <https://addi.ehu.es/handle/10810/25226>

Lillo, M. Á. (2014). Células madre de la glándula mamaria: capacidad regenerativa e implicación en la formación de tumores. Universidad Complutense de Madrid, 192. <https://eprints.ucm.es/25907/1/T35401.pdf>

Eguiara, A., Elorriaga, K., Rezola, R., & García Martín, Á. (2012). Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 25(3), 107–115. [https://doi.org/10.1016/s0214-1582\(12\)70024-5](https://doi.org/10.1016/s0214-1582(12)70024-5)

Hemmatzadeh, M., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F., Asghari, F., & Yousefi, M. (2016). The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 78, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.026>

Feliciano Aguirre, A. (2017). Identificación y caracterización funcional de microRNAs en cáncer de mama. https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2017/hdl_10803_458676/afa1de1.pdf

Frontela Noda, M. (2012). MicroRNAs en el cáncer: de la investigación a la práctica clínica. *Revista Cubana de Medicina*, 51(4), 325–335. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232012000400006

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-jones, S. a M., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003). L E T E R T O T H E E D I T O R A uniform system for microRNA annotation. 277–279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803.One>

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- García López, J. (2011). Biogénesis y expresión de microRNAs durante el desarrollo preimplantacional de ratón. 298.
- MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8381–8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>
- Toh, T. B., Lim, J. J., & Chow, E. K. H. (2017). Epigenetics in cancer stem cells. *Molecular Cancer*, 16(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0596-9>
- Lobo, N. A., Shiono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 675–699. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154>
- Proctor, E. N., & Simeone, D. M. (2013). Pancreatic cancer stem cells. *Advances in Cancer Stem Cell Biology*, 414(November), 197–209. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0809-3_12
- Baselga, J. (2010). Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology*, 21(SUPPL. 7), 36–40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq421>
- Velasco Capellas, M., Martínez Peralta, S., Cerdà Serdá, P., Estival González, A., Fernández

Bruno, M., & Lianes Barragan, P. (2012). Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 25(1), 14–21.

[https://doi.org/10.1016/s0214-1582\(12\)70004-x](https://doi.org/10.1016/s0214-1582(12)70004-x)

Arce, C., Martínez-Tlahuel, J., & Lara, F. U. (2006). Quimioterapia Adyuvante en Cáncer de

Mama: Presente y Futuro. *Cancerología*, 1(22), 177–185.

<http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1172289358.pdf>

De Juan, A., Calera, L., Gutiérrez, L., Saiz, L., & Ruiz De La Fuente, M. A. (2018).

Actualización del tratamiento del cáncer de mama.

<https://esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136579.pdf>

Colomer, R., Montero, S., Ropero, S., Menéndez, J., Cortés Funes, H., Solanas, M., &

Escrich, E. (2001). El oncogén HER2 como ejemplo del progreso diagnóstico y

terapéutico en cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 14(1), 8–

19.

CDC. (2020). ¿Cómo se trata el cáncer de mama? *Cáncer de Mama*.

Zaharia, M., & Gómez, H. (2014). Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil

diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*,

30(4), 2–8. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2013.304.247>

INEGI. (2020). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE).

Kim, J. M., Kim, H. M., Lee, E. J., Jo, H. J., Yoon, Y., Lee, N. J., Son, J., Lee, Y. J., Kim, M.

S., Lee, Y. P., Chae, S. J., Park, K. R., Cho, S. R., Park, S., Kim, S. J., Wang, E., Woo,

S. H., Lim, A., Park, S. J., ... Yoo, C. K. (2020). Original Article Detection and Isolation of SARS-CoV-2 in Serum, Urine, and Stool Specimens of COVID-19 Patients from the Republic of Korea. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 11(3), 112–117. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2020.11.3.02>

Salud, O. mundial de la salud. (2016). Resumen De Conocimientos Prevención: Factores De Riesgo Y Prevención. *The Breast Health Global Initiative*, 9-10-11–12. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/prevencion-factores-riesgo.pdf>

Maggioni, A. P., Maseri, A., Fresco, C., Franzosi, M. G., Mauri, F., Santoro, E., & Tognoni, G. (1993). The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UC SHARED JOURNAL COLLECTION on February 14, 2011. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1993 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *The New England Journal of Medicine*, 329(20), 1442–1448.

Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 95–120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

Grajales Pérez, E., Cazares Flores, C., Díaz Amezcua, L., & De Alba Ramírez, V. (2014). Factores de riesgo para el cáncer de mama en México: revisión de estudios en poblaciones mexicanas y Mexicoamericanas. *CES Salud Pública*, 5(1), 50-58–58. <https://doi.org/10.21615/2786>

Dumitrescu, R. G., & Shields, P. G. (2005). The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol*, 35(3), 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.04.005>

De, Y., Ramos, C., Rita, E., & Torres, M. (2015). Cáncer de mama, su caracterización epidemiológica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar Del Río*, 19(4), 619–629.

Curado, M. P. (2011). Breast cancer in the world: Incidence and mortality. *Salud Publica de Mexico*, 53(5), 372–384. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342011000500005>

Adami, H. O., Signorello, L. B., & Trichopoulos, D. (1998). Towards an understanding of breast cancer etiology. *Seminars in Cancer Biology*, 8(4), 255–262. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0077>

Carlson, R. W., Allred, D. C., Anderson, B. O., Burstein, H. J., Carter, W. B., Edge, S. B., Erban, J. K., Farrar, W. B., Forero, A., Giordano, S. H., Goldstein, L. J., Gradishar, W. J., Hayes, D. F., Hudis, C. A., Ljung, B. M., Mankoff, D. A., Marcom, P. K., Mayer, I. A., McCormick, B., ... Zellars, R. (2011). Invasive breast cancer: Clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9(2), 136–222. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0016>

Bazar, N. O., Hernández, C. B., & Bazar, L. V. (2020). Risk factors associated with breast cancer. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 36(2), 1–13. <https://doi.org/10.14302/issn.2372-6601.jhor-20-3544>

Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 151). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>

Tao, Z. Q., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>

Rakha, E. A., & Green, A. R. (2017). Molecular classification of breast cancer: what the

pathologist needs to know. *Pathology*, 49(2), 111–119.

<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.012>

Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C., & Yang, Y. (2017). Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis.

Scientific Reports, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>

Felipe Imigo G, Edgardo Mansilla S, Ignacio Delama G, María Teresa Poblete S3, C. F. Z. (2010). CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA Artículo de revisión. *Rev Venez Oncol*, 22(2), 109–116.

César López-Camarillo, * Miguel A Fonseca-Sánchez, ** Horacio Astudillo-de la Vega, **,

Erika Ruiz-García, **** Jorge A Guadarrama-Orozco, **** Ernesto Sánchez-Forgach,

****, & David E Muñoz-Gonzalez, ***** Laurence A Marchat**. (2014). Los

microRNA: nuevos biomarcadores en cáncer de mama. *Revista Mexicana de*

Mastología, 4(3), 100–107. [http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexmastol/ma-](http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexmastol/ma-2014/ma143e.pdf)

2014/ma143e.pdf

Cmi, D. (2007). Subtipos clínicos y genéticos de cáncer de mama: individualización del tratamiento. 24, 569–570

César López-Camarillo, * Miguel A Fonseca-Sánchez, ** Horacio Astudillo-de la Vega, **,

Erika Ruiz-García, **** Jorge A Guadarrama-Orozco, **** Ernesto Sánchez-Fortacho,

****, & David E Muñoz-Gonzalez, ***** Laurence A Marchat**. (2014). Los microRNA:

nuevos biomarcadores en cáncer de mama. *Revista Mexicana de Mastología*, 4(3), 100–

107. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexmastol/ma-2014/ma143e.pdf>

Schroeder, K., & Conrad, G. (1983). WARMRICHTEN DES THERMISCH VERFESTIGTEN BETONSTAHLS StT-IV. *Schweisstechnik Berlin*, 33(12), 561–564.

Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 294, 23–29. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>

Con formato: Español (México)

Código de campo cambiado

Institute, N. C. (2015). *Understanding Cancer* (p. 4).

Oncology, A. S. of C. (2020). *Estadios del cáncer de mama* (p. 5). <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-de-mama/estadios>

Luporsi, E.; André, F.; Spyrtos, F.; Martin, P. M.; Jacquemier, J.; Penault-Llorca, F.; Tubiana-Mathieu, N.; Sigal-Zafrani, B.; Arnould, L.; Gompel, A.; et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.*, 132(3):895-915, 2012.

Xin, H., Wang, C., & Liu, Z. (2019). MiR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting I κ B α . *BMC Cancer*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5245-1>

Código de campo cambiado

Bao, M., Pan, S., Yang, W., Chen, S., Shan, Y., & Shi, H. (2018). Serum miR-10a-5p and miR-196a-5p as non-invasive biomarkers in non-small cell lung cancer. 11(2), 773–780.

(K.B. Geiersbach, H. Chen, R. Emmadi, G.T. Haskell, X. Lu, Y.J. Liu, Current concepts in breast cancer genomics: An evidence-based review by the CGC breast cancer working group, et al. *Cancer Genet.*, 244 (2020), pp. 11-20).