
UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis del papel del miR-204 en la regulación de la expresión de CREB5
y el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

ESTEFANIA CONTRERAS SANZÓN

DIRECTOR

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

Ciudad de México, noviembre de 2019

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM.

Secretario: Dr. Mario César López Camarillo, UACM.

Vocal: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM.

Lugar donde se realizó la licenciatura:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario César López Camarillo

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. César López Camarillo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Dra. Martha E. Yocupicio Monrroy

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por ser mi casa de estudios.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer, en el Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, bajo la tutoría del Dr. César López Camarillo, a quien agradezco sinceramente por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así como todo el apoyo y las enseñanzas brindadas.

De igual manera quiero agradecer a la Dra Elizbhet Sánchez, a la Dra Martha Yocupicio y la Dra Elisa Azuara por haberse tomado el tiempo de leer mi proyecto de tesis y por sus comentarios

También quiero agradecer a mis a mis amigos de la licenciatura Marthita, Carlitos, Selene, Vanessa, Karina, Israel, Meztli por haberme apoyado a lo largo de la carrera.

A Olguita, Ali, Raúl, Ivonne, Fred, Victor, Yarely, Iraiz, Marthita, Darío, Rogelio, Fernando, Allan, Yesenia, Jaqueline, Euclides, Macrina, Andi, Marco, Bryan, Victor por su apoyo

A mi familia por darme los ánimos de seguir adelante

DEDICATORIA

A mis papás por el apoyo, comprensión, consejos, motivación constante, por los recursos que me brindaron para seguir adelante y por el amor que me dan. Este logro es gracias a ustedes. Los amo

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Hallmarks del cáncer	1
1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento.....	2
1.2.2 Insensibilidad a las señales de anti-crecimiento	2
1.2.3 Resistencia a la muerte celular programada (Apoptosis).....	3
1.2.4 Ilimitado potencial replicativo	3
1.2.5 Angiogénesis	3
1.2.6 Metástasis.....	4
1.2.7 Inestabilidad genómica	4
1.2.8 Inflamación	5
1.2.9 Desregulación metabólica y energética	5
1.2.10 Evasión a la destrucción por el sistema inmune	5
1.3 Cáncer de mama.....	7
1.3.1 Incidencia del cáncer de mama.....	9
1.3.2 Factores de riesgo de cáncer de mama.....	12
1.3.3 Subtipos moleculares de cáncer de mama	13
1.4 RNA de interferencia	16
1.4.1 MicroRNAs: reguladores negativos de la expresión génica	16
1.4.2 SiRNAs	17
1.4.2.1 Sort-hairpin RNA.....	18
1.4.3 Los miRNAs y shRNAs como herramientas terapéuticas contra el cáncer.....	20
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	21
2. Mimetismo Vasculogénico.....	21
2.1 Vía del mimetismo vasculogénico	22
3. El factor de transcripción de CREB5.	24
3.1 Activación de CREB.....	25
3.2 Antecedentes del papel de CREB5 en cáncer	28
3.3 CREB5 y mimetismo vasculogénico	28
4. El papel de miR-204 en cáncer de mama	31

II. HIPÓTESIS	32
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Cultivos celulares	36
6.1.2 Re-sembrado de los cultivos celulares	36
6.1.3 Congelamiento de las líneas celulares	37
6.1.4 Descongelamiento de las líneas celulares	37
7. Transfección de precursor del miR-204.	37
8. Evaluación de proliferación celular por MTT.	38
9. Extracción de RNA en líneas celulares	38
9.1 Extracción de RNA total de biopsias mamarias tumorales y normales. ¡Error! Marcador no definido.	
10. Análisis bioinformático	39
11. Extracción de proteínas de líneas celulares	39
11.1 Extracción de proteínas de muestras de tejido	40
11.2 Determinación de la concentración de proteínas	40
11.2.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	41
11.2.2 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	41
11.2.3 Ensayos de inmunodetección	41
12. Clonación.	42
12.1 Diseño de los oligonucleótidos para el silenciamiento de CREB5.	42
12.2 Oligonucleótidos sintetizados	42
12.3 Hibridación de los oligonucleótidos	43
12.4 Doble restricción del plasmido pSilencer	43
12.5 Purificación de plásmido restringido	43
12.6 Ligación de los insertos siRNAs dentro del plasmido pSilencer 5.1 U6 Retro	44

12.7 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α.....	46
12.8 Purificación de plásmido por lisis alcalina (Miniprep)	46
12.9 Purificación de plásmido para secuenciar.....	47
13 Silenciamiento de CREB5 en la línea celular MDA-MB-231 y MCF7.....	47
13.1 Secuenciación de plásmido con inserto	48
14. Ensayo de Mimetismo Vasculogénico.....	48
VII RESULTADOS	50
15. Búsqueda de la expresión de RNAm de CREB5 en muestras de tejido y líneas celulares de cáncer de mama.....	50
15.1 Presencia de CREB1 en muestras de tejido mamario normal y carcinomas	53
15.2 Determinación de la expresión de la proteína CREB5 en muestras normales de mama y tumores de mama.	55
15.3 Efecto del miR-204 sobre la expresión de la proteína CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama metastásicas MDA-MB-231 y MCF7	57
15.4 Silenciamiento de CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama.....	59
15.5 Efecto del silenciamiento de CREB5 en la proliferación celular en líneas celulares de mama.....	61
15.6 Efecto del silenciamiento de CREB5 en la formación del mimetismo vasculogénico.	64
15.7 Clonación de la región 3´UTR del gen CREB5 en el vector pSilencer 5.1 U6 retro.	67
VIII. DISCUSIÓN	72
VIII. CONCLUSIONES	75
X. BIBLIOGRAFÍA	76
XI. ANEXOS	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama

Tabla 2. Genes regulados en cáncer por el factor de transcripción CREB

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para el silenciamiento del gen CREB5

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hallmarks del cáncer.

Figura 2. Morfología de la mama.

Figura 3. Incidencia de cáncer en México.

Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial en 2018.

Figura 5. Biogénesis de los miRNAs y siRNAs.

Figura 6. Vía de señalización del mimetismo vasculogénico en cáncer.

Figura 7. Dominios de la familia de CREB.

Figura 8. Vía de activación de CREB mediante cAMP.

Figura 9. Estrategia experimental.

Figura 10. Mapa del vector plasmídico pSilencer 5.1 U6 Retro.

Figura 11A. CREB5 se encuentra aumentado en tejido de cáncer de mama.

Figura 11B. Análisis de expresión de CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama y línea celular normal.

Figura 12. Inmunohistoquímica de tejido mamario normal y cáncer de mama marcadas con anticuerpo de CREB1.

Figura 13. La proteína de CREB5 se sobreexpresa en tumores de cáncer de mama.

Figura 14. Mir-204 inhibe la expresión de la proteína CREB5.

Figura 15. Determinación del efecto del sh-CREB5 en el silenciamiento en la expresión de CREB5.

Figura 16A. Efecto del silenciamiento de CREB5 en proliferación celular.

Figura 16B. Efecto del silenciamiento de CREB5 en la viabilidad de las células.

Figura 17A. El silenciamiento de CREB5 inhibe la formación del mimetismo vasculogénico en la línea células MDA-MB-231.

Figura 17B. El silenciamiento de CREB5 inhibe la formación de tubos y nodos.

Figura 18. Hibridación de los oligonucleótidos de CREB5 visualizada en una electroforesis analítica en gel de agarosa al 1%.

Figura 19. Doble digestión del plásmido pSilencer con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*.

Figura 20. Obtención del plásmido de las colonias obtenidas del proceso de ligación.

Figura 21. Plásmido pSilencer-CREB5 purificados.

Figura 22. Validación del inserto de los oligonucleótidos del sh-CREB5 en el plásmido pSilencer 5.1 U6 retro.

ABREVIATURAS

AGO2	Argonauta 2
AKT	Proteína cinasa B
ATF2	Factor de transcripción activador 2
ATP	Adenosina trifosfato
BCL2	Linfoma de células b 2 (B-cell lymphoma 2)
bZIP	Zipper de leucina
cAMP	AMP cíclico o adenosina monofosfato-3',5' cíclico
CBP	Proteína de unión a CREB (CREB-binding protein)
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
CREB1	Proteína 1 de unión al elemento sensible a cAMP
CREB5	Proteína 5 de unión al elemento sensible a cAMP
DCIS	Carcinoma ductal in situ
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
EphA2	Receptor 2 de efrina A
ER	Receptor de estrógenos
ERK1/2	Cinasa de regulación extracelular
FAK	Cinasa de adhesión focal
GOLPH3	Fosfoproteína 3 de Golgi
GTP	Guanosina trifosfato
HER2	Receptor epitelial humano
HIF	Factor inducible por hipoxia
IDC	Cáncer ductal invasivo
IL6	Interleucina 6
ILC	Carcinoma lobular invasivo
LCIS	Carcinoma lobular in situ
miRNA	MicroRNA
MMP	Metaloproteinasas
MSK1	Proteína quinasa 1 activada por mitógeno y estrés

MV	Mimetismo Vasculogénico
OMS	Organización mundial de la salud
PAS	Acido periódico de schiff
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PKA	Proteína quinasa A (del inglés protein kinase A)
PKC	Proteína quinasa C (del inglés protein kinase C)
RNA Pol	RNA polimerasa
PR	Receptor de progesterona
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RNAm	RNA mensajero
Sh-RNA	Short harping RNA
SiRNAs	(small interfering RNAs)
TF	RNAs pequeños interferentes
TFP1/2	Inhibidor de la vía del factor tisular
Twist	Proteína relacionada con la torsión
VE-cadherin	Caderina endotelial vascular (del inglés vascular endothelial cadherin)
VEGF	Factor de crecimiento epidermal vascular
RT	Retro-transcripción
UTR	Región no traducida (del inglés untranslated region o bien de untranslated trailer)
SCR	Proteína cinasa tirosina proto-oncogén Src
RISC	RNA-induced silencing complex,
pb	Pares de bases
nt	Nucleótidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
µl	Microlitro
T.A	Temperatura ambiente

RESUMEN

La proteína CREB5 es un factor de transcripción nuclear implicada en la regulación de la expresión de múltiples genes que participan en la proliferación y diferenciación celular, el metabolismo de la glucosa, la regulación del sistema inmune y la regulación sináptica asociada a memoria. Se ha reportado la expresión de la proteína CREB5 se encuentra aumentada en muestras de tejidos tumorales, mientras que en tejido normal se encuentra disminuido, por lo que se comporta como un oncogén al regular genes que inducen un aumento en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular, así como en la diferenciación asociados a la tumorigénesis. Por ejemplo, en cáncer colorectal, la sobreexpresión de CREB5 induce migración, invasión y metástasis [Qui L y col. 2014], mientras que en cáncer de ovario epitelial CREB5 participa en el desarrollo y la progresión tumoral; además de que es un marcador de baja sobrevivencia y pobre pronóstico en las pacientes [He S y col, 2017]. Los microRNAs (miRNAs) son RNA pequeños no codificantes de 21-25 nucleótidos en longitud que regulan de manera negativa la expresión de al menos el 30% de los mRNAs que codifican proteínas en el genoma humano. En cáncer, la expresión de los miRNAs se altera por lo que su sobreexpresión o represión aberrante contribuye a la tumorigenesis.

En el presente trabajo nos enfocamos en el estudio de la posible función del miR-204 en la regulación negativa de la expresión de CREB5. Para esto, primero analizamos la relevancia clínica de CREB5 mediante el análisis de su expresión en tejidos mamarios tumorales y en muestras de tejido normal. Los resultados del análisis in silico de los datos reportados en la base de datos pública del TGCA (The Cancer Genome Atlas) demuestran que CREB5 se encuentra sobreexpresado en los tumores de mama en comparación con el tejido mamario normal. Esos datos fueron confirmados a través del análisis de la expresión de la proteína CREB5 mediante Western blot en tejidos mamarios tumorales y normales de pacientes Mexicanas. De manera interesante, previamente nuestro grupo de investigación había reportado que la expresión del miR-204 se encuentra reprimida en cáncer de mama, por lo que pensamos que pudiera existir una

correlación negativa entre la expresión de CREB5 y el miR-204. El análisis bioinformático de potenciales genes blanco del miR-204 utilizando la herramienta TargetScan identifico un sitio de unión potencial para el miR-204 en la región 3'UTR no traducida (UTR) del mRNA de CREB5, por lo que podría ser un blanco directo potencial. Posteriormente, restauramos la expresión del miR-204 mediante la transfección *in vitro* del precursor en líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados demuestran una disminución en los niveles de expresión de CREB5 comparadas con las líneas celulares control no transfectadas, lo cual refuerza la idea de que el miR-204 regula de manera negativa la expresión de CREB5 y por tanto los procesos celulares dependientes de esta factor de transcripción.

Recientemente, se ha descrito en diversos tipos de cáncer un nuevo proceso celular denominado mimetismo vasculogénico en el cual las células tumorales muy agresivas producen estructuras en tres dimensiones (3D) parecidas a vasos capilares o sanguíneos que le permiten a las células acceder a nutrientes como la sangre y el oxígeno favoreciendo de esta manera el crecimiento acelerado del tumor. Este fenómeno ocurre de manera conjunta con la neoangiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) y es promovido bajo condiciones de hipoxia, lo que promueva la activación del factor de transcripción CREB5 y el factor dependiente de hipoxia HIF1 α . Ambas proteínas se unen a regiones promotoras de genes que participan en la respuesta a hipoxia. De manera interesante, el sitio de unión de CREB5 (elemento CRE) es idéntico en 4 bases al sitio de unión de HIF1 α (elemento HRE). Esto indica que CREB5 podría regular genes con elementos HRE y CRE en su región promotora, por lo que podrían regular de manera conjunta genes tales como VEGF, COX2, entre otros. Por tanto la activación y el aumento de la expresión de CREB5 podrían ser relevantes en la regulación de la formación del mimetismo vasculogénico. Para poder determinar si CREB5 participa en el mimetismo vasculogénico bajo condiciones de hipoxia, silenciamos la expresión de CREB5 mediante es uso de moléculas pequeñas de RNA no codificante tipo short harpin (sh-CREB5). Interesantemente, la formación las estructuras de tubos y nodos características del mimetismo vasculogénico se vieron inhibidas en células transfectadas con el sh-CREB5 en la línea celular

MDA-MB-231 en comparación con los controles no transfectados. Nuestros resultados sugieren que el aumento de la expresión de CREB5 participa en la proliferación de células tumorales y el silenciamiento de este factor transcripcional, disminuye considerablemente la proliferación, viabilidad celular y el mimetismo vasculogénico.

I.INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un complejo grupo de enfermedades, en la cual las células tienen un potencial replicativo ilimitado y tienen bloqueada la capacidad de destruirse automáticamente cuando presentan un daño considerable al DNA (apoptosis), a diferencia de las células normales que mueren para que otras células nuevas tomen su lugar evitando así propagar mutaciones, lo que a largo plazo generan un tumor maligno. El cáncer puede originarse en cualquier parte del cuerpo y es causado por diferentes factores, entre los más comunes están: la acumulación de mutaciones que no pueden ser reparadas en genes que participan en diversos procesos como por ejemplo, el crecimiento celular y apoptosis o en genes que participan como reguladores genéticos. También los cambios epigenéticos, los factores hereditarios, la exposición prolongada y continua a factores ambientales como la radiación, infección por virus o bacterias e incluso el estilo de vida que llevamos (Ej. fumar, obesidad, exposición excesiva a estrógenos y falta de ejercicio) entre otros representan factores de riesgo importantes para el desarrollo de cáncer [American Cancer Society, 2018].

1.2 Hallmarks del cáncer

A pesar que hay muchos tipos de cáncer, hay algunas similitudes que convergen en todos ellos; estas similitudes son denominadas "*hallmarks del cáncer*". A medida que las células cancerosas se dividen, van acumulando una gran diversidad de mutaciones que le permiten evolucionar y por tanto adquirir diferentes capacidades distintivas que le confieren heterogeneidad a este tipo de células. Estas capacidades distintivas les permiten a las células cancerosas seguir desarrollándose y transformándose obteniendo así nuevas funciones biológicas para su crecimiento exacerbado en el micro ambiente tumoral [Hanahan *et al.*, 2011]. Los investigadores Hanahan y Robert A. Weinberg describieron a inicios del

2011 las diez características distintivas del cáncer las cuales se muestran en la Figura 1 y se describen a continuación:

1. Autosuficiencia de las señales de crecimiento
2. Insensibilidad a las señales anti-crecimiento
3. Resistencia a la muerte celular programada (apoptosis)
4. Ilimitado potencial replicativo
5. Angiogénesis
6. Metástasis
7. Inestabilidad genómica
8. Inflamación
9. Desregulación metabólica y energética
10. Evasión a la destrucción por el sistema inmune

1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento

En condiciones normales un tipo particular de célula produce factores de crecimiento para desencadenar la proliferación celular el cual puede afectar a otro tipo de célula, pero las células cancerosas no dependen de esta estimulación exógena, sino más bien ellas sintetizan sus propios factores de crecimiento para inducir su auto proliferación de forma autocrina y paracrina.

1.2.2 Insensibilidad a las señales de anti-crecimiento

Las células normales tienen un mecanismo para limitar su crecimiento, este mecanismo está regulado por diversas proteínas, por ejemplo las proteínas retinoblastoma RB y TP53. La función de RB es determinar si una célula puede o no inducir el crecimiento celular y su división; mientras que TP53 detiene el ciclo celular si se detecta un daño en el genoma y puede inducir la apoptosis si este daño no es reparado. Sin embargo las funciones de RB así como TP53 se

encuentran defectuosas en las células cancerosas lo que conlleva la evasión de señales anti proliferativas y la evasión de la apoptosis.

1.2.3 Resistencia a la muerte celular programada (Apoptosis)

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se desencadena cuando la célula sufre un daño que no puede ser reparado. Este proceso esta alterado en cáncer debido a que se activan proteínas anti-apoptóticas que interrumpen dicho proceso [Hanahan *et al.*, 2011]. La pérdida de la función de P53 promueve la participación de genes como BCL2, los cuales impulsan la supervivencia de las células cancerosas produciendo proteínas que intervienen en la inducción de la apoptosis.

1.2.4 Ilimitado potencial replicativo

El estado replicativo de una célula normal es alrededor de 60 a 70 duplicaciones, después de cada duplicación los telómeros se van acortando dejando desprotegido al DNA de los extremos terminales de los cromosomas, conduciendo la detención del crecimiento celular seguido de la muerte celular programada. Sin embargo, las células tumorales tienen un ilimitado potencial replicativo debido a que tienen una alta tasa de regeneración telomérica esto quiere decir que los telómeros no se acortan sino más bien recuperan su longitud debido a la sobreexpresión de la telomerasa o a la activación de la ruta alterna de mantenimiento de los telómeros denominada ruta ALT.

1.2.5 Angiogénesis

Como cualquier célula, las células tumorales requieren de la obtención de alimento y oxígeno, para ello, las células cancerosas promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, procesos denominados como neoangiogénesis o neovascularización que se realizan a partir

de las células endoteliales. Los nuevos vasos sanguíneos endoteliales transportarán los suplementos necesarios que se encontraban distantes para las células tumorales. Durante el desarrollo embrionario la neovascularización es fundamental para el origen de las células endoteliales las cuales se asocian para recubrir y formar los primeros vasos sanguíneos. En etapas adultas las células normales de diversos tejidos activan temporalmente la angiogénesis en respuesta a procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, en las células tumorales el proceso de angiogénesis continúa siempre activado de manera aberrante [Hanahan *et al.*, 2011].

1.2.6 Metástasis

La metástasis es la formación de un nuevo tumor en otra parte del cuerpo a partir del tumor primario original. Las células tumorales se liberan de la interacción célula – célula penetrando tejido circundante a través de circulación sanguínea para invadir tejidos locales y distantes y adherirse en un nuevo sitio para proliferar y generar un nuevo tumor secundario el cual es en general más agresivo y resistente a la quimioterapia convencional.

1.2.7 Inestabilidad genómica

Las células tumorales presentan dos tipos de inestabilidad genómica que le confieren a la célula tumoral variabilidad genética que dará lugar a la proliferación celular. Estas son: i) La inestabilidad a nivel cromosómico; la cual está relacionada con translocaciones, deleciones, duplicaciones y aneuploidías; ii) La inestabilidad a nivel de secuencia del DNA la cual involucra a las mutaciones puntuales y deleciones/inserciones.

1.2.8 Inflamación

Durante el proceso inflamatorio las células liberan factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos y otros factores que promueven la proliferación celular entre otros factores que benefician a las células tumorales ya que le confieren el microambiente necesario para su progresión y desarrollo.

1.2.9 Desregulación metabólica y energética

Las células tumorales tienen la capacidad de reprogramar el metabolismo de la glucosa aun en presencia de oxígeno (en condiciones normales el proceso de glicolisis se favorece en ausencia de oxígeno) y obtienen energía a través de la glucólisis anaeróbica seguidas por un proceso de fermentación láctica; proceso denominado como el efecto Warburg.

1.2.10 Evasión a la destrucción por el sistema inmune

Durante el desarrollo del cáncer hay un proceso llamado “inmuno-edición tumoral” el cual es llevado a cabo en diversas etapas. En la primera etapa, el sistema inmune destruye a las células tumorales en un proceso llamado eliminación, sin embargo algunas logran sobrevivir y pasan a la etapa de equilibrio en donde las células tumorales comienzan a proliferar y el sistema inmune destruye nuevamente a las células tumorales pero ahora teniendo prioridad a aquella que presentan antígenos tumorales y aguantando el ataque de las células tumorales con baja expresión de antígenos. Posteriormente, las células que sobrevivieron al ataque del sistema inmune comienzan a proliferar generando un microambiente inmunosupresivo favorable para el crecimiento tumoral proceso denominado como escape [Hanahan *et al.*, 2011].



Figura 1. Hallmarks del cáncer. Se esquematizan las 10 alteraciones celulares que ocurren en los tumores malignos. Tomada y modificada de Hanahan y Robert A Weinberg, 2011.

1.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama es un tipo de neoplasia que afecta a las células epiteliales de las glándulas mamarias, donde la multiplicación celular se da de manera anormal, aberrante e incontrolada generando así la formación de tumores malignos. Este tipo de cáncer es el de mayor incidencia y mortalidad entre mujeres en todo el mundo y en México. Las células mamarias cancerosas se originan en las glándulas generadoras de leche llamadas lóbulos y en los conductos los cuales son canales encargados de transportar la leche producida de los lóbulos y llevarla hacia el pezón [Breastcancer.org] (Figura 2). El cáncer de mama afecta principalmente a mujeres sin embargo se ha reportado casos de cáncer de mama en hombres, pero con una incidencia más baja de aproximadamente el 1%.

La formación de un tumor se clasifica como benigno o maligno, se denomina tumor benigno cuando las células mamarias que no son cancerosas, presentan una tasa replicativa tardía y más lenta comparado con los tumores malignos, además de que no migran a otros sitios sino más bien permanecen encapsulados en el sitio donde se desarrollaron y comúnmente no comprometen la vida de los pacientes. Por el contrario, los tumores malignos son más agresivos, poseen una replicación ilimitada y las células cancerosas pueden desprenderse del tumor donde se originaron y propagarse por los ganglios linfáticos y migrar a otros órganos del cuerpo para invadir y seguir desarrollándose proceso conocido como metástasis la cual compromete la vida de las pacientes [Breastcancer.org y American Cancer Society 2019].

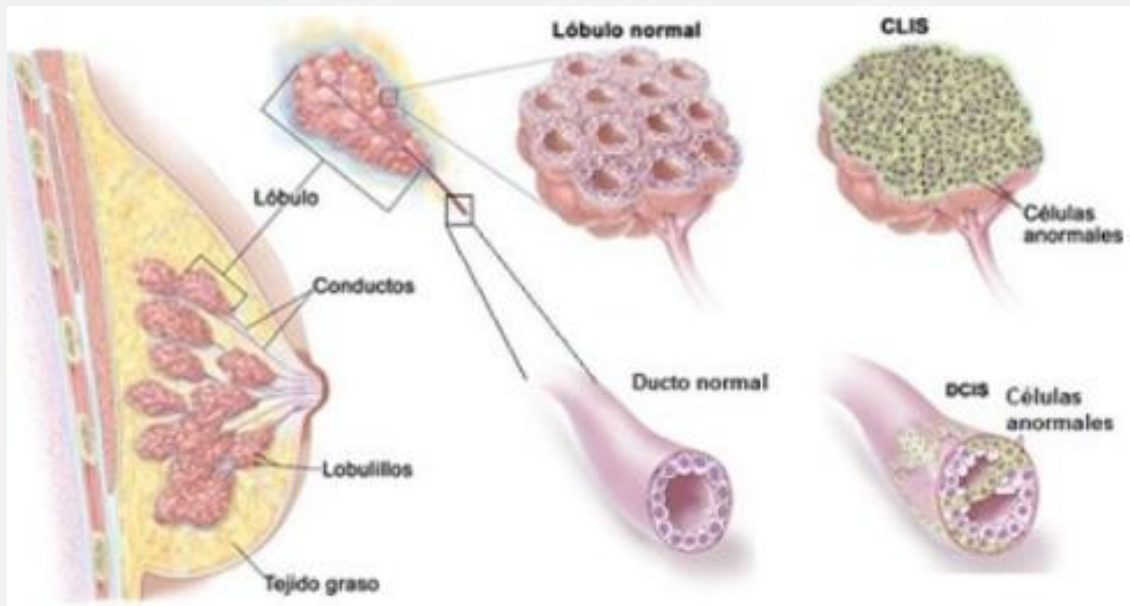


Figura 2. Morfología de la glándula mamaria humana. Arriba: representación de un lóbulo normal y la formación de carcinoma lobular *in situ*. Abajo: ducto mamario normal y a la derecha formación de un carcinoma ductal *in situ*.

Existen dos tipos de cáncer de mama los cuales se clasifican de acuerdo a su sitio de origen: el carcinoma ductal que ocurre en las células que conforman los conductos galactóforos que transportan la leche al pezón y ii) carcinoma lobular que se desarrolla a partir de las células que conforman las glándulas generadoras de leche [American Cancer Society, 2019]. Estos tumores pueden ser del tipo invasivo o no invasivo (carcinomas *in situ*), por lo que se sub-clasifican en:

Carcinoma ductal *in situ* (DCIS): Este tipo de cáncer afecta aproximadamente al 80% de las mujeres, representa las etapas más tempranas de a carcinogénesis mamaria por lo que no es invasivo, por lo tanto las células crecen dentro del lugar donde se originaron sin rebasar o salir del ducto mamario

Carcinoma lobular invasivo (ILC): Las células que se originaron en el lóbulo mamario comienzan a infiltrarse al tejido adyacente y puede generar metástasis.

Carcinoma lobular *in situ* (LCIS): Las células crecen dentro de las glándulas generadoras de leche, no invaden tejido adyacente. Es el aumento en el número de células representa el 10% de los casos. La morfología es parecida a las células cancerosas; a pesar de ello no es cáncer, pero si no se trata puede volverse cáncer de seno invasivo.

Cáncer ductal invasivo (IDC): Las células que se desarrollaron dentro del conducto lo atraviesan invadiendo tejido adyacente o puede inducir metástasis.

1.3.1 Incidencia del cáncer de mama

Las cifras del GLOBOCAN del año 2018 indican que a nivel mundial la incidencia de cáncer de mama por cada 100,000 personas fue de un 46.3% y una tasa de mortalidad de 13%. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el 2018 que el cáncer de mama afectó a 27 283 casos mujeres en México (Figura 3) siendo la principal incidencia de cáncer por encima del cáncer de próstata, cáncer colorectal, cáncer de tiroides y cáncer de cérvix, mientras que a nivel mundial

ocupa el primer lugar en cánceres y el segundo lugar en mortalidad en ambos sexos (Figura 4) [OMS, 2014].

A pesar de esa tasa de mortalidad elevada la American Cancer Society informó que en el periodo del 2006 al 2015 hubo un descenso de 1.4% en muertes por cáncer de mama en países hispanos esto debido a las mejoras de los tratamientos y detecciones oportunas.

1.3.2 Factores de riesgo de cáncer de mama

Actualmente no existe una causa en específica asociada con el desarrollo de cáncer de mama, pero la posibilidad del aumento en el riesgo de padecer este tipo de cáncer está relacionado con diversos factores tales como:

- i) El género (afecta con mayor incidencia a las mujeres),
- ii) Antecedentes familiares (son más propensas aquellas mujeres que tienen familiares directos con cáncer de mama).
- iii) La edad (mayores de 40 y 60 años),
- iv) Alta expresión de estrógenos y exposición temprana a anticonceptivos orales
- v) Menarca temprana y nuliparidad.
- vi) Estilo de vida (consumo excesivo de alcohol y tabaco, obesidad, sedentarismo).
- vii) Expresión deficiente de genes supresores tumorales y activación de oncogenes.

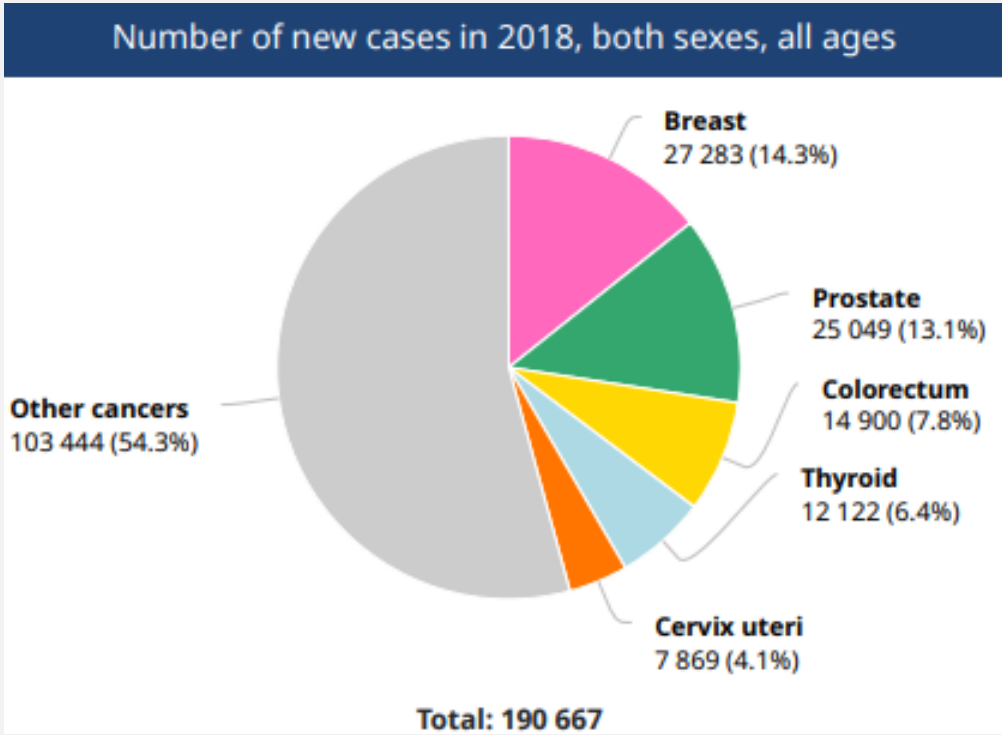


Figura 3. Incidencia de cáncer en México. Tomada de la OMS.

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes. all ages

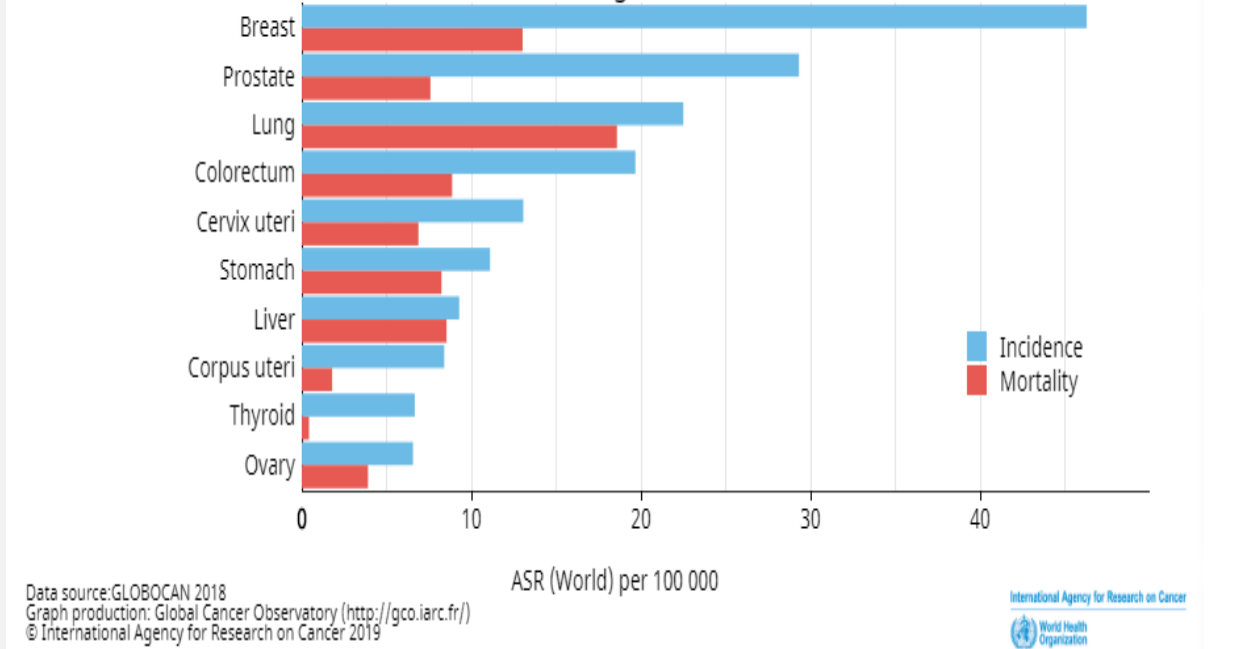


Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial en 2018. Tomada de Globocan, 2018.

1.3.3 Subtipos moleculares de cáncer de mama

Debido a la heterogeneidad el cáncer de mama se clasifica en base a su tipo histológico, grado tumoral (I, II, III y IV), estado de los ganglios y la expresión génica de marcadores predictivos que se encuentran en la membrana celular como el receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor epitelial humano (HER2). El cáncer de mama se puede subclasificar mediante estos tres marcadores biológicos en cuatro subtipos: Luminal (luminal A y luminal B), HER2+ y Triple negativo; cada subtipo tiene diferente pronóstico y respuesta a tratamiento. Los tumores con carencia de estos tres receptores en la membrana celular se clasifican como triple negativo (ER-, PR- y HER2-), los tumores luminales se subdividen en A y B estos presentan expresión del receptor a estrógenos (ER+) y/o expresión del receptor de progesterona (PR+) y no inducen metástasis.

- i) Los tumores luminales A se desarrollan de forma más sesgada en comparación con los luminales B los cuales se desarrolla de manera más progresiva, la velocidad de su crecimiento se encuentra proporcionalmente relacionado con un mal pronóstico, por tanto están asociados con un mejor pronóstico; ambos responden a la quimioterapia como tratamiento de manera poco eficiente sin embargo los luminales B tiene mayor respuesta y también son más invasivas y agresivas.
- ii) Tumores HER2+ los cuales sobreexpresan la proteína HER2, mientras ER se encuentra en baja expresión [Stuart *et al.*, 2012]. Los HER2 positivos (llamados también HER2 enriquecido) presentan expresión más elevada en el HER2 y una carencia en la expresión de ER, La sobreexpresión de HER2 está asociado con el rompimiento de las uniones célula-célula por lo tanto las células desprendidas puede invadir otros tejidos induciendo metástasis, este tipo de cáncer puede ser tratado con Herceptina [Stuart *et al.*, 2012].

-
- iii) Los tumores triple negativos expresan de manera muy deficiente o carecen totalmente de los receptores ER, PR HER2. Este tipo de clasificación se subdivide en basal A y basal B. Los basales A expresan citoqueratinas mientras que los basal B presenta una expresión baja de la claudina y se asocian con la invasión, metástasis y mayor agresividad del tumor [Dai *et al.*, 2017 y Stuart *et al.*, 2012] (Tabla 1).

La clasificación TNM del cáncer de mama está determinada con base al tamaño del tumor (T), diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M); la asignación de las etapas se expresa con los números romano 0, I, II, III y IV. La etapa 0 las células cancerosas y no cancerosos permanecen en el sitio donde se originaron y no existe invasión, en la etapa I las células pueden invadir tejido de la mama adyacente, se subdivide en IA y en IB, donde IA representa tumores pequeños y no hay diseminación a ganglios linfáticos mientras que IIB hay diseminación a ganglios linfáticos y el tamaño del tumor es $>0.2\text{mm}$ y $< 2\text{mm}$; en la etapa II describe la propagación de las células a los ganglios linfáticos, se subdivide en IIA y IIB los cuales corresponden al grado de afectación de dichos ganglios (puede afectar de 1 a 3 ganglios); la etapa III se subdivide (IIIA, IIIB y IIIC) respecto a tamaño del tumor y el número de ganglios linfáticos a los cuales se extendieron, la etapa IV representa a los cánceres que han hecho metástasis y el tumor puede ser de cualquier tamaño [Breastcancer.org].

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama

Clasificación	Receptores	Tratamiento	Metástasis	Características	Líneas celulares
Luminal A	ER+	Quimioterapia	No	Ki67 bajo	BR483
	PR+/-	Tamoxifeno		Mejor pronóstico,	EFM19
	HER2-	Herceptina		menos agresivo, más diferenciado, unión estrecha célula - célula	MCF-7 MDAMB134
Luminal B	ER+/-	Quimioterapia		Ki67 alto	BSMZ
	PR+/-	Trastuzumab		Mejor pronóstico,	BT474
	HER2-/+	Tamoxifeno Herceptina		menos agresivo, más diferenciado, unión estrecha célula - célula	EBEP1
HER2+	ER-	Trastuzumab	Invade	Ki67 alto	21MT1
	PR-	Herceptina		Mal pronóstico	SKBR3
	HER2+++	Quimioterapia		Agresivo	KPL4
Triple negativo	ER-	Quimioterapia	Basal A	Núcleo básico	BT-20
	PR-		(TNA): si	basal	CAL148
	HER2-		Basal B	Mínimo	BT549
			(TNB):	diferenciado, más	MDAMB157
			Altamente	apariencia	MDA-MB-
				mesénquima.	231
				Altamente	
				invasivo	

Receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), Receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2).

1.4 RNA de interferencia

Los RNAs interferentes (siRNAs) son RNAs pequeños no codificantes de doble cadena con una estructura de tallo-burbuja, los cuales han sido ampliamente utilizados en experimentos *in vitro* para la inactivación o el silenciamiento de genes específicos con funciones involucrada en procesos asociados al cáncer tales como como anti/pro-apoptóticos, angiogénesis, migración, invasión, metástasis y resistencia a la terapia mediante la escisión del RNAm blanco. Existe una variedad de siRNAs que contienen una estructura de tallo-burbuja denominados shRNAs (short hairpin RNAs) los cuales al ser introducidos en la célula huésped activan en el citoplasma la maquinaria de interferencia del RNA (RNAi) consistente en el procesamiento del shRNA mediante la enzima DICER la cual corta la estructura de burbuja del shRNA produciendo de esta manera un RNA pequeño de doble cadena el cual se asocia a la proteína Argonauta 2 (AGO2) la cual guía al RNA de doble cadena hacia su transcrito blanco con el cual se une mediante complementariedad de bases activando así la degradación del transcrito y el silenciamiento génico [Sliva *et al.*, 2010].

1.4.1 MicroRNAs: reguladores negativos de la expresión génica

Los microRNAs (miRNAs) son un grupo de RNA pequeños de cadena sencilla de 21 a 25 nucleótidos en longitud que no codifican para proteínas. Los miRNAs también actúan a través de la ruta de RNAi siendo procesados por DICER e interactúan con AGO2 donde posteriormente se dirigen y unen de manera complementaria por apareamiento de bases a la región semilla del extremo 3'UTR de su RNA mensajero (RNAm) blanco dando como resultado la degradación o traducción del transcrito y por tanto inhibiendo la síntesis de proteínas [López Camarillo *et al.*, 2014].

La mayor parte de los miRNAs derivan de regiones intrónicas pero también se generan a partir de los exones y son sintetizados por la RNA polimerasa II que

genera un transcrito largo que tiene complementariedad en algunas bases por lo que forma una estructura horquilla-tallo-burbuja llamado miRNA primario (pri-miRNA) la cual es procesada dentro del núcleo por la RNAsa tipo III llamada Drosha. Esta enzima en cooperación con DGCR8 corta las dos hebras del pri-miRNA para generar un precursor de 60-70 nucleótidos llamado miRNA precursor (pre-miRNA). Una vez procesado, el pre-miRNA es exportado al citoplasma mediante la exportina 5 y el complejo RAN-GTP. La molécula de GTP es hidrolizada a GDP para liberar del pre-miRNA en el citoplasma. En el citoplasma, el pre-miRNA es reconocido por la endonucleasa llamada Dicer que en conjunto con TRBP y PACT generan un nuevo corte produciendo así un RNA pequeño de doble cadena denominado miRNA dúplex. La separación de las cadenas genera un miRNA maduro el cual se une al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), específicamente la proteína AGO2, mientras que la cadena pasajera es descartada. Una vez que se activa el complejo RISC, el complejo miRNA/AGO2 es dirigido y unido a la región semilla de 7-8 nucleótidos del extremo 3'UTR de su RNAm blanco dando lugar a su degradación e inhibición de la traducción. La complementariedad del miRNA con el RNAm puede ocurrir de manera parcial lo que le permite tener una gran cantidad de RNAm como objetivos (Figura 5) [Lam *et al.*, 2015].

1.4.2 SiRNAs

Los siRNAs (small interfering RNAs) son RNAs pequeños de 20-25 nucleótidos formados a partir del corte de RNAs largos de doble cadena. Los siRNAs inhiben la expresión del gen blanco a nivel de ARNm mediante un mecanismo llamado interferencia de ARNm impidiendo que se lleve a cabo la síntesis de proteínas específicas. Comúnmente los siRNAs son utilizados para dominar la actividad de los transposones y combatir infecciones virales y pueden ser sintetizados artificialmente para procesos experimentales.

1.4.2.1 Sort-hairpin RNAs

Los short-hairpin RNAs (shRNAs) son una clase de siRNAs que. La secuencia del shRNA puede ser diseñada mediante herramientas bioinformáticas y posteriormente se puede clonar en un vector o plásmido (en nuestro caso fue en el vector pSilencer) el cual se introduce en las células mediante transfección, donde ocurre la síntesis y procesamiento del sh-RNA. Una vez que el vector llega al núcleo inicia la transcripción de la secuencia del shRNA mediante la RNA polimerasa II o III que genera una estructura en forma de doble cadena con un tallo-burbuja en su extremo el cual es procesado por la RNAsa tipo III nombrada DROSHA que forma un complejo con DGCR8 (proteína de dominio de unión a RNA bicatenario) para generar un shRNA de 29-30 nucleótidos con 2 nucleótidos salientes en la región 3'-terminal. El shRNA es transportado al citoplasma a través de exportina 5 en conjunto con RNA-GTP. Ya en el citoplasma la enzima DICER interactúa con TRBP/PACT para formar un complejo para generar una escisión en el bucle de la horquilla quedando un siRNA bicatenario con 2 nucleótidos salientes en la región 3'.

El complejo de DICER lleva al siRNA bicatenario hacia el complejo RISC que contiene acoplado a AGO2 el cual tiene actividad endonucleasa para liberar la cadena pasajera, mientras que la cadena guía queda unida al complejo RISC para unirse a la región 3'UTR del RNAm blanco donde AGO2 genera la degradación del RNAm blanco lo que genera el silenciamiento específico del gen [Rao *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2010 y Lam *et al.*, 2015]. De esta manera los shRNAs son considerados como una herramienta molecular y una alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer (Figura 5).

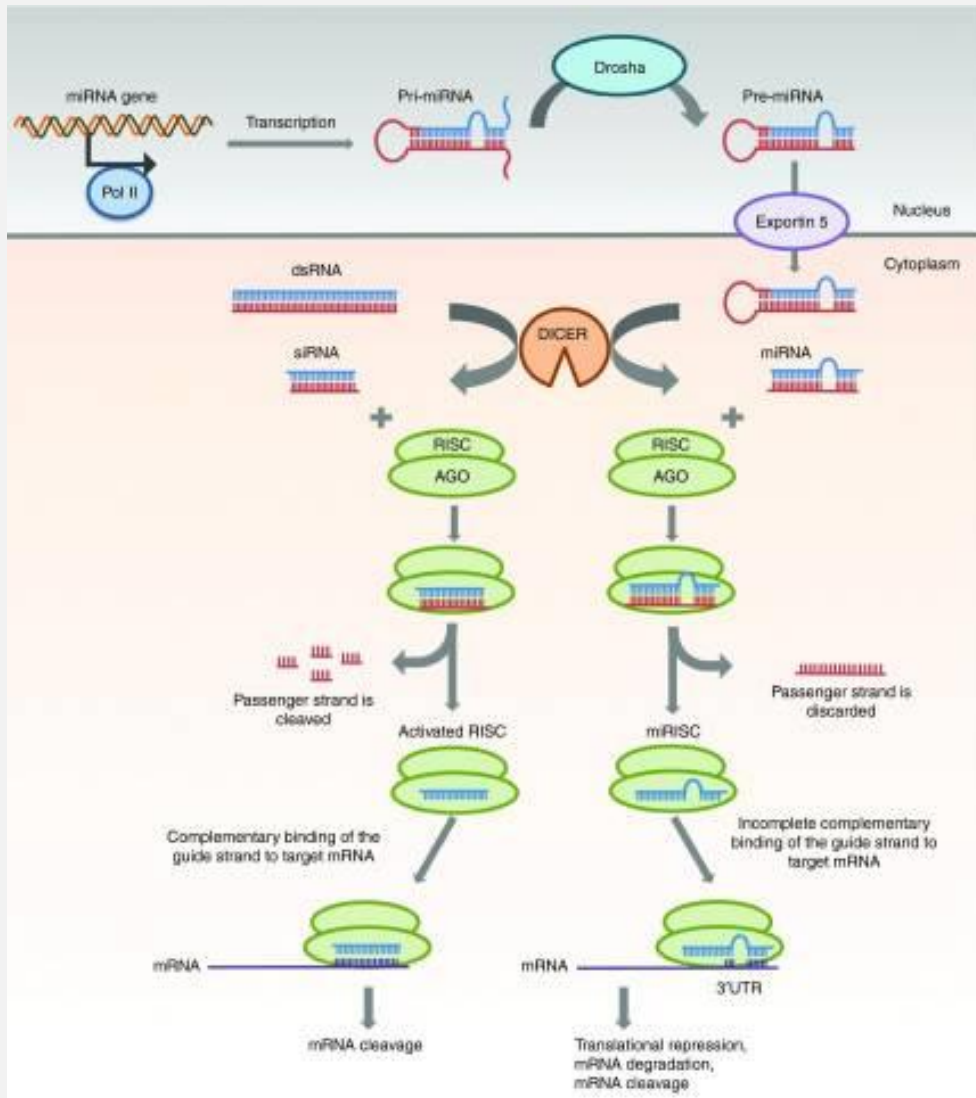


Figura 5. Biogénesis de los miRNAs y siRNAs. Tomada de Lam JK, 2015.

1.4.3 Los miRNAs y shRNAs como herramientas terapéuticas contra el cáncer

El estudio y uso de los RNA interferentes como reguladores de la expresión génica entre los que se incluyen los miRNAs y siRNAs, ha tenido gran importancia en los avances y efectividad en terapias contra diversos tipos de cáncer debido a la capacidad que estas moléculas ejercen para inducir silenciamiento dirigido a genes que están involucrados en procesos biológicos que se encuentran implicados el desarrollo y progresión del cáncer. Mansoori y colaboradores mencionan que la terapia contra el cáncer mediante el silenciamiento de genes puede ser empleada en etapas avanzadas del crecimiento tumoral. Además, el silenciamiento del gen es adquirido por la siguiente generación y también es un tratamiento de bajo costo [Mansoori *et al.*, 2014]. Los siRNAs al tener una complementariedad completa con el RNAm blanco son más específicos y selectivos por lo tanto son más dirigidos ya que son diseñados para unirse de manera específica a un gen en particular [Lam *et al.*, 2015], mientras que los miRNAs al unirse a unos pocos nucleótidos del RNAm blanco tiene mayor probabilidad de interceptar diversos genes que están implicados en procesos diferentes y puede que esa unión no se dé con el blanco esperado sino en otros genes.

Debido a la heterogeneidad del cáncer, cada vez se pueden encontrar más anomalías genéticas involucradas en el desarrollo, progresión y resistencia de células cancerígenas. Las terapias convencionales para combatir el cáncer no son suficientes para combatir a todo el repertorio de genes involucrados en el desarrollo y crecimiento tumoral de cada paciente; por ello el uso de shRNA como terapia personalizada en combinación con los miRNAs puede apoyar en aumentar la eficacia de los tratamientos y detener el desarrollo tumoral.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2. Mimetismo vasculogénico

Anteriormente se creía que la angiogénesis era el único mecanismo vascular por el cual los tumores agresivos obtenían un suministro de sangre y nutrientes, por lo que las terapias anti-angiogénicas orientadas a las células endoteliales no siempre producían buenos resultados, lo que significaba que la angiogénesis no era el único mecanismo de abastecimiento nutritivo en el tumor. Sin embargo, en 1999 Maniotis y colaboradores determinaron que las células tumorales de melanoma agresivo formaban estructuras complejas en tres dimensiones (3D) similares a vasos sanguíneos, donde no participaban células endoteliales, si no que estas estructuras estaban formadas por una membrana basal y conformadas por células tumorales. Las células tumorales en mimetismo vasculogénico se pueden identificar mediante tinción de ácido peryódico de schiff (PAS) lo cual da una reacción positiva y tinción negativa de CD31 el cuales es un marcador de las células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos [Qiao *et al.*, 2015].

Maniotis y col introdujeron el termino mimetismo vasculogénico para describir la plasticidad y la capacidad única que tienen estas células para expresar genes asociados al endotelio y formar estructuras tubulares y redes con dibujos en cultivos tridimensionales que imitan las redes vasculogénicas embrionarias. El mimetismo vasculogénico es una estrategia que usan las células tumorales para producir estructuras parecidas a los vasos sanguíneos los cuales se pueden o no conectan con los vasos sanguíneos normales formados por células endoteliales. La formación de estas nuevas redes de células en 3D se debe a la plasticidad que desarrollan estas células tumorales y pueden apoyar en la diseminación de células tumorales a otros órganos [Wang *et al.*, 2016 y Richard *et al.*, 2012].

Esta plasticidad permite que las células tumorales tengan cambios morfológicos para así formar redes con estructuras tubulares sin necesidad de utilizar a células endoteliales como es en el caso de la angiogénesis. Las estructuras tubulares formadas por el mimetismo vasculogénico poseen una cobertura interna de

glicoproteínas que transportan los fluidos (Dusan y col 2017). Otra característica importante del MV es que provee una vía de perfusión para el suministro de sangre, nutrientes y oxígeno; lo que contribuye a un crecimiento y desarrollo tumoral. Además la presencia de MV en pacientes con cáncer se asocia con invasión tumoral, inducción a metástasis, mal pronóstico y baja sobrevivencia [Qiao *et al.*, 2015].

2.1 Vías del mimetismo vasculogénico

El mimetismo vasculogénico puede comenzar por diferentes vías. A través del estado hipóxico se promueve la formación del mimetismo vasculogénico mediante la activación del factor transcripcional HIF-alfa el cual regula la expresión de diferentes genes involucrados en el desarrollo de este mecanismo como son VEGF, EphA2, Twist y Cox-2. Por lo tanto, cuando HIF-alfa se expresa, se activa la expresión de VEGF iniciando una cascada de señalización a través de la vía PI3K/AKT activando a las metalo proteinasas (MMPs) que conllevan a la escisión de la cadena Ln-5 γ^2 produciendo fragmentos pro-migratorios γ^2 y γ^{2x} favoreciendo la plasticidad de la matriz, migración, invasión, metástasis y formación de redes en 3D propias del mimetismo vasculogénico.

El factor de transcripción Twist regula la expresión de VE-cadherin la cual media la actividad de la efrina EphA2 que al ser fosforilado aumenta la actividad de las MPPs mediante la ruta PI3K y FAK. Por otra parte, Cox-2 aumenta la expresión de PGE2 el cual se une a su receptor EP3 que activa a ERK1/2 a través de PKC α conduciendo al desarrollo del mimetismo vasculogénico. Por otra parte, TF, TFP1 y TFP2 son proteínas transmembranales con función pro-coagulante, sin embargo se ha demostrado que están implicados en el desarrollo de los mecanismos de perfusión que suceden durante el mimetismo vasculogénico con ayuda de las MMPs (Figura 6) [Qiao *et al.*, 2015 y Hendrix *et al.*, 2003].

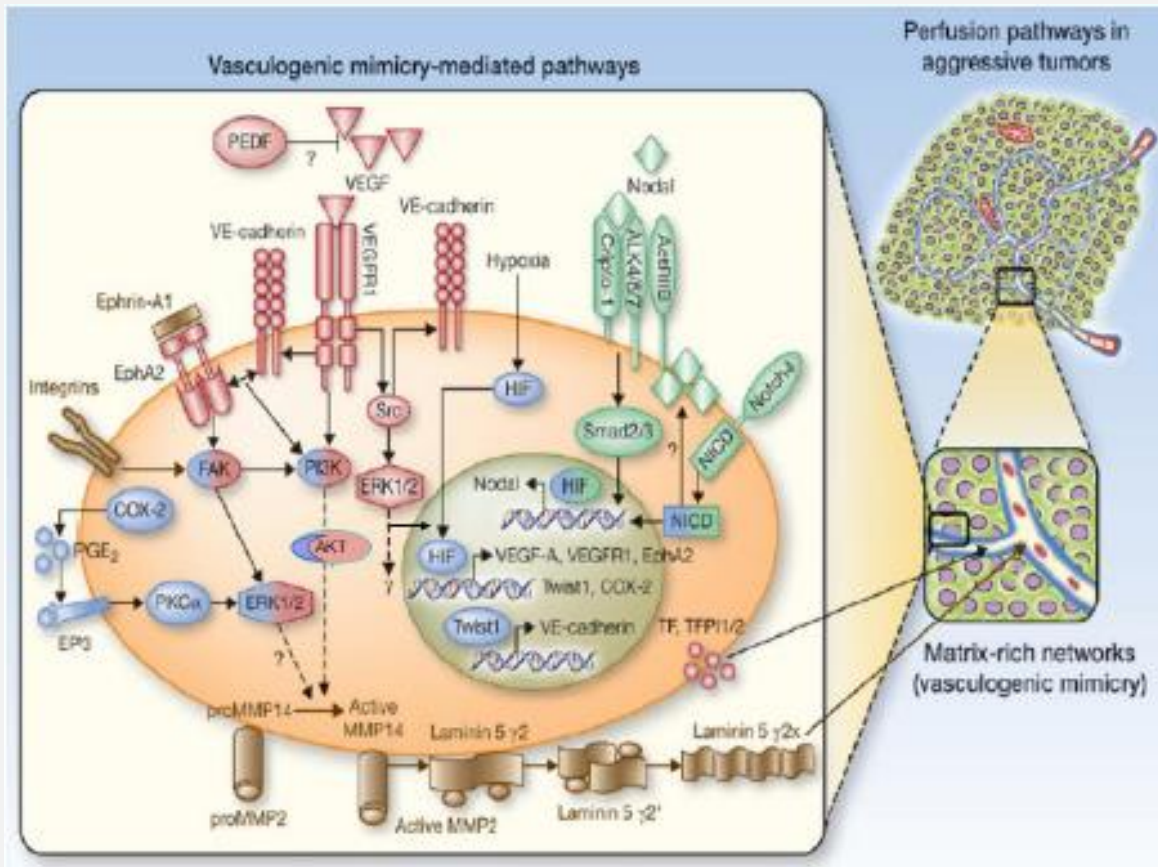


Figura 6. Vía de señalización del mimetismo vasculogénico en cáncer. Tomada de Hanahan D, and Weinberg R. Cell. 2011.

3. El factor de transcripción de CREB5

El factor transcripcional CREB5 (cAMP responsive element binding protein 5, por sus siglas en inglés) es una proteína que contienen dominios dedos de zinc que le permiten unirse al DNA y un zipper de leucina (bZIP) que le permiten la interacción con el ADN y son los responsables de la dimerización de la proteína. Los dominios de CREB ricos en glutamina (Q1 y Q2) contribuyen a la activación potencial de CREB. El dominio KID (dominio inducible por quinasas) contiene los sitios para la fosforilación de CREB; este dominio permite que otras proteínas coactivadoras se unan a CREB fosforilado permitiendo la activación de la transcripción (Figura 7). El gen de *CREB5* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 en la banda 15.1. La activación de CREB5 es mediada por cAMP, factores de crecimiento, hormonas, retinoides, citocinas y prostaglandinas mediante diferentes vías de señalización [Cho y col; 2011], una vez activado el factor de transcripción CREB5 interacciona de manera selectiva con una secuencia de ADN específica dentro de la región reguladora de CRE (cAMP Response Element, del inglés), localizado río abajo del gen, esta unión se da de forma de homodímero o heterodímero en conjunto con Jun o con ATF2/CREBP1, esto permite que CREB actúe como un regulador genético encendiendo o apagando genes [Genecards, 2019] [He *et al.*, 2017] [Shaywitz *et al.*, 1999].



Figura 7. Dominios de la familia de proteínas CREB.

El factor de transcripción CREB5 está presente en la mayoría de los tejidos y regula diferentes procesos biológicos tales como supervivencia celular, diferenciación, metabolismo, homeostasis de la glucosa, respuesta inmune y memoria entre otros [Steven *et al.*, 2016 y Cho *et al.*, 2011]. La expresión elevada de la proteína de CREB5 en diversos tipos de cánceres podría estar regulando positivamente diferentes procesos biológicos como la proliferación celular, migración, invasión, angiogénesis [Flores., 2016] metástasis [Qi *et al.*, 2014], inhibición de la apoptosis y diferenciación [Steven *et al.*, 2016].

3.1 Activación de CREB

El factor de transcripción CREB es activado a través de la fosforilación específica del residuo de la serina 133 el cual se encuentra dentro del dominio KID inducible por quinasa. Diferentes estímulos externos convergen en la activación de CREB debido a que múltiples proteínas quinasas como PKA, pp90rsk, PKC, AKT, forskolina, PKC, MSK-1, entre otras, estimulan la fosforilación de este factor transcripcional [Cho *et al.*, 2011]. Una de las vías de señalización que activa a CREB es a través del cAMP. La activación de los receptores acoplados a la proteína G estimula la respuesta de la adenilato ciclasa; esta enzima cataliza la conversión ATP a cAMP. El cAMP disocia al heterotetrámero de la PKA (proteína quinasa dependiente cAMP) contiene 2 subunidades reguladoras R y 2 subunidades catalíticas C. La PKA se encuentra en el citoplasma en forma inactiva mientras se encuentra como heterotetrámero. Una vez formado el cAMP, éste disocia las subunidades catalíticas de la proteína y las subunidades reguladoras se mantienen unidas al cAMP; las subunidades catalíticas migran al núcleo induciendo la fosforilación de CREB en la serina 133 (Figura 6).

CREB se activa al ser fosforilado y se une al elemento CRE en los promotores de genes blanco en forma de homodímero o heterodímero con c-Jun o CRE-BP1. Posteriormente, la proteína CBP (proteína de unión a CREB) es reclutada e interacciona con el complejo. CBP es un coactivador transcripcional que se asocia al complejo de la RNA polimerasa II. Otro factor transcripcional llamado TFIID se

une a la caja tata a través de TBP, TAF130 y TFIIB; las cuales se unen al dominio Q2 de CREB. La proteína CBP sirve como puente molecular al unirse al dominio KID de CREB permitiendo la interacción con la maquinaria transcripcional; el reclutamiento de la polimerasa requiere que el dominio KID se encuentre fosforilado. Estas interacciones permiten que CREB active la transcripción [Shaywitz *et al.*, 1999 y Mayr *et al.*, 2001].

Como se mencionó anteriormente cuando CREB se activa se une a los elementos CRE localizados en la región promotora de los genes el cual tiene una secuencia consenso de ocho pares de bases 5´TGACGTCA3´. También se ha identificado que CREB puede regular genes blancos que tengan la secuencia CRE incompleta CGTCA/TGACG, pero en este caso la activación transcripcional es menor [Mayr *et al.*, 2001].

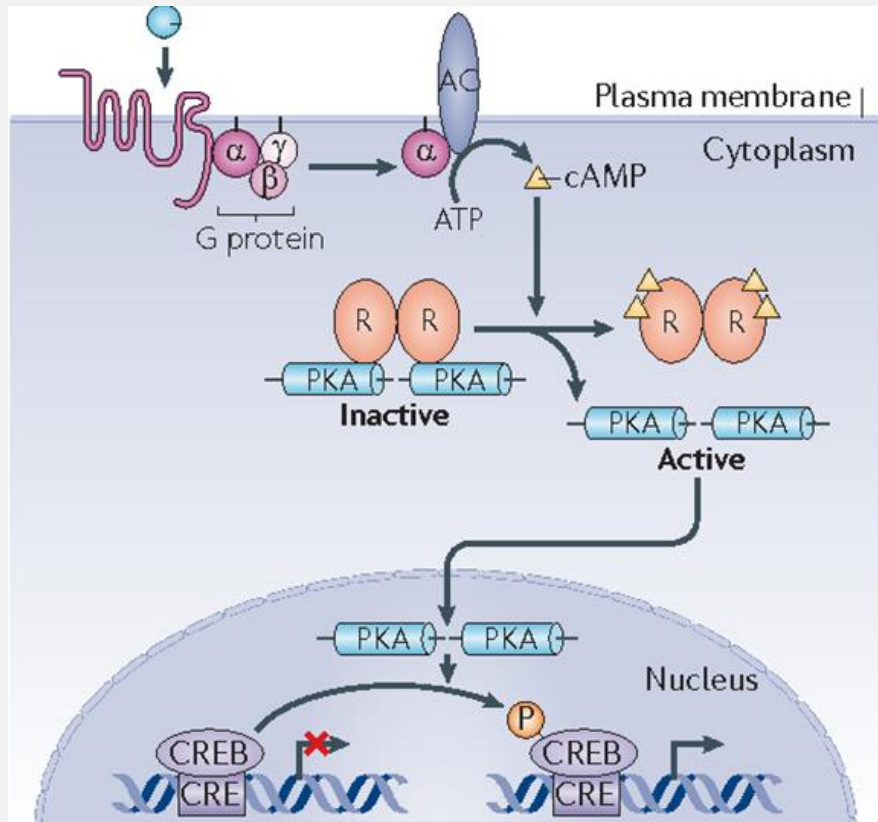


Figura 8. Vía de activación de CREB mediante cAMP. Primero la proteína G es activada a través de la unión de un ligando a su receptor (estas pueden ser hormonas o neurotransmisores) generando así cAMP, cuatro moléculas de cAMP se unen al dímero de PKA conduciendo a su activación. Al activarse la PKAR se transloca al núcleo para fosforilar a CREB en la ser133. Tomada de Altarejos y col., 2011.

3.2 Antecedentes del papel de CREB5 en cáncer

Diversos estudios demuestran el papel de CREB1 en la estimulación del crecimiento tumoral mediante diferentes procesos como son el aumento en la proliferación celular, invasión, migración, inhibición de la apoptosis y estimulación de la metástasis [Steven *et al.*, 2016 y Wang *et al.*, 2015]. No obstante, la función de CREB5 (miembro de la familia de proteínas CREB) no ha sido bien descrita en los procesos tumorigénicos. Se ha reportado que la expresión de CREB5 en cáncer de ovario epitelial se encuentra aumentada tanto en líneas celulares como en los tejidos de tumores de pacientes tanto a nivel de RNAm como proteína, lo cual se correlaciona positivamente con el grado histológico y la progresión del cáncer y una baja supervivencia en pacientes.

Además, Qi L y colaboradores reportaron que CREB5 regula positivamente 16 genes que participan en la migración celular (CSF1R, MMP9, PDGFRB, FIGF, IL6, entre otros), por lo que ellos sugieren que la expresión aumentada de CREB5 podría participar en la generación de la metástasis en cáncer colorectal [Qi *et al.*, 2014]. También se informó que la sobreexpresión de CREB5 en este tipo de cáncer aumentó la proliferación celular, metástasis, e inhibición de la apoptosis [Zhang *et al.*, 2018]. El factor de transcripción CREB5 regula diferentes procesos celulares implicados en la progresión y desarrollo del cáncer; sin embargo, hay muy pocos estudios que revelan su función en el cáncer de mama y hasta el momento no hay estudio publicado que indique la participación de CREB5 en el mimetismo vasculogénico.

3.3 CREB5 y mimetismo vasculogénico

Para entender la función de CREB5 asociada a la formación del mimetismo vasculogénico es necesario enfocarnos a la función de un miembro de la familia de este factor transcripcional llamado CREB1 (también nombrado CREB) el cual regula el crecimiento tumoral y ha sido ampliamente estudiado también en otros procesos celulares..

Al activarse CREB1 mediante fosforilación interactúa con CBP/P300 lo que permite el reclutamiento de la RNAPol II para el inicio de la transcripción de genes; curiosamente HIF1 α también interactúa con CBP/P300. Esto sugiere que CREB podría estar interactuando de manera indirecta con HIF1 α a través de CBP/P300 facilitando la asociación de HIF1 α a su secuencia promotora lo que da lugar a la regulación de genes como VEGF promoviendo la metástasis y la angiogénesis. [Wu *et al.*, 2007 y GeneTex]. Interesantemente, la proteína recombinante de CREB1 puede unirse a la secuencia consenso de HIF1 (Factor 1 inducible por hipoxia) [Kvietikova *et al.*, 1995]. De manera interesante el sitio de unión a CREB5 (CRE) es muy parecido a la secuencia al sitio de unión de HIF1 α (HRE). Lo que podría indicar una unión competitiva al sitio HRE con otros factores de transcripción como CREB5. Esto podría indicar que los genes que están regulados por HIF1 α también podrían ser blancos de miembros de la familia de CREB.

Por otro lado, diversos estudios señalan que la sobreexpresión de CREB podría estar favoreciendo la expresión de VEGF y Cox-2 al unirse a su sitio CRE, promoviendo la angiogénesis [Jeon *et al.*, 2007, Shneror *et al.*, 2017 y Scoditti *et al.*, 2010]. Además, GOLPH3 también es regulado por CREB/ATF; el aumento de expresión de GOLPH3 promueve la angiogénesis, proliferación y agresividad celular [Dai *et al.*, 2015. Peñalver-González *et al.*, 2019].

Estos estudios nos podrían ayudar a conocer el papel que tiene el factor transcripcional CREB en el desarrollo del cáncer y el mimetismo vasculogénico (Tabla 2).

Gen	Expresión en cáncer	Funciones en cáncer	Referencias
VEGFR-1 HIF-1 α	Aumentado	Angiogénesis	Wu <i>et al.</i> , 2007 Kvietikova <i>et al.</i> , 1995
IAP2, Bcl2, Bcl- XL	Disminuido	Inhibición de la Apoptosis	Abramovitch <i>et al.</i> , 2004
Cox-2	Aumentado	Resistencia a apoptosis y angiogénesis	Ghoshy <i>et al.</i> , 2007 Scoditti <i>et al.</i> , 2010
<i>CyclinD1</i> , <i>cyclin A</i>		Progresión del ciclo celular	Abramovitch <i>et al.</i> , 2004
EHZ2	Aumentado	Angiogénesis	Zang <i>et al.</i> , 2018

Tabla 2. Genes regulados en cáncer por el factor de transcripción CREB

4. El papel del miR-204 en cáncer de mama

Previos reportes indican que la expresión del miR-204 se encuentra disminuida en diversas neoplasias malignas, entre ellos el cáncer de mama, lo que indica que este miRNA se comporta como un supresor de tumores.

Hong BS y col. reportaron que la expresión del miR-204 se encontraba disminuida en tejido de cáncer de mama, en comparación con tejido de mama normal; ya que la restauración en la expresión de este miRNA disminuyó la proliferación celular, viabilidad y capacidad migratoria en células de cáncer de mama [Hong *et al.*, 2019]. Por otro lado Fan y colaboradores reportaron que al restablecer la expresión del miR-204 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 suprimió la proliferación celular, indujo la apoptosis e inhibió la migración e invasión [Fan *et al.*, 2019].

En nuestro equipo de trabajo se demostró que el miR-204 inhibe la proliferación celular, la migración, invasión y de manera particular la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*, mediante la supresión de la vía TGF β a través de la inhibición de dos factores pro-angiogénicos: ANGPT1 y TGFBR2 [Flores-Pérez, 2016]. Además, se realizó un análisis del transcriptoma de las células transfectadas con el miR-204 donde se encontró la modulación de alrededor de 500 genes entre los se encontró a CREB5 [Flores y col 2016]. Por otra parte, el miR-204 también suprimió el mimetismo vasculogénico a través de la reducción de la expresión y fosforilación de diversas proteínas oncogénicas que participan en rutas de señalización tales como PI3K, AKT, TGF β , VEGF, entre otras, en células de cáncer de mama agresivas triple negativo [Salinas-Vera, 2017]. Estos datos demuestran la importancia del miR-204 en tumorigenesis mamaria y al mismo tiempo abren nuevas interrogantes acerca de la participación de otros genes potencialmente regulados a nivel postranscripcional y que puedan participar en la carcinogénesis tales como CREB5.

II. HIPÓTESIS

Si la restauración de la expresión del miR-204 reprime la expresión de CREB5 entonces disminuirá la proliferación celular, viabilidad y la formación de estructuras 3D tipo capilares de líneas celulares de cáncer de mama.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres tanto en México como a nivel mundial. En este tipo de cáncer, el nivel de expresión del miR-204 está disminuido mientras que el nivel de CREB5 esta sobreexpresado, lo cual se asocia a un mal pronóstico para los pacientes. Estos datos sugieren también que el miR-204 podría estar regulando de manera negativa la expresión de CREB5 en cáncer de mama.

En este estudio se propone que el silenciamiento de la expresión de CREB5 mediante la restauración del miR-204 y a través de la transfección de un RNA de interferencia (sh-RNA) específico podría conducir a la inhibición del crecimiento celular y la inhibición de la formación del mimetismo vasculogénico.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar el papel del miR-204 en la regulación de la expresión de CREB5 y el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión del mRNA y proteína del factor de transcripción CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama y tumores de mama.
2. Determinar si el miR-204 inhibe la expresión de CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama.
3. Inhibir la expresión de CREB5 en líneas celulares metastásicas MDA-MB-231 y no metastásicas MCF7 mediante la transfección de dos sh-RNAs.
4. Evaluar los efectos de la inhibición de CREB5 en la proliferación celular y mimetismo vasculogénico.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

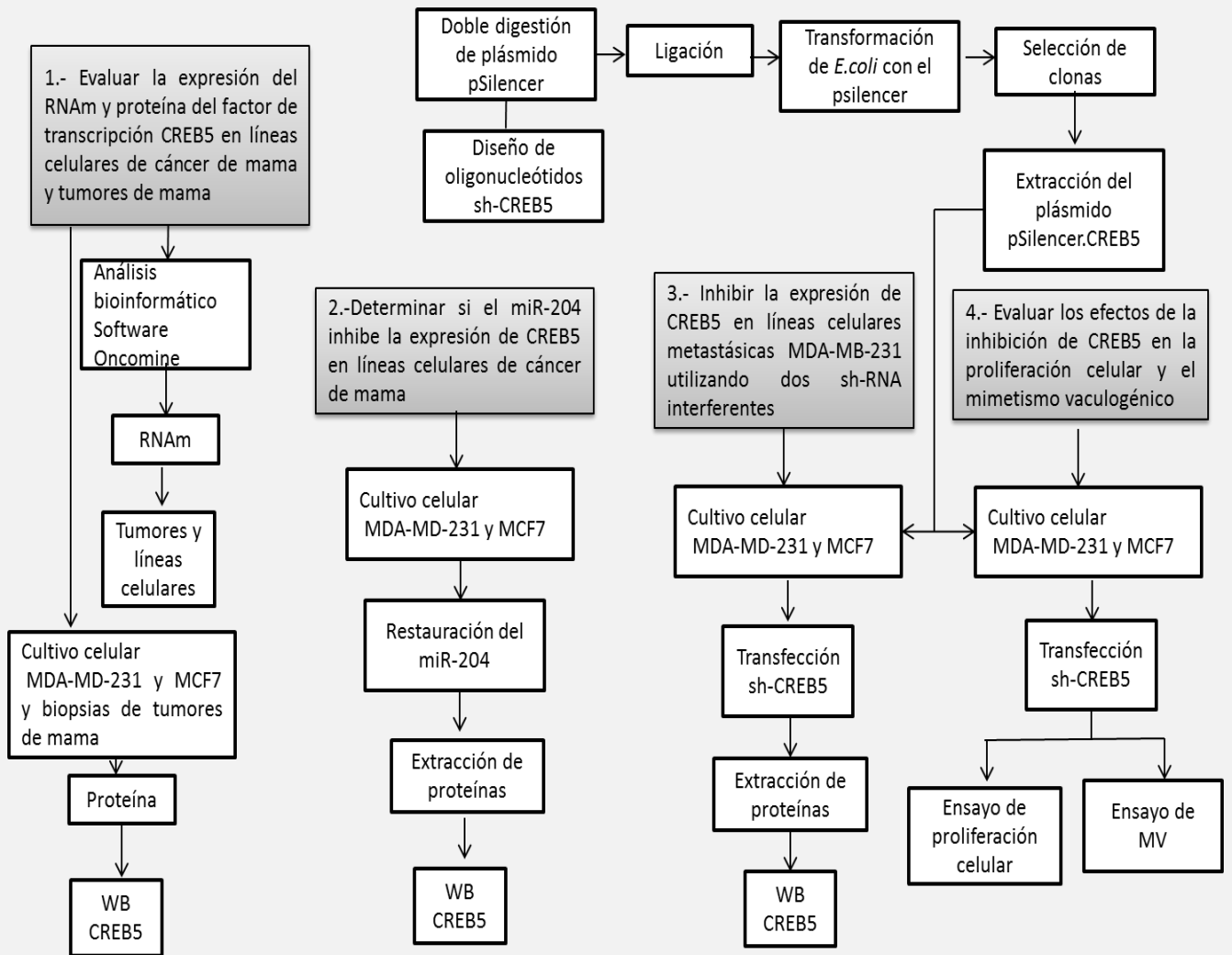


Figura 9. Estrategia experimental

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231y MCF7 se sembraron en cajas de 25 cm. Para el crecimiento las líneas celulares se cultivaron con 5 ml de medio DEMEM-F12 (Gibco, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB Gibco, Life Technologies) y 5 mL de penicilina-estreptomicina. Las células se incubaron en una incubadora semi húmeda a 37°C con 5% de CO₂.

Para el buen desarrollo de las líneas celulares, el medio de crecimiento se cambió después de que viro de color; para esto se desechó el medio viejo y se hizo un lavado con Buffer fosfato salino (PBS-1x). Posteriormente se añadió medio DEMEN-F12 suplementado fresco como se explicó anteriormente. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El PBS y el medio de cultivo se atempero a 37°C antes de usarlo.

6.1.2 Resembrado de los cultivos celulares

Cuándo las células alcanzan la confluencia al 80%, estas se resembraron en cajas nuevas para que se siguieran dividiendo. Para ello, se desechó el medio de cultivo y las células fueron lavadas con 5 ml de PBS 1x. Se removió el PBS, seguidamente se añadieron 3 ml de PBS-EDTA y 75 µl de tripsina, se mezcló homogéneamente y se incubaron 5 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se despegaron y se agregó 1 ml de medio suplementado para inactivar a la tripsina y las células se transfirieron a un tubo Falcón de 15 ml para posteriormente centrifugarlas a 1500 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de medio suplementado y se distribuyó en frascos de 25cm² nuevos y estériles. Se adicionaron 5 ml de medio suplementado y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

6.1.3 Congelamiento de las líneas celulares

2×10^6 células tumorales resuspendidas en 0.9 ml de medio fresco fueron agregadas a un criovial y posteriormente se agregó 100 μ L de DMSO. El tubo se cerró y se guardó a -20°C durante 20 min para posteriormente almacenarse a -80°C , hasta su uso.

6.1.4 Descongelamiento de las líneas celulares

Los crioviales se descongelaron en hielo por 2 min y posteriormente se descongelaron a 37°C en baño maría; las células tumorales se centrifugaron para retirar el medio que contenían y resuspendieron en 1ml de medio DMEM-F12 debidamente suplementado y se colocaron en frascos de cultivo de 25cm^2 nuevas y estériles.

7. Transfección de precursor del miR-204.

Para llevar a cabo la sobreexpresión del miR-204 en la línea celular MDA-MB-231 se utilizó el agente de transfección Lipofectamina 2000. Para ello, primero se realizó la siembra de las células en placas de 6 pozos, considerando dos por cada condición; teniendo así dos pozos con la condición mock, dos para el pozo Scramble, dos para la sobre expresión del miR-204 a una concentración de 30nM. En cada pozo fueron sembradas 250,000 células y cuando estas alcanzaron un 80% de confluencia se procedió a realizar la transfección. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron 7.7 μ L del precursor del miR-204 con 150 μ L de Opti-MEM I (Reduced Serum Medium), la solución se mezcló por pipeteo y se incubó durante 20 minutos. En otro tubo eppendorf de 1.5mL se colocaron 12.5 μ L de Lipofectamina 2000 con 150 μ L de Opti-MEM I Reduced Serum Medium, la solución se mezcló por medio de pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de 20 minutos de incubación se mezclaron los contenidos de los tubos por medio de pipeteo y se incubó durante 20 minutos a

temperatura ambiente. Finalmente, las células con la solución fue agregada en cada pozo el cual contenía 2180 μ L de Medio DMEM suplementado con SFB 5%, se procedió a realizar movimientos ondulatorios en la placa para realizar la mezcla de la solución junto con el medio de cultivo. La placa fue colocada en la incubadora durante 48 horas. La expresión relativa del miR-204 fue evaluada a las 48 h mediante qRT-PCR.

8. Evaluación de la proliferación celular por MTT

Para determinar el efecto del silenciamiento de CREB5 sobre la proliferación celular se sembraron 10,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 96 pozos, las células fueron transfectadas con el sh-CREB5.2 y el sh-CREB5.3 y como control se utilizaron células tratadas únicamente con el agente transfectante y células sin tratar. La transfección se evaluó a las 3, 6, 12 y 24 horas. Posterior al tiempo de transfección, se retiró el medio y los pozos fueron lavados con 50 μ L PBS, se retiró el PBS y se agregó 100 μ L de MTT (0.5mg/mL) y se incubo por 3 horas a 37°C. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó 100 μ L de isopropanol y se agitaron durante 10 minutos (la placa se cubrió con aluminio). La absorbancia se midió a 570nm.

9. Extracción de RNA en líneas celulares

Para la extracción de RNA total las células se despegaron de la caja cuando tenían más de un 80% de confluencia, para esto se desechó el medio y se lavó con PBS, se retiró el PBS y se agregó 3mL de PBS-EDTA y 75 μ L de tripsina, se incubaron las células a 37°C por 5 minutos una vez que las células se despegaron por completo se adiciono 1 mL de medio; las células se transfirieron en un tubo 15 mL y se centrifugaron 1500 rpm a 4°C por 5 min. Al finalizar el tiempo de centrifugación se decantó el sobrante y se agregó 1 mL de TRIzol a la pastilla, se re suspendió la pastilla por pipeteo vigorosamente. Posteriormente el lisado celular se pasó a un tubo de 1.5 mL y se incubo 5 minutos a temperatura

ambiente, por cada ml de TRIzol se añadieron 200 μ l de cloroformo y se mezcló por vortex durante 15 segundos, se incubó por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,500 rpm por 25 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo de 1.5mL, se adicionaron 500 μ L de isopropanol y se incubó 20 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó 12,000 rpm 25 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1mL de etanol al 75% y se secó la pastilla a T.A. La pastilla se re suspendió en 20 μ L de agua libre de RNAsas. El RNA se cuantificó en nanodrop y la integridad de éste se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

10. Análisis bioinformático

Para llevar a cabo el análisis de expresión de CREB5, se realizó una búsqueda de datos reportados en pacientes con cáncer de mama y tejido normal de mama mediante el uso del software Oncomine (<https://www.oncomine.org>) donde se obtuvieron los datos de expresión. Las imágenes de inmunohistoquímica de la expresión de CREB en tejidos de cáncer de mama y tejido mamario normal se obtuvieron de la base de datos The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org). Los análisis densitométricos de los western blots se realizaron con el software myImageAnalysis

11. Extracción de proteínas de líneas celulares

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de las líneas celulares de cáncer de mama, se lavaron tres veces los cultivos celulares MDA-MB-231 y MCF7 con PBS frío, luego se incubaron con 960 μ l de 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 40 μ L de cóctel de inhibidores de serina proteasas, cisteína proteasas y metalo proteasas 15X (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a 4°C durante 15 min en agitación. De manera alternativa, para mayor rendimiento en los extractos de proteínas, se pueden despegar las células de los frascos de

cultivo celular con tripsina 0.25%/PBS-EDTA como se describió anteriormente hasta obtener una pastilla de células, la cual se lava 1 vez con PBS frío, y se resuspendió en el buffer de lisis TNTE frío y suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa. Posteriormente, se centrifugó la suspensión de células-buffer a 12,500 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su cuantificación y análisis.

11.1 Extracción de proteínas de muestras de tejido

La porción de las biopsias destinada para los extractos de proteínas fue colocada en un tubo cónico estéril de 15 ml donde previamente se adicionaron 500 µL de buffer TNTE frío suplementado con inhibidor de proteasas “complete” (Roche), y se llevó a cabo la lisis utilizando un homogenizador de tejidos (TissueRuptor, Qiagen). El procedimiento fue realizado en hielo, con 3-5 impulsos de 10 segundos a velocidad máxima y descansos de 10 segundos, con el objetivo de no sobrecalentar la muestra. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 4°C durante 15 min en agitación, finalmente las muestras se centrifugaron a 12,500 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su cuantificación y análisis.

11.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos totales de las líneas celulares y tejidos tumorales, se utilizó el método de Bradford. La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (1 mg/ml). La concentración de proteína se determinó en el 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.

11.2.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó a una concentración de acrilamida del 10-12% 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.

11.2.2 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Los geles, las 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, se sumergió en la solución de transferencia y se transfirió a 400 mA durante 1 h en hielo ó a 40 mA durante toda la noche a 4°C. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó tinción con rojo Ponceau, posteriormente se lavó la membrana con PBS pH 7.4.

11.2.3 Ensayos de inmunodetección

Las membranas donde fueron transferidas las proteínas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS pH 7.4) durante 1 h a TA ó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron las membranas con PBS-Tween20 durante 5 min, tres veces, y posteriormente se agregó el anticuerpo primario de CREB5 (Abcam Ab168928) diluido 1:1000 en PBS, y se incubó durante toda la noche a 4°C, en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS y se adicionó el anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP (Invitrogen G21234) diluido en PBS y se incubó durante 1 h a TA en agitación. Posterior a la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron cinco veces durante 3 min con PBS 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 (Bio-Rad). A las bandas detectadas en las membranas se les realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo Scientific).

12. Clonación

12.1 Diseño de los oligonucleótidos para el silenciamiento de CREB5

Los oligonucleótidos necesarios para generar la molécula de sh-RNA dirigida específicamente contra el gen CREB5 fueron diseñados a partir de la base de datos InvivoGen (<https://www.invivogen.com/sirnazizard/>). Se utilizó la secuencia del transcrito principal de CREB5, del cual se obtuvieron tres posibles candidatos (Tabla 3). Se eligieron las secuencias nombradas sh-CREB5.2 y sh-CREB5.3; pues presentan mayor homología con las secuencias de todas las variantes del RNAm de CREB5.

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para el silenciamiento del gen CREB5

Nombre	Posición en el mRNA	Secuencia	Variante
SH-CREB5.1	65	GCACATTACATCATCGCTTGG	4
SH-CREB5.2	76	GCATTTATGCTCTGGCATTTCG	3
SH-CREB5.3	970	GCAGAACCATCCACATCACCA	2,4,1

12.2 Oligonucleótidos sintetizados

Los tubos que contenían los oligonucleótidos liofilizados se centrifugaron antes de abrir, posteriormente se agregó agua inyectable estéril, en el volumen indicado para llevar a una concentración de 100 μ M, el tubo se mezcló por inmersión y se aplicó vortexeo de 30 segundos.

12.3 Hibridación de los oligonucleótidos

Se tomó un total de 1ug/ μ L de cada uno de los oligonucleótidos y se aforó a 2 μ L con buffer de hibridación. Posteriormente los oligonucleótidos se hibridaron a 90°C 3 min, 37°C 1h y 4°C hasta sacar las muestras. Se comprobó la hibridación de los oligonucleótidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% y se visualizó en un foto documentador. Observándose en los oligonucleótidos hibridados una disminución en su movilidad electroforética en el corrimiento electroforético esto al comparar con los oligonucleótidos no hibridados.

12.4 Doble restricción del plásmido pSilencer

El plásmido pSilencer 5.1 U6 retro se trató con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* para tener los extremos compatibles con el inserto. Previamente se verificó que enzimas eran convenientes utilizar y el tipo de buffer. La reacción de restricción se hizo de la siguiente manera y se incubó a 37°C toda la noche.

pSilencer 1 μ g	1 μ l
Enzima <i>HindIII</i>	0.1 μ l
Enzima <i>BamHI</i>	0.5 μ l
Buffer 2.1 (10x)	2 μ l
Agua	16.4 μ l
Volumen total	20 μ l

12.5 Purificación de plásmido restringido

El plásmido digerido se resolvió en un gel de agarosa y posteriormente se cortaron las bandas para purificar el plásmido utilizando el kit QuiAquick. Las bandas cortadas se pesaron y se adicionaron 3 volúmenes de buffer QG dependiendo de lo que peso el gel (si el gel peso 100mg añadir 300 μ L de buffer). La muestra se incubó 50°C 10 min en el termobloque hasta solubilizar el gel. La mezcla se pasó

a la columna de afinidad que viene en el kit y se añadió 200 μ L de isopropanol (si el gel peso 100mg añadir 100ul de isopropanol). La muestra se centrifugó 10,000xg durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 750 μ L de buffer TE. Si la muestra se usa para digestión o secuenciación se deja reposar 5 min en el buffer de TE, se descartó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 10,000xg 2min; el sobrenadante se eliminó y la columna se pasó a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril. El DNA plasmídico se eluyó añadiendo 50 μ L de agua libre de nucleasas a la columna y se centrifugo a 10,000xg. La muestra se cuantifico en nanodrop y se corrió en un gel de agarosa para comprobar su integridad.

12.6 Ligación de los insertos siRNAs dentro del plasmido pSilencer 5.1 U6

Retro

Para realizar la reacción de ligación el inserto generado se diluyó a una concentración final de 0.52 ng/ μ l. Posteriormente se preparó la siguiente reacción de ligación en donde la concentración del inserto/vector fue 1:1.

50 ng pSilencer vector lineal	1.15 μ l
Oligonucleótidos hibridados	0.52 μ l
Buffer ligasa T4 5x	4 μ l
DNA ligasa T4	1 μ l
Agua	13.85 μ l
Volumen total	20 μ l

La concentración se realizó en una relación de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6. Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto (el inserto se sustituyó con 1 μ l de solución de hibridación). Las reacciones de ligación se incubaron toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones de ligación son empleados para transformar células *E. coli* DH5 α competentes obteniendo así las construcciones psilencer-CREB5.2 y psilencer-CREB5.3.

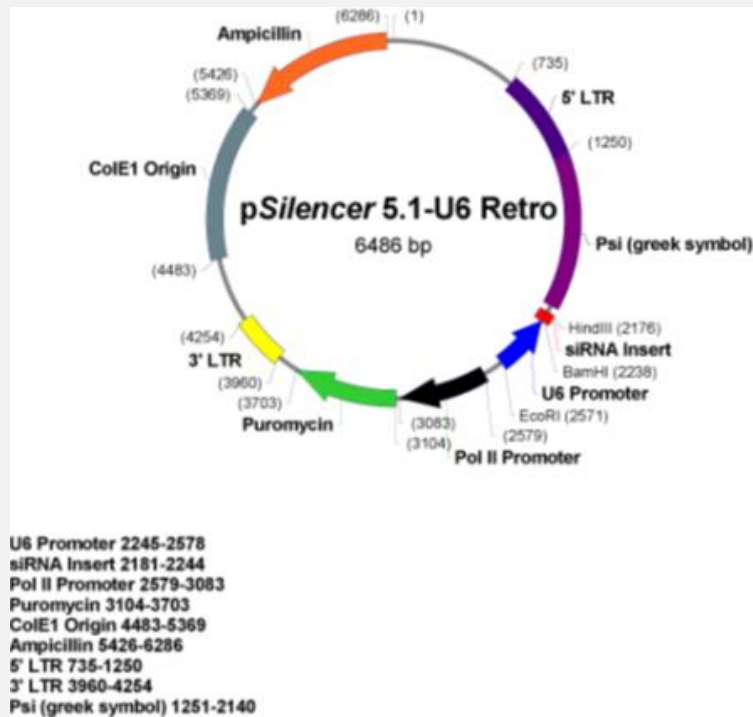


Figura 10. Mapa del vector plasmídico pSilencer 5.1 U6 Retro. Mapa y características del vector plasmídico utilizado para silenciar el gen de *CREB5* los oligonucleótidos fueron clonados entre los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *BamHI*.

12.7 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α

Para realizar la transformación de los plásmidos en las bacterias, se descongelaron en hielo alícuotas de células competentes *E. coli* DH5α se tomaron 50 µl de células competentes y se mezclaron con 1 µl del plásmido pSilencer-CREB5 de cada construcción (50-100ng). Las células se incubaron 20-30min en hielo y posteriormente se sometieron a choque térmico en baño maría a 42°C durante 90seg. Posteriormente, las células se incubaron a 4°C durante 3 min y se les adicionó 200 µl de medio LB líquido estéril. La mezcla se incubó por 45 min a 37°C en agitación 250rpm y se sembró en cajas de Petri con medio LB con ampicilina. La placa se incubó a 37°C toda la noche de manera invertida. En condiciones estériles.

12.8 Purificación de plásmido por lisis alcalina (Miniprep)

Se seleccionaron de 10-20 colonias aisladas y se inocularon en alícuotas de 5 ml de medio LB con 5 µl de ampicilina. Se incubaron a 37°C en agitación durante 16 h y se tomaron 1.5 ml del cultivo para posteriormente centrifugar las células a 8000 rpm durante 3 min y se retiró el sobrenadante. A la pastilla se le extrajo el plásmido mediante lisis alcalina. La pastilla se resuspendió en 100 µL de solución I fría [(glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM)] y se agitó fuertemente en vortex. Después se adicionaron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min para lisar las bacterias. Posteriormente, se agregaron 150 µl de solución III fría (acetato de potasio 3 M, pH 5.2), se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,000 xg durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y se centrifugó a 12,000 xg durante 5 min. La pastilla (ADN plasmídico y ARN) se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 a 15 min. El ADN se resuspendieron en 50 µl de agua estéril y el ARN se eliminó mediante incubación con 1µL de RNAsa (10 mg/ml) durante 30 min a 37°C. Las muestras se

cuantificaron y se corrieron en geles de agarosa al 1% para evaluar la integridad de los plásmidos.

12.9 Purificación de plásmido para secuenciar

El plásmido se purificó utilizando el kit QuiAquick. El eluido de la lisis alcalina se transfirió a la columna de afinidad y se agregaron 200 µl de isopropanol se centrifugó 13,000 rpm por 1 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se adicionó 600µL del buffer PE se incubó por 5 minutos y se centrifugó nuevamente 2 min a 13,000 rpm a 4°C y desechó el sobrenadante. Posteriormente, se transfirió la columna a un tubo de 1.5mL y el DNA plasmídico se eluyó con 50 µl de agua libre de nucleasas, se centrifugó 13,000rpm 2min a 4°C. El eluido se cuantificó por nanodrop y se guardó a -20 hasta su uso.

13 Silenciamiento de CREB5 en la línea celular MDA-MB-231 y MCF7

Una vez que se amplificaron y purificaron los plásmidos psilencer-CREB5.2 y psilencer-CREB5.3 se transfectaron mediante lipofección en las células tumorales MDA-MB-231 y MCF7. Para la transfección, se sembraron 250,000 células MDA-MB-231 y MFC7 por pozo en una placa de 6 pozos y se incubaron en condiciones normales (37°C, 5% CO₂ y 21% O₂), al día siguiente las células fueron transfectadas como sigue: (Reacción de transfección para un pozo), en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 2 µg de las construcción psilencer-CREB5.2 o silencer-CREB5.2 y se mezclaron con 150 µl de OptiMEM, por otro lado en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 9 µl de lipofectamina 2000 reagent (invitrogen) y se mezcló con 150 µl de OptiMEM. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Al finalizar el tiempo de incubación se mezcló el contenido de ambos tubos en uno solo por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 minutos a TA para permitir la formación de los complejos Lipofectamina-DNA. Las células y se lavaron 2 veces con PBS pH7.0, posteriormente se les adicionó 1.8 ml de

medio DMEM sin complementar. Pasado el tiempo de incubación se les adicionaron los complejos lipofectamina-DNA (200 μ l) correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 4 horas en condiciones normales. Pasado el tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se les adicionó 2000 μ l de DMEM debidamente complementado, las células se incubaron en condiciones normales durante 48 h. El silenciamiento de CREB5 se confirmó mediante inmunodetección de la proteína en las células transfectadas con los plásmidos.

13.1 Secuenciación de plásmido con inserto

Para determinar que los plásmido sh-CREB5.2 y sh-CREB5.3 realmente contenían el inserto esperado correspondiente a las secuencias interferentes diseñadas previamente, se realizó una reacción de PCR para llevar a cabo la secuenciación de éste. La reacción de secuenciación contenía 400-600ng de plásmido, 1 μ l de oligonucleótidos 10 μ M, 2 μ L de Big Dye 5x y 3 μ l de amortiguador, la mezcla se aforo con agua. Posteriormente, la muestra se incubó en el termociclador a 96°C 1min, 96°C 10s, 50°C 5min y 60°C 4min. Los tubos se guardaron a -20°C hasta la secuenciación.

14. Ensayo de mimetismo vasculogénico.

250,000 células MDA-MB-231 se sembraron en cada pozo en una placa de seis por duplicado. 24 horas después, se transfectaron con las construcciones sh-CREB5.2 y sh-CREB5.3 durante 48 horas en condiciones normales (5% CO₂, 21% O₂, 37°C). Posteriormente, las células se sometieron a hipoxia (1% de O₂) durante 48 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo se realizó un cultivo en 3D, previamente se colocó 50 μ l de matrigel preparada (900 μ l matrigel +100 μ L PBS-1x) en pozos de una placa de 96, cuidando de no formar burbujas. La placa se incubó a 37°C 1h. Posteriormente se sembraron 30,000 células con medio no suplementado en cada condición, sin transfectar, transfectadas con lipofectamina, mock,

transfectadas con sh-CREB5.2 y sh-CREB5.3. Adicionalmente todos los grupos fueron incubados a 37°C, 5%CO₂ y 1% O₂, por 12h. Se monitorearon la generación de tubos y nodos a través del tiempo tomando imágenes a las 0, 3, 6 y 9 horas. Posteriormente, se realizó el conteo de los túbulos formados, así como los puntos de ramificación o nodos representativos del mimetismo vasculogénico.

VII RESULTADOS

15. Determinación de la expresión del RNAm de CREB5 en muestras de tejido y líneas celulares de cáncer de mama

Con el objetivo de determinar la expresión de CREB5 a nivel de RNAm en tejido mamario normal y compararla con la expresión de CREB5 en tejido de carcinomas de mama, se realizó una búsqueda bioinformática utilizando la base de datos publica denominada Oncomine (<http://www.oncomine.org>) el cual contienen datos de expresión de transcritos en diversos tipos de cáncer humano. De este modo se obtuvieron los resultados a nivel de RNAm en donde partiendo de 59 pacientes (6 con tejido normal de mama y 53 pacientes de tejido tumoral de mama) se determinó que el nivel de expresión de CREB5 se encuentra aumentado en biopsias de cáncer de mama y suprimido en tejido mamario normal ($p < 0.05$) (Figura 11A).

Por otro lado, a través del mismo software se obtuvo el nivel de expresión de CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF7, MDA-MB-453, HCC2218 y Hs578t y se comparó su nivel de expresión con la línea celular normal de mama MCF10A, encontrándose que de igual modo la expresión de CREB5 se encuentra abatida en MCF10A mientras que las líneas de cáncer su expresión está aumentado (Figura 11B). A pesar que las líneas celulares son invasivas, la línea celular MDA-MB-231 es más agresiva y metastásica de manera que estos resultados indican que el nivel de expresión de CREB5 también podría estar relacionado con la agresividad de la línea tumoral.

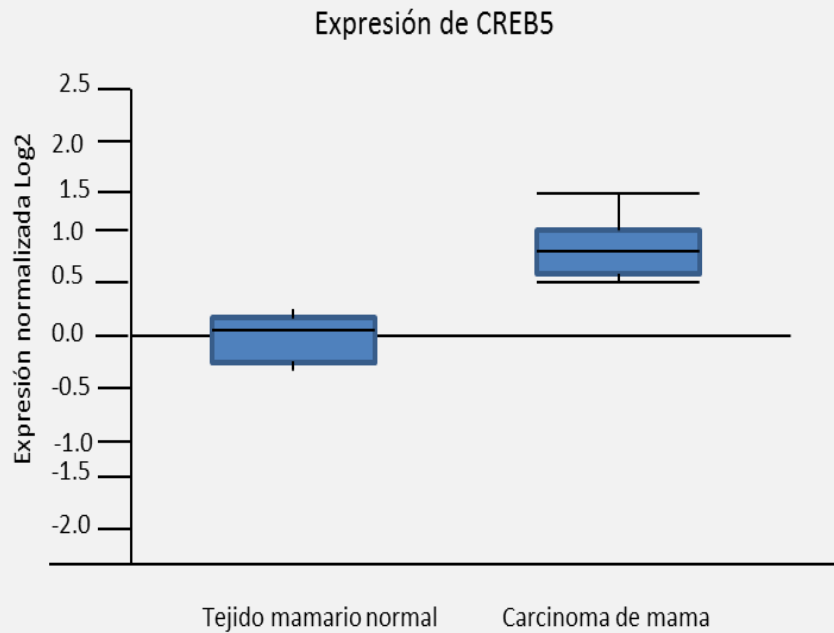


Figura 11A. CREB5 se encuentra aumentado en biopsias de cáncer de mama. En el gráfico se muestran los resultados del análisis de la expresión del RNAm de CREB5 en 59 biopsias (6 tejido mamario normal y 53 biopsias de cáncer de mama). La distribución normal de los datos se muestra en barras color azul. Los resultados se obtuvieron de los datos publicados en la base de datos públicos de cáncer Oncomine ($p < 0.05$).

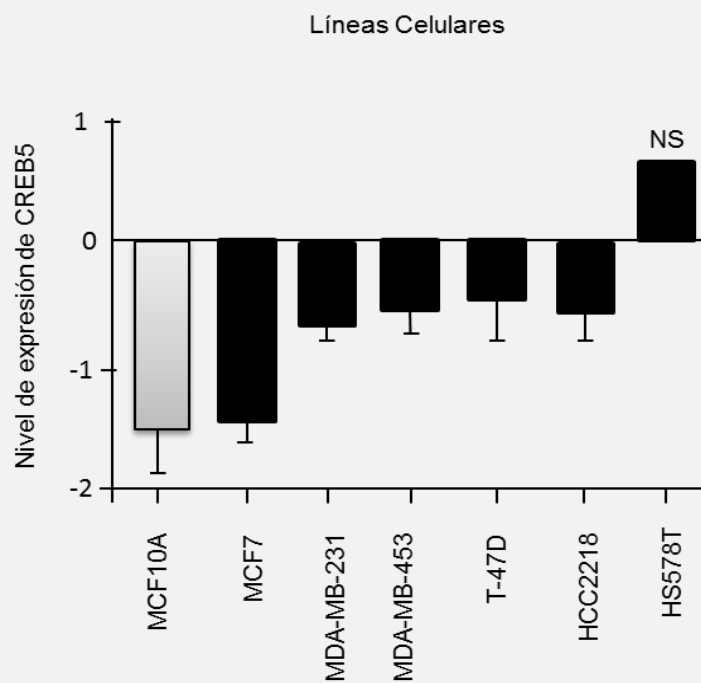


Figura 11B. Análisis de expresión de CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama y línea celular normal. En la gráfica se observa una mayor expresión del RNAm de CREB5 en las líneas celulares tumorales mamarias MDA-MB-231, MCF7, MDA-MB-453, HCC2218 y Hs578t comparada con la línea celular normal MCF10A. Los datos fueron obtenidos de la base de datos pública Oncomine.

15.1 Presencia de CREB1 en muestras de tejido mamario normal y carcinomas

Debido a que CREB5 es miembro de la misma familia que CREB1, se sugiere que CREB5 puede inducir la expresión de genes que son regulados por CREB1. El análisis de la expresión de CREB5 en la base de datos The Human Protein Atlas no arrojó ningún resultado, por lo que se decidió determinar la expresión diferencial del CREB1 en tejido mamario normal y carcinoma mamario. En las imágenes obtenidas se puede observar que CREB1 se localiza en el núcleo y este que se encuentra sobrepresado en carcinomas ductales y lobulares, mientras que en tejido normal hay una expresión muy escasa (Figura 12). La tinción de CREB1 se obtuvo utilizando el anticuerpo anti-CREB1 (HPA019150 Sigma-Aldrich) que se observa como una tinción de color marrón, mientras que la tinción con hematoxilina color azul permitió visualizar las características morfológicas celulares.

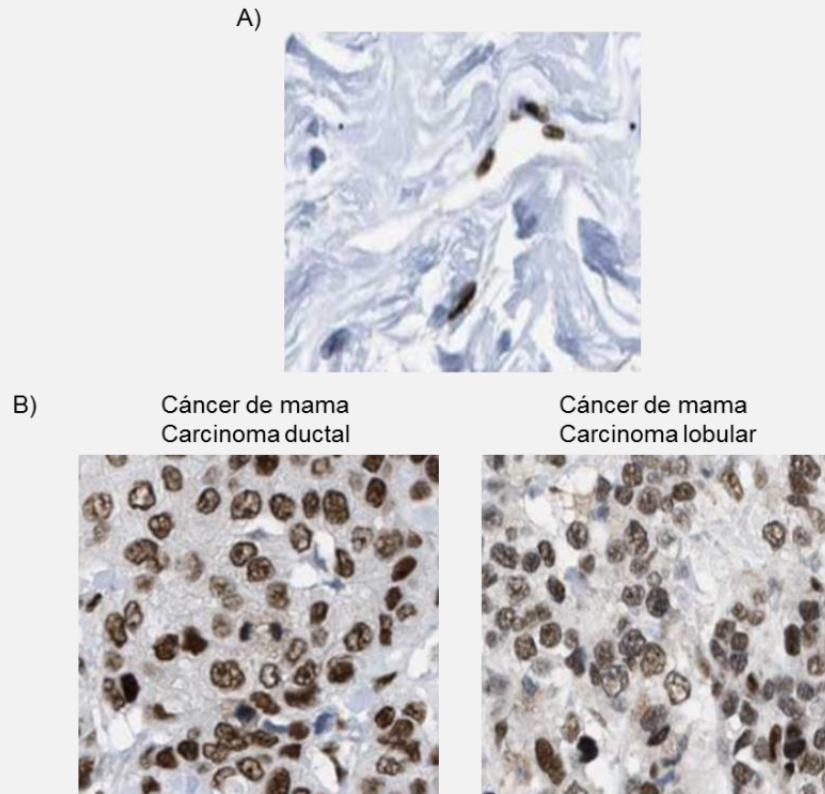


Figura 12. Inmunohistoquímica de tejido mamario normal y cáncer de mama teñidas con el anticuerpo de anti-CREB1. La proteína CREB1 se detectó con el anticuerpo anti-CREB1 (HPA019150 Sigma-Aldrich) marcado de color marrón. A) tejido mamario normal y B) muestras de cáncer de mama, en la izquierda carcinoma ductal y en la derecha carcinoma lobular. Las imágenes se obtuvieron de The Human Protein Atlas.

15.2 Determinación de la expresión de la proteína CREB5 en muestras normales de mama y tumores de mama

Para evaluar la expresión de CREB5 a nivel de proteína en muestras tumorales de pacientes mexicanas se realizaron ensayos de Western Blot a partir de los extractos totales de proteínas utilizando el anticuerpo anti-CREB5 (abcam ab168928). Como se ilustra en la figura 13B, en las muestras de tejido mamario normal el nivel de expresión de la proteína de CREB5 se encuentra disminuido mientras que en las biopsias de tumores de mama la expresión se ve aumentada (Figura 13A). Como control de carga se utilizaron anticuerpos dirigidos contra la proteína GADPH. Las bandas inmunodetectadas se utilizaron para llevar a cabo el análisis densitométrico (Figura 13B). El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas en la expresión de CREB5 en tejidos normales y tumorales ($P < 0.0005$). Estos datos están de acuerdo con los resultados de la expresión de CREB5 a nivel de mRNA en los tejidos tumorales mamaros.

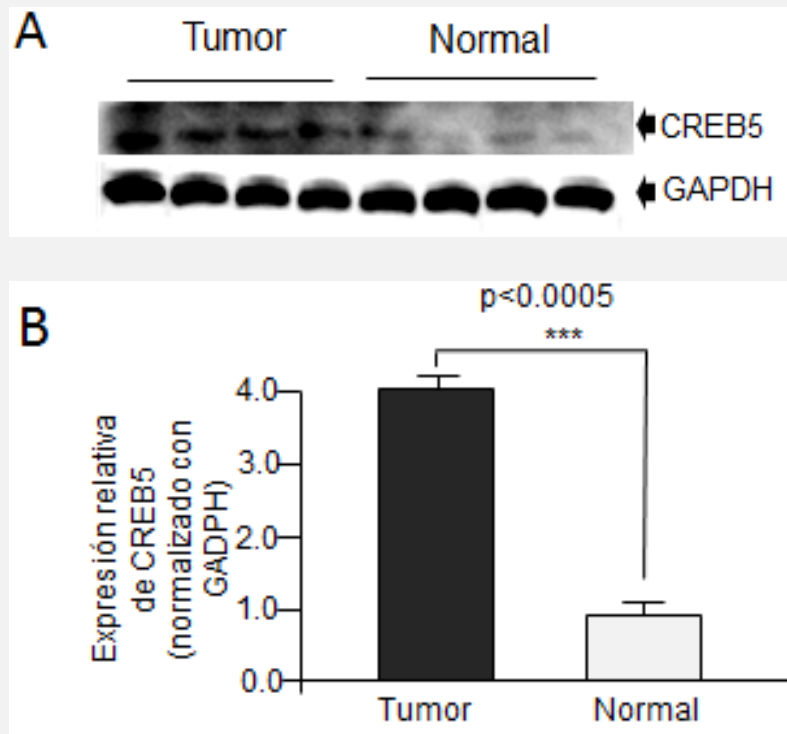


Figura 13. La proteína de CREB5 se sobreexpresa en tumores de cáncer de mama. (A) Análisis de Western Blot para evaluar la expresión diferencial de la proteína CREB5 en tejido tumoral y tejido mamario normal. (B) Análisis densitométrico de las bandas inmunodetectadas en A. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron representados como media \pm S.D. Las diferencias significativas se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

15.3 Efecto del miR-204 sobre la expresión de la proteína CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7

Para evaluar si la restauración del miR-204 era capaz de inhibir la expresión de la proteína CREB5, se transfectó el precursor del miR-204 en las células MDA-MB-231 y MCF7 a una concentración de 30 nM. Posteriormente, se realizó la inmunodetección de la proteína CREB5 utilizando el anticuerpo anti-CREB5 (abcam ab168928) a través de Western Blot.

Los resultados indican que la restauración del miR-204 en estas líneas celulares fue capaz de disminuir significativamente el nivel de expresión de CREB5 con respecto a las células transfectadas con la secuencia scramble utilizada como control negativo (Figura 14A). Las proteínas inmunodetectadas en el panel A se utilizaron para llevar a cabo el análisis densitométrico de las bandas y el análisis estadístico de éstas mostró diferencias significativas (Figura 14B). Lo anterior sugiere que el miR-204 tiene como gen blanco directo a CREB5.

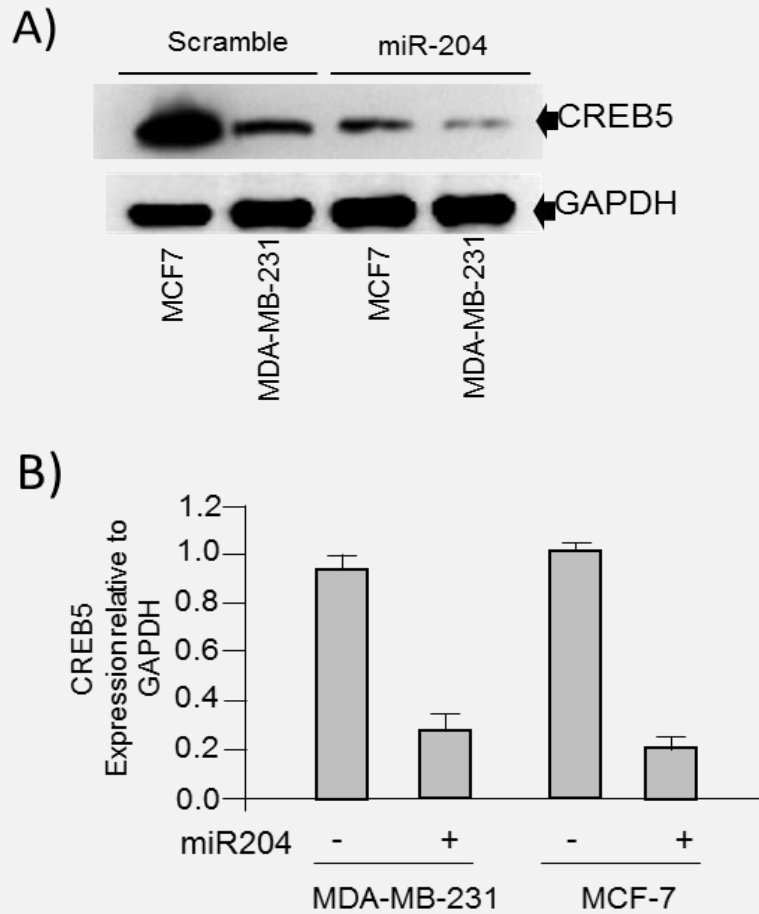


Figura 14. Mir-204 inhibe la expresión de la proteína CREB5. (A) Análisis de Western Blot para determinar la expresión de la proteína CREB5 en líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 transfectadas con el miR-204 (30 nM) y transfectadas con una secuencia scramble como control. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. (B) Cuantificación densitométrica del nivel de expresión de las proteínas inmunodetectadas en el panel A. Las diferencias significativas se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

15.4 Silenciamiento de CREB5 en líneas celulares de cáncer de mama

Para determinar el efecto del silenciamiento de CREB5 en la proliferación celular y el mimetismo vasculogénico primero diseñamos dos shRNAs específicos, los cuales se clonaron en el vector pSilencer RETRO U6 para generar dos construcciones plasmídicas denominadas pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3. Los detalles de la secuencias de los dos shRNAs y la clonación y verificación de las clonas obtenidas se detalla más adelante al final de la sección de resultados (Figura 18-22). Las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 contienen los oligonucleótidos diseñados sh-CREB5.2 y sh-CREB5.3 los cuales están dirigidos para unirse específicamente a dos regiones del gen CREB5. Posteriormente, ambas construcciones fueron transfectadas en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 y se realizaron ensayos de Western Blot a partir de extractos de proteínas totales para determinar la efectividad de los siRNAs en el silenciamiento de CREB5.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la expresión de CREB5 en las células transfectadas con ambas construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3. El silenciamiento de CREB5 mediante la construcción del sh-CREB5.3 es mayor que en la construcción sh-CREB5.2 en ambas líneas celulares. Además el silenciamiento de CREB5 fue considerablemente mayor en la línea celular MDA-MB-231 que en MCF7. El nivel de expresión de GAPDH fue utilizado como control de carga (Figura 15A). Las imágenes de las proteínas inmunodetectadas en el panel A se utilizaron para llevar a cabo el análisis densitométrico de las bandas y el análisis estadístico de éstas mostró diferencias significativas (Figura 15B).

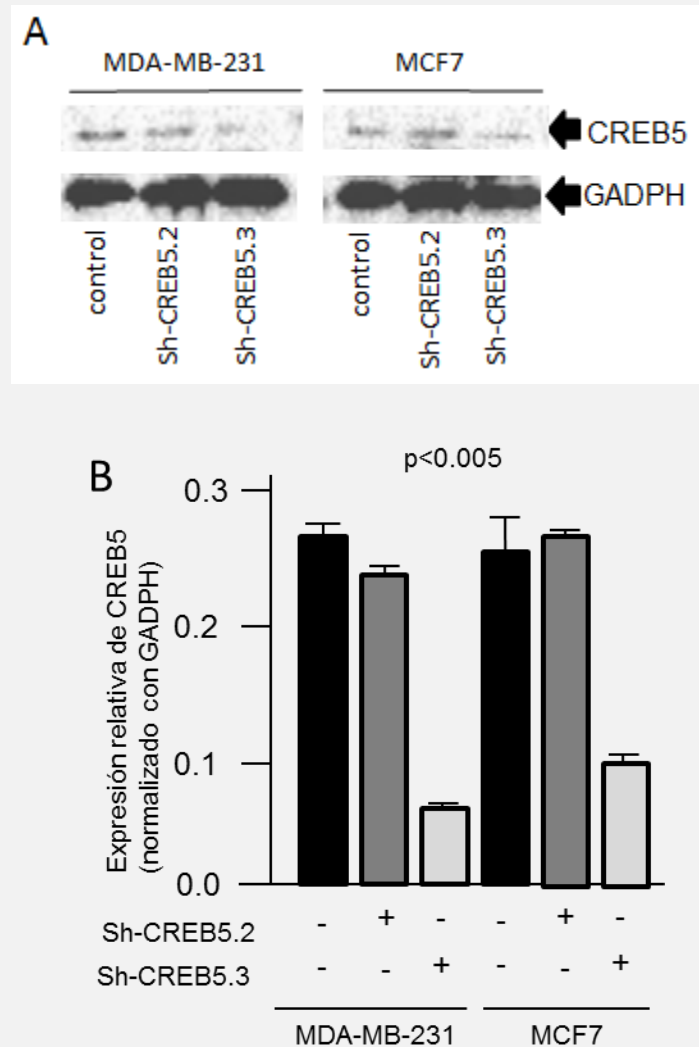


Figura 15. Determinación del efecto del sh-CREB5 en el silenciamiento en la expresión de CREB5. (A) Ensayo de Western Blot para determinar el silenciamiento de la expresión CREB5 posterior a la transfección de las dos construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 en células MDA-MB-231 y MCF7. La proteína de CREB5 fue inmunodetectada con el anticuerpo anti-CREB5 (abcam ab168928). La proteína GADPH se utilizó como control de carga. (B) Cuantificación densitométrica de las bandas inmunodetectadas en el panel A. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t-student, valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

15.5 Efecto del silenciamiento de CREB5 en la proliferación celular en líneas celulares de mama

El impacto del silenciamiento de CREB5 se evaluó también en la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 a las 3, 6, 12 y 24 horas postransfección con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 mediante ensayos de MTT. Para ello se sembraron 10,000 células MDA-MB-231 en placa de 96 pozos bajo las siguientes condiciones: células control, células mock con lipofectamina, células transfectadas con la construcción sh-CREB5.2 y células transfectadas con la construcción sh-CREB5.3.

Los resultados mostraron que la proliferación de las células control y mock incremento con respecto al tiempo. Interesantemente, las células que fueron transfectadas con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 mostraron una disminución significativa en la proliferación celular durante las primeras 3 horas (Figura 16A). La disminución en la proliferación celular se vio mayormente afectada por la construcción pSilencer-CREB5.3. Por otro lado se observó el efecto del silenciamiento de CREB5 en el porcentaje de células viables (Figura 16B). Por otra parte, las células transfectadas con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 mostraron una disminución menor en la viabilidad en comparación con los controles. Estos datos indican que CREB5 podría estar regulando genes implicados con la proliferación y viabilidad celular en cáncer de mama.

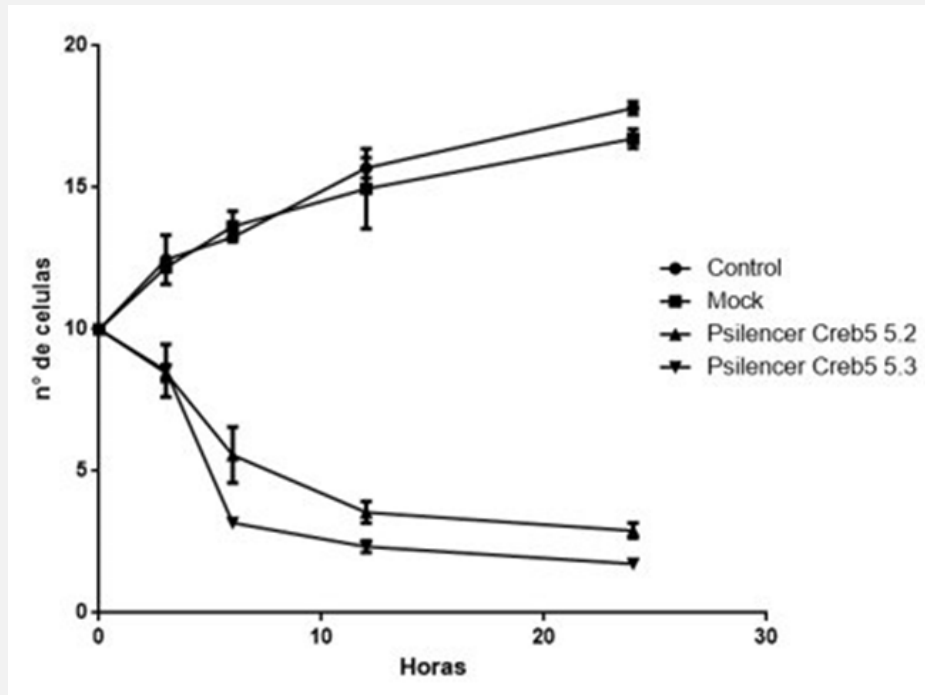


Figura 16A. Efecto del silenciamiento de CREB5 en proliferación celular. Se efectuó el ensayo de proliferación celular en la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con 2 μ g de ambas construcciones pSilencer-sh-CREB5.2 y pSilencer-sh-CREB5.3 a periodos de 0, 6, 12 y 24 horas. Las diferencias de proliferación celular en las condiciones control y mock ($P < 0.002$) fueron estadísticamente significativas, así como las condiciones sh-CREB5.2 y sh-CREB5.3 ($p = 0.00515$). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de student y valores inferiores de $p < 0,005$ se consideraron estadísticamente significativos.

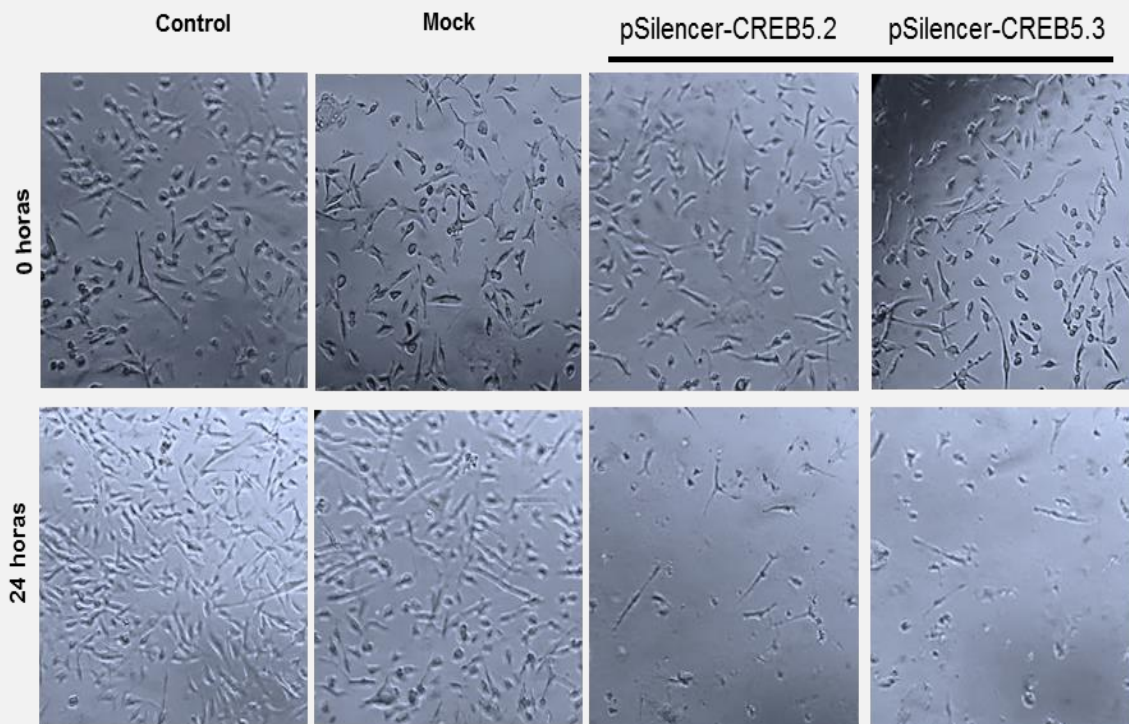


Figura 16B. Efecto del silenciamiento de CREB5 en la viabilidad de las células. Análisis morfológico de la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3. Después de 24 horas se evaluó la morfología celular mediante microscopía óptica.

15.6 Efecto del silenciamiento de CREB5 en la formación del mimetismo vasculogénico.

Previamente hemos reportado que la restauración del miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico en células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 y Hs578t en condiciones de hipoxia [Salinas-Vaera Y, 2019]. Con el objetivo de determinar si el silenciamiento específico de CREB5 inhibe la formación de estructuras tipo capilar en condiciones de hipoxia en las células MDA-MB-231 realizamos ensayos de mimetismo vasculogénico bajo las siguientes condiciones: células control sin transfectar, células mock y células transfectadas con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3. Los resultados muestran la formación de las estructuras tipo capilar en 3D durante 0, 3, 6, 9, y 12 h en las células MDA-MB-231 control bajo condiciones de hipoxia. Las células control y mock después de incubación en un microambiente hipóxico (1% O₂) y baja concentración de nutrientes formaron estructuras en 3D tipo capilar dentro de las primeras 3 horas de incubación en matrigel y estas estructuras fueron progresando conforme transcurrió el tiempo (Figura 17A). Interesantemente, las células transfectadas con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 y silenciadas para CREB5 no formaron las estructuras tipo capilares las cuales fueron crecidas en las mismas condiciones que las células control y mock.

Posteriormente se realizó el conteo de las estructuras tipo capilar (tubos y nodos) formados a partir de las imágenes obtenidas. El número de tubos y nodos (puntos de ramificación) en las células control y mock incrementaron respecto al tiempo; mientras que en las células transfectadas con las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 no se cuantificaron debido a que estas estructuras no se formaron (Figura 17B).

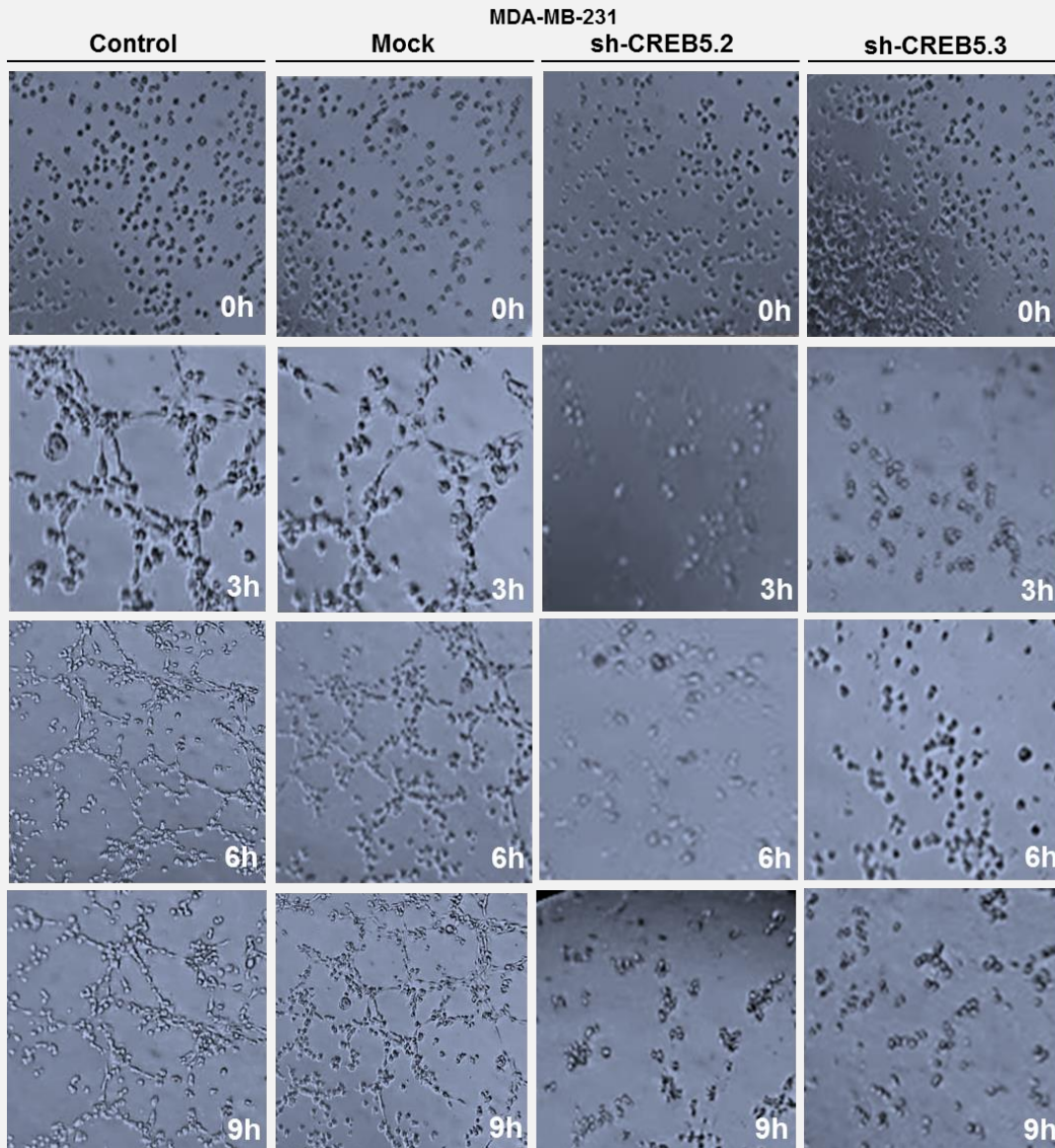


Figura 17A. El silenciamiento de CREB5 inhibe la formación del mimetismo vasculogénico en la línea celular MDA-MB-231. Columna 1, células control. Columna 2, células mock. Columna 3, células transfectadas con la construcción pSilencer-CREB5.2 y columna 4, células transfectadas con el pSilencer-CREB5.3. La formación de estructuras tubulares en 3D fue evaluada a las 0, 3, 6 y 9h de incubación sobre matrigel.

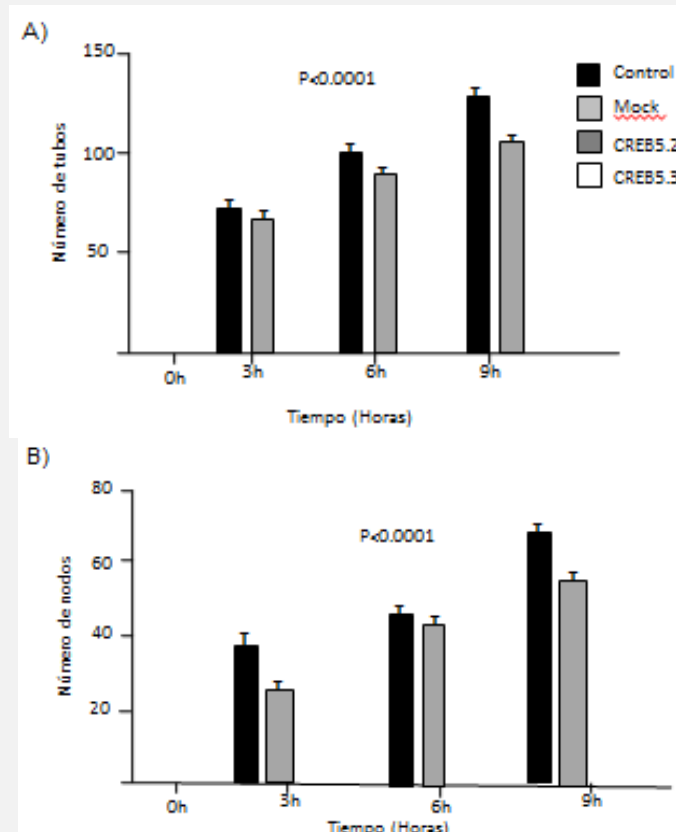
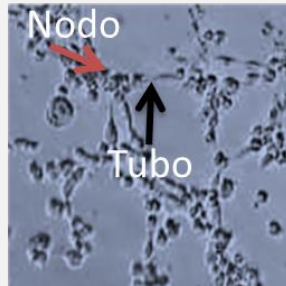


Figura 17B. El silenciamiento de CREB5 inhibe la formación de tubos y nodos. Las gráficas representan la cuantificación de estructuras tipo capilar después de las 0, 3, 6 y 9 h bajo condiciones de hipoxia. (A) Cuantificación de los tubos capilares. (B) Cuantificación de nodos (puntos de ramificación). Las gráficas se realizaron a través de GRAPH PRISM versión 08. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de student y valores inferiores de $p < 0,005$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM (error estándar de la media) $p < 0.001$.

15.7 Clonación de la región 3´UTR del gen CREB5 en el vector pSilencer 5.1 U6 retro.

Para inducir el silenciamiento de CREB5 primero se hibridaron los oligonucleótidos sentido y antisentido dirigidos contra CREB5 (Figura 18). Posteriormente, se realizó una doble digestión del plásmido pSilencer para linealizar el vector (Figura 19). Una vez que el plásmido se linearizó, se clonó en el vector pSilencer 5.1 U6 retro la secuencia de CREB5 correspondiente a los oligonucleótidos hibridados. Finalmente, se evaluó la integridad de las construcciones plasmídicas obtenidas pSilencer-CREB5.2 y pSilencer-CREB5.3 (Figura 20 y 21).

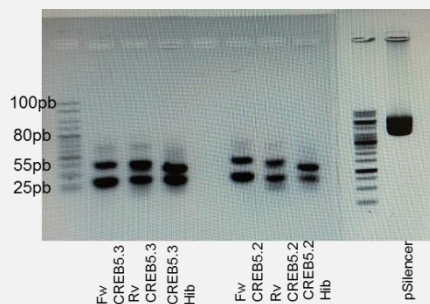


Figura 18. Hibridación de los oligonucleótidos de CREB5 visualizada en una electroforesis analítica en gel de agarosa al 1 %. Carril 1, marcador de 100pb. Carril 2, oligonucleótido sentido de la región 3'UTR del gen CREB5.2. Carril 3, oligonucleótido antisentido de la región 3'UTR del gen CREB5.3. Carril 4, oligonucleótidos hibridados de la construcción CREB5.3. Carril 5, vacío. Carril 6, oligonucleótido sentido de la región 3'UTR del gen CREB5.2. Carril 3, oligonucleótido antisentido de la región 3'UTR del gen CREB5.2. Carril 4, oligonucleótidos hibridados de la construcción CREB5.2.

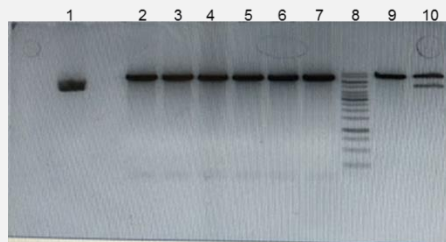


Figura 19. Doble digestión del plásmido pSilencer con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Carril 1, plásmido pSilencer sin digerir. Carril 2-7, doble digestión del plásmido pSilencer 5.1 U6 retro con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. Carril 8, marcador de 1Kb. Carril 9, reacción con *HindIII*. Carril 10, reacción con *BamHI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

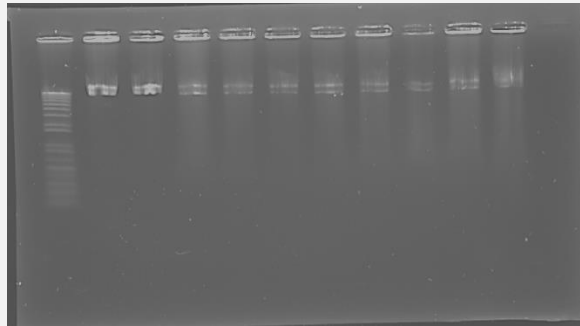


Figura 20. Obtención del plásmido de las colonias obtenidas del proceso de ligación. Carril 1, marcador de tamaño molecular. Carril 2-6, plasmidos con la construcción pSilencer-CREB5.2. Carril 7-11, plasmidos con la construcción pSilencer CREB5.3.

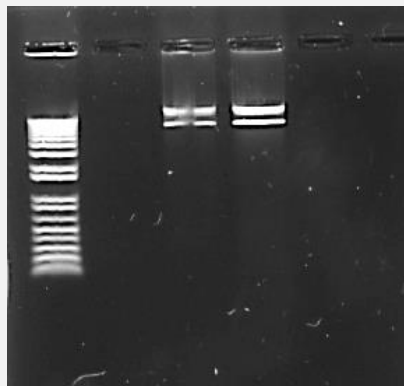


Figura 21. Plásmido pSilencer-CREB5 purificado. La purificación del plásmido se realizó usando el kit QuiAquick Carril 1, marcador. Carril 2, vacío. Carril 3, pSilencer-CREB5.2. Carril 4, pSilencer-CREB5.3.

Para verificar la integridad y veracidad de las secuencias clonadas del sh-CREB5 en el vector pSilencer 5.1 U6 retro se realizó la secuenciación automática de las construcciones pSilencer-CREB5.2 y pSilencer5.3. Los resultados muestran que los plásmidos purificados contienen las secuencias de ADN diseñadas para el silenciamiento de CREB5 (Figura 22) y las secuencias que formaran la burbuja (la hibridación de la secuencia sentido y antisentido formarán la estructura del tallo).

Secuenciación

5.2C3

```
ACCATCGGCCCGTCTCTCCCTTGACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCCTTTATCCAGC
CTTTTACCTTCACTAGGCGCCGGAATTAGATCGATCTCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTCCA
AAAAAGCATTATGCTCTGGCATTCTCTTTGAAAGAAATGCCAGAGCATAAATGCGATCCCGCTCC
TTCCACAAGATATATAAACCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATT
TTAAAACATAATTTTAAACTGCAAACTACCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTGTACTAA
TATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAAATG
AAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTTCTCTGCCGACCTTGGCGCGCTCGGCGCGGGTACAGCTC
CGTCACGTGGTGCCTTTGCCTGCGCTCTTCCACTGGGGAATTCTACCGGTAGGGGAGGCGCTTTT
CCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCT
GGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGGGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTTCGCG
CCACCTTCTACTCTCCCTAGTCAGAAAGTTCCCCCGCCCGCAGCTCGGTTCTGCAGGACGTGA
CAAATGGAAGTAACACGTTCTCACCTAGTCTCGTGCAAATGGGACAGCAACCGCTGAACATTGGGA
GGCGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCATTAGCACTTTTCTTCTCGCTTTTGGGCTCAAAGG
CTGGGAAAGGGTGGGGTCCGGGGGGCGGGGCTCAGGGGCGGGGCTCAGGGGCGGGGGCGGGG
CCCCGAAAGGGTCCCTCGGAGAGGGCCCGGATTTTGGGCCGCTTTCAAAAACCGCAGGTCTGGG
CGGGCGGGTCTTCTCTTCTCTATCGCGGGGCTTTGAACTGGGAGCCAAGCTTGTACATTGTA
CCGGAAGTACAAGCCTCAGGGGGGGGCTTGGCAACGGCGAGAGAACACGACAGTCTCCAAGT
GGCGAGTATGAGAACCCTCT
```

5.3C6

```
CCCTCCGGCCCCGGTCTCTCCCTTGACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCCTTTATCCAGCCC
TTATTCCTTCTAGGCGCCGGAATTAGATCGATCTCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTTCCAAA
AAAGCAGAACCATCCACATCACCATCTCTTGAATGGTGATGTGGATGGTTCTGCGATCCCGCTCC
CGCGTCTTTCCACAAGATATATAAACCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGAT
AGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAACTGCAAACTACCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTT
TGTAATAATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATG
CAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTTCTCTGCCGACCTTGGCGCGCTCGGCGCGGG
TCACGCTCCGTCACGTGGTGCCTTTGCCTGCGCTCTTCCACTGGGGAATTCTACCGGTAGGGGAG
GCGCTTTTCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGT
GGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCC
TTGCGGCCACCTTCTACTCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCGCAGCTCGCGTCTGTCAGGA
CGTGACAAATGGAAGTAGCAGTCTCACTAGTCTCGTGACAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAA
GCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCAATAGCAGCTTTTGTCTTTTCTGCTTTTGGGCTCAAAGGCTG
GGAAGGGTGGGGTCCGGGGGGGGGCTCAAGGGCGGGCTTCAAGGCGGGCGGCGCCGAAGGTCT
CCGAAGCCGGCATTCTGCCACGCTTCAAAGGCGCCACGCTGCGCGCTGTTCTCTCTCTCATCTCG
GCCCTTTCGAACCTGCAGCCAGCTAGCTACATGACCGAGTACAACCCACGGTGGGCTTGCATCGGACG
ACGTCTAAGTGGACGTTATG
```

Figura 22. Validación del inserto de los oligonucleótidos del sh-CREB5 en el plásmido pSilencer 5.1 U6 retro. Secuencia del plásmido pSilencer 5.1 U6 retro con el inserto de sh-CREB5. En morado se muestra la secuencia que formara el loop o burbuja, en verde el sitio de corte de las enzimas de restricción, en amarillo la secuencia del sh-CREB5.2 y en magenta la secuencia del sh-CREB5.3.

VIII. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública con mayor mortalidad en mujeres tanto en México como a nivel mundial. A pesar de los grandes esfuerzos para combatir y erradicar esta enfermedad la incidencia de cáncer de mama va en aumento. Por ello encontrar nuevas herramientas y/o marcadores que ayuden al pronóstico y tratamiento en este tipo de enfermedad es de vital importancia para aumentar la sobrevivencia de los pacientes.

La proteína CREB5 es miembro de una familia de factores transcripcionales que regulan diferentes procesos biológicos como diferenciación y crecimiento celular; aumento en la expresión de CREB está relacionado con aumento en la proliferación y migración celular así como una disminución de la apoptosis [Steven *et al.*, 2016]. Múltiples quinasas pueden mediar la activación de CREB5 a partir de la fosforilación en la serina 133, regulando genes que contengan un sitio CRE en su promotor.

Pocos estudios se han publicado respecto a la expresión de CREB5 en cáncer. Algunos reportes muestran la expresión de CREB5 en diferentes tipos de cáncer como cáncer de ovario [He *et al.*, 2017], cáncer colorectal [Qi *et al.* 2014] y cáncer de pulmón [Seo *et al.*, 2008 y Linnerth *et al.*, 2005], sin embargo hasta el momento no hay reportes que correlacionen la función de este factor transcripcional en cáncer de mama.

El análisis de la base de datos Oncomine demostró que la expresión de CREB5 a nivel de RNA se encuentra aumentada tanto en tumores como en líneas celulares de cáncer de mama sugiriendo que la proteína actúa como un oncogén. Estos datos fueron corroborados experimentalmente mediante la inmunodetección de CREB5 a nivel de proteína en ensayos de western blot con proteínas obtenidas de biopsias tumorales de pacientes Mexicanas. Los resultados demuestran un aumento en la expresión de CREB5 en tumores de mama comparado con la expresión del tejido mamario normal.

Los microRNAs han tomado gran relevancia en cáncer ya que se ha visto que estos regulan la expresión de genes involucrados en diversos procesos biológicos incluidos el desarrollo y progresión del cáncer.

Anteriormente Flores y colaboradores reportaron que el miR-204 se encontraba reprimido en tumores y líneas celulares de cáncer de mama; además se realizó un análisis del transcriptoma de las células transfectadas con el miR-204 donde se encontró la modulación de alrededor de 500 genes entre los se encontró a CREB5 [Flores y col 2016]. Por ello confirmamos si CREB5 era blanco directo de miR-204 mediante un ensayo de inmunodetección y al restaurar la expresión de este miRNA en líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 verificamos que la expresión disminuyó considerablemente comparadas con las líneas celulares sin la restauración del miR-204 donde CREB5 se encontraba aumentado.

La formación del mimetismo vasculogénico es un proceso que se lleva a cabo por células agresivas para generar nuevos canales y permitir la perfusión de sangre a tejidos tumorales, además participa en la diseminación de progresión del cáncer y metástasis [Ge *et al.*, 2018]. Recientemente, hemos reportado que la restauración del miR-204 en línea celular MDA-MB-231 inhibe la formación del mimetismo vasculogénico a través de la inhibición de diversas rutas de señalización [Salinas Vera *et al.*, 2018].

En el presente estudio demostramos por primera vez que el CREB5 podría estar participando en la formación del mimetismo vasculogénico en cáncer de mama ya que el silenciamiento de este factor transcripcional inhibió considerablemente el número de tubos y nodos formados en condiciones de hipoxia. Este es el primer estudio que reporta la asociación de CREB5 con el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.

CREB y CREB5 inducen la transcripción al unirse al elemento CRE (5'TG**ACGT**CA3'); por otro lado HIF1a reconoce la secuencia consenso HRE (5'-**ACGT**G-3') ambas secuencias tienen en común 4 bases (5'-**ACGT**-3'), Mayr B reportó que CREB5 también tiene la capacidad de reconocer una secuencia CRE

incompleta (Mayr *et al.*, 2001). Por lo tanto, CREB5 se une no solo al promotor de CREB1 si no también en regiones promotoras de HIF1A. Esto indicaría que CREB5 tenía la capacidad de regular genes que tienen la secuencia HRE en su promotor. Con base en estas observaciones suponemos que CREB5 podría competir con otros factores por la unión al sitio HRE y modular genes asociados a la respuesta a hipoxia que ocurre durante las etapas tempranas del mimetismo vasculogénico.

Por otra parte demostramos que CREB5 también participa en proliferación celular en cáncer de mama. El efecto del silenciamiento de CREB5 mediante sh-RNAs mostró una disminución considerable en la proliferación en las líneas tumoral MDA-MB-231 a partir de las primeras 3 horas de haber inducido el silenciamiento, mientras que aquellas células que no fueron tratadas la proliferación iba aumentando conforme al tiempo.

Otro mecanismo afectado por el silenciamiento de CREB5 fue la viabilidad de las células de cáncer de mama, como se pudo observar a través del microscopio la proporción de células vivas que expresaban sh-CREB5 era significativamente menor que las células control y mock que no fueron transfectadas con el siRNA. El porcentaje de la viabilidad celular se determinó con azul de tripano a las 24h; las células control y mock no transfectadas con el siRNA mostraban un 90% de células vivas, mientras que las células que expresaban el sh-CREB5 mostraron un 50% de células viables.

En conjunto, nuestros datos experimentales demuestran que el factor de transcripción CREB5 se sobreexpresa en los tejidos tumorales y líneas celulares de cáncer de mama. Funcionalmente, el silenciamiento *in vitro* de CREB5 produjo una disminución en la proliferación celular y la viabilidad; así como una inhibición del mimetismo vasculogénico. Esos datos sugieren que CREB5 pudiera representar un nuevo blanco terapéutico en cáncer de mama.

VIII. CONCLUSIONES

1. La expresión de CREB5 a nivel de RNAm y proteína se encuentra aumentada en los tumores de mama y en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7; mientras que en tejido normal de mama y la líneas celular MCF10A su expresión se encuentra inhibida.
2. La restauración del miR-204 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 inhibe significativamente la expresión de la proteína CREB5
3. El silenciamiento de CREB5 mediante el uso de dos shRNAs resulto en la disminución de la proliferación y la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231
4. El silenciamiento de CREB5 mediante el uso de dos shRNAs inhibió la formación del mimetismo vasculogénico en la línea celular MDA-MB-231.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, Rechavi G, Galun E, Honigman A. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1338-46. PubMed PMID: 14973073.

Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Mar;12(3):141-51. doi: 10.1038/nrm3072. Review. PubMed PMID: 21346730; PubMed Central PMCID: PMC4324555.

American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018.* Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.

Barresi V, Branca G, Caffo M, Tuccari G. p-CREB expression in human meningiomas: correlation with angiogenesis and recurrence risk. *J Neurooncol.* 2015 Mar;122(1):87-95. doi: 10.1007/s11060-014-1706-9. Epub 2015 Jan 7. PubMed PMID: 25563814.

breastcancer.org, (2018-2019) Types of breast cancer. Ardmore, P.A.: breastcancer.org. Recuperado de <http://breastcancer.org>

Cho EC, Mitton B, Sakamoto KM. CREB and leukemogenesis. *Crit Rev Oncog.* 2011;16 (1-2):37-46. Review. PubMed PMID: 22150306; PubMed Central PMCID: PMC3243968.

Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer.* 2017 Sep 12;8 (16):3131-3141. doi: 10.7150/jca.18457. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 29158785; PubMed Central PMCID: PMC5665029

Flores Ali Pérez. (2016). Análisis funcional del microRNA-204 en cáncer de mama. (Tesis de pregrado doctoral). Universidad Autónoma de la Ciudad de México. CDMX.

Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, Bautista-Piña V, Hidalgo-Miranda A, Ocampo EA, Martínez MS, Palma-Flores C, Fonseca-Sánchez MA, Astudillo-de la Vega H, Ruíz-García E, González-Barrios JA, Pérez-Plasencia C, Streber ML, López-Camarillo C. Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep*. 2016 Oct 5;6:34504. doi: 10.1038/srep34504. PubMed PMID: 27703260; PubMed Central PMCID: PMC5050489.

García García Frederick (2018). Análisis de la expresión y función del miR-145-5p en la respuesta patológica completa al tratamiento neoyuvante en cáncer de mama triple negativo. (Tesis de pregrado de maestría). Universidad Autónoma de la Ciudad de México. CDMX.

Ge, H., & Luo, H. (2018). Overview of advances in vasculogenic mimicry - a potential target for tumor therapy. *Cancer management and research*, 10, 2429–2437. doi:10.2147/CMAR.S164675.

Genecards, (2018-2019) CREB5 gene (Protein coding) cAMP Responsive Element Binding Protein 5.: GeneCards Human Gene Database. Recuperado de: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CREB5>.

Ghosh R, Garcia GE, Crosby K, Inoue H, Thompson IM, Troyer DA, Kumar AP. Regulation of Cox-2 by cyclic AMP response element binding protein in prostate cancer: potential role for nexrutine. *Neoplasia*. 2007 Nov;9(11):893-9. PubMed PMID: 18030357; PubMed Central PMCID: PMC2077880.

GLOBOCAN (2018-2019). Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages. Sitio web mundial. WHO.

Recuperado de:

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multibars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review. PubMed PMID: 21376230.

He, S., Deng, Y., Liao, Y., Li, X., Liu, J., & Yao, S. (2017). CREB5 promotes tumor cell invasion and correlates with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Oncology letters*, 14(6), 8156–8161. doi:10.3892/ol.2017.7234.

Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3070-5. Review. PubMed PMID: 12789282.

Hong BS, Ryu HS, Kim N, Kim J, Lee E, Moon H, Kim KH, Jin MS, Kwon NH, Kim S, Kim D, Chung DH, Jeong K, Kim K, Kim KY, Lee HB, Han W, Yun J, Kim JI, Noh DY, Moon HG. Tumor Suppressor miRNA-204-5p Regulates Growth, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2019 Apr 1;79(7):1520-1534. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0891. Epub 2019 Feb 8. PubMed PMID: 30737233

Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, Yie SW, Eom SH, Kim PH. The PKA/CREB pathway is closely involved in VEGF expression in mouse macrophages. *Mol Cells*. 2007 Feb 28;23(1):23-9. PubMed PMID: 17464208.

Kinjo K, Sandoval S, Sakamoto KM, Shankar DB. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2005 Sep;4(9):1134-5. Epub 2005 Sep 6. Review. PubMed PMID: 16096372.

Kovach SJ, Price JA, Shaw CM, Theodorakis NG, McKillop IH. Role of cyclic-AMP responsive element binding (CREB) proteins in cell proliferation in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Cell Physiol*. 2006 Feb;206(2):411-9. PubMed PMID: 16110470.

Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M. The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res*. 1995 Nov 25;23(22):4542-50. PubMed PMID: 8524640; PubMed Central PMCID: PMC307423.

Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 15;4:e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23. Review. PubMed PMID: 26372022; PubMed Central PMCID: PMC4877448.

Lee H, Lee S, Bae H, Kang HS, Kim SJ. Genome-wide identification of target genes for miR-204 and miR-211 identifies their proliferation stimulatory role in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2016 Apr 28;6:25287. doi: 10.1038/srep25287. PubMed PMID: 27121770; PubMed Central PMCID: PMC4848534.

Li T, Pan H, Li R. The dual regulatory role of miR-204 in cancer. *Tumour Biol*. 2016 Sep;37(9):11667-11677. Epub 2016 Jul 20. Review. PubMed PMID: 27438705; PubMed Central PMCID: PMC5080331.

Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):605-23. Review. PubMed PMID: 12194863.

López Camarillo C, Fonseca Sánchez M, Astudillo de la Vega H, Ruiz García E, Guadarrama Orozco J. Los microRNA: nuevos biomarcadores en cáncer de mama. *Revista mexicana de mastología* 2014; 4 (3).

Lu F, Zheng Y, Donkor PO, Zou P, Mu P. Downregulation of CREB Promotes Cell Proliferation by Mediating G1/S Phase Transition in Hodgkin Lymphoma. *Oncol Res.* 2016;24(3):171-9. doi: 10.3727/096504016X14634208142987. PubMed PMID: 27458098.

Mansoori B, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. RNA interference and its role in cancer therapy. *Adv Pharm Bull.* 2014 Dec;4(4):313-21. doi: 10.5681/apb.2014.046. Epub 2014 Aug 10. Review. PubMed PMID: 25436185; PubMed Central PMCID: PMC4137419.

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):599-609. Review. PubMed PMID: 11483993.

Mohar-Betancourt A, Reynoso-Noverón N, Armas-Texta D, Gutiérrez-Delgado C, Torres-Domínguez JA. Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *J Glob Oncol.* 2017 Dec;3(6):740-748. doi: 10.1200/JGO.2016.007476. Epub 2017 Mar 15. PubMed PMID: 29244991; PubMed Central PMCID: PMC5735971.

Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol.* 2010;629:141-58. doi: 10.1007/978-1-60761-657-3_10. PubMed PMID: 20387148; PubMed Central PMCID: PMC3679364.

Nyormoi O, Bar-Eli M. Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(3):251-63. Review. PubMed

PMID: 12741683.

OMS, (2014-2019) Perfiles oncológicos de los países, 2014, sitio web mundial.: Organización mundial de la salud. Recuperado de <https://www.who.int/cancer/country-profiles/es/>

Peñalver-González B, Vallejo-Rodríguez J, Mentxaka G, Fullaondo A, Iglesias-Ara A, Field SJ, Zubiaga AM. Golgi Oncoprotein GOLPH3 Gene Expression Is Regulated by Functional E2F and CREB/ATF Promoter Elements. *Genes (Basel)*. 2019 Mar 25;10(3). pii: E247. doi: 10.3390/genes10030247. PubMed PMID: 30934642; PubMed Central PMCID: PMC6471639.

Qi L, Ding Y. Involvement of the CREB5 regulatory network in colorectal cancer metastasis. *Yi Chuan*. 2014 Jul;36(7):679-84. doi: 10.3724/SP.J.1005.2014.0679. PubMed PMID: 25076032.

Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med*. 2015 Feb;19(2):315-26. doi: 10.1111/jcmm.12496. Epub 2015 Jan 19. Review. PubMed PMID: 25598425; PubMed Central PMCID: PMC4407602.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Jul 25;61(9):746-59. doi: 10.1016/j.addr.2009.04.004. Epub 2009 Apr 20. Review. PubMed PMID: 19389436.

Salinas Vera Yarely (2017). Análisis de las rutas de señalización VEGF/PI3K/AKT en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204 en cáncer de mama. (Tesis de pregrado de maestría). Universidad Autónoma de la Ciudad de México.CDMX.

Salinas-Vera YM, Marchat LA, García-Vázquez R, González de la Rosa CH, Castañeda-Saucedo E, Tito NN, Flores CP, Pérez-Plasencia C, Cruz-Colin JL, Carlos-Reyes Á, López-González JS, Álvarez-Sánchez ME, López-Camarillo C. Cooperative multi-targeting of signaling networks by angiomiR-204 inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2018 Sep 28;432:17-27. doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.003. Epub 2018 Jun 6. PubMed PMID: 29885516.

Scoditti E, Massaro M, Carluccio MA, Distante A, Storelli C, De Caterina R. PPARgamma agonists inhibit angiogenesis by suppressing PKCalpha- and CREB-mediated COX-2 expression in the human endothelium. *Cardiovasc Res.* 2010 May 1;86(2):302-10. doi: 10.1093/cvr/cvp400. Epub 2009 Dec 23. PubMed PMID: 20032081.

Seftor RE, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan NV, Hendrix MJ. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol.* 2012 Oct;181(4):1115-25. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.013. Epub 2012 Aug 31. Review. PubMed PMID: 22944600; PubMed Central PMCID: PMC4851740.

Seo HS, Liu DD, Bekele BN, Kim MK, Pisters K, Lippman SM, Wistuba II, Koo JS. Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6065-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5376. PubMed PMID: 18676828; PubMed Central PMCID: PMC3058903.

Seo HS, Liu DD, Bekele BN, Kim MK, Pisters K, Lippman SM, Wistuba II, Koo JS. Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6065-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5376. PubMed PMID: 18676828; PubMed Central PMCID: PMC3058903.

Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61. Review. Erratum in: *Annu Rev Biochem.* 2003;72:vii. PubMed PMID:10872467.

Shneor D, Folberg R, Pe'er J, Honigman A, Frenkel S. Stable knockdown of CREB, HIF-1 and HIF-2 by replication-competent retroviruses abrogates the responses to hypoxia in hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2017 Feb;24(2):64-74. doi: 10.1038/cgt.2016.68. Epub 2016 Dec 9. PubMed PMID: 27934882; PubMed Central PMCID: PMC5339434.

Sliva K, Schnierle BS. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology.* 2010 Sep 21;7:248. doi: 10.1186/1743-422X-7-248. Review. PubMed PMID: 20858246; PubMed Central PMCID: PMC2949849.

Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget.* 2016 Jun 7;7(23):35454-65. doi: 10.18632/oncotarget.7721. Review. PubMed PMID: 26934558; PubMed Central PMCID: PMC5085243.

Stuart J. Schnitt, MD, Sandra J. Shin, MD. (2012). *Breast Pathology: Diagnosis and Insights, An Issue of Surgical Pathology Clinics*. Philadelphia, Pennsylvania: guest editors.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017 Nov 1;13(11):1387-1397. doi: 10.7150/ijbs.21635. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 29209143; PubMed Central PMCID: PMC5715522.

Wang H, Lin H, Pan J, Mo C, Zhang F, Huang B, Wang Z, Chen X, Zhuang J, Wang D, Qiu S. Vasculogenic Mimicry in Prostate Cancer: The Roles of EphA2

and PI3K. *J Cancer*. 2016 Jun 5;7(9):1114-24. doi: 10.7150/jca.14120. eCollection 2016. PubMed PMID: 27326255; PubMed Central PMCID: PMC4911879.

Wang YW, Chen X, Gao JW, Zhang H, Ma RR, Gao ZH, Gao P. High expression of cAMP-responsive element-binding protein 1 (CREB1) is associated with metastasis, tumor stage and poor outcome in gastric cancer. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):10646-57. PubMed PMID: 25825983; PubMed Central PMCID: PMC4496382.

Wu D, Zhou HE, Huang WC, Iqbal S, Habib FK, Sartor O, Cvitanovic L, Marshall FF, Xu Z, Chung LW. cAMP-responsive element-binding protein regulates vascular endothelial growth factor expression: implication in human prostate cancer bone metastasis. *Oncogene*. 2007 Aug 2;26(35):5070-7. Epub 2007 Feb 19. PubMed PMID: 17310988.

Zhang M, Li Y, Wang H, Yu W, Lin S, Guo J. LncRNA SNHG5 affects cell proliferation, metastasis and migration of colorectal cancer through regulating miR-132-3p/CREB5. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(4):524-536. doi: 10.1080/15384047.2018.1537579. Epub 2018 Nov 5. PubMed PMID: 30395767; PubMed Central PMCID: PMC6422517.

Zhang Y, Zheng D, Zhou T, Song H, Hulsurkar M, Su N, Liu Y, Wang Z, Shao L, Ittmann M, Gleave M, Han H, Xu F, Liao W, Wang H, Li W. Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. *Nat Commun*. 2018 Oct 4;9(1):4080. doi: 10.1038/s41467-018-06177-2. PubMed PMID: 30287808; PubMed Central PMCID: PMC6172226.

Zhuang H, Meng X, Li Y, Wang X, Huang S, Liu K, Hehir M, Fang R, Jiang L, Zhou JX, Wang P, Ren Y. Cyclic AMP responsive element-binding protein promotes renal cell carcinoma proliferation probably via the expression of spindle

and kinetochore-associated protein 2. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):16325-37.
doi: 10.18632/oncotarget.7017. PubMed PMID: 26824422; PubMed Central
PMCID: PMC4941317.

Linnerth NM, Baldwin M, Campbell C, Brown M, McGowan H, Moorehead RA.
IGF-II induces CREB phosphorylation and cell survival in human lung cancer
cells. *Oncogene*. 2005 Nov 10;24(49):7310-9. PubMed PMID: 16158061.

XI. ANEXOS

Durante el desarrollo de la presente Tesis de licenciatura participe en la publicación de un estudio relacionado al mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.



[Front Oncol.](#) 2019; 9: 381.

PMCID: PMC6528691

Published online 2019 May 14. doi: [10.3389/fonc.2019.00381](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00381)

PMID: [31157166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31157166/)

HypoxamiRs Profiling Identify miR-745 as a Regulator of the Early Stages of Vasculogenic Mimicry in SKOV3 Ovarian Cancer Cells

[Yarely M. Salinas-Vera](#),¹ [Dolores Gallardo-Rincón](#),² [Raúl García-Vázquez](#),³
[Olga N. Hernández-de la Cruz](#),¹ [Laurence A. Marchat](#),³ [Juan Antonio González-Barrios](#),⁴
[Erika Ruíz-García](#),² [Carlos Vázquez-Calzada](#),⁵ [Estefanía Contreras-Sanzón](#),¹
[Martha Resendiz-Hernández](#),¹ [Horacio Astudillo-de la Vega](#),⁶ [José L. Cruz-Colin](#),⁷
[Alma D. Campos-Parra](#),⁸ and [César López-Camarillo](#)^{1,*}