

**UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

**COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**ESTUDIO DEL MIR-342-3P EN LA REGULACIÓN  
DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE EPC1 EN  
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A:

**YECENIA MARTÍNEZ NÁJERA**

DIRECTOR

**Dr. Mario César López Camarillo**

CODIRECTOR

**Dra. Alma Delia Campos Parra**

**POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS**

Ciudad de México, julio, 2020

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

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. Elizabeth Álvarez Sánchez  
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.
- Secretario: Dr. Mario César López Camarillo  
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.
- Vocal: Dra. Alma Delia Campos Parra  
Instituto Nacional de Cancerología.
- 1<sup>er</sup> Suplente: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy  
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.
- 2<sup>do</sup> Suplente: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga  
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.
- Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

### **DIRECTOR**

---

Dr. Mario César López Camarillo  
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

### **CODIRECTORA:**

---

Dra. Alma Delia Campos Parra  
Instituto Nacional de Cancerología

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM bajo la tutoría del Dr. Mario César López Camarillo, a quien agradezco permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), por el apoyo académico.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (893478) y de igual manera quiero agradecer al Colegio de Ciencia y Tecnología de la UACM (CCyT) por el apoyo económico brindado para el financiamiento de reactivos usados en la realización de este proyecto (Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología Convocatoria CCyT-2019, proyecto PI-CCyT-2019-04).

Agradezco a la Dra. Alma por ser mi codirectora, a la Dra. Olga Hernández por ser mi asesora, a la Dra. Martha Yocupicio por ser mi asesora y formar parte de los lectores de tesis, a la Dra. María Elizabeth por ser mi lectora y apoyarme en cuestiones experimentales, a la Dra. Elisa Azuara por ser mi lectora de mi tesis.

Agradezco al técnico Carlos Vázquez de la unidad de microscopía del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV por el apoyo en la toma de imágenes por microscopía confocal que se realizaron para esta tesis.

A la maestra en ciencias Laura Vázquez por ayudarme en la secuenciación de las muestras que se realizaron para esta tesis.

## **Dedicatoria**

A mi padre Román Saúl Martínez a quien agradezco infinitamente su apoyo, su ejemplo, sus consejos, su comprensión, su sabiduría; tú me enseñaste que en esta vida hay que esforzarse por lo que uno quiere y hacer las cosas correctas, que la humildad, honestidad y el trabajo duro es el mayor tesoro que uno tiene; agradezco cada uno de tus esfuerzos por apoyarme en este camino y por darme el mejor regalo que pude pedir, gracias papá por cada día, por cada sonrisa, por cada gesto de nobleza y por tanto amor, en especial a ti y a mi mamá les dedico mi esfuerzo y te agradezco por todo lo que me diste y lo que logramos, sabes que no olvidare todo lo que hiciste por mí y siempre estaré agradecida por ser el mejor padre, te amo papá. A mi madre Magabeli Nájera agradezco todo el apoyo brindado para poder terminar este ciclo y que juntas seguiremos adelante, gracias por también enseñarme que el esfuerzo es lo que hace que uno obtenga lo que quiere, gracias por tus consejos, por escucharme, por todo tu apoyo, por tu sacrificio y por ser la mejor mamá, te amo. Sin duda sin ustedes no sería quien soy, gracias por todo.

A mis hermanos: Verónica, Saúl, Miguel, José y Laura por estar siempre motivándome a salir adelante, por apoyarme y escucharme; gracias por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por darme cada uno consejos y por simplemente estar conmigo. A mi sobrino Gael por ser mi alegría y motivación, por enseñarme que si se puede y que siempre a pesar de lo mal que era un día con su alegría lo mejoraba todo, te amo.

A Víctor Hugo Morales, a quien agradezco de todo corazón todo el apoyo para terminar este ciclo, sin dudas ambos sabemos lo complicado que fue y que en las buenas y en las malas siempre me apoyaste; gracias mi amor por escucharme, por aconsejarme, por ayudarme, por ser la persona con la que más podía confiar, no solo eres mi amigo sino el mejor compañero que tuve durante este recorrido, sin tus consejos ni tu conocimiento no habría terminado, sin tu motivación y sin esa larga espera, gracias por cuidarme y por toda tu paciencia en todos los sentidos. Muchas gracias, te amo.

A mi tía Gloria por apoyarme, a mi amiga Kika por estar conmigo en los momentos más complicados y echarme porras para terminar esto, a mi amigo Ángel le agradezco el apoyarme en este proyecto, aunque sin entenderme siempre estuviste escuchándome y por ser el gran amigo cuando más lo necesite. A la Dra. Miriam, Cris y Liz por apoyarme incondicionalmente.

A todos los que me apoyaron muchas gracias.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	1
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	4
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	5
<b>ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1. ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	9
<b>1.1 Cáncer</b> .....	9
<b>1.2 Carcinogénesis</b> .....	9
<b>1.3 Epidemiología del cáncer</b> .....	12
<b>1.4 Cáncer de mama</b> .....	12
<b>1.5 Rasgos distintivos del cáncer</b> .....	13
Mantenimiento de la señal proliferativa .....	13
Resistencia a la muerte celular .....	13
Capacidad replicativa ilimitada.....	15
Evasión de los supresores del crecimiento.....	16
Angiogénesis.....	16
Invasión y metástasis.....	17
Evasión de la respuesta inmune .....	17
Reprogramación del metabolismo energético .....	18
Inestabilidad genómica.....	18
Inflamación tumoral.....	18
<b>1.6 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria normal</b> .....	20
<b>1.7 Clasificación del cáncer de mama</b> .....	22
<b>1.8 Factores de riesgo en cáncer de mama</b> .....	25
<b>1.9 Diagnóstico de cáncer de mama</b> .....	26
<b>1.10 Tratamiento del cáncer de mama</b> .....	26
<b>II. ANTECEDENTES PARTICULARES</b> .....	27
<b>2.1 Mecanismos de metástasis en cáncer</b> .....	27
<b>2.2 microRNAs</b> .....	29
<b>2.3 Papel de los miRNAs en la metástasis tumoral</b> .....	33
<b>2.4 miR-342-3p en cáncer</b> .....	35
<b>2.5 Predicción de genes blanco del miR-342-3p</b> .....	37

2.6 Regulación epigenética del cáncer.....	40
2.7 Proteína potenciadora homóloga del complejo de polycomb 1 (EPC1).....	43
2.8 Regulación de la maquinaria epigenética mediante miRNAs.....	45
<b>III. MODELO DE TRABAJO .....</b>	<b>46</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>47</b>
<b>V. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
Objetivo general .....	48
Objetivos particulares.....	48
<b>VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>49</b>
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
<b>1. Líneas celulares derivadas de tejido mamario y de cáncer de mama.....</b>	<b>50</b>
1.1 Mantenimiento de las células.....	51
1.2 Tripsinización de las células .....	51
1.3 Congelamiento de las células.....	52
1.4 Descongelamiento de células.....	52
<b>2. Extracción de RNA total a partir de cultivos celulares.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Análisis de la expresión del hsa-miRNA-342-3p empleando sondas Taqman... 54</b>	<b>54</b>
<b>4. Transfección del precursor del hsa-miRNA-342-3p en células MDA-MB-231 y Hs 578T. ....</b>	<b>55</b>
<b>5. Ensayo de cicatrización <i>in vitro</i> (Wound-healing assay).....</b>	<b>55</b>
<b>6. Ensayo de invasión celular <i>in vitro</i>. ....</b>	<b>56</b>
<b>7. Obtención de extractos de proteínas totales. ....</b>	<b>57</b>
<b>8. Obtención de extractos de proteínas nucleares. ....</b>	<b>58</b>
<b>9. Determinación de la concentración de proteínas de los extractos nucleares y totales.....</b>	<b>58</b>
<b>10. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....</b>	<b>59</b>
<b>11. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa. ....</b>	<b>59</b>
<b>12. Ensayos para identificar la expresión de la proteína EPC1 mediante Western blot .....</b>	<b>59</b>
<b>13. Análisis de la expresión del gen <i>EPC1</i> mediante RT-PCR.....</b>	<b>60</b>
<b>14. Análisis de la expresión y localización celular de la proteína EPC1 mediante inmunofluorescencia. ....</b>	<b>61</b>
<b>15. Análisis bioinformáticos.....</b>	<b>62</b>
<b>16. Construcciones de los plásmidos pmiR-3'UTR-EPC1. ....</b>	<b>62</b>
16.1 Hibridación de las secuencias <i>wild type</i> y mutada de la región 3'UTR del gen <i>EPC1</i> . ....	62

16.2 Restricción del plásmido pMIR-REPORT-Luciferasa .....	63
16.3 Ligación de los insertos 3'UTR del gen <i>EPC1</i> dentro del plásmido pmiR-REPORT Luciferasa.....	64
16.4 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -competentes .....	65
16.5 Extracción de plásmido por lisis alcalina (Miniprep para construcciones pMIR-EPC1 y pmiR-REPORT Luciferasa).....	65
16.6 Identificación de las clonas con el inserto pMIR-3'UTR-EPC1 <i>wild type</i> y pMIR-3'UTR-EPC1 mutada.....	66
<b>17. Validación del blanco EPC1 mediante las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1 <i>wild type</i> y pMIR-3'UTR-EPC1 mutada.</b> .....	<b>67</b>
17.1 Transfección de las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1 mutada y pMIR-3'UTR-EPC1 <i>wild type</i> en células MDA-MB-231 y Hs 578T.....	67
17.2 Co-transfección del pre-miR-342-3p y pre-miR-Ctrl-Neg en células transfectadas con las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1.....	68
17.3 Detección de la actividad de luciferasa.....	68
<b>18. Análisis bioestadístico</b> .....	<b>69</b>
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
<b>1. Análisis de la expresión del miR-342-3p y EPC1 en líneas celulares de cáncer de mama.</b> .....	<b>70</b>
1.1 Análisis de la expresión de EPC1 en líneas celulares de cáncer de mama.	73
<b>2. Evaluar el efecto de la restauración miR-342-3p en la migración e invasión en dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y Hs 578T).</b> .....	<b>78</b>
<b>3. Validación de <i>EPC1</i> como un transcrito blanco del miR-342-3p.</b> .....	<b>83</b>
<b>X. DISCUSIÓN</b> .....	<b>87</b>
<b>XI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>94</b>
<b>XII. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>95</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>96</b>
<b>XII. APÉNDICE</b> .....	<b>102</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Clasificación molecular del cáncer de mama (Holliday D. y Speirs V. 2011). .....	<b>24</b>
<b>Tabla II.</b> Factores de riesgo en cáncer de mama (Ceballos y Hernández, 2008; INEGI, 2016).....	<b>25</b>
<b>Tabla III.</b> Blancos del miR-342-3p involucrados en la regulación de los sellos distintivos del cáncer. ....	<b>36</b>
<b>Tabla IV.</b> Genes blanco del miR-342-3p asociados con los sellos del cáncer obtenidos de la base de datos TargetScan. ....	<b>37</b>
<b>Tabla V.</b> Curva para cuantificar proteínas. ....	<b>58</b>
<b>Tabla VI.</b> Primers específicos para clonar la región 3'UTR del gen <i>EPC1</i> . ....	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de carcinogénesis.....	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b> Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial y en México .....	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b> Rasgos distintivos del cáncer .....	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Anatomía de la glándula mamaria normal.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Sitios en donde se origina el cáncer en la glándula mamaria.....	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Proceso metastásico en cáncer de mama .....	<b>30</b>
<b>Figura 7.</b> Biogénesis de los miRNAs.....	<b>32</b>
<b>Figura 8.</b> miRNAs que modulan la metástasis.. .....	<b>34</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema de la organización de la cromatina y su regulación mediante modificaciones epigenéticas.....	<b>42</b>
<b>Figura 10.</b> Proteína potenciadora 1 del complejo de polycomb (EPC1) .....	<b>44</b>
<b>Figura 11.</b> Líneas celulares utilizadas en este trabajo .....	<b>51</b>
<b>Figura 12.</b> Mapa del plásmido pMIR-REPORT Luciferasa .....	<b>64</b>
<b>Figura 13.</b> Primer utilizado para la secuenciación del plásmido pMIR-REPORT Luciferasa .....	<b>67</b>
<b>Figura 14.</b> Integridad del RNA total de líneas celulares de cáncer de mama y línea no tumoral.....	<b>71</b>
<b>Figura 15.</b> Expresión inhibida del miR-342-3p en líneas celulares triples negativas de cáncer de mama .....	<b>71</b>
<b>Figura 16.</b> Expresión del miR-342-3p obtenidos de tumores de pacientes con diferente subtipo tumoral con cáncer de mama.....	<b>72</b>
<b>Figura 17.</b> Expresión del gen EPC1 mediante RT-PCR de punto final.....	<b>73</b>
<b>Figura 18.</b> Expresión del gen EPC1 en líneas celulares y en diferentes tipos de cáncer mamario .....	<b>75</b>
<b>Figura 19.</b> Análisis de la expresión de la proteína EPC1 en extractos de proteínas en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T47-D).....	<b>76</b>
<b>Figura 20.</b> Localización de la proteína EPC1 en las líneas celulares MDA-MB-231 y T-47D .....	<b>77</b>
<b>Figura 21.</b> Restauración de la expresión del miR-342-3p en las células MDA-MB-231 y Hs 578T. ....	<b>79</b>
<b>Figura 22.</b> El miR-342-3p inhibe la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama.....	<b>81</b>
<b>Figura 23.</b> El miR-342-3p inhibe la invasión celular en las líneas celulares de cáncer de mama.....	<b>82</b>
<b>Figura 24.</b> Proceso de clonación del extremo 3'UTR del gen EPC1 con el sitio semilla del miR-342-3p en el 3'UTR del gen de la luciferasa en el plásmido pMIR-REPORT ....	<b>83</b>
<b>Figura 25.</b> Electroferograma de las secuencias obtenidas para determinar la clonación del fragmento de las construcciones. ....	<b>84</b>
<b>Figura 26.</b> El miR-342-3p regula la expresión de EPC1 al unirse a su extremo 3'UTR. ...	<b>86</b>
<b>Figura 27.</b> Expresión del miR-342-3p en líneas celulares de cáncer de mama.....	<b>89</b>

## ABREVIATURAS

AGO	Proteína Argonauta
AGR2	Proteína homóloga 2 anterior de gradiente
COX2	Ciclooxigenasa 2
CSCs	Células madre de cáncer
CTCs	Células tumorales circulantes
DNMT1	DNA metiltransferasa 1
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EPC1	Proteína potenciadora homóloga del complejo de polycomb 1
ER+	Receptor de estrógeno
FOXM1	Proteína M1 de caja de horquilla
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Desacetilasa de histonas
HER2+	Receptor de crecimiento epidérmico
ID4	Inhibidor de la proteína de unión al DNA ID-4
IKK- $\gamma$	Proteína quinasa activada por mitógeno
MCT1	Transportador de Monocarboxilato 1
miRISC	Complejo de silenciamiento inducido por el miRNA
mRNA	Mensajero de ácido ribonucleico
MMP	Metaloproteinasas
Pre-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	microRNA primario
PR+	Receptor de progesterona
RAP2B	Proteína relacionada con Ras Rap-2b
TAB 2 y 3	TGF-beta-cinasa activada 1 y proteína de unión a MAP3K7
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral beta
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TNC	Tenascina C
TRBP	Proteína de unión al RNA transactivador
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
XPO5	Exportina 5
UTR	Región no traducida

## RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y en México. Se han descrito nuevos mecanismos moleculares que participan en la regulación de la expresión génica en cáncer que incluyen a los microRNAs (miRNAs), los cuales funcionan como reguladores negativos de sus transcritos blanco y que contribuyen en el desarrollo y progresión de la enfermedad. El miR-342-3p se ha identificado como un supresor tumoral y su expresión se encuentra reprimida en diferentes tipos de cáncer. Mediante análisis bioinformáticos identificamos que el miR-342-3p puede tener como blanco directo al gen *EPC1*, el cual codifica para una acetilasa de histonas que regula diferentes procesos biológicos tales como regulación del ciclo celular y apoptosis; sin embargo, se desconoce su papel en el proceso metastásico en cáncer de mama.

En este trabajo se determinó que la expresión del miR-342-3p es variable en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama analizadas mediante qRT-PCR, encontrando una mayor expresión en la línea celular MCF-7 comparado con las células de tejido mamario no tumoral MCF-10A. Mediante, los ensayos funcionales encontramos que la restauración de la expresión del miR-342-3p, resultó en una disminución de la migración y una tendencia de disminución de la invasión celular en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y Hs-578T. Por otro lado, el análisis de la expresión de *EPC1* mediante ensayos de Western blot en extractos totales de proteínas, mostró mayores niveles de expresión en las células MCF-7 comparado con el resto de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, Hs-578T y T-47D. Adicionalmente, se analizó la expresión de *EPC1* mediante RT-PCR semicuantitativa encontrando una tendencia de mayor expresión en las líneas celulares de cáncer de mama (Hs-578T, MDA-MB-231, MCF-7 y T-47D) comparado con la línea no tumoral MCF10A. Mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos se localizó a la proteína *EPC1* en la periferia del núcleo, además se encontró que tiende a una mayor expresión en la línea celular MDA-MB-231 (alta capacidad metastásica) comparada con la línea celular T-47D (baja capacidad metastásica). Finalmente, mediante ensayos de luciferasa se demostró que el miR-342-3p se une directamente a la región 3'UTR del gen *EPC1*, por lo que se sugiere como un nuevo blanco epigenético.

## ABSTRACT

Breast cancer is the main cause of death in women worldwide and in Mexico. New mechanisms such as miRNAs and their targets have been described that contribute in the regulation of the progression of the disease. Novel molecular mechanisms have been described that participate in the regulation of gene expression in cancer, including non-coding RNAs such as microRNAs (miRNAs) that function as negative regulators of their target transcripts and that contribute to the development and progression of the disease. miR-342-3p has been identified as a tumor suppressor and its expression is diminished in different types of cancer. Otherwise, we identified that protein EPC1 may be a direct target of this miRNA. EPC1 is a histone acetylase that regulates different biological processes such as regulation of the cell cycle, apoptosis and response to DNA damage; however, its role in the metastatic process in breast cancer is unknown.

Our quantitative RT-PCR assays results demonstrated that the expression of miR-342-3p was variable in the different breast cancer cell lines analyzed, finding a higher expression in the MCF-7 cell line in comparison to non-tumor breast tissue cells MCF-10A. Through functional assays, we found that the restoration of miR-342-3p expression by transfection of its precursor, resulted in a significant decrease in the migration and cell invasion of the MDA-MB-231 and Hs-578T triple negative breast cancer cell lines.

Moreover, the analysis of EPC1 protein by Western blot assays in total protein extracts, showed significant higher levels of expression in MCF-7 cells compared to MDA-MB-231, Hs-578T and T-47D breast cancer cell lines. Additionally, the expression of *EPC1* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR, finding higher expression in the breast cancer lines (Hs-578T, MDA-MB-231, MCF-7 and T-47D) compared to the non-tumor line MCF10A. Through immunofluorescence assays using specific antibodies, the protein EPC1 was immunolocalized in the periphery of the nucleus, and a higher expression was found in the MDA-MB-231 cell line (high metastatic capacity) relative to T-47D cells (low metastatic capacity). Finally, luciferase assays showed that miR-342-3p binds directly to the 3'UTR region of the *EPC1* gene, therefore it is suggested as a new epigenetic target.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. ANTECEDENTES GENERALES**

#### **1.1 Cáncer**

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen al cáncer como un conjunto de enfermedades relacionadas, pero etiológicamente distintas entre sí, ya que se originan en diferentes sitios y estos progresan a diversos órganos secundarios. El cáncer es un proceso secuencial que provoca que algunas células del cuerpo crezcan descontroladamente sobrepasando a las células normales, adquiriendo tamaños, formas y funciones anormales (células neoplásicas); destruyendo a las células vecinas y manteniendo a las células que deberían eliminarse, lo que conlleva a un inadecuado funcionamiento y a la generación de cúmulos de células malignas lo que forma un tumor (Redig A. y McAllister S, 2013). Además, se ha visto al cáncer como una enfermedad ecológica, ya que requiere de la interacción dinámica de células malignas y no malignas, la generación de un microambiente tumoral (TME) para la supervivencia, crecimiento y progresión del tumor. Una vez que se forma este tumor, las células que lo conforman pueden invadir otros tejidos y órganos mediante el proceso denominado metástasis que es la principal causa de muerte por cáncer (Barcellos *et al.* 2013).

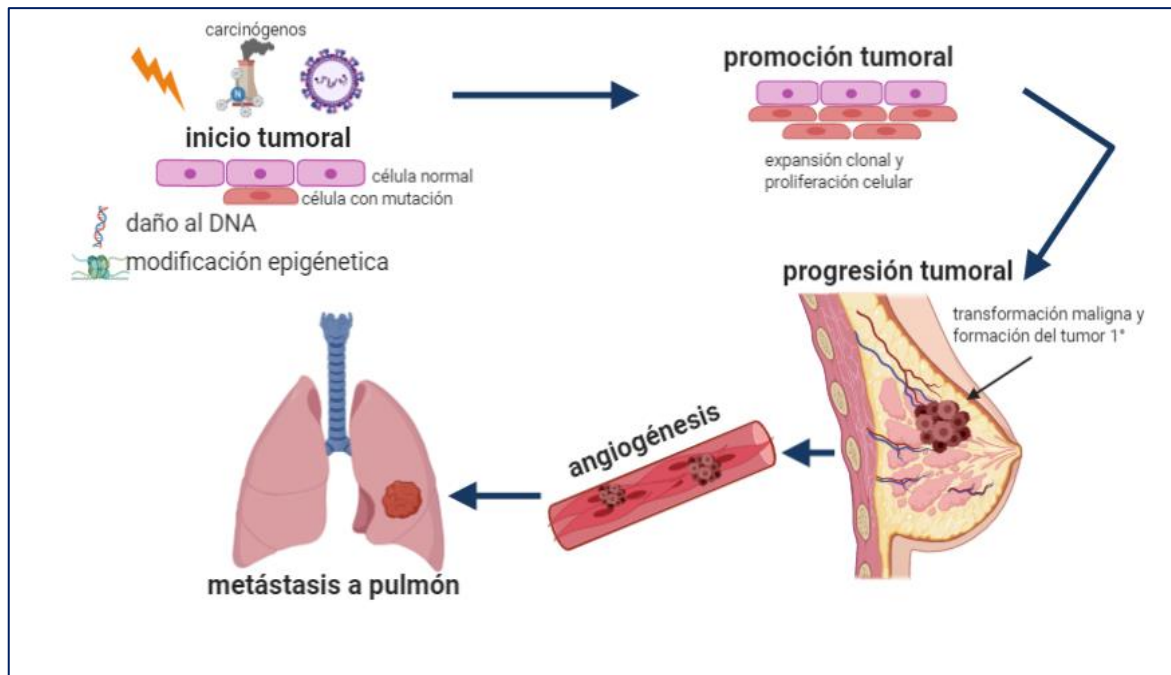
#### **1.2 Carcinogénesis**

Es el proceso mediante el cual las células normales se transforman en células tumorales, esto se debe a alteraciones en el material genético por mutaciones que le confieren a la célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor que su cohorte y conservar una descendencia que conserve esta mutación a los que se les denomina clones celulares y la subsiguiente selección clonal de células portadoras de las mismas (células hijas) acumulen diversas mutaciones y alteren su comportamiento, lo que les permitirá tener mejores capacidades de supervivencia, crecimiento y proliferación (Devi, P. 2004). Para que se lleve a cabo este proceso de clonalidad y diseminación se requieren tres etapas (Figura 1):

- 1) Inicio tumoral. Ocurre a nivel del genoma y comprende un daño irreversible por una mutación inicial hasta que se inicia la neovascularización (angiogénesis) y puede durar años en lo que se genera el potencial para el desarrollo neoplásico.

Las mutaciones de los genes responsables de la carcinogénesis (oncogenes o genes supresores de tumor) pueden ser heredadas o adquiridas de *novo* (mutaciones somáticas), generalmente producto de la exposición a sustancias del ambiente (carcinógenos) o a agentes biológicos (virus oncogénicos). Además, hay factores adicionales involucrados en el fenotipo final resultante, las modificaciones epigenéticas que son cambios heredables que no afectan la secuencia de DNA (Lichtenstein, 2009; Peters y González, 2018; Ravegnini *et al.* 2015). Para que estas mutaciones iniciadoras de tumores logren persistir en la célula y dar origen a una clona tumoral, deben darse dos eventos fundamentales a nivel de célula y de su microambiente los cuales son: inestabilidad genómica mediante agentes que dañan el DNA (lesiones cromosómicas, reordenamiento de genes y sus secuencias reguladoras) que promueve la adquisición de capacidades que favorecen la progresión celular y el segundo evento es la inflamación tumoral que es promovida por células del sistema inmune que infiltran al tumor (Chorazy, 1985).

- 2) Promoción tumoral. La célula transformada puede permanecer latente, hasta que sea estimulada para proliferar y alterar el equilibrio celular; esta etapa representa el crecimiento tisular con la formación del tumor, en donde participan los factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformante (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ -) y los receptores a los factores de crecimiento, promoviendo la angiogénesis y degradación de la matriz extracelular (Devi, P. 2004).
- 3) Conversión neoplásica y progresión. Este proceso es mucho más rápido, en donde el tumor crece descontroladamente adquiriendo mutaciones adicionales lo que conduce a una mayor heterogeneidad de la población celular e implica las etapas metastáticas finales de desarrollo del proceso tumoral. Cuando las células que conforman al tumor pierden sus propiedades de adherencia, éstas se desprenden e invaden otros tejidos en donde entran en circulación para reubicarse en otros órganos y establecer un nuevo tumor (Devi, P. 2004; Barcellos *et al.* 2013).



**Figura 1. Proceso de carcinogénesis.** Se muestran las tres etapas del proceso tumoral: inicio tumoral en donde hay factores (químicos o biológicos) que generan un daño al DNA o alguna modificación epigenética lo que conducirá a mutaciones; promoción tumoral en donde se promueve la expansión clonal y hay un recambio en las células para activarlas y transformarlas a malignas y, finalmente la última etapa de progresión tumoral en donde el tumor establece un nicho primario para generar y adquirir los requerimientos necesarios, con ello desarrollar un nuevo nicho e invadir otros tejidos y órganos, desarrollándose la metástasis. Tomada y modificada de Barcellos *et al.* (2013).

### **1.3 Epidemiología del cáncer**

El cáncer es una de las primeras causas de muerte por cáncer a nivel mundial con una cifra estimada de 9.6 millones hasta el año 2018 y para México se tiene a la fecha registrados 83 476 muertes de acuerdo con la base de datos GLOBOCAN. Para el año 2040, a nivel mundial se predice que las muertes aumenten a 16.3 millones y para México los casos aumenten de 190 667 a 359 542 y que la cifra estimada de muertes sea de 172 961 (GLOBOCAN, 2019). Una de cada diez defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad y los tipos de cáncer que causan un mayor número de defunciones destacan: el cáncer pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y de mama (INEGI, 2012; Figura 2).

### **1.4 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial en mujeres, con una cifra estimada de 2 088 849 casos y 626 679 muertes para el año 2018; la mayoría de los fallecimientos por cáncer de mama no se deben al tumor primario, sino que se da como el resultado de la metástasis a órganos distantes. En México constituye la primera causa de muerte dentro de las muertes por cáncer en mujeres con una cifra de 6 884 defunciones registradas hasta el 2018 y con una incidencia de 27 283 casos para el mismo año (GLOBOCAN, 2019).

El desarrollo, crecimiento y diseminación de las células tumorales se explica a través de características distintivas, las cuales se denominan *hallmarks*, estas incluyen 1) mantenimiento de la capacidad proliferativa, en donde existe una desregulación de las señales promotoras del crecimiento y división celular; 2) resistencia a la muerte celular por inhibición de la apoptosis, estimulando la autofagia y la senescencia celular; 3) evasión de los mecanismos supresores de la proliferación celular, en donde se pierde la función de los genes supresores de tumor que controlan el crecimiento sostenido y la proliferación celular; 4) inmortalidad replicativa, se refiere a que las células se vuelven inmortales adquiriendo la capacidad de replicarse ilimitadamente por desregulación en el mantenimiento de la longitud de los telómeros; 5) angiogénesis sostenida, que permite el acceso a nutrientes, oxígeno y la eliminación de residuos metabólicos y dióxido de carbono de las células tumorales, permitiendo su supervivencia y proliferación; y 6) capacidad de invasión y metástasis, la célula activa los programas

celulares relacionados con la transición epitelio-mesénquima (Fouad y Aanei, 2017). Además, se han agregado cuatro características que contribuyen a la progresión del tumor las cuales son inestabilidad genómica, inflamación tumoral, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la respuesta inmune (Hanahan D y Weinberg RA, 2011; Figura 3).

## **1.5 Rasgos distintivos del cáncer**

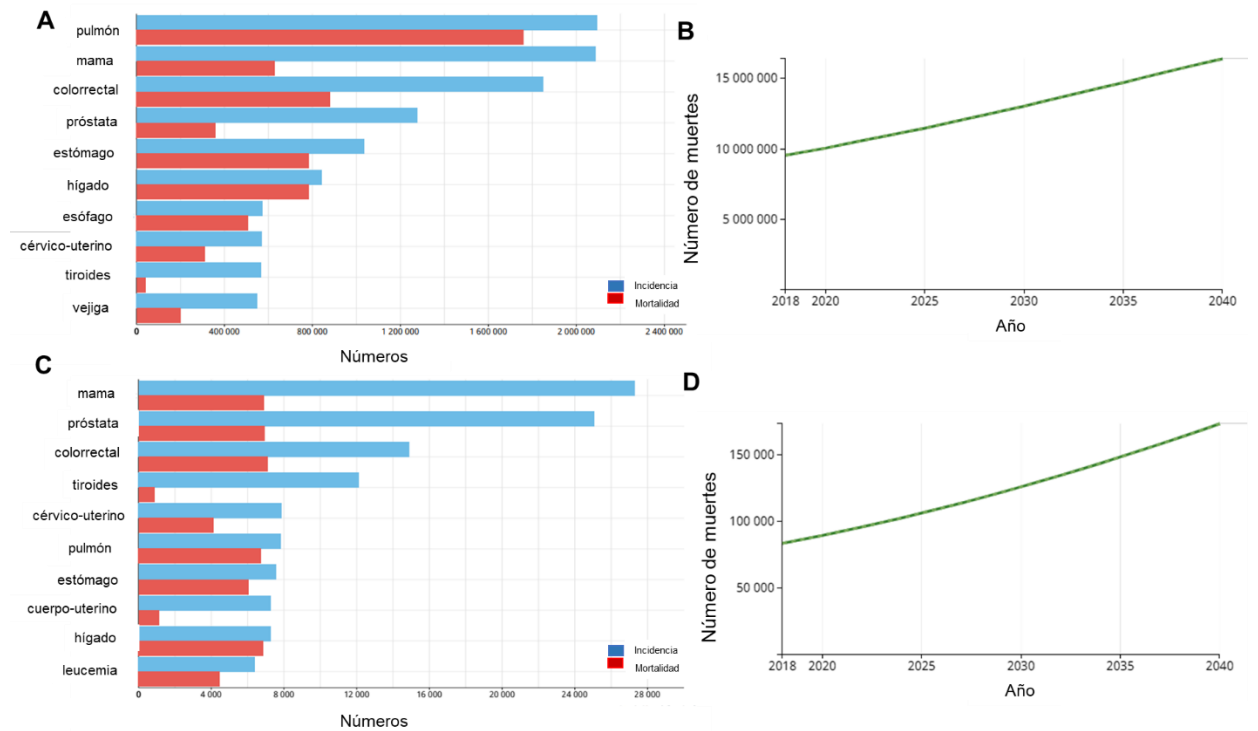
### Mantenimiento de la señal proliferativa

En condiciones normales, los tejidos controlan la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento y progresión a través del ciclo y división celular, se mantiene la homeostasis y por lo tanto el mantenimiento de la arquitectura y función normal del tejido. Las células tumorales desregulan estas señales proliferativas mediante factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular, los cuales emiten señales a través de las vías de señalización intracelular que regulan la progresión a través del ciclo celular, así como el crecimiento celular (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

Las células tumorales han encontrado diversas maneras para mantener su capacidad proliferativa, ya sea mediante una estimulación proliferativa autocrina que se genera al producir ligandos del factor de crecimiento a los que pueden responder mediante la expresión de receptores afines, además las células tumorales pueden ser hiperreactivas a cantidades limitantes del ligando del factor de crecimiento o en el que el receptor se active independiente de su ligando. Otra forma del mantenimiento proliferativo es que las células tumorales manden señales para estimular a las células normales dentro del estroma asociado al tumor y éstas suministren factores de crecimiento (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

### Resistencia a la muerte celular

La muerte celular programada por apoptosis se desencadena debido a un desequilibrio en la señalización o por daño al DNA, esto ocurre por el desarrollo de células tumorales, pero cuando éstas alcanzan un grado elevado de malignidad y resistencia a la terapia, la célula es incapaz de activar la muerte celular y en su contraparte se activan genes (anti-apoptóticos) que evitan este proceso (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).



**Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial y en México.** A) Casos de mortalidad e incidencia a nivel mundial (2018), ambos sexos y en todas las edades. B) Casos de muertes estimados de cáncer a nivel mundial hasta el año 2040. C) Casos de mortalidad e incidencia en México (2018), ambos sexos y en todas las edades. D) Casos estimados de muerte por cáncer en México hasta el año 2040. Tomado y modificado de GLOBOCAN 2018 (<http://gco.iarc.fr/today>).

La maquinaria apoptótica está compuesta por reguladores río arriba y componentes efectores río abajo, éstos a su vez se dividen en dos circuitos principales, uno que recibe y procesa señales extracelulares inductoras de muerte (el programa apoptótico extrínseco), y el otro que detecta e integra una variedad de señales de origen intracelular (el programa intrínseco), desencadenando la activación de proteasas (caspasa 8 y 9, respectivamente), que inician una cascada proteolítica con caspasas efectoras responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, provocando que la célula se desarme progresivamente y luego se consume, tanto por sus vecinos y por células fagocíticas profesionales. Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis, entonces se han desarrollado otras formas de muerte celular que amplían el alcance de la "muerte celular programada" como barrera para el cáncer. La autofagia permite que las células descompongan los orgánulos celulares para su reciclaje en procesos metabólicos, está opera a niveles basales bajos en las células, pero puede ser fuertemente inducida en ciertos estados de estrés celular, el más obvio de los cuales es la deficiencia de nutrientes. Se ha identificado que la autofagia converge con algunas vías de señalización que inhiben la apoptosis (AKT, PI3K, mTOR), cuando existe alguna alteración por parte de las células tumorales se pueden activar ambos programas ya sea apoptosis o autofagia, sin embargo, las células tumorales han encontrado estrategias para evadir la acción de ambos mecanismos y en etapas tardías del tumor se ha identificado que la autofagia contribuye para promover el desarrollo tumoral (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

#### Capacidad replicativa ilimitada

De manera normal la mayoría de los linajes celulares pasan a través de un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular, esta limitación se asocia a dos barreras; la senescencia que es un estado irreversible no proliferativo pero viable y una fase de crisis que implica la muerte celular. Cuando las células en cultivo logran evadir la barrera de senescencia y luego la fase de crisis, en donde algunas células pueden emerger, éstas exhiben un potencial replicativo ilimitado lo que se denomina inmortalización (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

Se ha identificado que los telómeros, que protegen los extremos de los cromosomas, están involucrados centralmente en la capacidad proliferativa ilimitada. Los telómeros están compuestos de múltiples repeticiones de hexanucleótidos en tándem, se acortan progresivamente en células no immortalizadas, perdiendo la capacidad de proteger los extremos del DNA cromosómico, la longitud del DNA telomérico en una célula dicta cuántas generaciones celulares sucesivas puede pasar su progenie antes de que los telómeros pierdan las funciones protectoras. La telomerasa, que es la DNA polimerasa encargada de agregar los segmentos repetidos al extremo del DNA telomérico, está casi ausente en las células no immortalizadas, pero se expresa altamente en células immortalizadas (90%), esto último conlleva a la resistencia de la senescencia y la apoptosis (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

#### Evasión de los supresores del crecimiento

Las células tumorales controlan los circuitos de regulación negativa de la proliferación, muchos de estos circuitos están integrados por genes supresores de tumor, entre éstos son dos los principales y codifican para las proteínas de retinoblastoma (RB) y TP53. La proteína RB integra diversas señales extracelulares e intracelulares y decide si una célula debe o no pasar por su ciclo de crecimiento y división (señales inhibitorias de crecimiento), si existe un defecto en la proteína entonces implicará que persista la progresión celular. Por otro lado, TP53 recibe señales de sensores de estrés y anormalidad dentro de la célula y si el daño al genoma es excesivo, dicha proteína detiene la progresión del ciclo celular hasta normalizar las condiciones en la célula o si el daño es irreparable desencadena la apoptosis (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

#### Angiogénesis

Durante el desarrollo embrionario, la formación de vasos sanguíneos implica la generación de nuevas células endoteliales y su re-arreglo en tubos (vasculogénesis), además del brote de nuevos vasos a partir de los existentes (angiogénesis); posteriormente la vasculatura normal se vuelve en gran parte inactiva. En el adulto, como parte de procesos fisiológicos como la curación de heridas y el ciclo reproductivo femenino, la angiogénesis se activa, pero solo de manera transitoria (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

Por el contrario, durante la progresión tumoral, un "interruptor angiogénico" casi siempre se activa y permanece encendido; mediante este proceso los tumores obtienen nutrientes y oxígeno, así como la capacidad para eliminar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Las proteínas que regulan este proceso en los tumores son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y la trombospondina-1 (TSP-1), mientras que la primera induce la angiogénesis, la segunda inhibe este proceso (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

### Invasión y metástasis

Las células cancerosas con alto grado de malignidad desarrollan alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular (ECM). La alteración mejor caracterizada implica la pérdida de E-cadherina, una molécula clave de adhesión de célula a célula. Al formar uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, la E-cadherina ayuda a ensamblar láminas de células epiteliales y a mantener la quiescencia de las células dentro de estas láminas. El aumento de la expresión de E-cadherina inhibe la invasión y la metástasis, mientras que la reducción de su expresión potencia estos fenotipos. Por el contrario, las moléculas de adhesión asociadas con las migraciones celulares que ocurren durante la embriogénesis y la inflamación aumentan; por ejemplo, N-cadherina, que se expresa en las células mesenquimales durante la organogénesis, está regulada positivamente en muchas células de carcinoma invasivo (Hanahan D y Weinberg RA, 2011; Scully *et al.* 2012).

Para que se lleve a cabo el proceso metastásico se tienen que considerar múltiples pasos que conllevan la invasión local por las células tumorales, posteriormente la transición epitelio-mesénquima, las células atraviesan los vasos sanguíneos y los ganglios linfáticos por un proceso denominado intravasación y sobreviven en el torrente sanguíneo para extravasar y colonizar un nuevo nicho y órganos específicos (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

### Evasión de la respuesta inmune

Las células tumorales inicialmente son destruidas por el sistema inmune, sin embargo, éstas desarrollan estrategias para evadir su detección y destrucción por

parte del sistema inmune, además reclutan células inmunosupresoras que limitan la acción de los linfocitos T citotóxicos y aprovechan las señales de proliferación celular generadas por las células del sistema inmune (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

### Reprogramación del metabolismo energético

La célula tumoral genera energía mediante la glucólisis anaeróbica, caracterizada por glicólisis sin procesamiento del piruvato en el ciclo de Krebs (efecto Warburg). Los intermediarios glucolíticos son utilizados para la generación de nucleósidos y aminoácidos necesarios para la proliferación celular (Fouad y Aanei, 2017).

### Inestabilidad genómica

Existen dos tipos de inestabilidad, uno a nivel cromosómico (translocaciones e inversiones, duplicaciones) y otro a nivel de DNA (mutaciones, inserciones y deleciones); lo que brinda a la célula tumoral la variabilidad genética necesaria para adquirir ventajas para sobrevivir, crecer y proliferar; a través de un proceso con sucesivas expansiones clonales. Un ejemplo es cuando se genera una mutación en el gen p53 que es un regulador esencial de la maquinaria de reparación de daño al DNA. Además, se ha identificado que la pérdida de DNA telomérico en muchos tumores genera inestabilidad cariotípica e inserción-delección asociada de segmentos cromosómicos (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

### Inflamación tumoral

La inflamación surge como un mecanismo de defensa por parte del sistema inmune para que active una respuesta contra agentes extraños (microorganismos) y desencadene un efecto sobre éstos para que no generen un daño. La inflamación asociada a tumores promueve un microambiente favorable para la progresión tumoral, ya que pueden reclutar a moléculas que son liberadas durante el proceso inflamatorio como algunos de los factores de crecimiento, enzimas y moléculas de señalización que activan la transición epitelio-mesénquima, invasión y metástasis (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

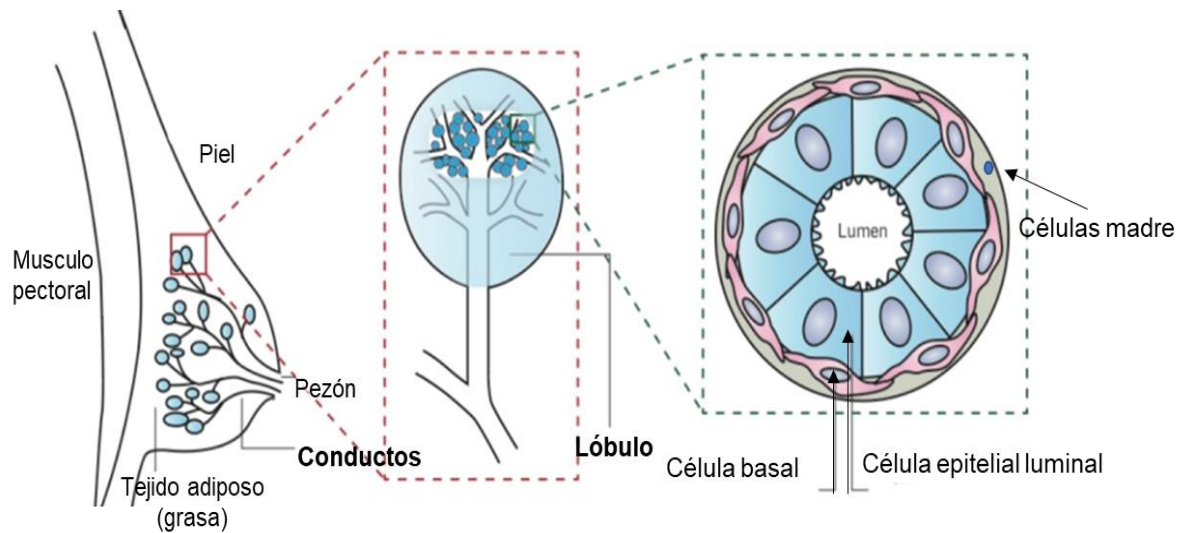


**Figura 3. Rasgos distintivos del cáncer.** Se muestran las diez características distintivas para el desarrollo del cáncer, destacando la invasión y metástasis que son propiedades determinantes del estado maligno de la enfermedad. Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg (2011).

## **1.6 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria normal**

La glándula mamaria tiene como principal función la producción y secreción de leche para la lactancia. La leche es producida en estructuras denominadas lobulillos que se agrupan para formar a los lóbulos (15-20 a manera de racimos), que son las unidades funcionales; están conectados con unas estructuras denominadas conductos en los cuales viaja la leche a través de conductos más gruesos llamados galactóforos (12-19) y pasar a la areola para desembocar en el pezón. Entre el tejido glandular se encuentra el denominado estroma o tejido de sostén, constituido por grasa, tejido conectivo, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos; la glándula mamaria tiene en su interior venas y arterias encargadas de mantener oxigenados los tejidos. En su estructura externa está conformada por el pezón y la piel que recubren y protegen a la glándula mamaria (NIH, 2019; Figura 4).

La mama pasa por diferentes estadios de acuerdo con la edad de la mujer, durante el embarazo y la lactancia la mayor parte del tejido es glandular y el resto del tiempo predomina el estroma; cuando se inicia la menopausia hay una disminución de ambos tejidos y el tejido glandular se atrofia, persistiendo los ductos lo que conlleva a una incidencia de cáncer de mama en esas edades (NIH, 2019).



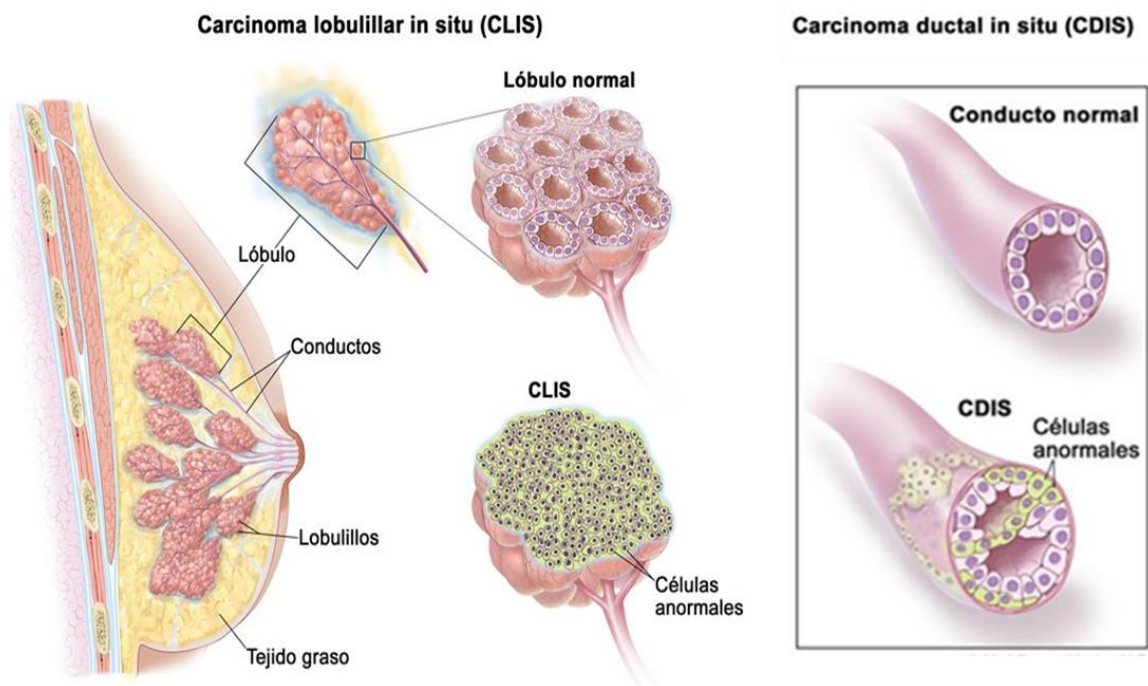
**Figura 4. Anatomía de la glándula mamaria normal.** Se muestra las estructuras de lóbulos y conductos, además de las células que forman parte de cada estructura y el tejido adiposo. Tomada del Instituto Nacional del Cáncer (NIH), publicado en línea en <https://visualsonline.cancer.gov/collection.cfm?groupid=10>.

## 1.7 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama se puede originar en diferentes tejidos del seno, siendo ductal el que corresponde a la mayoría de los casos (80%) o lobular con un número menor de casos (30%); e inicia como una enfermedad localizada, que se puede extender a los ganglios linfáticos y diseminarse a otros tejidos. Se reconocen dos tipos de carcinomas: carcinoma *in situ* que aún no rompen la lámina basal y que están localizados únicamente en el tejido mamario y carcinomas invasivos que rompen la lámina basal y se extienden a tejidos circundantes de la mama (Redig A. y McAllister S, 2013; Figura 5).

Adicionalmente el cáncer de mama se puede clasificar en estadios de acuerdo con el sitio de origen y progresión, considerando la clasificación TNM que consiste en evaluar el tamaño y ubicación del tumor (T), ganglios linfáticos (N) y diseminación del cáncer a otros tejidos u órganos (M); siendo cinco los estadios que inicia en el estadio 0 como un proceso gradual que comienza en los conductos mamarios (cáncer *in situ*), progresa al estadio I en donde el tumor se vuelve invasivo y comienza a afectar tejidos adyacentes, pero no alcanza los ganglios linfáticos. En el estadio II, las células de los ganglios linfáticos individuales comienzan a agruparse y causar inflamación, posteriormente en el estadio III el cáncer se propaga a otros órganos y el estadio IV el cáncer tiene un alto grado metastásico (Edge *et al.* 2010; Khan *et al.* 2012).

Por otro lado, en la tabla I se muestra la clasificación del cáncer de mama de acuerdo a las características inmunohistoquímicas subyacentes del tumor, que incluyen la expresión de los receptores de: estrógeno (ER+), progesterona (PR+) y el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2+); esta clasificación permite brindar un diagnóstico y un pronóstico con el cual sugieran opciones de tratamiento como el uso de terapias anti-estrogénicas (Holliday D. y Speirs V. 2011; Redig A. y McAllister S, 2013).



**Figura 5. Sitios en donde se origina el cáncer en la glándula mamaria.** Secciones transversales de la mama en donde se muestran lóbulos, conductos y tejido graso; del lado izquierdo el carcinoma lobular *in situ* que presenta células anormales en el lobulillo comparado con un lóbulo normal, y del lado derecho se ejemplifica el carcinoma ductal *in situ* que reviste el conducto de la mama comparado con un ducto normal. Tomada del Instituto Nacional del Cáncer (NIH), publicado en línea en <https://visualsonline.cancer.gov/collection.cfm?groupid=10>.

**Tabla I.** Clasificación molecular del cáncer de mama (Holliday D. y Speirs V. 2011).

<b>Subtipo</b>	<b>Expresión de receptores</b>	<b>Características moleculares</b>	<b>Sobrevida</b>
<b>Luminal A</b>	ER+, PR+/-, HER2- -	Ki67 bajo, respuesta endocrina, a menudo quimioterapia	2.2 años
<b>Luminal B</b>	ER+, PR+/-, HER2+	Ki67 alto, endocrino sensible, variable a la quimioterapia.	1.6 años
<b>Basal</b>	ER -, PR -, HER2-	Ki67 alto, endocrino no responde, EGFR+ y/o citocina 5/6 +, quimioterapia	0.5 años
<b>Bajo en Claudina</b>	ER -, PR -, HER2-	Ki67 alto, baja E-cadherina y claudina, respuesta intermedia a quimioterapia.	0.9 años
<b>HER2</b>	ER-, PR-, HER2++	Ki67 alto, sensible a trastuzumab.	0.7 años

ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona, HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

## 1.8 Factores de riesgo en cáncer de mama.

Algunos de los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de mama se enlistan en la Tabla II (Ceballos y Hernández, 2008; INEGI, 2016).

**Tabla II.** Factores de riesgo en cáncer de mama (Ceballos y Hernández, 2008; INEGI, 2016).

<b>Factores</b>	<b>Descripción</b>
<b>Edad</b>	Aumenta gradualmente el riesgo conforme la mujer envejece, siendo el grupo más afectado de 40-59 años.
<b>Antecedentes familiares</b>	Si algún familiar directo (hermana, madre, abuela) ha desarrollado cáncer.
<b>Factores hormonales</b>	Las mujeres con terapia hormonal de reemplazo durante mucho tiempo parecen tener mayor probabilidad de desarrollar cáncer.
<b>Alteraciones genéticas</b>	Específicas de cada gen que aumente el riesgo de cáncer de mama (BRCA1, BRCA2, PTEN, P53 y ATM).
<b>Menstruación y reproducción</b>	Edad temprana de menstruación antes de los 11 años, edad tardía en tener su primer hijo (>30 años) o nuliparidad, y menopausia tardía mayor a 55 años tienen una mayor la probabilidad de desarrollar cáncer de mama.
<b>Densidad de la mama</b>	Gran cantidad de tejido denso del pecho, no de tejido graso.
<b>Dieta y estilo de vida</b>	Alto consumo de grasa y deficiencia de consumo de frutas y verduras, el sobrepeso y obesidad, consumo de alcohol, tabaquismo, falta de ejercicio aumentan la incidencia.

## **1.9 Diagnóstico de cáncer de mama**

El cáncer de mama en etapas iniciales se presenta de manera subclínica en la mayoría de los casos y es detectable por estudios de imagen (mastografía y ultrasonido), en menor proporción por tumores palpables y como un tumor no doloroso; por otro lado, los tumores localmente avanzados se detectan de manera clínica (American Cancer Society, 2019).

## **1.10 Tratamiento del cáncer de mama.**

El tratamiento integral en cáncer de mama es multidisciplinario siendo el tratamiento inicial la cirugía y radioterapia (Arce *et al.* 2011), por otro lado, los tratamientos hormonales más utilizados son los anti-estrógenos (tamoxifeno), y los inhibidores de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano) que pueden utilizarse como:

- Terapia adyuvante o complementario, se da tras la primera cirugía, su objetivo es eliminar la enfermedad micro-metastásica antes del desarrollo de clones resistentes (NIH, 2019).
- Terapia neoadyuvante, se da antes de la cirugía y en etapas avanzadas de la enfermedad, con el objetivo de reducir el tamaño tumoral y actuar sobre las células micro-metastásicas ocultas, además de facilitar el tratamiento quirúrgico y en tumores operables determinar a los pacientes respondedores con base a la expresión de sus receptores hormonales, proliferación celular (Ki67) y grado nuclear (Arce *et al.* 2011; NIH, 2019).

Por otro lado, en pacientes con enfermedad avanzada la principal forma de tratamiento para disminuir los síntomas del paciente es el tratamiento sistémico, que incluye la quimioterapia, la terapia endocrina y la terapia dirigida a blancos moleculares (American Cancer Society, 2019; Arce *et al.* 2011).

## II. ANTECEDENTES PARTICULARES

### 2.1 Mecanismos de metástasis en cáncer

Metástasis es una capacidad intrínseca o una característica adquirida del tumor primario, clínicamente es una enfermedad heterogénea que se denomina local o sistémica. Aproximadamente el 15% de los pacientes que se les detecta cáncer de mama desarrollan metástasis tres años después de ser identificado el tumor primario, sin embargo, las manifestaciones ocurren 10 años después del diagnóstico inicial; siendo los principales órganos donde se desarrolla la metástasis por cáncer de mama el hueso, pulmón y con menor frecuencia hígado y cerebro (Weigelt *et al.* 2005). La metástasis tumoral es la principal causa de muerte relacionada con cáncer, que está determinada por factores anatómicos y hemodinámicos del sistema vascular. Existen diferentes hipótesis para explicar su mecanismo, siendo una de las más relevantes la hipótesis de la semilla y el suelo, que consiste en que la semilla funge como célula cancerosa y en el suelo existen diferentes factores que ayudan a la progresión y crecimiento de la célula tumoral, lo que contribuye a la metástasis (Liu *et al.* 2017; Figura 6).

Para que inicie la metástasis se debe preparar el sitio pre-metastásico, aquí el tumor primario secreta vesículas extracelulares (EV) que median la interacción entre la célula tumoral y la célula adyacente. Las EVs contienen DNA, RNA, proteínas y otros componentes moleculares como: el factor inducible de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), siendo capaces de alterar la adhesión celular al mediar la interacción célula-célula y remodelar el microambiente para que la célula cancerosa sea permisiva. Una vez que se tiene el nicho pre-metastásico las células tumorales secretan citocinas y quimiocinas (CXCR4, TNF $\alpha$ , CCL2, IL-6, CCL5) para activar diferentes tipos celulares (macrófagos asociados al tumor-TAMs, células madre mesenquimales-MSCs), proteínas (osteoponina, tenascina C, clusterina) y otros componentes (células estromales) que rodean al tumor primario (invasión local) y contribuyen en la migración y transición epitelio-mesénquima (EMT). Las células tumorales alteran la adhesión célula-célula y la adhesión celular a la matriz extracelular (MEC), la familia cadherina es importante en este paso, debido a que para que ocurra la EMT, es necesario que exista una disminución de uniones

adherentes E-cadherina y aumente la regulación de N-cadherina y otros marcadores mesenquimales como vimentina; así como que se expresen represores transcripcionales de E-cadherina como: homeobox 1 de unión a E-box de dedo de zinc (ZEB1 y 2), proteína 1 relacionada con la torsión (TWIST), proteína de dedo de zinc Snail y Slug, involucrados en vía de TGF- $\beta$  y el eje de fosfatidilinositol 3' cinasa serina / treonina cinasa (PI3K / AKT) vinculado al eje de los programas de EMT (Liu *et al.* 2017; Scully *et al.* 2012).

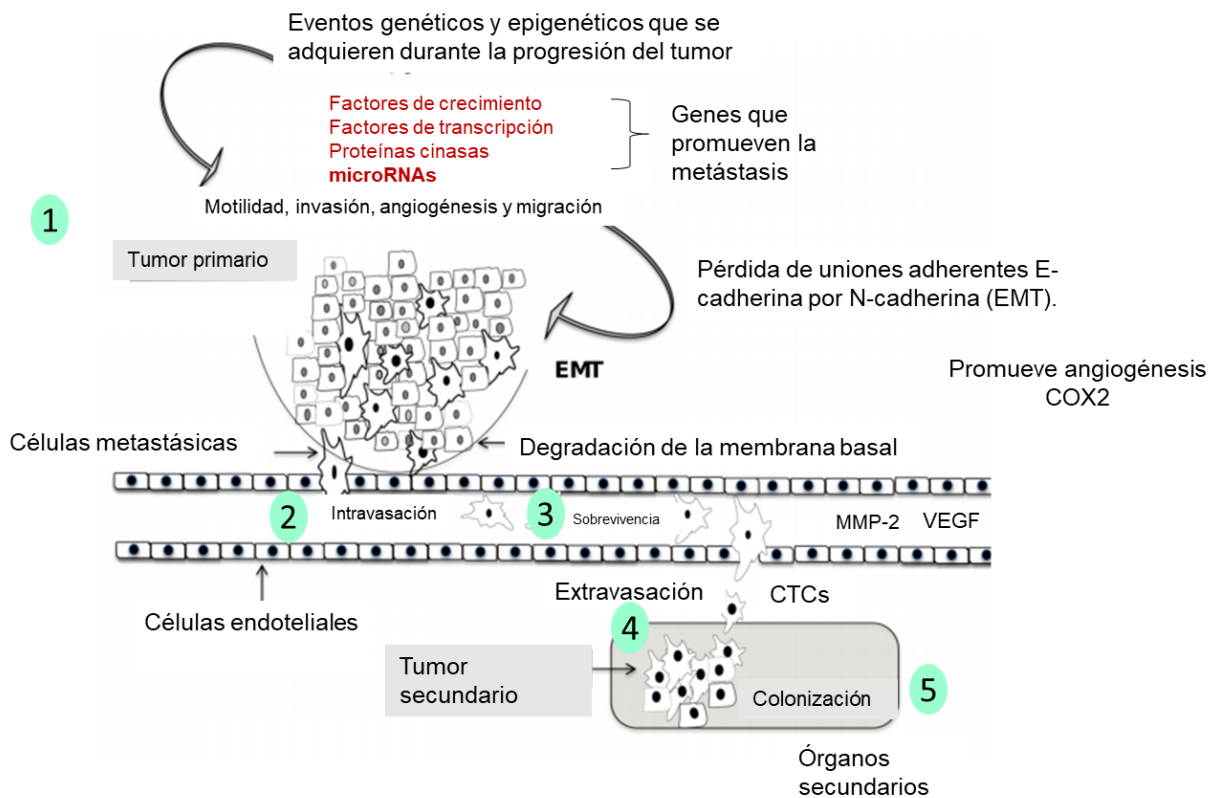
La diseminación tumoral ocurre a través de los vasos sanguíneos mediante células tumorales circulantes (CTCs) que se introducen en la circulación y son reclutadas en la microvasculatura (intravasación). Se ha identificado que las células endoteliales acompañan a las CTCs para protegerlas de sufrir anoikis (muerte celular programada); cuando las células tumorales entran a los vasos sanguíneos los niveles de oxígeno son insuficientes lo que causa hipoxia tumoral, activando al HIF-1 $\alpha$  que promueve que las células produzcan más factores pro-angiogénicos como VEGF que estimula la angiogénesis (Chen W. *et al.* 2018; Liu *et al.* 2017).

En cáncer de mama se ha identificado que los fibroblastos asociados a carcinoma (CAF) promueven el crecimiento tumoral y la angiogénesis, al igual que los adipocitos y HIF-1 $\alpha$  ayudan a la invasión y la EMT; por otro lado, los derivados de plaquetas (factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- $\beta$ ) regulan la apertura de la barrera endotelial, permitiendo la migración transendotelial de células tumorales a través del receptor P2Y<sub>2</sub> y por lo tanto promueve la extravasación de células cancerosas, evadiendo la respuesta inmune y las señales apoptóticas para sobrevivir. La adherencia de las células tumorales a la MEC esta mediada por receptores transmembranales denominados integrinas que se encuentran en componentes de MEC como fibronectina, laminina, colágeno, fibrinógeno y vitronectina. Para que se lleve a cabo la invasión es necesario que se degrade la MEC por medio de metaloproteinasas (MMP) y para que exista una colonización a órganos distantes debe generarse una adaptación de las células tumorales al nuevo entorno, estos órganos tienen componentes celulares que facilitan la formación de nichos metastásicos (Liu *et al.* 2017).

En cáncer de mama para que se lleve a cabo la invasión se requiere de MMP-2 y 9, y del sistema activador de plasminógeno uroquinasa (uPA); cuando se colonizan órganos específicos como el cerebro, las células tumorales requieren de miRNAs y de IL-23 derivada de astrocitos para que secreten MMP e induzcan la pérdida de PTEN en las células cancerosas promoviendo la metástasis cerebral. Si las células tumorales tienen la capacidad de completar estos pasos, el proceso se puede repetir para producir metástasis secundarias (Chen *et al.* 2018; Scully *et al.* 2012; Figura 6).

## **2.2 microRNAs.**

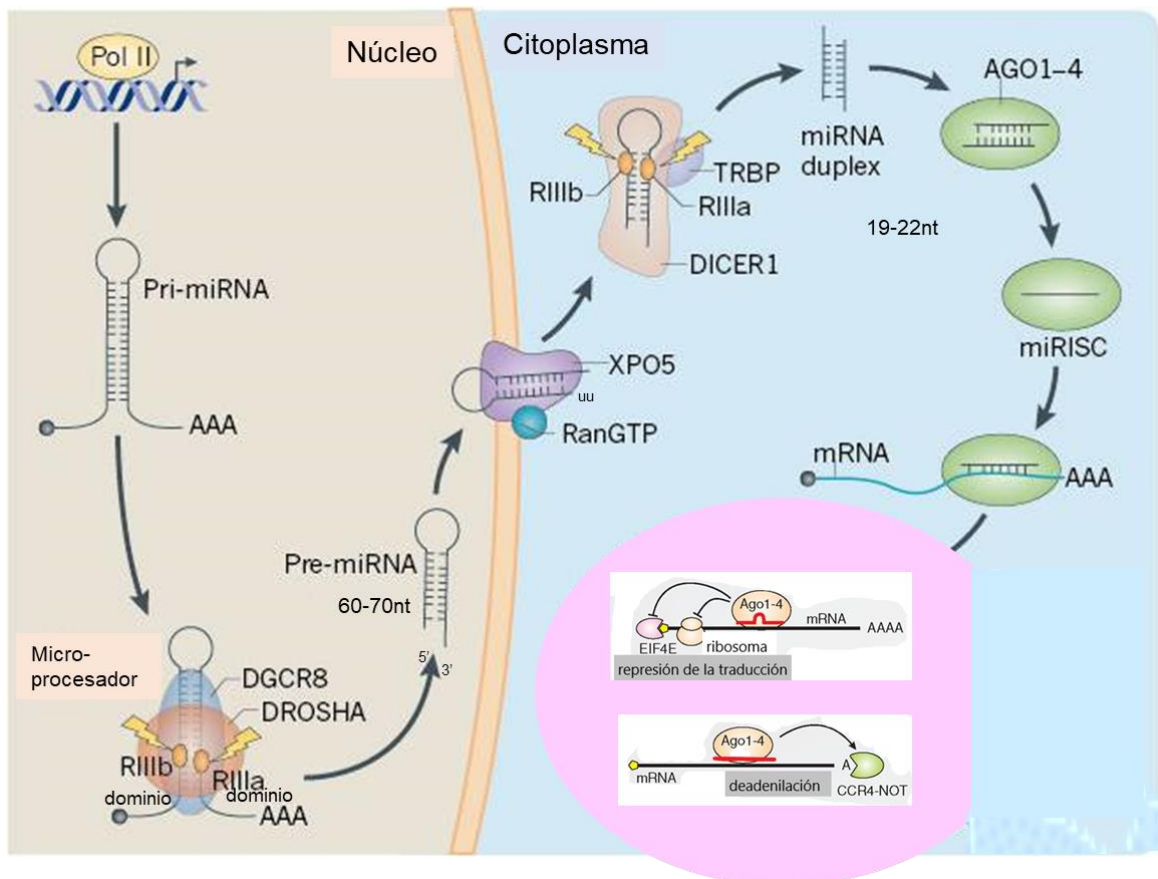
Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes con una longitud aproximada de 19-22 nucleótidos (nt) que regulan procesos esenciales a nivel post-transcripcional, la mayoría de los miRNAs se encuentran en intrones de transcritos codificantes y no codificantes de proteínas, aunque también se han identificado en exones y de acuerdo a la base de datos miRBase existen 2654 miRNAs maduros; estos reconocen secuencias en la región 3' no traducida (3'UTR) de los RNA mensajeros (mRNAs) y se unen de manera competitiva para modular el silenciamiento. Una vez que hibridan ambas cadenas se reclutan complejos multi-enzimáticos que degradan o almacenan al mRNA en cuerpos P (Hudder y Novak, 2008).



**Figura 6. Proceso metastásico en cáncer de mama.** Se muestran los factores extrínsecos e intrínsecos para generar un ambiente favorable para la célula tumoral y la formación de nichos primarios y secundarios pre-metastásicos que contribuyen a la invasión de órganos distantes. Tomada y modificada de López-Camarillo, *et al.* (2012).

Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II en una estructura de tallo y burbuja denominada pri-miRNA, que como cualquier RNA mensajero tienen un cap y una cola de poliA; este pri-miRNA es procesado por un complejo microprocesador conformado por una RNasa tipo III DROSHA y por la proteína de unión de RNA DGCR8 que escindirán el cap y la cola de poliA generando un miRNA precursor o pre-miRNA con una longitud de 60-70 nucleótidos y que tienen un extremo 3' rico en uracilos que es reconocido por la exportina 5 (XPO5) y con ayuda de RanGTP es exportado del núcleo al citoplasma para ser procesado por otro complejo microprocesador conformado por la proteína de unión al RNA transactivador (TRBP) y por una RNasa tipo III DICER que se encarga de escindir la estructura de burbuja, generando un miRNA dúplex con una longitud de 19-22 nucleótidos. Una vez que se genera el miRNA dúplex, éste es reconocido por proteínas catalíticas Argonauta (1-4) que seleccionaran a la cadena guía y se formara el complejo de silenciamiento inducido por el miRNA (miRISC), este será guiado hacia su mRNA blanco y reconocerá secuencias (región semilla) de ~7pb de elementos de reconocimiento del miRNA (MRE) en la región 3' no traducida (3'UTR) para actuar de dos formas en los cuerpos P, una es inhibiendo la traducción mediante el bloqueo de los factores de traducción o por otro lado, mediante la degradación total del mRNA mediante el uso de enzimas que degradan el cap (decapping) o la cola de poliA (Klinge C. 2018; Rupaimoole y Slack. 2017; Figura 7).

Los miRNA que se sobre-expresan en los tumores de mama se denominan oncomiRs, mientras que los miRNA que están regulados negativamente se denominan miRNAs supresores de tumor; sin embargo, un miRNA no siempre actuará como un oncomiR o un supresor tumoral, ya que su actividad depende del contexto celular (Hudder y Novak, 2008).

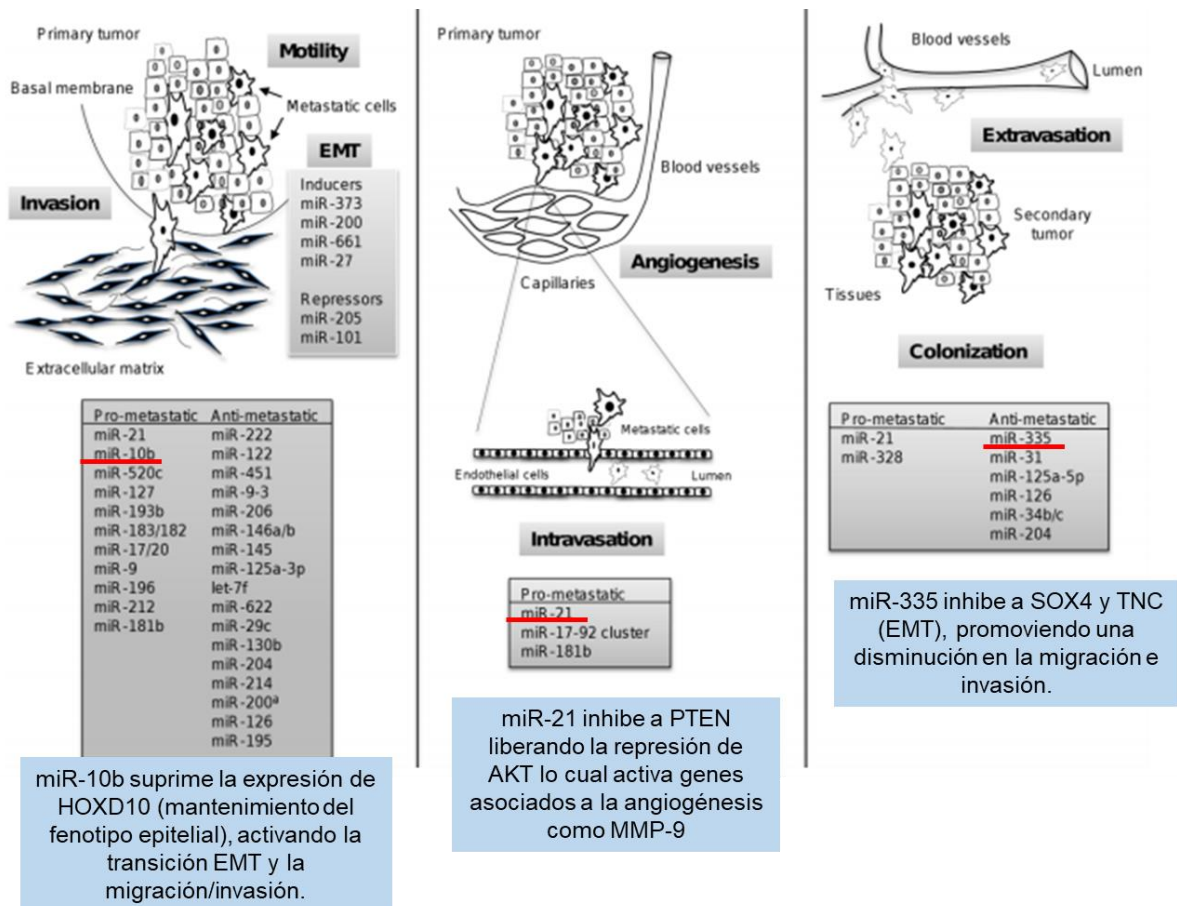


**Figura 7. Biogénesis de los miRNAs.** Los miRNAs se transcriben en el núcleo, luego se exportan al citoplasma para formar un complejo maduro miRISC y unirse a sus mRNAs blanco y de acuerdo con el grado de complementariedad inhibir la traducción o ser degradado en los cuerpos de procesamiento. Tomado y modificado de Lin y Gregory (2015).

### **2.3 Papel de los miRNAs en la metástasis tumoral**

Se han identificado una gran variedad de miRNAs implicados en el proceso metastásico, un miRNA bien estudiado es el miR-21 que promueve la metástasis siendo un blanco de este miRNA la proteína PTEN, al inhibir la expresión de esta proteína se libera de la represión a AKT que activa genes para promover la angiogénesis (Aigner A. 2011). Existen estudios sobre la regulación por macrófagos asociados a tumores (TAMs) y miRNAs oncogénicos que promueven la invasión de células de cáncer de mama, en este contexto los macrófagos son capaces de formar microvesículas (exosomas) que transportan proteínas o miRNAs (miR-223) a células adyacentes dentro del microambiente promoviendo la invasión; el miR-223 es específico de macrófagos M2 activados por IL-4 y asociado con la granulopoyesis humana (Yang *et al.* 2011).

Otro estudio implica a los pre-adipocitos que son uno de los componentes básicos en el microentorno tumoral (TME) y que son capaces de diferenciarse en tejidos adiposos, estos funcionan a través de la regulación negativa del receptor de andrógenos (AR) y de la modulación del miR-301a, induciendo las señales de TGF- $\beta$ 1 / Smad / MMP9, para aumentar la invasión de células de cáncer de próstata y por ende la metástasis (Xie *et al.* 2015). Tavazoie y colaboradores (2008) identificaron un conjunto de miRNAs endógenos reprimidos en cáncer de mama: miR-335, miR-126, miR-206, miR-122a, miR-199a y miR-489; posteriormente identificaron que mediante la restauración del miR-126 y miR-206 se inhibía el crecimiento y la proliferación tumoral, mientras que la restauración del miR-335 inhibió la migración e invasión celular a través del factor de transcripción de células progenitoras SOX4 y el componente de la matriz extracelular tenascina C, regulando un conjunto de genes asociados con el riesgo de metástasis distal (Figura 8).



**Figura 8. miRNAs que modulan la metástasis.** Algunos miRNAs funcionan como oncogenes y otros como supresores de tumor, regulando a genes que participan en las diferentes etapas del proceso metastásico e.g. miR-10b, miR-21 y miR-335. Tomada y modificada de López-Camarillo, *et al.* (2012).

## 2.4 miR-342-3p en cáncer

Los miRNAs pueden actuar como supresores de tumor o como oncomiRNAs, y esto depende de su expresión e interacción con sus sustratos blanco. Se ha identificado que el miR-342-3p tiene una expresión reprimida en tumores basales y triple negativo en diferentes tipos de cánceres; por ejemplo en cáncer cervical se correlacionó la alta expresión del factor de transcripción de mamíferos Forkhead Box M1 (FOXM1-un factor oncogénico) con la baja expresión del miR-342-3p, lo que desempeña un papel esencial en la invasión celular, metástasis y la transiciones epitelio-mesénquima, si se restablece la expresión del miR-342-3p estas características distintivas del cáncer son inhibidas (Li *et al.* 2014).

El miR-342-3p, localizado en el cromosoma 14q32.2 es un miRNA intrónico dentro del gen Ena/VASP (EVL, intrón 3, longitud de 25879 pb), la región promotora de su gen huésped tiene dos sitios de unión proximal al receptor de estrógeno. EVL es una proteína relacionada con la actina, que están implicadas en varios procesos asociados con la polaridad celular y la remodelación del citoesqueleto, como la guía axonal y lamellipodial y la dinámica filopodial en células migratorias (Ronchetti *et al.* 2008). Se ha identificado que el miR-342-3p y su gen huésped EVL en cáncer colorrectal son coordinadamente sobre reguladas bajo la poca frecuencia de metilación del DNA en el locus EVL/miR-342-3p y que al ser silenciado epigenéticamente (metilación) contribuye al proceso carcinogénico (Han *et al.* 2018); adicionalmente que la expresión del miR-342-3p también se encuentra coordinada con la expresión del ER positivo, confirmando una asociación positiva en aquellos tumores que presentan la expresión de este receptor comparado con aquellos tumores con ER negativos (Cittelly *et al.* 2010; Lowery *et al.* 2009).

En diversos trabajos en donde se analiza la expresión del miR-342-3p, se ha identificado que éste tiene un papel funcional como supresor de tumor, en donde su baja expresión se asocia con un pronóstico desfavorable y una supervivencia menor y con recaída (Romero-Córdoba *et al.* 2018). En la tabla III, se muestran diversos trabajos en diferentes tipos de cáncer donde se ha asociado su baja expresión con la progresión del tumor, migración, invasión y metástasis.

**Tabla III.** Blancos del miR-342-3p involucrados en la regulación de los sellos distintivos del cáncer.

<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Blancos</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<b>Mama</b>	MCT1	Inhibe metabolismo y proliferación.	Romero-Córdoba <i>et al.</i> (2018)
	ID4	Modula a BRCA 1.	Crippa E., <i>et al.</i> (2014)
<b>Cervical</b>	FOXO1	Inhibe apoptosis, migración e invasión.	Li <i>et al.</i> (2014).
<b>Hígado</b>	IKK- $\gamma$ , TAB2 y TAB3.	Inhibe proliferación e invasión	Zhao y Zhang (2015).
<b>Pulmón</b>	E2F1	Inhibe la progresión del ciclo celular y proliferación.	Tai <i>et al.</i> (2015).
	AGR2	Inhibe proliferación, migración e invasión.	Xue <i>et al.</i> (2018).
	RAP2B		Xie <i>et al.</i> (2015).
<b>Colorrectal</b>	DNMT1	Inhibe proliferación, migración e invasión.	Wang H. <i>et al.</i> (2011).

Por otro lado, en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), el grupo de la Dra. Alma Delia Campos analizó biopsias de tumores de mama primarios pertenecientes a pacientes que desarrollaron metástasis hacia el pulmón y tumores sin metástasis. Para ello realizaron un análisis de expresión global de miRNAs mediante RNA sequencing (RNA-seq) en la búsqueda de miRNAs que tuvieran una expresión diferencial en los tumores. Mediante este análisis se identificó que la expresión del miR-342-3p se reprimió significativamente en las muestras de tumores primarios que desarrollaron metástasis, por lo cual se decidió realizar su análisis funcional en el presente proyecto con la finalidad de entender su contribución en el fenómeno de metástasis (Martínez-Gutiérrez, *et al.* 2019).

## 2.5 Predicción de genes blanco del miR-342-3p

En la tabla IV se muestran algunos de los posibles genes blanco (319 transcritos) para el miR-342-3p de acuerdo con la base de datos TargetScan (<http://www.targetscan.org>), enfatizando al gen *EPC1* debido a que se ha identificado como un regulador importante de genes asociados con la metástasis en cáncer de mama y modificador de histonas (Wang *et al.* 2016).

**Tabla IV.** Genes blanco del miR-342-3p asociados con los sellos del cáncer obtenidos de la base de datos TargetScan, los blancos mostrados se seleccionaron en base a su implicación en el proceso tumoral.

Gen blanco	Transcrito representativo	Nombre del gen	Función
<b>Regulación epigenética</b>			
EPC1	ENST00000319778.6	enhancer of polycomb homolog 1	Componente del complejo NuA4 acetiltransferasa, participa en la activación transcripcional, crecimiento celular, senescencia replicativa, apoptosis y reparación del DNA.
EP300	ENST00000263253.7	E1A binding protein p300	Actividad acetiltransferasa, participa en el proceso apoptótico, respuesta al daño del DNA y en el ciclo celular.
HAT1	ENST00000392584.1	histone acetyltransferase 1	Acetilación de la histona H4 en 'Lys-5' (H4K5ac) y 'Lys-12' (H4K12ac) e histona H2A en 'Lys-5' (H2AK5ac).
KAT7	ENST00000259021.4	K(lysine) acetyltransferase 7	Participa en la acetilación de H3K14, la proliferación celular, regula la replicación del DNA y actuar como un coactivador.
METTL8	ENST00000375258.4	methyltransferase like 8	Probable metiltransferasa.
SETD7	ENST00000274031.3	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	Histona metiltransferasa que monometila H3Lys-4 para la activación transcripcional.

KMT2A	ENST00000534358.1	lysine (K)-specific methyltransferase 2A	Histona metiltransferasa que participa en el desarrollo temprano, la hematopoyesis y el proceso apoptótico
KMT2D	ENST00000301067.7	lysine (K)-specific methyltransferase 2D	Histona metiltransferasa (H3K4me) participa en la activación transcripcional y actúa como un coactivador para el receptor de estrógenos.
KDM6B	ENST00000254846.5	lysine (K)-specific demethylase 6B	Histona desmetilasa (H3Lys27), participa en la remodelación de la cromatina (miembros de la familia T-box). Respuesta inflamatoria a macrófagos.
KDM2A	ENST00000398645.2	lysine (K)-specific demethylase 2A	Histona desmetilasa (H3Lys36), puede unirse a proteínas fosforiladas y ubiquitina. Se asocia con centrómeros y reprime la transcripción de pequeños RNA no codificantes.
<b>Factores de transcripción</b>			
ID4	ENST00000378700.3	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	Participa en el crecimiento celular, senescencia, apoptosis, diferenciación, angiogénesis y transformación neoplásica.
FOSB	ENST00000592811.1	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Factor de transcripción de unión al DNA.
TFDP2	ENST00000499676.2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	Estimula la transcripción dependiente de E2F, el complejo E2F1: DP, media la proliferación celular y la apoptosis.
TBR1	ENST00000389554.3	T-box, brain, 1	Involucrado en procesos de desarrollo.
TXK	ENST00000264316.4	TXK tyrosine kinase	Regulación de la respuesta inmune adaptativa.

FOXQ1	ENST00000296839.2	forkhead box Q1	Unión al DNA, RNA polimerasa II y participa en la diferenciación del folículo piloso.
NKX2-2	ENST00000377142.4	NK2 homeobox 2	Desarrollo de células $\beta$ productoras de insulina en el páncreas.
CEBPG	ENST00000284000.4	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	Regulación positiva de la reparación del DNA.
FBXL20	ENST00000394294.3	F-box and leucine-rich repeat protein 20	Papel en la transmisión neural.
<b>Migración celular</b>			
SYNPO2L	ENST00000372873.4	synaptopodin 2-like	Proteína asociada a actina y regulación positiva de la transducción de señal de la proteína Rho.
CSK	ENST00000220003.9	c-src tyrosine kinase	Regulación del crecimiento celular, la diferenciación, la migración y la respuesta inmune.
TTBK2	ENST00000267890.6	tau tubulin kinase 2	Regulador de la ciliogénesis, organización del citoesqueleto y en migración celular.
EDA	ENST00000374553.2	ectodysplasin A	Citoquina que participa en la señalización epitelial-mesenquimatosa.
MTDH	ENST00000336273.3	metadherin	Promueve el crecimiento de melanocitos y astrocitos, componente clave en la expansión de las células tumorales. Participa en el proceso apoptótico, angiogénesis y señalización de $\kappa\beta$ .
RASA1	ENST00000456692.2	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	Regulador inhibitorio de la vía del AMP Ras-cíclico, regulación negativa del proceso apoptótico y vasculogénesis.

## 2.6 Regulación epigenética del cáncer

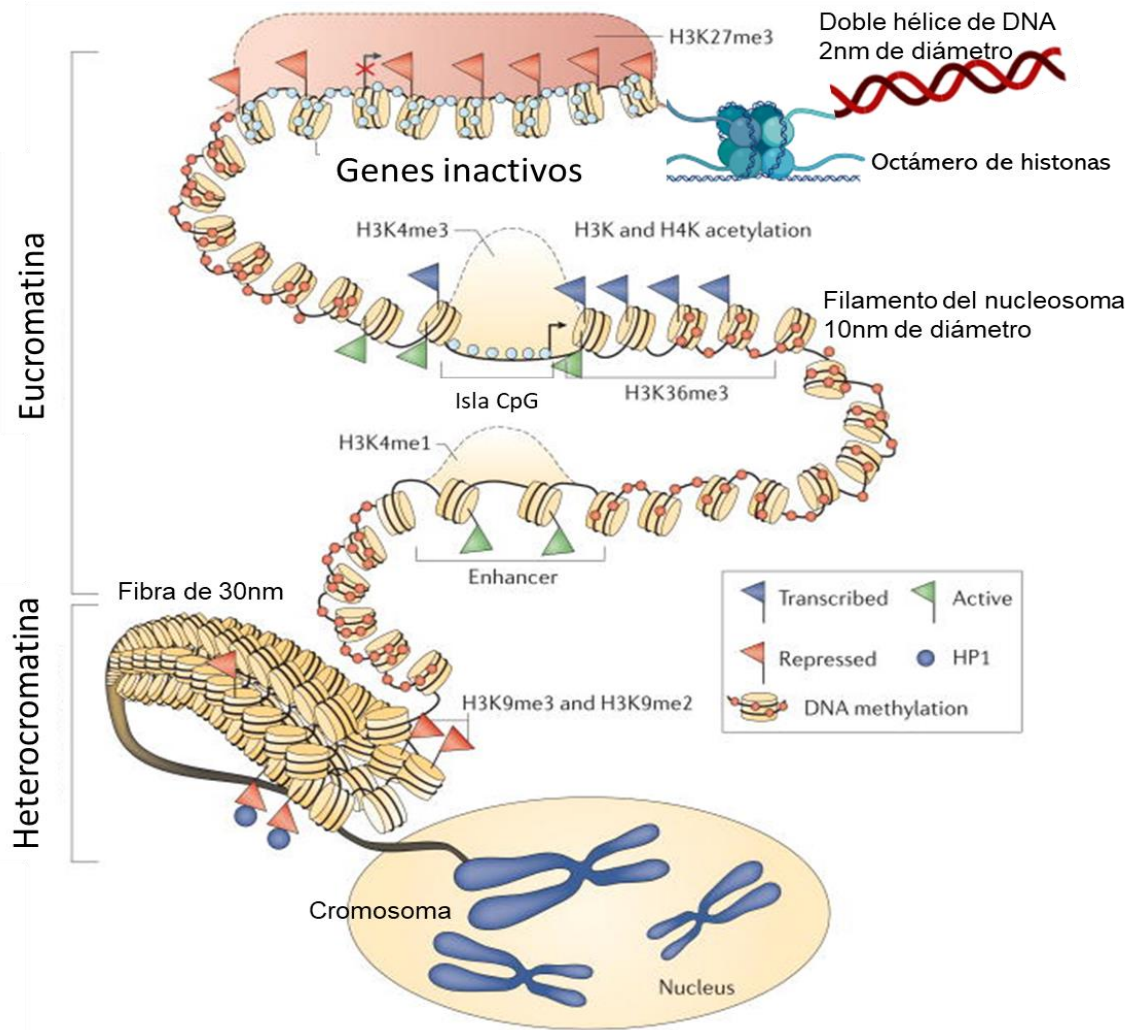
Las modificaciones epigenéticas juegan un papel muy importante en la regulación del control de la expresión génica, y su desregulación se ha asociado con el desarrollo de enfermedades complejas y su transformación maligna. La cromatina es el complejo de DNA y proteínas denominadas histonas que se encargan de la organización de todo el genoma, la unidad funcional básica de la cromatina es el nucleosoma que contiene 147pb de DNA que se envuelven alrededor del octámero de histona con dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, y con la histona H1 que las enlaza. La cromatina se puede dividir en dos regiones principales: la heterocromatina, que está altamente condensada, tardía en replicarse y contiene principalmente genes inactivos; y la eucromatina, que está relativamente descondensada y contiene la mayoría de los genes activos (Baylin y Jones, 2011; Figura 9).

Una forma de modular el papel de la cromatina como participante activo y dinámico en múltiples procesos es mediante la modificación postraduccional (PTM) al DNA y a las histonas a través de enzimas modificadoras de cromatina que alteran las interacciones no covalentes dentro y entre los nucleosomas de una manera altamente regulada; y funcionan como sitios de acoplamiento para proteínas especializadas con dominios únicos que reconocen específicamente estas modificaciones. De acuerdo con Dawson y Kouzarides (2012) existen cuatro modificaciones al DNA que incluye la metilación de las islas CpG principalmente en centrómeros, telómeros, cromosoma X inactivo y secuencias repetidas; por su parte hay al menos 16 modificaciones a histonas que reprimen o activan genes las cuales incluyen: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otras, estas modificaciones no son estáticas si no un paisaje dinámico y complejo que evoluciona de manera dependiente del contexto celular (Huang *et al.* 2011).

Una marca fundamental de la cromatina es la acetilación de histonas (HAT) que está involucrada en las modificaciones de la estructura de la cromatina, reparación al DNA y transcripción; esta modificación implica alteración de vías de señalización con pérdida o ganancia de la función, generando consecuencias graves para la célula. La HAT es un mecanismo clave para la activación transcripcional, modificando los residuos de lisina en el grupo épsilon NH<sub>2</sub>-terminal de las histonas

mediante la transferencia de grupos acetilo de acetil-CoA neutralizando la carga positiva de lisina y, en consecuencia, debilitando la interacción electrostática entre las histonas y el DNA cargado negativamente que da como resultado una conformación abierta de los nucleosomas y una mayor accesibilidad de las proteínas reguladoras del DNA. La acetilación de lisina también sirve para la unión de varias proteínas con bromodominios y dedos de homeodominio en tándem (PHD) (Audia y Campbell, 2016; Khan *et al.* 2012).

Se ha identificado que varias HAT se encuentran alteradas genéticamente en una variedad de cánceres, por lo cual son blancos atractivos para las intervenciones terapéuticas. Existen dos clases de HAT, el tipo A que son principalmente nucleares y pueden clasificarse ampliamente en familias GNAT, MYST y CBP / p300; y el tipo B que son predominantemente citoplasmáticas y modifican histonas libres. Los miembros de esta familia incluyen a importantes coactivadores transcripcionales como p300, proteína de unión al elemento sensible a p300/cAMP (CBP), el factor asociado a la CBP (PCAF) y la proteína del complejo de polycomb homóloga potenciadora 1 (EPC1) que forma parte del complejo NuA4 que pueden catalizar la acetilación de histonas y otros sustratos, desempeñando un papel fundamental en las funciones diferenciales de la expresión génica en cáncer (Avvakumov y Côté, 2007).

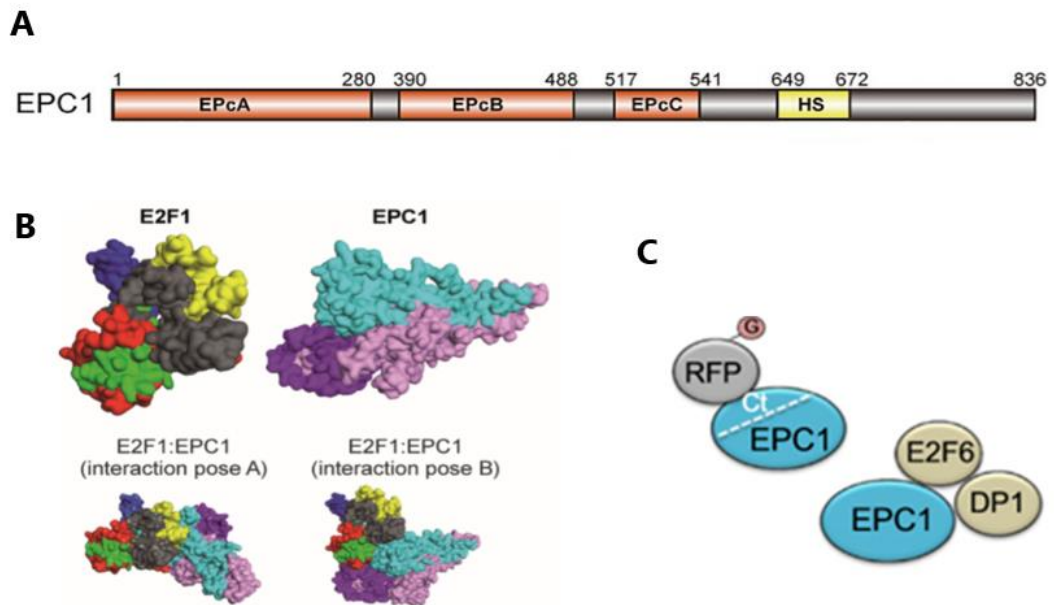


**Figura 9. Esquema de la organización de la cromatina y su regulación mediante modificaciones epigenéticas.** Se muestra DNA alrededor de las histonas para formar los nucleosomas, estos se organizan en fibras de 30nm que a su vez se ensamblan en dominios de asas que se compactan durante la mitosis para formar los cromosomas. Se muestran modificaciones para la activación o represión de genes, ejemplificando que hay un amplio dinamismo en la regulación génica. Tomada y modificada de Baylin y Jones (2011).

## **2.7 Proteína potenciadora homóloga del complejo de polycomb 1 (EPC1).**

EPC1 es un miembro de la familia de proteínas del grupo de polycomb (PcG) las cuales son bien conocidas por su papel en el silenciamiento de genes homeóticos durante el desarrollo embrionario; existen dos grupos en función con su asociación con complejos multiméricos que son PRC1 que se ha visto que tiene una función enzimática mediante la ubiquitinación de la histona H2A en K119 (H2AK119), así como una función no enzimática a través de la compactación de polinucleosomas. Por otro lado, el grupo PRC2 realiza la función de metilación de la histona H3 en K27 (H3K27me3). Se ha visto que los miembros de PcG tienen niveles de expresión aumentados en diferentes tipos de cáncer como en próstata y colon, por su parte la proteína EPC1 se describió recientemente asociada a una firma genética de genes metastásicos en cáncer de mama y de vejiga; además EPC1 se une al factor transcripcional E2F1 de manera específica con su dominio de unión al DNA y su expresión correlacionada es indispensable para la progresión del tumor (Wang, *et al.* 2016; Figura 10).

EPC1 forma parte del complejo NuA4/TIP60 que es una de las HAT más potentes que puede acetilar preferentemente las histonas H2A y H4, adicionalmente este complejo puede sufrir otras modificaciones postraduccionales tales como ubiquitinación y metilación (Doyon y Côté, 2004). La proteína EPC1 en el extremo N contiene dominios EPcA, EpcB y EPcC y en su extremo C-terminal se ha visto que puede interactuar con diferentes factores transcripcionales como el represor proteína del dedo RET (RFP). Asimismo, se ha identificado que participa en diversos procesos biológicos tales como regulación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación y respuesta al daño del DNA. Se ha encontrado evidencia de que EPC1 es importante en cáncer ya que funciona como onco-proteína al ser regulada por el factor de transcripción E2F1 y E2F6, se ha visto que la sobreexpresión de EPC1 se correlaciona con la progresión de la enfermedad y la baja sobrevivencia del paciente (Searle y Pillus, 2018; Wang *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2020; Figura 10).



**Figura 10. Proteína potenciadora 1 del complejo de polycomb (EPC1).** A) Esquema de la organización de los dominios de la proteína EPC1 donde se muestra: EPc, potenciador de Polycomb; HS, segmento hidrofóbico; ZnF, dedo de zinc. B) Estructuras tridimensionales del complejo EPC1-E2F1 y de las proteínas individuales. Modelo de EPC1 con dominio EPC1-A en color cian, dominio EPC1-B en púrpura y región EPC1-CQCT en color lila (arriba a la derecha). E2F1 con dominio de unión al DNA en verde, dominio de dimerización en rojo, dominio de transactivación en azul y dominio de unión de ciclina/CDK2 en amarillo. C) Interacción de EPC1 con represores transcripcionales como RFP y E2F6-DP1. Tomada de Wang *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2020).

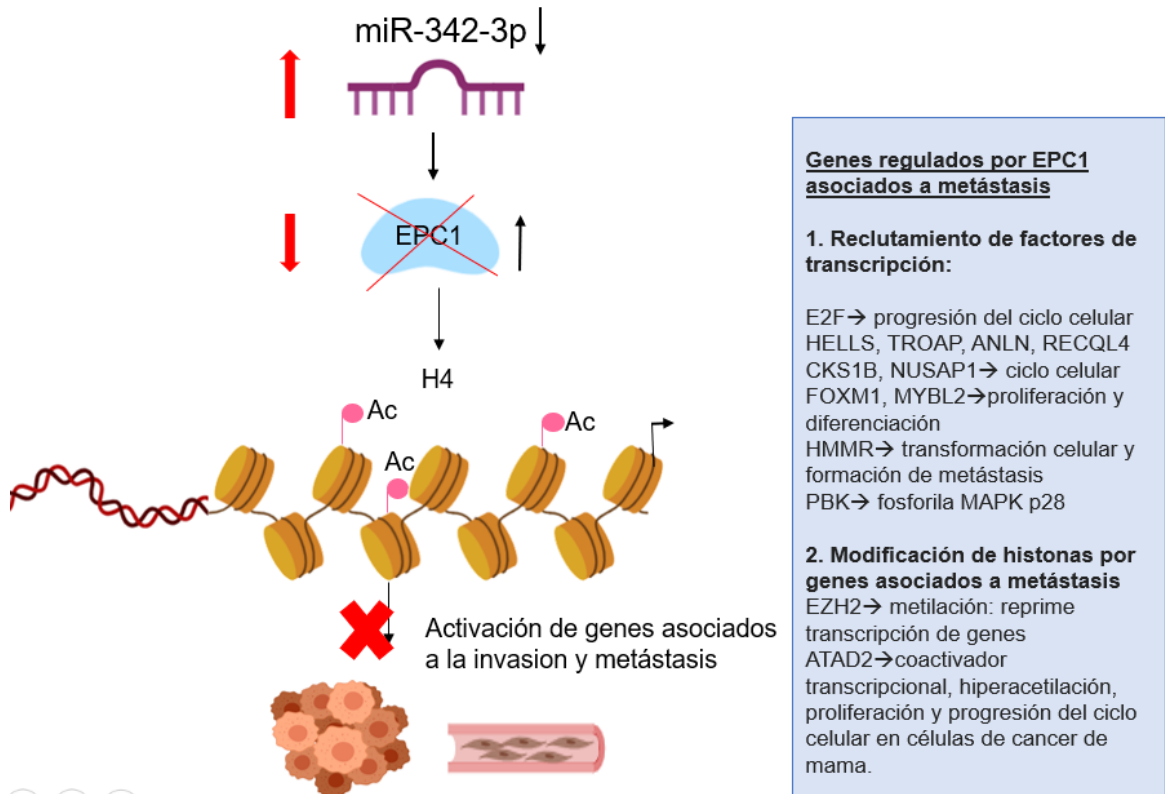
## **2.8 Regulación de la maquinaria epigenética mediante miRNAs**

La expresión de los miRNAs se encuentra regulada por múltiples redes transcripcionales y por la maquinaria epigenética, este último modo de regulación se debe principalmente a que los genes o proteínas blanco de los miRNAs pueden sufrir modificaciones epigenéticas tales como la metilación del DNA o las modificaciones de histonas específicas (acetilaciones o desacetilaciones), provocando la activación o represión de genes implicados en el desarrollo de enfermedades. Las modificaciones epigenéticas en las regiones promotoras de los genes y la regulación del miRNA en la región 3' UTR son considerados dos mecanismos reguladores (Wang *et al.* 2012).

El miR-127 en cáncer de próstata, miR-124a en múltiples tumores sólidos, miR-34b-34c en cáncer hematológico, miR-9 en cáncer de mama metastásico, miR-1 en cáncer colorrectal y el miR-203 en linfomas y leucemias; todos en conjunto se han identificado hipermetilados favoreciendo el desarrollo del tumor y además en algunos casos la progresión hacia un estado maligno e invasivo. Por otro lado, los miRNAs también se pueden desregular por reguladores epigenéticos como las desacetilasas de histonas (HDACs), estas HDACs en algunos casos de cáncer se encuentran sobreexpresadas mediando el silenciamiento epigenético de miRNAs como miR-15a, miR-16 y miR-29b en leucemia linfocítica crónica; si se inhiben a las HDACs se pueden restablecer estos miRNAs y por consiguiente la disminución de blancos anti-apoptóticos (Malumbres, 2013).

Los miRNAs por sí solos pueden ser reguladores epigenéticos, ya que estos reclutan complejos de proteínas específicas para el DNA genómico y algunos promotores que modulan la expresión de genes; en carcinoma hepatocelular se identificó que el miR-224 y p300 se encuentran sobre-expresados, para conocer si entre ellos se modulan se utilizó un inhibidor específico para p300 (C646), identificándose que el miR-224 inhibía también su expresión. Lo anterior implica que los mecanismos epigenéticos y los miRNAs contribuyen para establecer perfiles de expresión génica particulares, y que cualquier alteración en el sistema cooperador conduce al desarrollo de enfermedades (Ott M. y Verdin E. 2010; Wang *et al.* 2012).

### III. MODELO DE TRABAJO



**Figura 10. Modelo de trabajo del posible mecanismo del miR-342-3p y EPC1 analizados.** Se ha identificado que en células tumorales el miR-342-3p tiene una baja expresión y que la proteína EPC1 tiene una alta expresión, se ejemplifica que al sobre expresar al miR-342-3p se inhiba EPC1 y no se activen genes implicados con el proceso metastásico como 1) factores transcripcionales y 2) modificadores de histonas (Wang *et al.* 2012).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Si el miR-342-3p inhibe a EPC1, entonces disminuirá la migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama.

#### **V. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte a nivel mundial en mujeres. La metástasis es uno de los sellos distintivos del cáncer más devastante por lo que su estudio a nivel molecular puede coadyuvar en la identificación de nuevos genes con potencial terapéutico.

El miR-342-3p se ha identificado como un supresor de tumor y se encuentra reprimido en diferentes tipos de cáncer, sin embargo, se desconoce su papel en la regulación epigenética de genes asociados al proceso metastásico en cáncer de mama. Por lo cual se espera que los resultados obtenidos en este proyecto ayuden a comprender mejor el mecanismo de acción del miR-342-3p en cáncer de mama.

## **VI. OBJETIVOS**

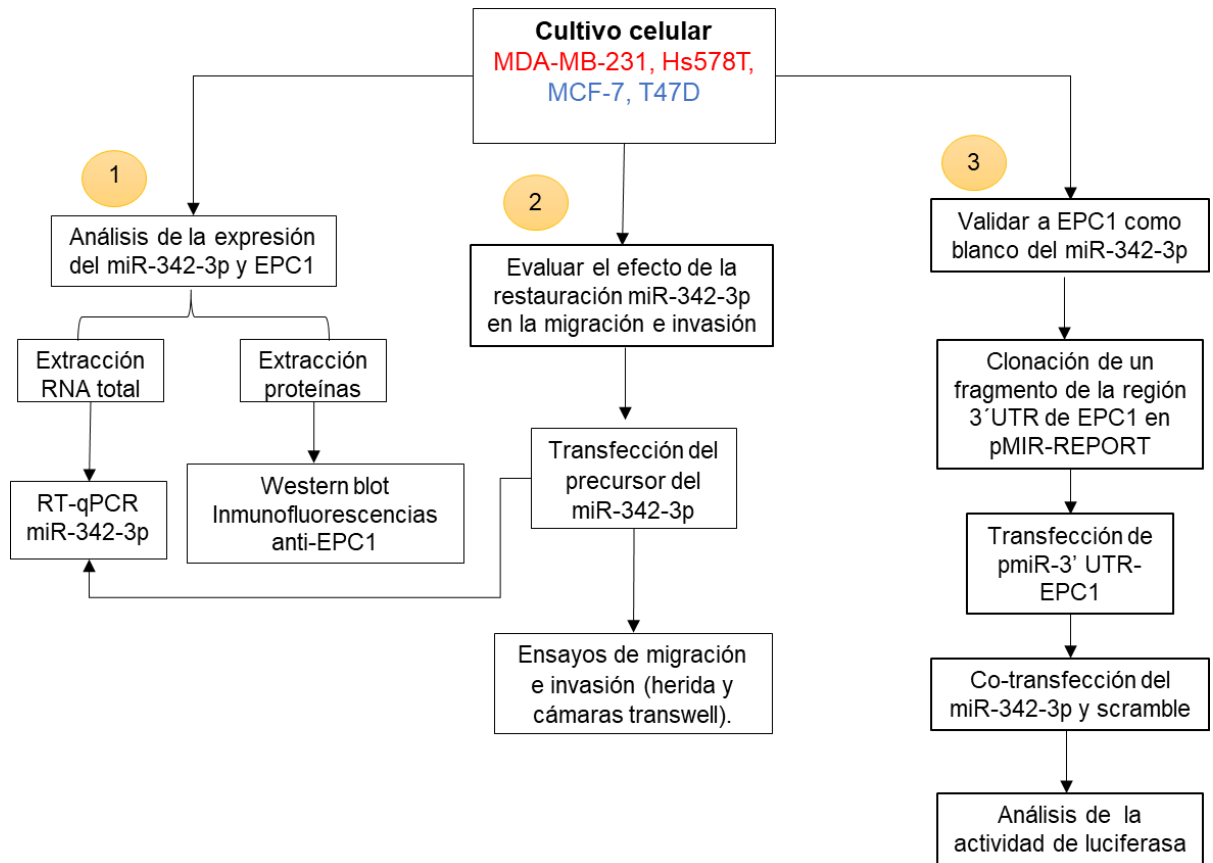
### **Objetivo general**

Determinar el papel del miR-342-3p en la regulación de EPC1 y su impacto en la migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama.

### **Objetivos particulares**

1. Analizar la expresión del miR-342-3p y EPC1 en líneas celulares de cáncer de mama con alta (MDA-MB-231, Hs578T) y baja capacidad metastásica (MCF-7, T47D).
2. Evaluar el efecto de la restauración miR-342-3p en la migración e invasión en dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y Hs 578T).
3. Validar a EPC1 como un transcrito blanco del miR-342-3p.

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

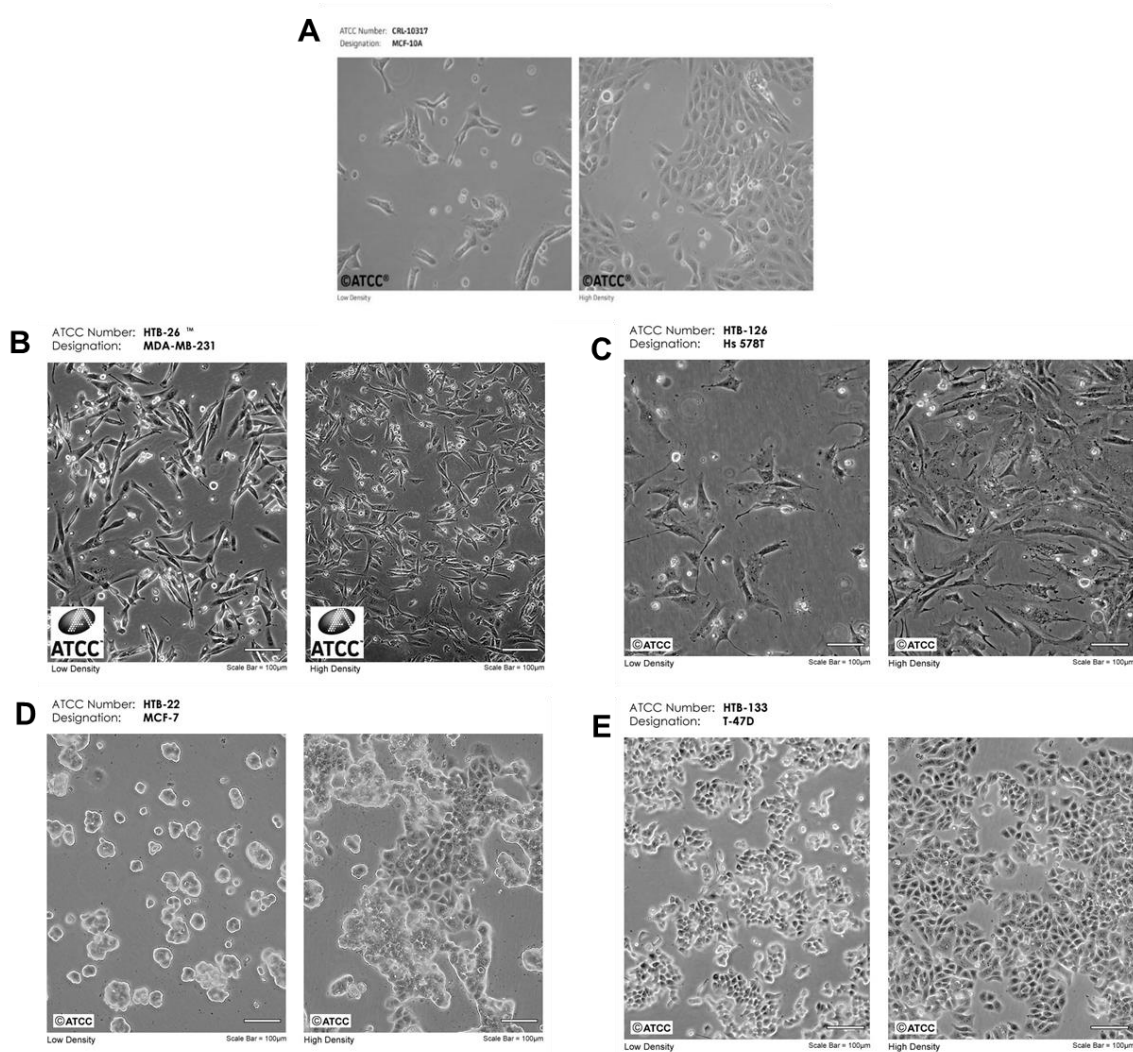


## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Líneas celulares derivadas de tejido mamario y de cáncer de mama.

La línea celular de tejido mamario no tumoral empleada fue MCF-10A la cual fue obtenida de una mujer de 36 años con enfermedad fibroquística y la cual tenía etnicidad caucásica (Figura 11). Las líneas celulares adherentes de cáncer de mama empleadas fueron: MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D derivadas de sitios metastásicos. Todas fueron obtenidas de la Colección de Cultivo Tipo Americana (ATCC).

**MDA-MB-231** es una línea celular tumoral subtipo basal, la cual tiene una baja expresión en claudina, obtenida de un sitio metastásico pulmonar por efusión pleural, de una mujer de 51 años con adenocarcinoma y etnicidad caucásica. Expresan a los receptores: factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) y al oncogén WNT7B; el tiempo de duplicación de la población es de 24 horas. La línea celular **Hs 578T** es un subtipo basal también con una expresión disminuida de claudina, derivada de carcinoma de una mujer de 74 años con etnicidad caucásica. No se expresa el ER, PR ni HER2; el tiempo de duplicación de la población es de 26 horas. La línea **MCF7** es una línea celular subtipo luminal A, derivado de un sitio metastásico pulmonar obtenida por efusión pleural de una mujer de 69 años con adenocarcinoma y etnicidad caucásica. Expresa al ER+ y al oncogén WNT7B, a la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP) BP-2, BP-4 y BP-5; el tiempo de duplicación de la población es de 29 horas. **T-47D** es una línea celular subtipo luminal A, derivada de un sitio metastásico pulmonar por efusión pleural de una mujer de 54 años con carcinoma ductal. Esta línea expresa al receptor de calcitonina, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de glucocorticoides positivo, prolactina, receptor de andrógenos y al oncogén WNT7B; el tiempo de duplicación de la población es de 32 horas.



**Figura 11. Líneas celulares utilizadas en este trabajo.** A) MCF-10A, B) MDA-MB-231, C) Hs 578T, D) MCF-7, E) T-47D. Tomadas de ATCC.

### 1.1 Mantenimiento de las células

Las líneas celulares se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-Gibco, Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS-Gibco, Life Technologies), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Se incubaron en cajas de poliestireno T25 para células adherentes (Thermo Fisher Scientific) a 37°C en una cámara humidificada suplementada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2 Tripsinización de las células

Una vez que las células estaban en confluencia (80% de células crecidas en las cajas T25), se realizó el subcultivo de las líneas celulares para el cual se retiró el medio de cultivo de cada caja y las células se lavaron tres veces con Buffer de

Fosfato Salino (PBS) (ver apéndice), posteriormente el PBS 1X se eliminó y se adicionaron 1.5 mL de PBS-EDTA 1X pH 7.0/6.8 mM (ver apéndice), más 50  $\mu$ L de tripsina al 0.25% (Gibco-Life Technologies); distribuyendo homogéneamente la solución en las células y estas fueron incubadas durante cinco a diez minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se golpeó ligeramente la caja y se visualizaron en el microscopio óptico para corroborar que las células estuvieran completamente despegadas, se agregó 1 mL de medio DMEM para detener la reacción de la tripsina y las células despegadas se recuperaron en un tubo falcón de 15 mL para centrifugarse a 1,500 rpm/ 5 minutos; el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido que contenía las células fue diluido en 1 mL de medio DMEM suplementado con FBS y antibiótico. Una vez divididas las células se contaron mediante el uso de una cámara de Neubauer y se sembraron 1 x 10<sup>6</sup> células en cajas T25 de 70 mL nuevas y estériles debidamente rotuladas (nombre de la línea celular, numero de pase, medio en el que se mantiene, nombre del responsable y fecha) con medio necesario (5 mL) y se dispensaron adecuadamente agitándose suavemente de izquierda a derecha y de adelante hacia atrás para repartirlas en toda la superficie para su crecimiento, manteniéndose en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta que estuvieran de nuevo confluentes para su división o la realización de los experimentos correspondientes.

### 1.3 Congelamiento de las células

Para llevar a cabo el procedimiento de congelamiento de células, se siguió el proceso de subcultivo celular hasta la obtención del pellet que contenía aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células. Una vez obtenida la pastilla de células, se adicionaron 700  $\mu$ L de DMEM suplementado (ver apéndice), 200  $\mu$ L de FBS y 100  $\mu$ L de dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10% (Sigma-Aldrich) para su congelamiento. Las células se colocaron en un criotubo y se mantuvieron durante 30 minutos a -20°C, transcurrido ese tiempo se conservaron a -80°C hasta su uso.

### 1.4 Descongelamiento de células

Para el descongelamiento de las células, el criotubo se mantuvo en hielo y posteriormente se colocó en baño a 37°C; el contenido del vial se transfirió a un tubo falcón de 15 mL y a este se le adicionaron 2 mL medio suplementado para

detener la acción del DMSO. El contenido se centrifugó a 1,500 rpm/ 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, el pellet de células se diluyó en 1 mL de medio nuevo y se colocó en una caja nueva estéril con medio DMEM suplementado, dispensando el contenido homogéneamente en la caja y las células se mantuvieron en condiciones de cultivo celular.

## **2. Extracción de RNA total a partir de cultivos celulares.**

Las células a las cuales se realizaba la extracción de RNA fueron crecidas en microplacas de poliestireno de 6 pozos con fondo plano para células adherentes (Corning™), estas se lavaban tres veces con PBS 1X frío para retirar células muertas y detritos. Una vez lavadas las células, se adicionaba en cada pozo 500 µL a 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se raspaba el pozo de la placa con una punta de 200 µL para ayudar a la lisis celular; el contenido se colectaba en un tubo eppendorf de 1.5 mL siempre manteniendo en hielo la muestra y se mezcló usando vórtex durante 15 segundos e incubaban los tubos en hielo por 5 minutos, transcurrido el tiempo se le añadió 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol utilizado y se mezcló por inversión, se dejó incubando por 3 minutos. Posteriormente se centrifugó el tubo a 12,000 rpm/ 10 minutos/ 4°C, recuperando la fase acuosa en tubos eppendorf nuevos y se le adicionó 500 µL de isopropanol que se dejó incubando a temperatura ambiente sobre hielo por 30 minutos para que precipitara el RNA. Se separó nuevamente la fracción celular por centrifugación a 12,000 rpm/ 15 minutos/ 4°C, eliminando el sobrenadante y se realizó un lavado a la pastilla con etanol al 70% realizando una última centrifugación a 6,000 rpm/ 5 minutos/ 4°C; se eliminó sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar la pastilla aproximadamente por 15 minutos con el tubo eppendorf invertido. Una vez seca la pastilla se colocó de nuevo en hielo y se resuspendió con 20 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (UltraPure™, Thermo Fisher Scientific).

Una vez obtenido el RNA se cuantificó mediante el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 y 280 nm, si el RNA tenía una relación de densidad óptica 260/280 mayor o igual a 1.8 pero menor de 2 se consideraba libre de proteínas que interfirieran con nuestros análisis y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se comprobó la integridad del RNA extraído, las muestras se almacenaron a -80°C.

### **3. Análisis de la expresión del hsa-miRNA-342-3p empleando sondas Taqman.**

Para determinar la expresión del miR-342-3p en líneas celulares de cáncer de mama, el RNA obtenido de las cuatro líneas celulares tumorales: MDA-MB-231, Hs 578T, MCF7, T-47D y la el RNA de la línea no tumoral MCF-10a fue donado por el grupo de la Dra. Alma Delia Campos Parra; estos fueron sintetizados inicialmente a cDNA mediante la utilización de sondas stem loop RT (Applied Biosystems) específicas del miR-342-3p y se utilizó como control endógeno la sonda específica del RNA pequeño nucleolar (RNU48).

Para realizar la retro transcripción (RT-PCR) del RNA, se colocaron en un tubo de PCR para un volumen total de 15  $\mu$ L de reacción: 10 ng de la muestra, 3  $\mu$ L de primer RT, 0.15  $\mu$ L de dNTPs (100 mM), 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ $\mu$ L), 1.5  $\mu$ L de buffer de transcripción 10X, 0.19  $\mu$ L de inhibidor de RNAsa (20 U/ $\mu$ L) y 4.16  $\mu$ L de agua libre de RNasa. El contenido se resuspendió mediante pipeteo suave y se incubaron las muestras durante 5 minutos en hielo, los tubos se colocaron en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems) programado con tres temperaturas: 16°C/ 30 minutos; 42°C/ 30 minutos y 85°C/ 5 minutos, se adicionó una última temperatura a 4°C por tiempo indefinido ( $\infty$ ) para mantener la reacción.

Posteriormente a la reacción de RT-PCR, se procedió a montar la PCR en tiempo real mediante la utilización de sondas TaqMan, para lo cual se colocaron en placas de 96 pozos específicas para el termociclador (placas ópticas) los siguientes reactivos por pozo para una reacción final de 20  $\mu$ L: 1.33  $\mu$ L del producto de la reacción de RT, 10  $\mu$ L de master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2X), 7.67  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ L de la sonda PCR (específica para cada miRNA y para el control RNU48); cada una de estas reacciones se realizó por triplicado. La reacción se corrió en un equipo 7500 de Applied Biosystems, con las siguientes condiciones: 95°C/ 10 minutos, continuado por 40 ciclos con dos temperaturas, una de 95°C/ 15 segundos y la última a 60°C/ un minuto. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de doble Delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), usando como calibrador la expresión del miRNA en la muestra control (línea celular no tumoral MCF-10A) y como normalizador, la

expresión del gen endógeno RNU48. Se realizaron triplicados técnicos y experimentales para el análisis estadístico.

#### **4. Transfección del precursor del hsa-miRNA-342-3p en células MDA-MB-231 y Hs 578T.**

Las líneas celulares de cáncer de mama se transfectaron con la molécula precursora del miR-342-3p o con una secuencia scramble denominada pre-miR-ctrl-negativo a una concentración de 30 nM. El procedimiento para la transfección fue el siguiente: primero se sembraron 250 000 células MDA-MB-231 y Hs 578T por pozo en placas de seis pozos con fondo plano para células adherentes (Corning™), las células se mantuvieron en condiciones de cultivo y se esperó a que tuvieran un 70% de confluencia para ser transfectadas con la mezcla que contenía al precursor del miRNA o la secuencia scramble. La transfección se realizó con el reactivo Lipofectamina 2000® (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante, para lo cual en un tubo eppendorf de 1.5 mL se preparó la mezcla que incluyó 100 µL de medio de transfección Opti-MEM® (Gibco-Life Technologies) con 5 µL del agente de transfección Lipofectamina 2000® por cada pozo a transfectar, al mismo tiempo en otro tubo eppendorf se colocaron 100 µL de medio Opti-MEM® con 7.5 µL del precursor pre-miR-342-3p o del scramble a una concentración de 10 µM; los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se adicionó el contenido de la mezcla con el reactivo de transfección a cada condición ya sea al que contenía el precursor o el scramble y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se colocó en cada pozo junto con medio suplementado DMEM (hasta un volumen final en cada pozo de 2.5 mL), se agitó suavemente la placa con movimientos circulares durante un minuto y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su análisis. La expresión relativa del miRNA se evaluó 48 horas post-transfección mediante RT-qPCR usando sondas TaqMan como se describió anteriormente, este ensayo se realizó por triplicado técnico y experimental.

#### **5. Ensayo de cicatrización *in vitro* (Wound-healing assay).**

Se sembraron 250,000 células MDA-MB-231 y Hs 578T por pozo en una placa de seis pozos con fondo plano para células adherentes (Corning™), estas se colocaron con diferentes condiciones: células sin transfectar y células transfectadas con

control negativo scramble y con el precursor del miR-342-3p como se explica anteriormente; se esperó la condición de que las células formen una monocapa cerrada. Posteriormente se realizaron cuatro heridas cruzadas de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  usando una punta estéril de 100  $\mu\text{L}$  y se lavaron las células con PBS 1X para capturar una imagen mediante uso de microscopio óptico de cada herida en el tiempo inicial es decir tiempo cero, se adicionó medio suplementado DMEM y las células con la herida realizada se incubaron en condiciones de cultivo. Se consideraron cuatro tiempos para la obtención de las imágenes de las heridas siendo 0, 12, 24 y 48 horas después de realizar la herida. Las imágenes fueron analizadas con ayuda del software my Image Analysis v2.0 software (Thermo Scientific) y los resultados se reportaron como porcentaje de cicatrización de herida a través del análisis de reducción del área de la herida, considerando como 100% el área de la herida documentada en el tiempo cero o como porcentaje de las células que migran hacia la herida, respectivamente. Este experimento se realizó por triplicado técnico y experimental.

## **6. Ensayo de invasión celular *in vitro*.**

Para el ensayo de invasión se realizó empleando cámaras Transwell (Corning, poro 0.8 micras- $\mu\text{m}$ ), se colocaron 250,000 células MDA-MB-231 y Hs 578T por pozo en una placa de seis pozos con fondo plano para células adherentes (Corning<sup>TM</sup>), se transfectaron como se describió anteriormente y las células se despegaron 48 horas después de la transfección mediante tripsina 0.25%/PBS-EDTA. Un día antes de despegar las células y resembrarlas en las cámaras transwell, estas se incubaron a 4°C, además de tubos eppendorf de 1.5 mL, puntas, PBS 1X y matrigel. Se diluyeron 500  $\mu\text{L}$  de matrigel que fue previamente incubado a 4°C en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X frío, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de matrigel 1X en el compartimiento superior de la cámara transwell y se incubaron durante una hora a 37°C. Posteriormente, se adicionará 600  $\mu\text{L}$  de medio complementado y atemperado en el compartimiento inferior de la cámara transwell y 100  $\mu\text{L}$  de medio sin complementar en la parte superior (donde está la capa de matrigel) y se sembraron 100, 000 células en la parte superior de la cámara transwell. Las cámaras se incubaron a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  durante 16 a 48 horas, pasando ese tiempo se retiró el inserto y se observó si invadieron células en el fondo del pozo, si fue así se lavaron los pozos con PBS 1X y las células fueron fijadas con paraformaldehído durante 30 minutos,

posteriormente se lavó bien el pozo y el número de células invasivas que son capaces de degradar las proteínas de la matriz se contabilizan manualmente en cuatro campos con ayuda de un microscopio óptico.

## **7. Obtención de extractos de proteínas totales.**

Para la extracción de proteínas totales, las líneas celulares MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D de cáncer de mama se mantuvieron en cultivo hasta tener un 80% de confluencia para poder realizar el proceso de subcultivo celular mediante el uso de tripsina 0.25%/PBS 1X-EDTA como se describió anteriormente, sin embargo al recuperar el pellet de células este fue lavado con PBS 1X frío y resuspendido con 900  $\mu$ 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 100  $\mu$ L de cóctel de inhibidores de serín-proteasas, cisteín-proteasas y metaloproteasas 10X (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Posteriormente se agitó vigorosamente la muestra con ayuda de vórtex durante 10 minutos y se mantuvo en hielo a 4°C, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm/ 15 minutos/ 4°C y se recuperó el sobrenadante que contenía los extractos proteicos totales. La alícuota de los extractos se mantuvo en hielo para llevar a cabo la cuantificación de proteínas o fue almacenado a -80°C hasta su cuantificación y análisis.

Por otro lado, se sembraron células en placas de seis pozos con fondo plano para células adherentes (Corning™), cuando se requerían diferentes condiciones en las células como la transfección con el scramble y con el miR-342-3p, siguiendo el proceso de despegar las células de las placas con tripsina 0.25%/PBS-EDTA o de manera alternativa para recuperar las células de estas placas se lavaron con PBS 1X y se adicionó directamente el buffer de lisis suplementado con el coctel de inhibidores, se raspó la muestra mecánicamente y se recuperó el lisado celular, se agito durante 5 minutos con ayuda de vórtex dando impulsos cada minuto y descanso de 10 segundos, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12, 000 rpm/15 minutos/ 4°C hasta la obtención del sobrenadante y mantenimiento de los extractos proteicos a -80°C.

## 8. Obtención de extractos de proteínas nucleares.

Para la extracción de proteínas nucleares se mantuvieron en cultivo las células MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D hasta tener un 80% de confluencia hasta despegar las células como se describió anteriormente, se obtuvo la pastilla del lisado celular y se le adicionaron 100  $\mu$ L del Buffer 1 frío más el cocktail de inhibidores de proteasas para separar extractos citoplasmáticos, este se mezcló por inversión vigorosamente y se incubó durante 15 minutos en hielo; se centrifugó a 6,000 rpm/ 15 minutos/ 4°C y se recuperó el sobrenadante (fracción citoplasmática), se cuantificó y se almaceno a -80°C. A la pastilla recuperada se le añadieron 100  $\mu$ L del Buffer 2 más el cocktail de inhibidores de proteasas y el lisado celular se incubó durante 30 minutos/ 4°C en agitación; posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm/ 10 minutos/ 4°C y se recuperó el sobrenadante (la fracción nuclear), se cuantificó y se realizaron alícuotas con 60  $\mu$ g de proteínas para almacenar a -80°C hasta su uso.

## 9. Determinación de la concentración de proteínas de los extractos nucleares y totales.

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos totales y nucleares, se utilizó el método de Bradford. La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (1  $\mu$ g/mL), NaCl 0.15 M y Bradford 1X como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla V.** Curva para cuantificar proteínas.

	NaCl 0.15 M ( $\mu$ L)	BSA 1 $\mu$ g/mL ( $\mu$ L)	Bradford 1X
<b>Curva patrón</b>	20	0	Se lleva a un volumen final de 1 mL
	17.5	2.5	
	15	5	
	12.5	7.5	
	10	10	
	7.5	12.5	
	5	15	
<b>Muestra</b>	18	2	

Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se obtuvieron sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras en la ecuación de la recta elaborada a partir de los valores de la curva estándar. La ecuación es:  $y = m x + b$ , donde  $y$  es la absorbancia 595 nm,  $m$  es la pendiente,  $x$  es la concentración de proteínas y  $b$  es la ordenada al origen.

#### **10. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE se realizó a una concentración de acrilamida del 10% en el gel separador y al 5% en el gel concentrador. Las proteínas para cargar en el gel se les adicionó la cantidad correspondiente de buffer de carga 2X y se calentaron en baño maría a 95°C/ 5 minutos para ayudar a su desnaturalización. Para correr el gel se empleó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92 y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 90 V.

#### **11. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.**

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron en membranas de nitrocelulosa con 0.2 mm de poro (Bio-Rad). Los geles, las membranas, papeles Whatman y esponjas se incubaron 15 minutos en solución de transferencia de proteínas (Tris-Glicina y metanol al 20%). Posteriormente, se armó el casete, se sumergió en la solución de transferencia y se transfirió a un voltaje constante de 100 V durante 1 h manteniéndose todo el proceso en hielo. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó la tinción con rojo Ponceau, posteriormente se lavó la membrana con TBS 1X o PBS 1X a pH de 7.4.

#### **12. Ensayos para identificar la expresión de la proteína EPC1 mediante Western blot**

Las membranas donde fueron transferidas las proteínas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche en TBS 1X o PBS 1x pH 7.4) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con TBS 1X o PBS 1X-Tween 20 (Bio-Rad/0.05%) durante 10 minutos, cinco veces, y posteriormente se agregó el anticuerpo primario:  $\alpha$ -EPC1 (1:1000) Abcam o Biosource,  $\alpha$ -Lamin  $\beta$ 1 (1:1000) Invitrogen,  $\alpha$ -GADPH (1:1000) Santa Cruz; diluido en TBS 1X o PBS 1X-Tween 20

0.05%, y se incubó durante toda la noche a 4°C, en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron cinco veces en TBS 1X o PBS 1x-Tween 20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa:  $\alpha$ -mouse (1:3000) para ambos anticuerpos primarios  $\alpha$ -Lamin  $\beta$ 1 y  $\alpha$ -GADPH y  $\alpha$ -rabbit (1:2000) para  $\alpha$ -EPC1; este anticuerpo también fue diluido en TBS 1X o PBS 1X y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) en agitación.  $\alpha$ -Lamin  $\beta$ 1 y  $\alpha$ -GADPH se utilizaron en la misma membrana como control de carga ya sea de extractos nucleares o extractos totales respectivamente.

Posterior a la incubación del anticuerpo secundario, las membranas se lavaron cuatro veces durante 10 minutos con TBS 1X o PBS 1x-Tween 20 al 0.05 % y un último lavado de 10 minutos con TBS 1X o PBS 1X, adicionalmente las membranas se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante uno a cinco minutos con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA) y cada membrana fue leída en un equipo ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad). Las bandas correspondientes al peso esperado de cada proteína identificadas en las membranas, se les realizó un análisis densitométrico empleando el programa my Image Analysis software (Thermo Scientific).

### **13. Análisis de la expresión del gen *EPC1* mediante RT-PCR.**

Para determinar la expresión del gen *EPC1* en líneas celulares de cáncer de mama, el RNA (1  $\mu$ g) obtenido de las cuatro líneas celulares tumorales: MDA-MB-231, Hs 578T, MCF7, T47D y de la línea no tumoral MCF-10A; fueron tratados con 1  $\mu$ L de DNasa I, 1  $\mu$ L de Buffer de reacción con  $MgCl_2$  10X y agua DEPC hasta 10 $\mu$ L, esta reacción se incubó durante una hora a 37°C y para detener la reacción se adicionó 1  $\mu$ L de EDTA 50  $\mu$ M, incubando la reacción por 10 minutos a 65°C; el RNA tratado se almacena a -20°C hasta su uso. Para realizar la retro transcripción (RT-PCR) del RNA, se colocaron en un tubo de PCR para un volumen total de 13  $\mu$ L de reacción: 1  $\mu$ L de oligo dT 50  $\mu$ M (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L de mix de dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ g de la muestra y x de agua destilada; se incubó la reacción a 65°C durante 5 minutos y después se mantuvo en hielo durante un minuto. Posteriormente se adicionó a cada reacción 4  $\mu$ L de 5X First Strand Buffer, 1  $\mu$ L de DTT (0.1 M), 1  $\mu$ L de Inhibidor de RNasa (40 u/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de SuperScript III RT (200U/ $\mu$ L) para completar un volumen final de 20  $\mu$ L. El contenido se resuspendió mediante pipeteo

suavemente y se incubaron las muestras durante una hora a 50°C, se inactivó la reacción al calentar las muestras a 70°C por 5 minutos y se adicionó una última temperatura a 4°C por tiempo indefinido ( $\infty$ ) para mantener la reacción. Se colocaron los respectivos controles negativos (sin muestra y otro de cada una de las muestras sin la enzima SuperScript III RT).

Posterior a la reacción de RT-PCR, se procedió a montar la PCR punto final mediante la utilización de primers específicos EPC1 (forward 5'-GGGGAATTTAAGATGCCAAA-3' y reverse 5'-TTTTTCTAGGCGGTCAATCA-3', amplicón de 171 pb), se utilizó como control endógeno a GADPH (forward 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' y reverse 5'-CAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3', amplicón de 131 pb). Se colocó en un tubo de PCR lo siguiente para cada reacción: 5  $\mu$ L de 2X PCR Master Mix (Promega), 0.5  $\mu$ L de forward 10  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L de reverse 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ L de templado y 3  $\mu$ L de agua; además de los controles negativos de cada muestra que no contenían el molde y este fue reemplazado por agua. Las condiciones para el termociclador fueron las siguientes: 94°C/ 2 minutos, 30 ciclos (94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos, 72°C/30segundos), 72°C/ 5 minutos/ 4°C por tiempo indefinido ( $\infty$ ) para mantener la reacción.

#### **14. Análisis de la expresión y localización celular de la proteína EPC1 mediante inmunofluorescencia.**

Se sembraron 250,000 células MDA-MB-231 y T-47D por pozo en una placa de seis pozos con fondo plano para células adherentes (Corning™) que contenían portaobjetos estériles, se incubaron con medio DMEM suplementado hasta que estos tenían un 60% de células confluentes y posteriormente se les retiró el medio a las células y estas se lavaron con PBS 1X para retirar los detritos celulares, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) en PBS al 4% durante 30 minutos/ 37°C, transcurrido el tiempo se lavaron las células con PBS 1X tres veces y se permeabilizaron las células con Tritón en PBS al 0.2% durante 15 minutos/ 37°C, se lavaron las células con PBS 1X tres veces. Se adicionó una solución de bloqueo con BSA en PBS al 1% por una hora y posteriormente se lavaron las células con PBS 1X tres veces, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario  $\alpha$ -EPC1 (1:100-Abcam) durante toda la noche a 4°C. Se retiró el anticuerpo primario y se lavaron las muestras tres veces con PBS 1X, se agregó el anticuerpo secundario

Alexa Fluor 546  $\alpha$ -rabbit (1:200) y se cubrieron las muestras de la luz e incubaron durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente las células se lavaron con PBS 1X tres veces y se contra tiñeron los núcleos con DAPI, se montaron las muestras y se almacenaron las muestras a 4°C hasta su análisis en el microscopio de fluorescencia.

## 15. Análisis bioinformáticos.

Para la predicción *in silico* de los blancos del miR-342-3p se utilizaron los programas TargetScan versión 5.2 (<http://www.targetscan.org>), miR-Base (<http://www.mirbase.org/>), miRDB (<http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>) y miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/human/gene/9679/>).

Cada programa fue utilizado con los parámetros que los programas generan por defecto. De cada lista obtenida en los diferentes programas, se tomaron sólo aquellos blancos predichos que eran comunes en las tres bases de datos. Posteriormente, se analizó cuáles de estos posibles blancos predichos se encontraban involucrados con la regulación de la maquinaria epigenética. Por otra parte, se realizó una búsqueda de datos reportados en pacientes donde se analizó la expresión del miRNA, así como la expresión de *EPC1* en cáncer de mama mediante la utilización del software del TCGA Cancer Regulome tool. (<http://explorer.cancerregulome.org/>).

## 16. Construcciones de los plásmidos pmiR-3'UTR-EPC1.

### 16.1 Hibridación de las secuencias *wild type* y mutada de la región 3'UTR del gen *EPC1*.

Se diseñaron 2 pares de primers correspondientes a un fragmento de 70 pb de la región 3'UTR del gen *EPC1*, a uno de ellos se le introdujeron cambios en 8 bases las cuales forman parte la región semilla o sitio de unión al miR-342-3p; los primers fueron diseñados de acuerdo con el protocolo del plásmido pMIR-REPORT Luciferasa de insertos diseñados químicamente con los sitios de restricción *Hind* III y *Spe* I (Tabla VI). Los primers fueron resuspendidos con agua libre de nucleasas para utilizarlos a una concentración de 1  $\mu$ g/mL, colocando en un tubo de PCR: 2  $\mu$ L del primer sentido más 2  $\mu$ L del primer antisentido y 46  $\mu$ L de buffer de alineamiento 1X. Los primers se hibridaron a 90°C/ 3 minutos y 37°C/ 1 hora, el

dúplex (sentido/antisentido) se diluyó a una concentración final de 10 ng/μL con agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C. Se comprobó la hibridación de los primers mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Gel Red 6X y se visualizó mediante el uso de un foto-documentador (BioRad). En los primers hibridados comparados con los primers no hibridados, se observó un menor corrimiento electroforético que indicaba la correcta hibridación.

**Tabla VI.** Primers específicos para clonar la región 3'UTR del gen *EPC1*.

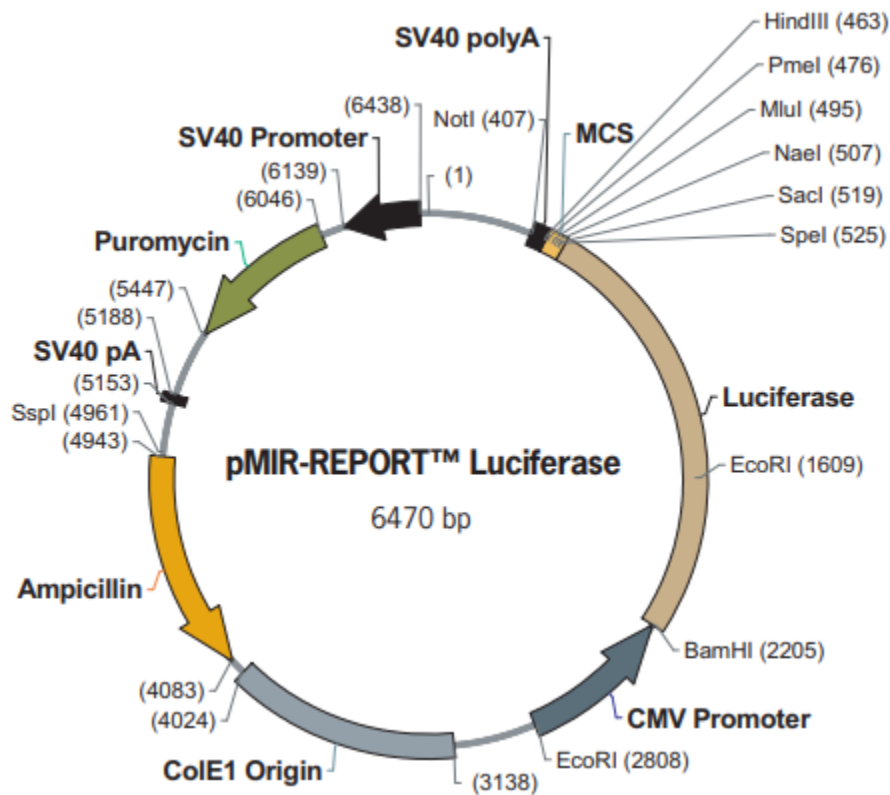
Primer	Secuencia	Amplicon (pb)
EPC1 forward	5'-CTAGTGTGGGAGGGAAATCAATTGCAACAAAGAGT GTGAGATGTGAGATTGTATAGAGATGAAGTGTCAA-3'	70
EPC1 reverse	5'-AGCTTTGACACTTCATCTCTATAACAATCTCACATCT CACACTCTTTGTTGCAATTGATTTCCCTCCCACA-3'	70
EPC1 mut forward	5'-CTAGTGTGGGAGGGAAATCAATTGCAACAAAGA TCACTGAGTGTGAGATTGTATAGAGATGAAGTGTCAA- 3'	70
EPC1 mut reverse	5'-AGCTTTGACACTTCATCTCTATAACAATCTCACAC TCAGTGATCTTTGTTGCAATTGATTTCCCTCCCACA-3'	70

En color verde se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Hind* III y *Spe* I, en color amarillo la región semilla correspondiente al miR-342-3p y en color rojo la región semilla modificada para la no unión por parte del miR-342-3p.

### 16.2 Restricción del plásmido pMIR-REPORT-Luciferasa

Los primers con los fragmentos de la región 3'UTR se cuantificaron y diluyeron a una concentración final de 10 ng/μL, posteriormente 2 μg del plásmido pMIR-REPORT fue restringido con las enzimas *Spe* I y *Hind* III (New England BioLabs) a 37°C durante toda la noche en un volumen final de 20 μL (2 μg de pMIR-REPORT, 1 μL de *Spe* I (2000U), 1 μL de *Hind* III (1000U), 2 μL de Buffer NEBuffer 2.1 y agua destilada; posteriormente los fragmentos se corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño del plásmido linearizado y se purificó a partir banda utilizando GENE CLEAN II kit (MP Biomedicals). El fragmento purificado y

restringido correspondiente al plásmido se diluyó a una concentración final de 100 ng/μL. En la figura 16 se muestra el plásmido pMIR-REPORT Luciferasa y los sitios de digestión seleccionados para colocar el inserto.



**Figura 12. Mapa del plásmido pMIR-REPORT Luciferasa.** Promotor de Citomegalovirus (CMV): 2210-2813, luciferasa de luciérnaga: 540-2210, sitio de corte múltiple (MCS): 467-539, SV40 poly(A): 404-467, promotor SV40: 6139-6438, Puromicina: 5447-6046, señal pA SV40: 5153-5188, Ampicilina: 4083-4943, Origen ColE1: 3138-4024. Tomada de Applied Biosystems.

### 16.3 Ligación de los insertos 3'UTR del gen *EPC1* dentro del plásmido pmiR-REPORT Luciferasa

Las reacciones de ligación se prepararon utilizando 100 ng de plásmido restringido y purificado, se montaron dos reacciones de ligación para cada inserto (relación molar vector: inserto) 1:3 y 1:5. Las reacciones de ligación se prepararon a un volumen final de 20 μL (x μL del inserto diluido, agua libre de nucleasas hasta 20 μL, 4 μL de buffer de ligasa T4 5X, 1 μL (100 ng) del vector pmiR-REPORT-

Luciferasa (Applied Biosystems) y 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ). Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto (el inserto se sustituyó con 1  $\mu\text{L}$  de solución de hibridación de DNA 1X). Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones de ligación se emplearon para transformar células *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  competentes. Todas las construcciones fueron expandidas y purificadas por lisis alcalina mediante el uso del kit Miniprep (Wizard) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### 16.4 Transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$ -competentes

Para realizar la transformación se descongelaron en hielo alícuotas con 50  $\mu\text{L}$  de células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ -competentes y luego se añadió la mezcla de ligación (20  $\mu\text{L}$ ) mezclando suavemente. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos, luego se dio un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se volvió a incubar en hielo durante 3 minutos. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de medio Luria sin ampicilina y se incubó en agitación a 200 rpm/ una hora/ 37°C. Finalmente se crecieron las bacterias transformadas en una placa con medio Luria-agar con ampicilina a 37°C durante toda la noche.

#### 16.5 Extracción de plásmido por lisis alcalina (Miniprep para construcciones pMIR-EPC1 y pmiR-REPORT Luciferasa)

Para propagar las clonas de las construcciones EPC1 *wild type* y EPC1 mutada, se eligieron 10 colonias aisladas y se inocularon en alícuotas de 7 mL de medio Luria con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. Se incubaron a 37°C en agitación durante 16 horas. Posteriormente, se tomaron 1.5 mL para realizar gliceroles y se sedimentó el resto de las células por centrifugación a 7,500 rpm/ 15 minutos y se retiró el sobrenadante. A la pastilla se le extrajo el plásmido por lisis alcalina mediante el kit Miniprep (Wizard) siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante.

Por otro lado, se siguió el método tradicional de lisis alcalina para la extracción del plásmido pMIR-REPORT-Luciferasa, se creció una clona de igual manera y la pastilla obtenida se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de solución I fría (ver apéndice) y se agitó fuertemente en vórtex. Después se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución II (ver apéndice), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos para lisar

las bacterias; una vez transcurrido el tiempo se agregaron 150  $\mu$ L de solución III fría (ver apéndice), se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,000 rpm/ 10 minutos/ 4°C. La fase acuosa se recuperó, se agregaron 800  $\mu$ L de etanol absoluto y se centrifugó a 8,500 rpm/ 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla (DNA plasmídico) se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El DNA se resuspendió con 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y el RNA restante en la muestra se degradó mediante incubación con 1  $\mu$ L de RNAsa A (10 mg/mL) durante 30 minutos a 37°C.

#### 16.6 Identificación de las clonas con el inserto pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* y pMIR-3'UTR-EPC1 mutada

Para analizar las clonas candidatas ya purificadas, se realizó PCR para secuenciación utilizando el siguiente primer: (1) Forward 5'-AGGCGATTAAGTTGGGTA-3', como se muestra en la Figura 17 el sitio de unión dentro del plásmido pMIR-REPORT Luciferasa. Se realizó PCR para secuenciación con el DNA de las respectivas construcciones, se colocó en un tubo de PCR lo siguiente: 1  $\mu$ L de primer pMIR-REPORT (1) 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ L de Byg Dye 5X, 3  $\mu$ L de Buffer 5X y agua destilada hasta 20  $\mu$ L; las condiciones del ciclado fueron las siguientes: 96°C/ 1 minuto, 40 ciclos (96°C/ 10 segundos, 50°C/ 5 segundos y 60°C/ 4 minutos), al final se mantuvo a 4°C/  $\infty$ . El producto de reacción de secuenciación se purificó mediante exclusión molecular para su secuenciación, esta consistió inicialmente en centrifugar el tubo con resina para descartar el buffer de mantenimiento a 750 g/ 3 minutos, se descartó el buffer y se colocó un microtubo para recuperar la muestra que se depositó directamente en la resina y se centrifugó a 750 g/ 3 minutos; se dejaron secar las muestras durante una hora a temperatura ambiente y se entregaron para su secuenciación, las muestras se procesaron en el secuenciador del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, por la M. en C. Laura Vázquez.

Una vez obtenidas las secuencias se analizaron mediante la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para corroborar que fuera el plásmido pMIR-REPORT y para asegurar que tuviera el inserto correspondiente a EPC1 *wild type* y EPC1 mutada.

1. Forward 5'-AGGCGATTAAGTTGGGTA-3'



**Figura 13. Primer utilizado para la secuenciación del plásmido pMIR-REPORT Luciferasa.** Se utilizó el primer forward 1 para la secuenciación de las clonas con el inserto EPC1 *wild type* y EPC1 mutada. Tomada de Applied Biosystems.

## 17. Validación del blanco EPC1 mediante las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* y pMIR-3'UTR-EPC1 mutada.

### 17.1 Transfección de las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1 mutada y pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* en células MDA-MB-231 y Hs 578T.

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones pMIR-3'UTR EPC1, se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 y Hs 578T por pozo en una placa de 6 pozos con fondo plano para células adherentes (Corning™) y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente las células fueron transfectadas mediante Lipofectamina 2000® en condiciones de esterilidad como sigue por pozo: en un microtubo de 1.5 mL se colocaron 5 µg de la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* o pMIR-3'UTR-EPC1 mutada y se mezclaron con 150 µL de Opti-MEM®, por otro lado en un microtubo de 1.5 mL se colocaron 9 µL de Lipofectamina 2000® y se mezcló con 150 µL de Opti-MEM®. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Pasado 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 15 minutos a TA para permitir la formación de los complejos Lipofectamina-DNA. Durante el tiempo de incubación se retiró el medio a las células y se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7.4, posteriormente se les adicionó 1.8 mL de medio DMEM sin complementar (DMEM sin FBS ni antibiótico). Transcurrido el tiempo de incubación se le adicionaron los complejos Lipofectamina-DNA correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 5 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Posteriormente se retiró el medio sin complementar de los pozos con células y se les adicionó 2 mL de medio de cultivo DMEM complementado, las células se

incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24h. Como normalizador se utilizó el plásmido pMIR-REPORT Luciferasa.

### 17.2 Co-transfección del pre-miR-342-3p y pre-miR-Ctrl-Neg en células transfectadas con las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1.

Una vez que las células fueron transfectadas con las construcciones pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* o pMIR-3'UTR-EPC1 mutada, estas fueron co-transfectadas con el pre-miR-342-3p o el premiR-Ctrl-Neg (Scramble). En un microtubo de 1.5 mL se mezclaron 100 µL de Opti-MEM<sup>®</sup> con 5 µL del agente de transfección Lipofectamina 2000<sup>®</sup> por cada pozo a transfectar, a la par en otro microtubo de 1.5 mL se mezclaron 100 µL de Opti-MEM<sup>®</sup> con 7.5 µL del precursor pre-miR-342-3p o Scramble a una concentración de 10 µM y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se mezcló el contenido de cada microtubo en uno solo (pre-miR-342-3p o scramble más el tubo correspondiente a Lipofectamina), y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM complementado (hasta 2-2.5 mL). La placa se agitó suavemente con movimientos circulares durante 1 minuto y posteriormente se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 17.3 Detección de la actividad de luciferasa.

Para la determinación de la actividad luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) para ello primero se diluyó el buffer de lisis 5X (CCLR) en agua destilada, las células se lavaron con PBS 1X pH 7.4 y se les adicionó 150 µL de buffer de lisis 1X, las células se mantuvieron en agitación durante 5 minutos en hielo. Posteriormente se transfirió el lisado de células a un microtubo de 1.5 mL y se agitó en vórtex tres veces de 10-15 segundos, finalmente el lisado celular se centrifugó durante a 12,000 rpm/ 2 minutos/ 4°C, se recuperó el sobrenadante en un microtubo ámbar a 4°C. En una placa de 96 pozos de fondo opaco se colocaron 100 µL de Luciferase Assay Reagent II y 20 µL de lisado celular y se mezcló por pipeteo, la lectura de la placa se realizó en el equipo Fluoroskan Ascent<sup>™</sup> Microplate Fluorometer (Thermo Scientific) con 2 segundos de retardamiento antes de cada lectura seguida de lecturas de 10 segundos para cada pozo. Los resultados se reportaron como actividad de luciferasa relativa.

## 18. Análisis bioestadístico

La evaluación estadística de los datos se llevó a cabo en base a los valores promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Para los ensayos de RT-qPCR para el análisis de expresión del miR-342-3p, los datos adquiridos de la base TGCA de la expresión del miR-342-3p y de la expresión de EPC1, los ensayos de expresión de la proteína EPC1 se realizó la prueba comparativa entre grupos t-student considerando los valores de  $p < 0.05$  significativos. Para el experimento de RT-PCR y Western blot de la expresión de EPC1 y el ensayo de migración *in vitro* se llevaron a cabo análisis densitométricos mediante la cuantificación de las bandas o del área de células que migraron, para el análisis de las bandas se realizó la gráfica considerando como control la expresión de la línea celular MDA-MB-231 y para el área de las células que migraron se considero como control las células en el tiempo cero para realizar la gráfica; se realizó la prueba comparativa entre grupos t-student considerando significativos los valores de  $p < 0.05$ .

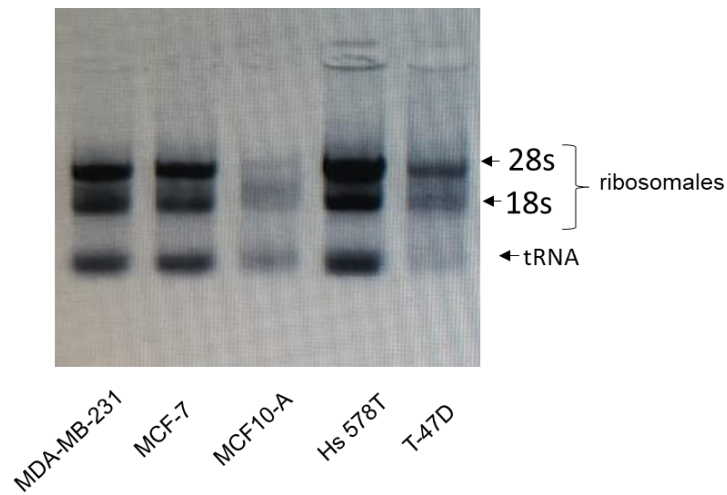
Por otro lado, para el ensayo de inmunofluorescencia se cuantificaron los píxeles de cinco campos de células utilizando el software ImageJ y se graficaron empleando como normalizador el área de fluorescencia de la línea celular MDA-MB-231 con valor de 1; para el ensayo de invasión se contaron las células que invadieron el pozo y ese número de células se graficó de acuerdo con cada condición. Finalmente, la gráfica correspondiente al ensayo de luciferasa se realizó de acuerdo con la luminiscencia de cada condición respecto a la luminiscencia del control pMIR-REPORT considerando como valor basal 1.

## IX. RESULTADOS

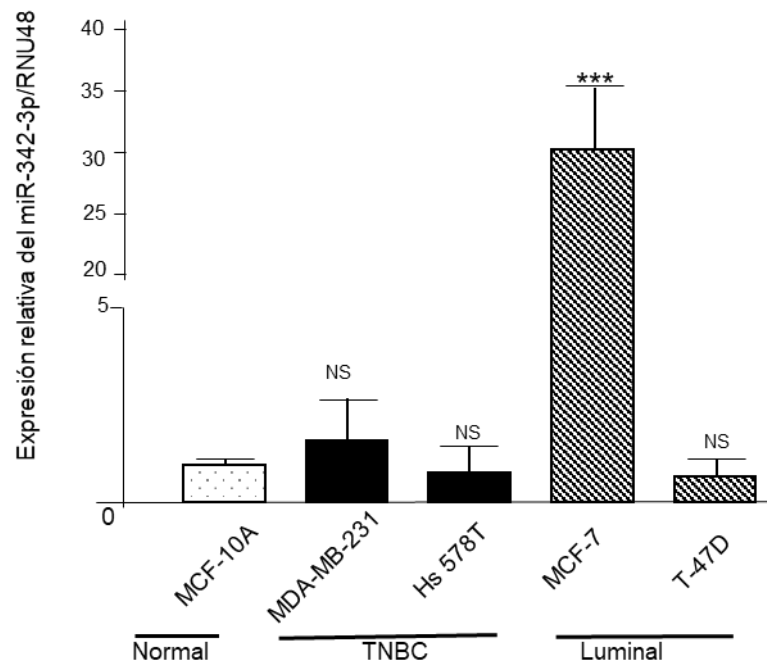
### 1. Análisis de la expresión del miR-342-3p y EPC1 en líneas celulares de cáncer de mama.

Para cumplir con el objetivo 1 se realizó la extracción del RNA total en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D mediante la técnica de TRIzol, posteriormente se cuantificó con el uso de Nanodrop y se comprobó su integridad mediante un gel de agarosa al 1%, en el cual se observa la presencia de bandas que corresponden a los RNAs ribosomales 28s y 18s lo cual demuestra la integridad de los ácidos nucleicos obtenidos (Figura 14). Una vez corroborada la integridad del RNA, se llevó a cabo un ensayo de RT-qPCR para determinar la expresión del miR-342-3p en las líneas tumorales y no tumorales analizadas, empleando sondas específicas para el miR-342-3p y el control de normalización RNU48 (RNA pequeño nucleolar (sno-RNA), no codificante de proteínas).

Los resultados obtenidos de la RT-qPCR se detallan en la Figura 15, en donde se muestra que la expresión del miR-342-3p en las cinco líneas celulares: MCF-10A línea no tumoral para comparar la expresión del miR-342-3p con respecto a las líneas tumorales de baja (MCF-7 y T-47D) y alta capacidad metastásica (MDA-MB-231 y Hs 578T). Como se puede observar en la Figura 15, existe una mayor expresión del miR-342-3p en la línea celular MCF-7 comparado con la línea celular no tumoral MCF-10A ( $p < 0.0009$ ), por otro lado, no se encontraron diferencias significativas con el resto de las líneas celulares MDA-MB-231, Hs 578T y T-47D respecto al control MCF-10A. Sin embargo, nuestros resultados también muestran que la alta expresión del miR-342-3p en la línea celular con subtipo luminal MCF-7 también se puede comparar con la expresión del miRNA en el resto de las líneas celulares; en donde la tendencia es disminuir la expresión del miR-342-3p tanto en las líneas de cáncer de mama con subtipo triple negativo (MDA-MB-231 y Hs 578T) y otra línea con subtipo luminal (T-47D).

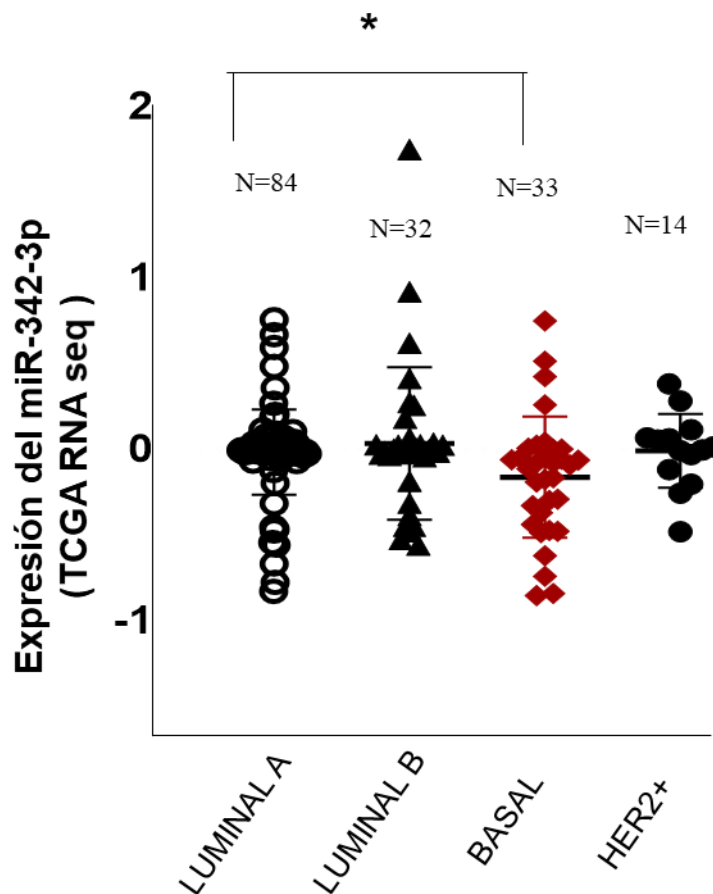


**Figura 14. Integridad del RNA total de líneas celulares de cáncer de mama y línea no tumoral (MCF-10A).** 100 ng del RNA se cargo en un gel de agarosa al 1%, posteriormente se tiño con *Ge/Red 6X* y se documento en un fotodocumentador de geles de BioRad. Las flechas señalan las bandas que corresponde a los RNAs ribosomales 28 y 18s.



**Figura 15. Expresión inhibida del miR-342-3p en líneas celulares triples negativas de cáncer de mama.** 10 ng del RNA obtenido de las líneas celulares se utilizó para los ensayos de RT-qPCR empleando sondas Taqman. La línea celular MCF-10A se usó como control no tumoral. Los datos se normalizaron con el RNU48 pequeño-nucleolar como control endógeno. Las barras representan la media de tres experimentos independientes (\*\*\*) $p < 0.0009$  t-student). NS=no significativo.

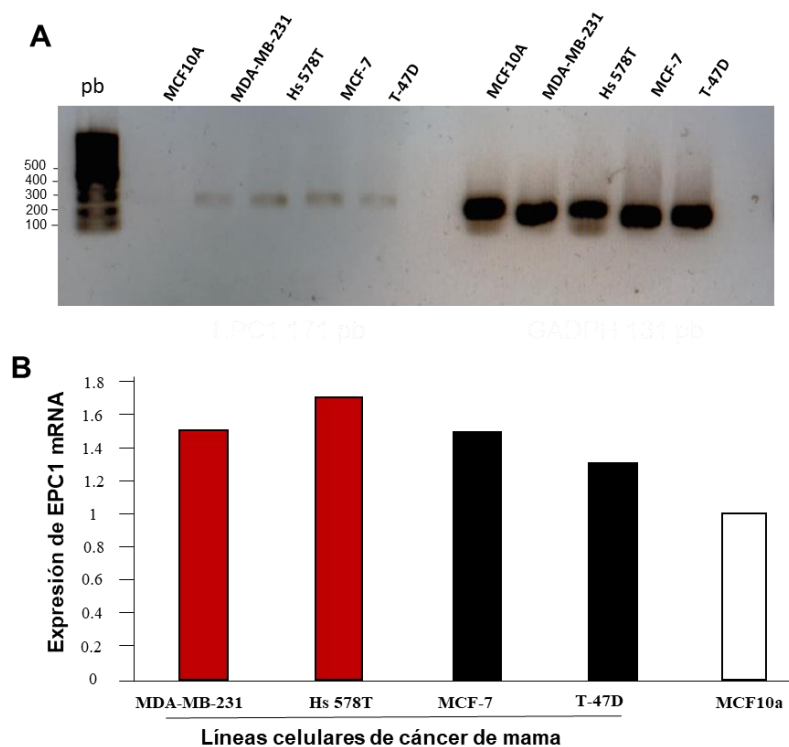
Por otro lado, se analizaron los datos de expresión del miR-342-3p en tumores de pacientes con diferentes subtipos tumorales de cáncer de mama considerados en la base de datos *The Cancer Genome Atlas Database* (TCGA), su expresión fue agrupada de acuerdo a la clasificación del subtipo tumoral y en la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos, identificando que existe una mayor expresión del miR-342-3p en tumores con fenotipo luminal A (N=84) comparado con tumores con fenotipo basal (N=33). Se ha identificado que el miR-342-3p tiene una expresión diferencial de acuerdo con el fenotipo tumoral y que en aquellos que son triples negativos o basales tienden a una menor expresión del miRNA comparado con los subtipos luminales y HER2+, esto se debe a la diferencia de expresión de los receptores principalmente al ER+.



**Figura 16. Expresión del miR-342-3p obtenidos de tumores de pacientes con diferente subtipo tumoral con cáncer de mama.** Los datos se obtuvieron de la base de datos *The Cancer Genome Atlas Database* (TCGA), los cuales corresponden al análisis de RNAseq. La barra representa la diferencia entre el subtipo luminal y basal (N=163, \*p<0.0129 t-student).

### 1.1 Análisis de la expresión de *EPC1* en líneas celulares de cáncer de mama.

Para analizar la expresión de *EPC1* a nivel de transcrito, se realizó una RT-PCR de punto final. En la figura 17 se muestra el análisis de la expresión de *EPC1* en las cinco líneas celulares MCF-10A, MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D; se puede apreciar la banda correspondiente al fragmento del gen *EPC1* de 171 pb y al fragmento correspondiente a *GADPH* de 131 pb. Se observó que en las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D) existe una tendencia de una mayor expresión del gen *EPC1*, comparada con la línea no tumoral MCF-10A. La línea celular que presenta una mayor expresión del gen *EPC1* es la línea celular Hs 578T, una línea celular con alta capacidad metastásica subtipo triple negativo; sin embargo, no hay una diferencia significativa en la expresión de *EPC1* en las líneas con alta capacidad metastásica comparadas con la expresión en las líneas de baja capacidad metastásica (Figura 17-B).

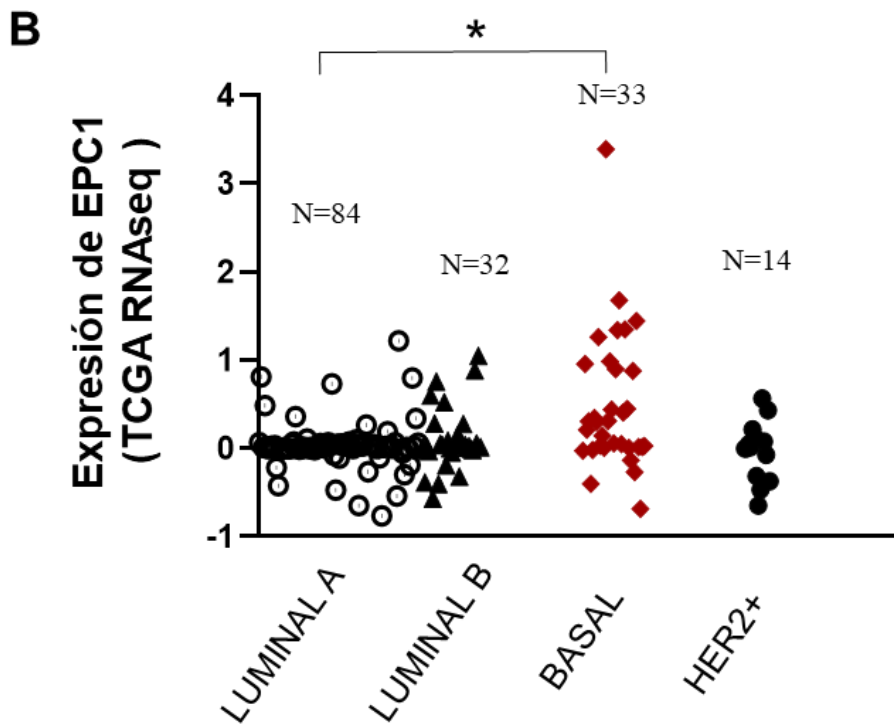
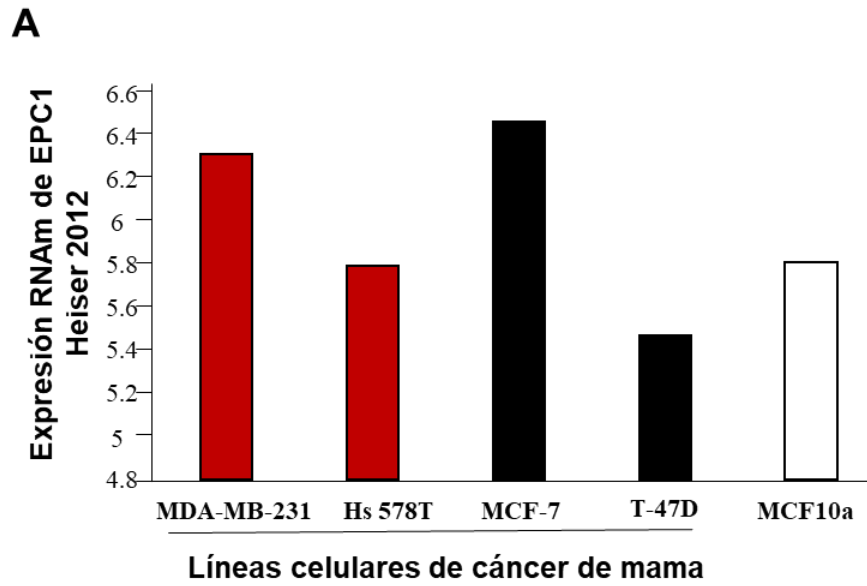


**Figura 17. Expresión del gen *EPC1* mediante RT-PCR de punto final.** A) Gel de agarosa al 3% que muestra la banda correspondiente a *EPC1* 171 pb y a *GADPH* 131 pb. B) Análisis densitométricos de las bandas correspondientes a los genes amplificados, los píxeles de las bandas amplificadas se cuantificaron empleando la herramienta del software myImage Analysis (Thermo Fisher). La expresión del gen *EPC1* se normalizó con respecto a la expresión del gen *GADPH*. El experimento se realizó por duplicado.

Por otro lado, se analizaron las bases de datos UCSC Xena y TCGA para comparar la expresión de *EPC1* en las líneas celulares y en tumores de pacientes (N=163). En la Figura 18-A se muestran los resultados obtenidos de la base de datos UCSC Xena en donde se recopiló el estudio realizado por Heiser en el 2012 de la expresión de *EPC1* en las líneas celulares de cáncer de mama, estos datos indican que hay una expresión variable en las diferentes líneas celulares; encontrando una mayor expresión en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 comparada con la línea no tumoral MCF-10A.

El análisis de expresión de *EPC1* en tumores de pacientes con cáncer de mama obtenido de la base de datos TCGA (Figura 18-B), permite asociar la expresión de *EPC1* se asoció con el fenotipo tumoral invasivo debido a que se encontró una mayor expresión de dicha proteína en tumores basales ( $p < 0.0026$ ) comparado con la expresión en tumores con fenotipo luminal (A y B) y HER2+; esto último nos podría indicar que la expresión de *EPC1* posiblemente se asocia con el subtipo tumoral y que el fenotipo que tiene una mayor expresión del gen *EPC1* son aquellos que tienen un alto grado metastásico o invasivo como lo es el fenotipo basal o triple negativo.

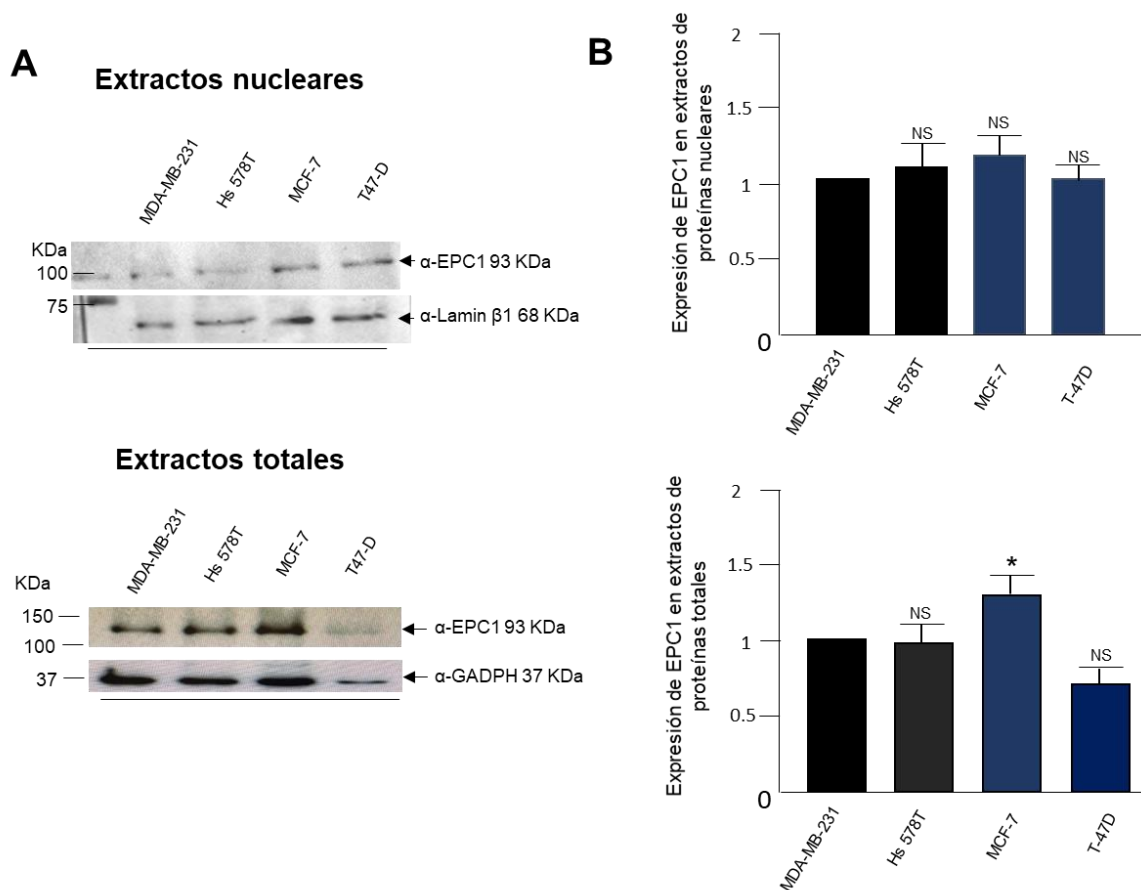
Posteriormente, para analizar la expresión a nivel proteína de *EPC1* se llevó a cabo la extracción de proteínas en extractos nucleares y totales de las cuatro líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D) como se describió en material y métodos; se analizó su expresión mediante Western blot, utilizando los anticuerpos específicos  $\alpha$ -*EPC1* (1:1000) y como control de carga para extractos totales se utilizó al anticuerpo  $\alpha$ -GADPH (1:1000), como control de carga para extractos nucleares al anticuerpo  $\alpha$ -Lamin  $\beta$ 1 (1:1000). En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos de la expresión a nivel de proteína para *EPC1* tanto en extractos nucleares como en extractos totales (Figura 19-A), como se puede apreciar para el caso de los extractos totales, se detectó que hay una mayor expresión de *EPC1* en la línea MCF-7 comparado con el resto de las líneas celulares analizadas ( $p < 0.0236$ ), por otra parte, en las líneas altamente metastásicas (MDA-MB-231 y Hs 578T) la expresión fue similar entre éstas; por otro lado, al analizar la expresión en proteínas nucleares no se encontró una diferencia significativa de la expresión de *EPC1* en las líneas celulares analizadas.



**Figura 18. Expresión del gen *EPC1* en líneas celulares y en diferentes tipos de cáncer mamario.** Análisis de la expresión de *EPC1* en líneas celulares (A) y en tumores (B). Los datos de expresión del gen fueron obtenidos de bases de datos Heiser, 2012 y TCGA, este último grupo de datos graficado respecto al subtipo tumoral A y analizado con la herramienta estadística t-student (\* $p < 0.0026$ ).

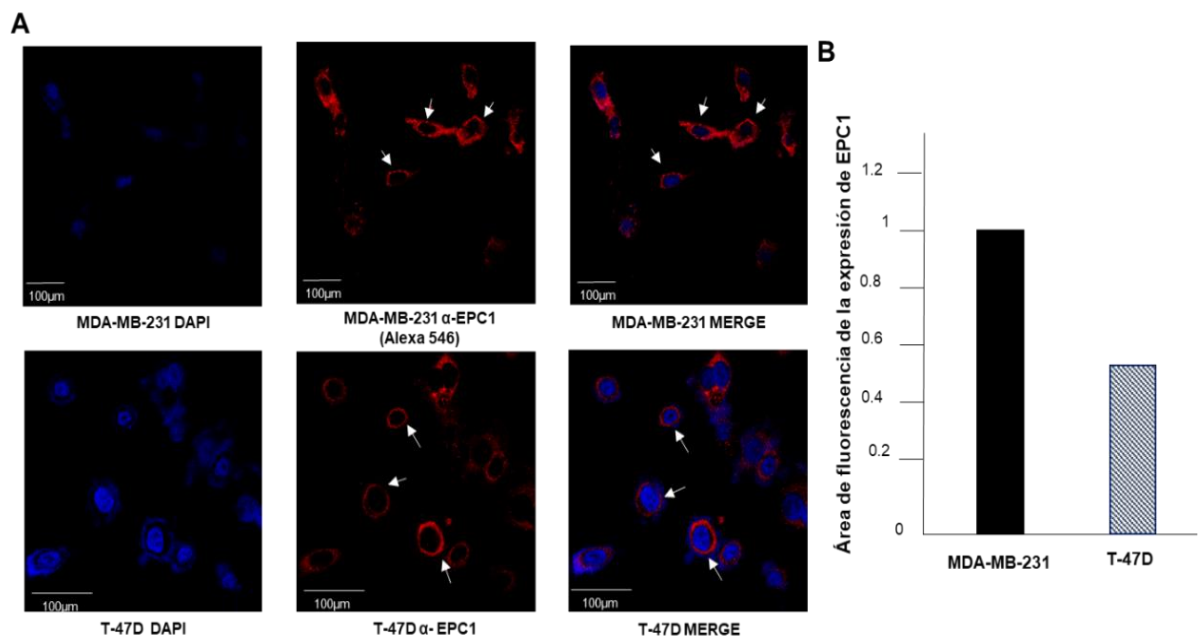
El resultado de la expresión de *EPC1* en extractos nucleares y totales en las diferentes líneas celulares posiblemente no se correlaciona con la expresión del

miR-342-3p; sin embargo, existe información previa reportada por Wang *et al.* (2016) de que en las líneas altamente metastáticas (MDA-MB-231) la expresión de la proteína EPC1 es mayor comparado con las que no tienen una alta capacidad metastásica (MCF-7), asociándolo con la progresión del cáncer de mama.



**Figura 19. Análisis de la expresión de la proteína EPC1 en extractos de proteínas en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T47-D).** 60 µg de extractos proteicos nucleares y 60 µg de extractos proteicos totales se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. A) Se inmunodetectaron con los anticuerpos α-EPC1 (Abcam 1:1000) y α-Lamin-β1 (Invitrogen 1:1000) extractos proteicos nucleares y se inmunodetectaron con anticuerpos α-EPC1 (BioSource 1:1000) y α-GADPH (Sta. Cruz 1:1000) extractos proteicos totales. B) La intensidad de las bandas se cuantificó mediante análisis densitométrico con el software myImage Analysis (Thermo Fisher) y analizadas mediante la herramienta estadística t-student (\* $p < 0.0236$ , NS= no significativo).

Adicionalmente se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -EPC1 para analizar la expresión y distribución de la proteína EPC1 en las líneas celulares MDA-MB-231 y T-47D. La proteína EPC1 se localizó en el núcleo con una distribución aparentemente perinuclear (Figura 20-A). Para determinar si existían diferencias en la expresión de las líneas celulares se cuantificaron diferentes campos, encontrando una tendencia de mayor expresión de la proteína EPC1 en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con la línea celular T-47D (Figura 20-B).



**Figura 20. Localización de la proteína EPC1 en las líneas celulares MDA-MB-231 y T-47D.** A) Inmunofluorescencias empleando el anticuerpo  $\alpha$ -EPC1 en las líneas celulares MDA-MB-231 y T-47D permeabilizadas con Tritón, como anticuerpo secundario se empleó  $\alpha$ -rabbit Alexa 546. Los núcleos se contra tiñeron con DAPI (color azul) y se observaron en un microscopio confocal. Las flechas indican la localización perinuclear. B) Cuantificación de la expresión de EPC1 en ambas líneas celulares. Se analizaron cinco campos utilizando el software ImageJ y se graficaron empleando como normalizador el área de fluorescencia de la línea celular MDA-MB-231.

Lo anterior nos podría sugerir que el nivel de expresión de la proteína EPC1 tiene relación con el subtipo tumoral y que en aquellas líneas celulares con alta capacidad metastásica tiene una expresión más alta comparada con las que no

tienen alta capacidad metastásica. Sin embargo, los resultados mostrados son de un experimento, por lo que consideramos necesario llevar a cabo por triplicado experimentos adicionales de la expresión de EPC1 en los que se incluyan a las dos líneas celulares restantes Hs 578T y MCF-7.

## **2. Evaluar el efecto de la restauración miR-342-3p en la migración e invasión en dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y Hs 578T).**

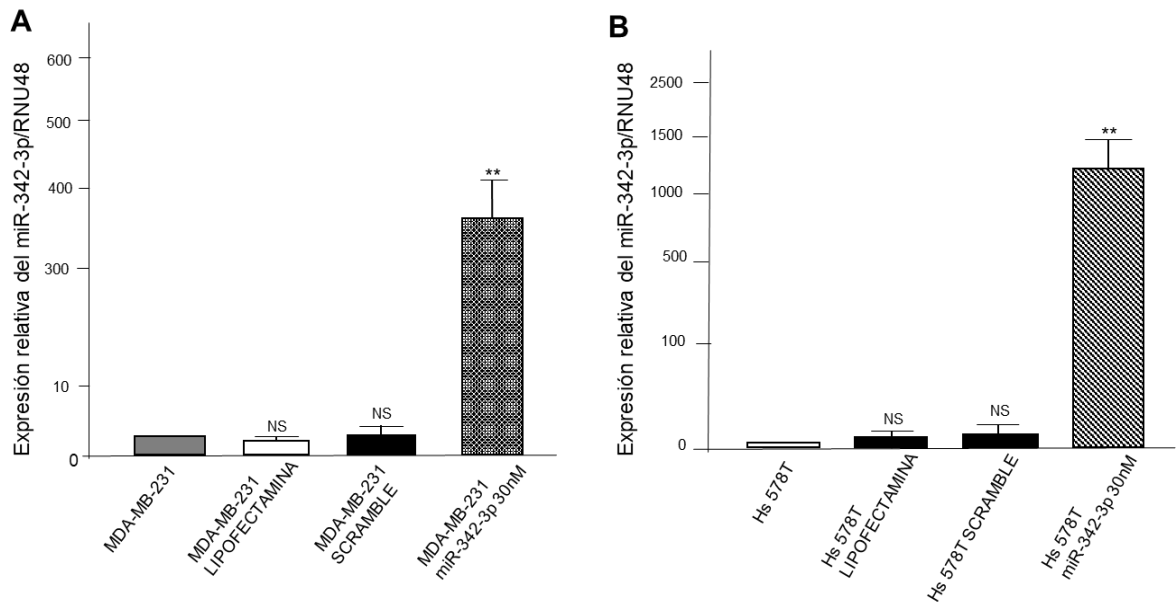
Una vez analizada la expresión del miR-342-3p en las cuatro líneas celulares tumorales MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D; se eligieron dos líneas celulares (MDA-MB-231 y Hs 578T) para evaluar el efecto de la restauración del miR-342-3p. Se llevó a cabo la restauración de la expresión utilizando el precursor del miR-342-3p en las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs 578T, se ha reportado que el miR-342-3p se encuentra involucrado en la migración, la apoptosis, el ciclo celular, la invasión y metástasis por lo cual se eligieron estas líneas celulares que tienen una alta capacidad metastásica y representa a subtipo tumoral basal o triple negativo.

La restauración del miR-342-3p se llevó a cabo a una concentración de 30 nM en ambas líneas celulares mediante RT-qPCR, verificando que la transfección fue adecuada, utilizando como control de la transfección a la Lipofectamina y al control negativo scramble a una concentración de 30 nM (scramble); para todas las muestras se utilizó como normalizador la expresión de RNU48.

En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos al transfectar las células con las condiciones anteriormente mencionadas, identificando que al ser restaurado el miR-342-3p en la línea celular MDA-MB-231 su expresión aumenta 300 veces más y que existe una diferencia significativa ( $p < 0.0020$ ) respecto al control utilizado (células no transfectadas), adicionalmente se identificó que no existe un aumento en el nivel de expresión del miR-342-3p en las células transfectadas con Lipofectamina y transfectadas con el control negativo scramble, por lo que no existen diferencias significativas (NS).

Por otro lado, al restaurar la expresión del miR-342-3p en la línea celular Hs 578T, la expresión se restablece 1000 veces más y que existe una diferencia significativa

( $p < 0.0011$ ) respecto al control (células no transfectadas), además se identificó que no existe un aumento en el nivel de expresión del miR-342-3p en las células transfectadas con Lipofectamina y transfectadas con el control negativo scramble (NS).



**Figura 21. Restauración de la expresión del miR-342-3p en las células MDA-MB-231 y Hs 578T.** A) Línea celular MDA-MB-231 transfectada con pre-miR-342-3p (30 nM) o control pre-miR-negativo (scramble) a las 48 h después de la transfección. B) Línea celular Hs 578T transfectada con pre-miR-342-3p (30 nM) o pre-miR-negativo (scramble) a las 48 h después de la transfección. Las barras representan la media de tres experimentos independientes (MDA-MB-231  $**p < 0.0020$  y Hs 578T  $**p < 0.0011$  t-student).

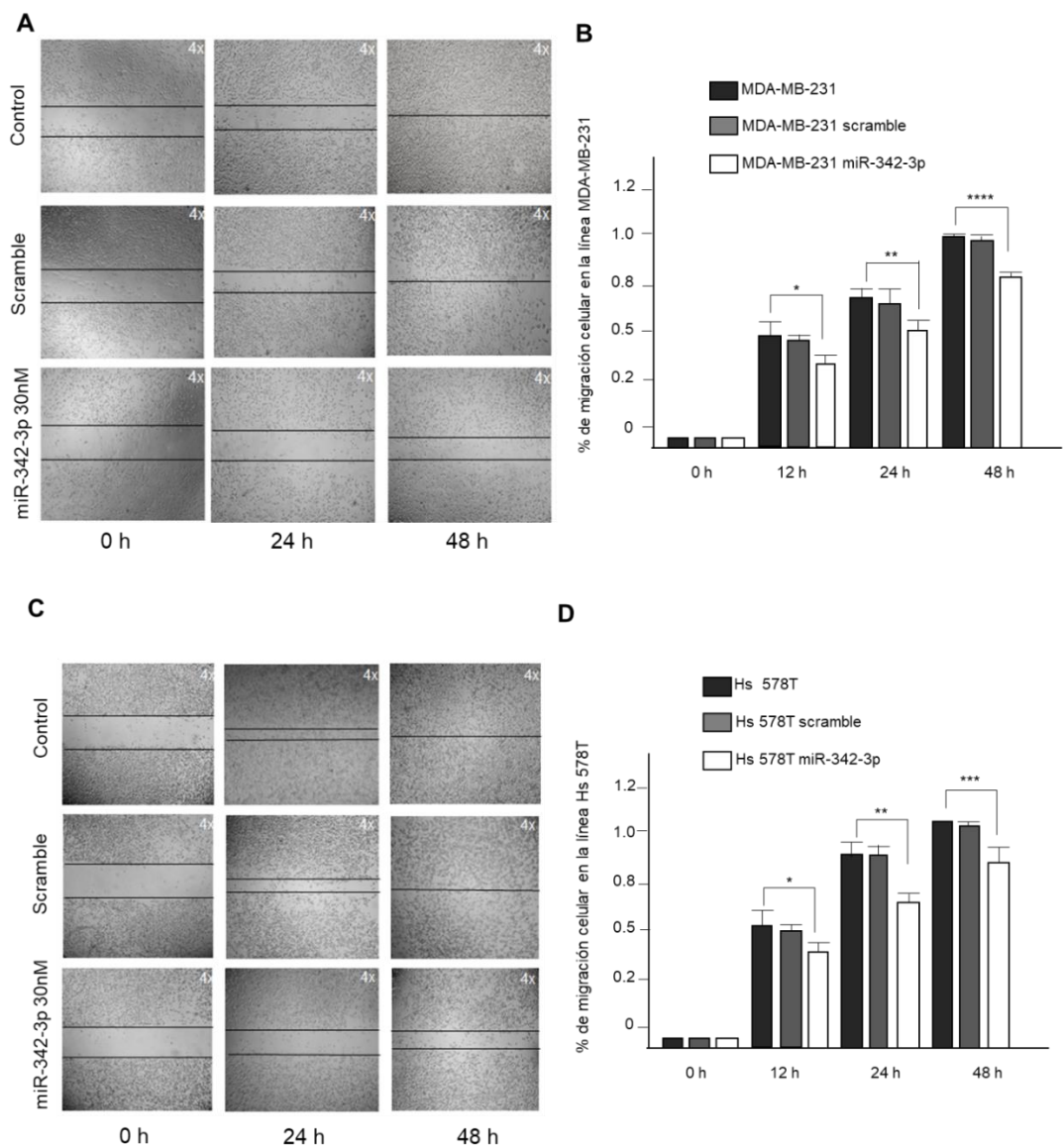
Una vez que se corroboró que la transfección del pre-miR-342-3p produce un aumento en el nivel de expresión del miRNA en las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs 578T, se llevaron a cabo experimentos con el fin de analizar si este se encontraba implicado en los fenotipos de migración e invasión celular. Para el ensayo de migración se utilizó el modelo clásico de cierre de herida *in vitro* que permiten analizar la capacidad migratoria de las células simulando el proceso de cicatrización que tiene lugar *in vivo* en respuesta a un daño tisular.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron las dos líneas celulares triple negativas MDA-MB-231 y Hs 578T, que fueron sembradas en placas de seis pozos con diferentes condiciones: sin transfectar, transfectadas con el control negativo scramble y transfectadas con el precursor del miR-342-3p; transcurridas 48 horas se realizó la herida y esta fue evaluada hasta que cicatrizará completamente en alguna de las condiciones siendo el tiempo final evaluado 72 horas.

En la Figura 22 se muestra los resultados de la migración en ambas líneas celulares MDA-MB-231 y Hs 578T mediante el ensayo de cierre de herida, en ambas líneas celulares se evidencia la inhibición de este fenotipo al ser restaurado el miR-342-3p comparada con las células que fueron transfectadas con el control negativo (scramble) y las que no se transfectaron en los tiempos evaluados.

En las células MDA-MB-231 no transfectadas respecto a las células transfectadas con el miR-342-3p hay diferencias significativas en el porcentaje de migración celular desde las 12 horas ( $p < 0.0157$ ), pero este efecto se ve más evidente respecto al tiempo a las 24 ( $p < 0.023$ ) y 48 horas ( $p < 0.0001$ ). Por otro lado, para las células Hs 578T el efecto es muy similar, con una mayor diferencia significativa del porcentaje de migración celular a las 12 horas ( $p < 0.0149$ ), pero es más evidente el efecto de migración celular a las 24 horas ( $p < 0.0044$ ) y 48 horas ( $p < 0.0004$ ).

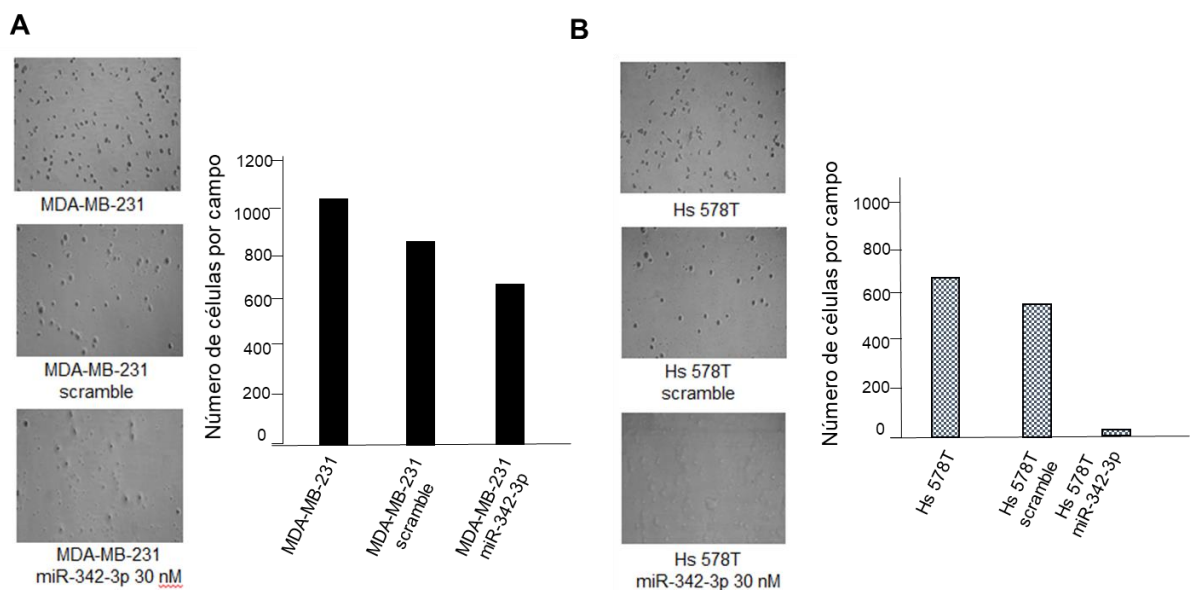
En ambas líneas celulares MDA-MB-231 y Hs 578T, el mayor efecto ocurre a las 48 horas, en donde las células realizan el cierre de la herida por completo en las condiciones de no transfectado y transfectado con el control negativo scramble, pero que el cierre de la herida no ocurre totalmente en la condición de las células transfectadas con el precursor del miR-342-3p a una concentración de 30 nM; este resultado permite inferir que la sobreexpresión del miR-342-3p es capaz de inhibir la migración celular *in vitro* en las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs 578T, las cuales como se mencionó anteriormente tienen una alta capacidad de migración y son altamente metastásicas.



**Figura 22. El miR-342-3p inhibe la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama.** A) Línea celular MDA-MB-231 en diferentes condiciones: células sin transfectar, células transfectadas con pre-miR-negativo (scramble) y células transfectadas con pre-miR-342-3p (30 nM); evaluadas a las 0, 12, 24 y 48 horas después de la transfección. B) Porcentaje de migración de la línea celular MDA-MB-231. (C) Línea celular Hs 578T en diferentes condiciones: células sin transfectar, células transfectadas con pre-miR-negativo (scramble) y células transfectadas con pre-miR-342-3p (30 nM); evaluadas a las 0, 12, 24 y 48 horas después de la transfección. D) Porcentaje de migración de la línea celular Hs 578T. Las gráficas se realizaron de acuerdo con el análisis densitométrico del área de la herida, considerando como control el T0. Las barras representan la media de tres experimentos independientes (MDA-MB-231 \* $p < 0.0157$ , \*\* $0.023$ , \*\*\*\* $0.0001$  y Hs 578T \* $p < 0.0149$ , \*\* $0.0044$ , \*\*\* $0.0004$  t-student).

Por otro lado, para el ensayo de invasión se utilizaron ambas líneas celulares MDA-MB-231 y Hs 578T; y cámaras transwell que contenían matrigel lo que simulaba la matriz extracelular (laminina, colágeno IV, proteoglicanos de sulfato de heparán y una serie de factores de crecimiento). Se utilizaron las siguientes condiciones: células sin transfectar, transfectadas con el control negativo y transfectadas con pre-miR-342-3p (30 nM).

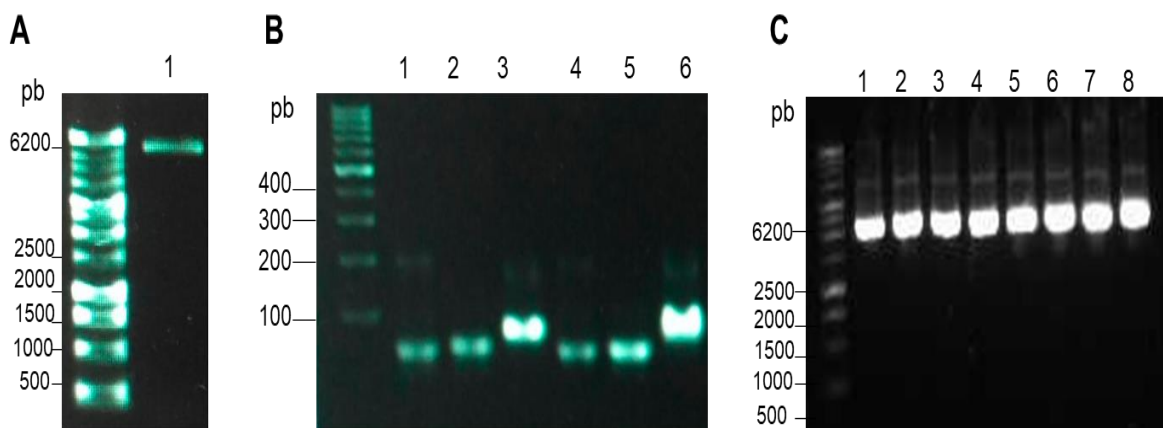
En la Figura 23 se muestra el resultado del experimento de invasión celular *in vitro* de las células en las condiciones anteriormente mencionadas, incluyendo los paneles de cada condición, en donde se observa las células que invadieron el pozo de la caja y en el gráfico se representa el número de las células que invadieron cada pozo en las condiciones anteriormente mencionadas, lo que nos permite identificar que en ambas líneas celulares MDA-MB-231 (40%) y Hs 578T (85%) hay una tendencia a disminuir la invasión celular al ser restaurada la expresión del miR-342-3p en comparación con las células que no se transfectaron y con las que se transfectaron con el control negativo (scramble).



**Figura 23. El miR-342-3p inhibe la invasión celular en las líneas celulares de cáncer de mama.** A) Línea celular MDA-MB-231 en diferentes condiciones: células sin transfectar, células transfectadas con pre-miR-negativo (scramble) y células transfectadas con pre-miR-342-3p (30 nM). B) Línea celular Hs 578T en diferentes condiciones: células sin transfectar, células transfectadas con pre-miR-negativo (scramble) y células transfectadas con pre-miR-342-3p (30 nM). El experimento se realizó una vez para cada línea celular.

### 3. Validación de *EPC1* como un transcrito blanco del miR-342-3p.

Para validar al gen *EPC1* como blanco del miR-342-3p, se realizó una búsqueda en la base de datos Target Scan Human para determinar la posición en la que se encontraba el sitio de unión del RNAm de *EPC1* con la región semilla del miR-342-3p (Figura 26-A); una vez analizado se descargó la secuencia correspondiente al RNA mensajero del gen y se diseñaron los primers específicos para generar las construcciones *wild type* y mutante (Tabla 6). Los primers se hibridaron para ser clonados en el vector pMIR-REPORT Luciferasa como se muestra en la Figura 28, una vez hibridados se almacenaron y el plásmido digerido previamente se visualizó en un gel de agarosa al 1% y el plásmido linearizado se purificó a partir de banda del gel que corresponde al tamaño esperado (6400 pb). Una vez obtenido el plásmido digerido y purificado, y los primers hibridados, se llevó a cabo la ligación y el proceso de transformación en células *DH5- $\alpha$*  competentes; se seleccionaron las clonas para cada construcción, se expandieron y se purificó el DNA plasmídico, verificando la integridad de este mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 24-C).



**Figura 24. Proceso de clonación del extremo 3'UTR del gen *EPC1* con el sitio semilla del miR-342-3p en el 3'UTR del gen de la *luciferasa* en el plásmido pMIR-REPORT.** A) Plásmido pMIR-REPORT Luciferasa digerido con las enzimas *Hind* III y *Spe* I. B) Primers hibridados: (1) forward *EPC1 wild type*, (2) reverse *EPC1 wild type*, (3) primers hibridados *EPC1 wild type* (4) forward *EPC1 mutada*, (5) reverse *EPC1 mutada*, (6) primers hibridados *EPC1 mutada*, C) Clonas candidatas con las construcciones pMIR-3'UTR-*EPC1 wild type* (1-4) y pMIR-3'UTR-*EPC1 mutada* (5-8) de 6470 pb.

El DNA plasmídico obtenido de cada construcción deseada se envió a secuenciar mediante el método de Sanger, corroborando cada una de las construcciones y en la Figura 25 se muestra el electroferograma con las secuencias de las construcciones correspondientes a pMIR-EPC1 *wild type* y pMIR-EPC1 mutada, señalando el sitio que corresponde a la región de unión con el miR-342-3p; en la construcción EPC1 mutada se cambió completamente esta región para eliminar la complementariedad entre la región semilla y el miRNA.

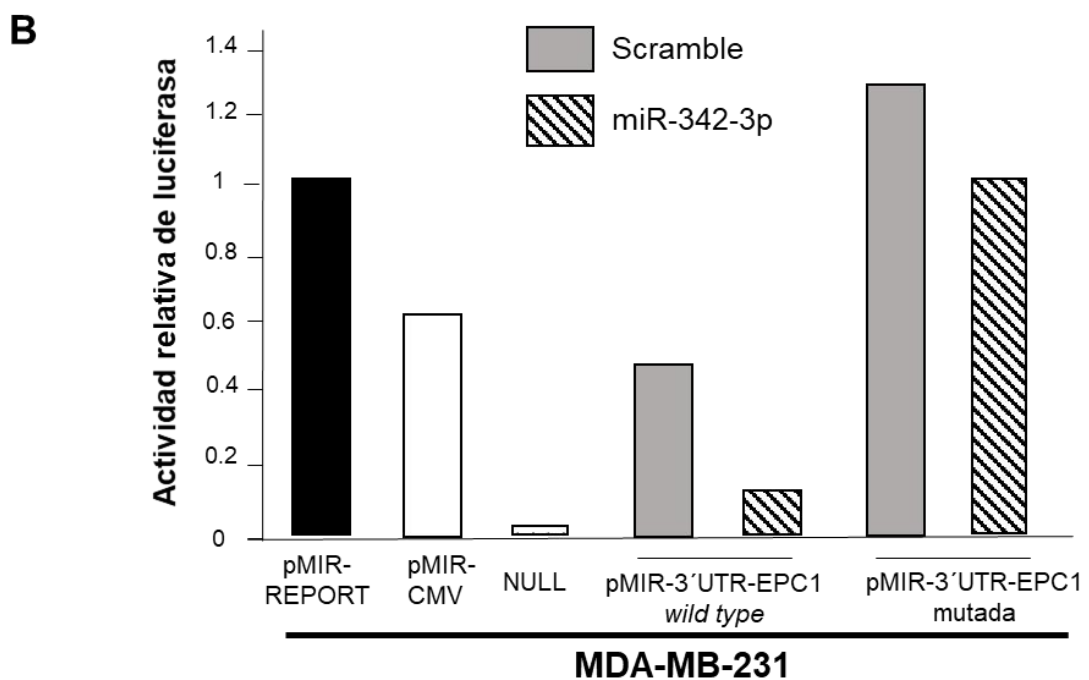
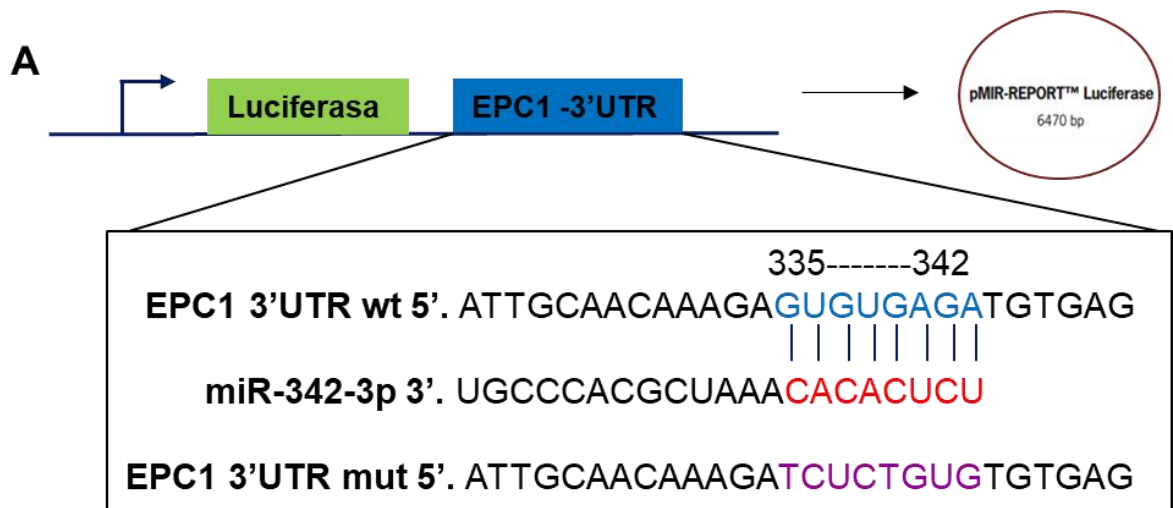


**Figura 25. Electroferograma de las secuencias obtenidas para determinar la clonación del fragmento de las construcciones. A) pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* que tiene el fragmento del gen *EPC1* que contiene la región semilla correspondiente al miR-342-3p y B) pMIR-3'UTR-EPC1 mutada que contiene el fragmento del gen *EPC1* y la región semilla correspondiente al miR-342-3p totalmente modificada. En ambas secuencias se muestra el reverso de cada primer en sentido 5'-3'.**

Una vez confirmadas las secuencias correspondientes a cada construcción pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* y pMIR-3'UTR-EPC1 mutada, se procedió a la realización del ensayo de luciferasa para confirmar que EPC1 es un blanco directo del miR-342-3p. Se realizó la co-transfección en células MDA-MB-231 colocando la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* y pMIR-3'UTR-EPC1 mutada, en conjunto con 30 nM del precursor del miR-342-3p o control negativo (scramble), colocando además como control positivo al plásmido pMIR-CMV, como control negativo pMIR-NULL y como normalizador al plásmido pMIR-REPORT Luciferasa.

En la Figura 26-A se representa esquemáticamente el sitio de unión de la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* con la región semilla del miR-342-3p y por otro lado se muestra la ausencia de complementariedad con respecto a la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 mutada; en la misma figura en el apartado B se muestra el ensayo de luciferasa con las condiciones antes mencionadas en la línea celular MDA-MB-231 observando que existe una disminución de la actividad relativa de la luciferasa (luminiscencia) en la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* cuando es co-transfectada con el precursor del miR-342-3p comparada con el control pMIR-REPORT Luciferasa y además comparada con la misma construcción que fue co-transfectada con el control negativo scramble. Sin embargo, la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 *wild type* co-transfectada con el control negativo scramble comparada con la construcción mutada en las mismas condiciones se encontró que hay una diferencia de la luminiscencia.

Adicionalmente nuestros resultados muestran que al analizar la construcción pMIR-3'UTR-EPC1 mutada en ambas condiciones de co-transfección (miR-342-3p y scramble) no se mostró una drástica disminución de la actividad de luciferasa comparada con el control pMIR-REPORT Luciferasa. Con lo anterior podríamos sugerir que EPC1 es un blanco directo del miR-342-3p en la línea celular MDA-MB-231, pues se requiere realizar al menos dos experimentos independientes adicionales (Figura 30-B).



**Figura 26. El miR-342-3p regula la expresión de *EPC1* al unirse a su extremo 3'UTR.** A) Validación de la unión de la región semilla del miR-342-3p al extremo 3'UTR de *EPC1*. B) Actividad relativa de luciferasa en la línea celular MDA-MB-231 en diferentes condiciones: células transfectadas con pMIR-REPORT, CMV, NULL, pMIR-3'UTR-*EPC1 wild type* y pMIR-3'UTR-*EPC1 mutada*; las células con las últimas dos construcciones fueron co-transfectadas con pre-miR-negativo (scramble) y con pre-miR-342-3p (30 nM).

## X. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, las alteraciones moleculares y los genes relacionados con esta enfermedad se han investigado exhaustivamente, lo que amplía nuestro conocimiento de las vías genéticas asociadas con el proceso carcinogénico. Sin embargo, aún quedan complejas interacciones por entender y como estas contribuyen a su naturaleza heterogénea, entre estas interacciones es importante conocer como los miRNAs pueden regular múltiples mRNAs blanco y a su vez como estos mRNAs tienen diferentes sitios de interacción con diferentes miRNAs (Malumbres, 2013).

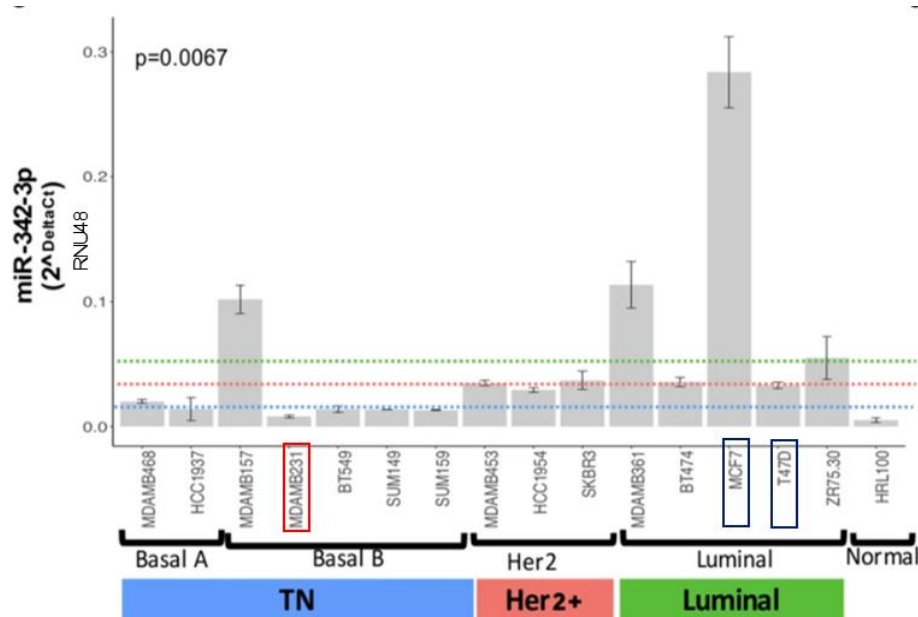
En el presente trabajo se identificó la expresión del miR-342-3p en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7, T-47D) y una línea celular normal (MCF-10A), encontrando que existe una mayor expresión en las células de cáncer de mama MCF-7 comparado con la línea normal no tumoral MCF-10A. El resultado anterior es comparable con lo reportado en la literatura por Romero-Córdoba y colaboradores (2018), analizando de la misma manera la expresión del miR-342-3p en líneas celulares de cáncer de mama e identificando que la línea celular MCF-7 tiene una mayor expresión de este miRNA comparado con el resto de las líneas celulares (basales, luminal B, HER2+) (Figura 27). La alta expresión del miR-342-3p se debe a que el miR-342-3p es un miRNA intrónico del gen EVL, que tiene dos sitios de unión proximales en el promotor del gen EVL para el receptor de estrógeno (ER+) y que la expresión del miR-342-3p depende de las secuencias reguladoras y de la expresión del gen huésped EVL; por lo cual las líneas celulares con fenotipo luminal A en este caso la línea celular MCF-7 podría estar sobre expresando al miRNA comparado con aquellas líneas celulares que carecen de la expresión de dicho receptor como lo son las líneas celulares triple negativas y HER2+.

La expresión diferencial de muchos miRNAs se correlaciona con el estado de los receptores de estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), que son miembros de la familia del factor de transcripción de la hormona nuclear, esto contribuye a la unión con la hormona esteroidea estradiol (E<sub>2</sub>) que conduce a la regulación transcripcional de genes involucrados en el control del crecimiento celular. Los receptores de estrógeno que

median la acción proliferativa de los estrógenos en las células de cáncer de mama, son factores de transcripción dependientes de ligandos que regulan la expresión de sus genes blanco a través de varios mecanismos; el primero es que el ER $\alpha$  se une directamente al DNA (elemento de respuesta al estrógeno ERE) y funciona como un coactivador, segundo que el ER promueve el reclutamiento de varias moléculas co-reguladoras (anclaje) que inducen modificaciones de cromatina que aumentan o disminuyen el nivel de transcripción del gen blanco y tercero que pueden alterar la transcripción génica a través de la modulación de las cascadas de señalización por mecanismos de acción no genómicos (Maillot *et al.* 2009).

La hormona unida al ER $\alpha$  activa a la proteína a través de fosforilación y varias señales extracelulares activan a proteínas cinasas que modulan la actividad del ER $\alpha$ , entre las principales se encuentran ERK1/2, AKT, p38 y SRC. Los miRNAs parecen contrarrestar la proliferación celular dependiente de estrógenos y su expresión está regulada por el tratamiento anti-estrógeno de las células tumorales de mama, aunque la respuesta secundaria al estrógeno a través de factores de transcripción regulados por E2 como E2F1/2 puede explicar la falta de correlación entre la unión del ER $\alpha$  y la expresión génica del blanco (Bhat-Nakshatri *et al.* 2009; Cittelly *et al.* 2010). Con lo anterior posiblemente la diferencia de expresión del miR-342-3p se deba al mecanismo de regulación que tenga el ER $\alpha$  en las líneas celulares que lo tengan presente.

Crippa *et al.* (2014) al analizar muestras de pacientes (N=52) identificaron que existe una mayor expresión del miR-342-3p en aquellos pacientes que expresan al ER+ comparados con aquellos pacientes que no lo expresan; por otro lado Savad y colaboradores (2012) encontraron que la expresión del miR-342-3p se asocia con el estadio clínico, analizando que hay una disminución drástica de su expresión en el estadio II y III que son estados clínicos de enfermedad avanzada.



**Figura 27.** Expresión del miR-342-3p en líneas celulares de cáncer de mama. Tomada de Romero-Córdoba y colaboradores (2018).

En otros tipos de cáncer en donde se ha restaurado la expresión del miR-342-3p, éste se ha asociado con la disminución de la progresión tumoral al unirse a diferentes blancos ya validados, como en cáncer colorrectal el miR-342-3p tiene como blanco directo al RNAm de la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1), en cáncer cervical humano tiene como blanco al RNAm del factor de transcripción FOXM1, en hepatocarcinoma regula a Ikk- $\gamma$ , TAB2 y TAB3 que participan en la vía NF- $\kappa$ B, en cáncer de pulmón tiene como blanco directo al RNAm del factor de transcripción E2F1 y a AGR2; y en cáncer de mama también se han validado otros blancos como el RNAm de ID4 y MCT1 (Tabla 3).

La investigación anteriormente mencionada sugiere que el miR-342-3p juega un papel muy importante en la progresión del cáncer, en específico en cáncer de mama con las líneas celulares que tienen una alta capacidad metastásica y en estudios previamente reportados se asocia con el fenotipo tumoral invasivo (TNBC), no solo en cáncer de mama sino en otros tipos de cáncer y que su restauración contribuye con la disminución de diferentes hallmarks como lo son inhibición del ciclo celular, proliferación, migración e invasión.

Por otro lado, los resultados de los fenotipos de migración e invasión en dos líneas celulares con alta capacidad metastásica como lo son la línea MDA-MB-231 y Hs

578T, contribuyeron a sugerir una asociación directa entre la disminución de ambos fenotipos y la restauración del miR-342-3p en estas líneas celulares. El miR-342-3p disminuyó significativamente el cierre de herida en ambas líneas celulares en los diferentes tiempos siendo más evidente el tiempo de cierre total de la herida de las condiciones transfectadas con el control negativo y las no transfectadas; por otro lado, en el ensayo de invasión se observó una disminución de la invasión de las células cuando fueron transfectadas con el miR-342-3p siendo más pronunciada esta disminución en las células Hs 578T. Estos datos son congruentes con lo observado en otros estudios (Tabla III), en donde se realizaron estos experimentos de migración e invasión y de igual manera encuentran una disminución de estos fenotipos al ser restaurada su expresión en líneas celulares con alta capacidad metastásica. Sin embargo, son más evidentes los resultados en ensayos de migración que en los ensayos de invasión por la dificultad que conlleva el paso de las células por las cámaras transwell previamente tratadas con matrigel.

Se ha visto que la expresión del miR-342-3p requiere de condiciones celulares con altos niveles de oxígeno y glucosa, por lo cual modula la glucólisis alterando la captación de glucosa, la producción de lactato y la tasa de acidificación extracelular al suprimir la vía de señalización PI3K/AKT/GLUT1 mediada por IGF-1R; el flujo de glucosa y la glucólisis aeróbica puede afectar el pH celular que a su vez controla negativamente los mecanismos de adhesión celular a través de vías específicas, como la adhesión y la migración dependientes de integrinas. Por otro lado, si hay condiciones de hipoxia y privación de glucosa, la regulación del miR-342-3p tiene una modulación descendente y la consiguiente sobreexpresión de transportadores (MCT1) que alteren el flujo de lactato para que las células tumorales sobrevivan (Romero-Córdoba *et al.* 2018).

Además la base de datos TCGA contiene información acerca de la expresión de este miRNA en pacientes en donde se observa que aquellos pacientes con fenotipo basal (N=33) tienen una menor expresión del miR-342-3p comparada con el subtipo luminal (N=116) y HER2+ (N=14), aquí se comprueba que la expresión del miRNA se asocia con el fenotipo y con la progresión de la enfermedad; adicionalmente se ha determinado por Martínez-Gutiérrez *et al.* (2019) que la alta expresión de este miRNA contribuye con la respuesta al tratamiento sistémico y la supervivencia general

libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama y por Romero-Córdoba *et al.* (2018) que la mayor expresión del miR-342-3p se asocia con una mejor supervivencia y ausencias de recaídas.

Se ha observado que la ganancia de función del miR-342-3p altera importantes vías relacionadas con las funciones clave en las células tumorales, como la modulación ascendente del ensamblaje de nucleosomas y las enzimas modificadoras de la cromatina-histonas, así como la modulación a la baja de la formación de colágeno, la organización de la matriz extracelular, los transportes de ácido gamma, el metabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo celular. Por lo anterior, se decidió analizar un posible blanco del miR-342-3p que estuviera involucrado en la maquinaria epigenética, como lo es la proteína EPC1, que actúa como una acetiltransferasa de histonas y que su alta expresión se ha visto asociada con la progresión tumoral y metástasis, además de baja supervivencia en los pacientes con cáncer de vejiga y cáncer de mama (Wang *et al.* 2016).

Al analizar la expresión de EPC1 a nivel de proteína mediante Western blot no encontramos una asociación directa entre la expresión de la proteína con el subtipo tumoral en extractos nucleares y totales, esto pudo deberse al anticuerpo utilizado y que en aquellos extractos totales la banda identificada tiene un mayor peso al esperado y esto podría deberse a la complejidad de la proteína por unirse a factores de transcripción como lo es el factor de transcripción E2F1 y a otras proteínas que forman parte del complejo NuA4 para llevar a cabo su actividad de histona acetiltransferasa; sin embargo, Wang *et al.* (2016) observaron que la expresión de la proteína se asocia con el subtipo tumoral en varios tipos de cáncer incluido cáncer de mama y argumentaron que EPC1 es un regulador clave de varios genes que promueven la progresión metastásica. Debido a lo anterior se realizaron otros experimentos como inmunofluorescencias que nos permitieran apreciar de otra manera la expresión de la proteína y además nos diera información de su localización que ha sido reportada específicamente nuclear en la base de datos UniProt y The Human Atlas. Los resultados en las dos líneas celulares analizadas muestran una posible distribución perinuclear en ambas líneas celulares y que puede además encontrarse una localización fuera de este compartimento celular, con ello también se cuestiona la diferencia de expresión tanto a nivel nuclear como

a nivel total de proteína; la cuantificación de los campos en las células nos permitió determinar que en la línea celular MDA-MB-231 existe una mayor expresión de la proteína EPC1 en comparación con la línea T-47D, lo que nos llevaría a sugerir que para este experimento existe una asociación de acuerdo al subtipo tumoral, siendo mayor la expresión de EPC1 en la línea celular triple negativa.

Para complementar esta información se realizó un análisis a partir de RNA obtenido de las líneas celulares y se llevó a cabo PCR punto final, en donde se aprecia que existe una disminución de la expresión de EPC1 en la línea celular no tumoral MCF-10A comparado con las líneas tumorales MDA-MB-231, Hs 578T, MCF-7 y T-47D, adicionalmente se revisaron bases de datos en donde analizaran las mismas líneas celulares encontrando el estudio de Heiser (2012) en donde muestra una expresión similar en las cuatro líneas tumorales sin embargo en su estudio se aprecia una mayor expresión en las líneas triple negativas MDA-MB.231 y Hs 578T comparado con la expresión de EPC1 en la línea no tumoral MCF-10A y las líneas luminales; además revisando la base de datos TCGA en tumores de pacientes para analizar la expresión se determinó que ésta se asocia con el fenotipo tumoral implicando una mayor expresión en el subtipo basal; esto nos sugiere que la expresión de esta proteína identificada como una onco-proteína favorece el desarrollo de un estado avanzado de cáncer.

Lo anterior nos sugiere que en el subtipo basal la expresión de la proteína EPC1 esta aumentada comparada con los subtipos luminales y que por otra parte la expresión del miR-342-3p en el subtipo basal se encuentra disminuida comparada con la alta expresión en el subtipo luminal, además es interesante saber que el miR-342-3p tiene como blanco a el factor de transcripción E2F1 y que EPC1 se une directamente a este factor de transcripción para activar genes asociados a metástasis siendo está otra manera de disminuir la progresión tumoral.

Finalmente, para determinar que EPC1 es un blanco directo del miR-342-3p se llevó a cabo el ensayo de luciferasa en la línea celular MDA-MB-231 lo que nos llevó a confirmar que el miRNA se une directamente a la región 3'UTR de EPC1 para inhibir su traducción o para degradar el mRNA ya que disminuyó la luminiscencia cuando se tomaron las lecturas de actividad de luciferasa en la condición de la

construcción *wild type* y no así cuando se analizó la expresión relativa de luciferasa en la construcción mutada.

Como se mencionó el cáncer de mama es la primera causa de muertes en mujeres en México, su naturaleza heterogénea hace difícil encontrar no solo una cura si no la evaluación de los factores de riesgo; por lo cual se necesitan nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico para identificar a los pacientes con mayor riesgo lo que permitiría implementar nuevas estrategias de tratamiento para las personas con este tipo de cáncer. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podrían utilizarse estas dos firmas: la baja expresión del miR-342-3p y la alta expresión de la proteína EPC1 en conjunción para tener un mejor diagnóstico y una mayor probabilidad de un tratamiento oportuno, además que el miR-342-3p podría servir como un blanco terapéutico.

## XI. CONCLUSIONES

- El miR-342-3p se sobre expresa en la línea celular MCF-7 en comparación con la línea celular normal MCF10A y al parecer no muestra cambios en su expresión en las líneas celulares TNBC respecto a MCF-10A.
- La alta expresión de miR-342-3p se podría asociar con la expresión del ER+ en las células MCF7.
- La restauración del miR-342-3p inhibe la migración y promueve una disminución en la invasión celular *in vitro* en las células MDA-MB-231 y Hs 578T.
- La proteína EPC1 tiene una distribución perinuclear y tiende a presentar una mayor expresión en líneas celulares de cáncer de mama TNBC cuando se compara con la línea no tumoral MCF-10A.
- *EPC1* tiene una alta expresión en tumores con fenotipo basal en comparación con los tumores luminales y HER2+.
- *EPC1* es un blanco directo del miR-342-3p en la línea celular MDA-MB-231.

## XII. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido comprender de mejor manera la posible actividad funcional del miR-342-3p en cáncer de mama, teniendo en cuenta la importancia de las interacciones que contribuyen a la regulación de múltiples mRNAs blanco como lo es el gen *EPC1*, lo anterior podría ser validado mediante western blot utilizando un anticuerpo que permita diferenciar entre isoformas o a través de RT-qPCR una vez restaurada la expresión del miRNA en las líneas celulares de cáncer de mama para confirmar la implicación directa del miRNA para regular a su mRNA blanco. El análisis de la expresión en tumores del miR-342-3p y de *EPC1* nos sugieren que existe un mecanismo modulador entre estos dos reguladores y que hay una correlación de acuerdo con el fenotipo tumoral, para validar que el efecto de la migración e invasión este coordinada por esta modulación seria mediante ensayos *knock out* en donde haya una depleción de *EPC1* o analizando la expresión de otros posibles genes blanco del miR-342-3p involucrados en la migración como lo es la proteína *TTBK2* que está relacionada con la remodelación del citoesqueleto.

### XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Target Scan Human. Prediction of microRNAs target. Consultado 12/02/19 en: <http://www.targetscan.org/>
2. Aigner A. (2011). MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med (Berl)*; 89(5):445-57.
3. American Cancer Society. Consultado el 12/05/19 en <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>.
4. Arce Claudia, Bargalló Enrique, Villaseñor Yolanda, Gamboa Carlos, Lara Fernando, Pérez Sánchez Víctor y Villarreal Patricia. (2011). Oncoguía: Cáncer de mama. *Cancerología* 6: 77-86.
5. ATCC. Consultado 12/04/19 en: <https://www.atcc.org/>.
6. Audia JE. & Campbell RM. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;8(4): a019521.
7. Avvakumov N, Côté J. (2007). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*. 26(37):5395-5407.
8. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 13(7):511-8.
9. Baylin SB, Jones PA. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*; 11(10):726-34.
10. Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, Carroll JS, Brown M, Hammond S, Srour EF, Liu Y, Nakshatri H. (2009). Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*; 37:4850–4861.
11. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool – NIH. Consultado 20/03/20 en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
12. Ceballos C. G. y Hernández R. N. (2008). Moduladores de Progresión en Cáncer de Mama. *Cancerología* 3: 41-49.
13. Cittelly DM, Das PM, Spoelstra NS, Edgerton SM, Richer JK, Thor AD, Jones FE. (2010). Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors. *Mol Cancer*. 20; 9:317.

14. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. (2018). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol* .2(1):4.
15. Chorazy M. (1985). Sequence rearrangements and genome instability. A possible step in carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 109(3):159-72.
16. Crippa E, Lusa L, De Cecco L, Marchesi E, Calin GA, Radice P, Manoukian S, Peissel B, Daidone MG, Gariboldi M, Pierotti MA. (2014). miR-342 regulates BRCA1 expression through modulation of ID4 in breast cancer. *PLoS One*. 9(1): e87039.
17. Dawson MA, Kouzarides T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*; 150 (1):12-27.
18. Devi, P.U. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Adm*. 17(1): p. 16-24.
19. Doyon Y, Côté J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev*; 14(2):147-54.
20. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, eds. *American Joint Committee on Cancer Staging Manual*. (2010). 7th ed. New York, NY: Springer.
21. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. (2018). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [26/03/2020].
22. Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016–1036.
23. Hanahan D & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-74.
24. Han Y, Zhang K, Hong Y, Wang J, Liu Q, Zhang Z, Xia H, Tang Y, Li T, Li L, Xue Y, Hong W. (2018). miR-342-3p promotes osteogenic differentiation via targeting ATF3. *FEBS Lett*; 592(24):4051-4065.
25. Heiser. (2012). *Breast Cancer Cell Lines*. Consultado 22/02/20 en: <https://xenabrowser.net/>
26. Holliday DL, Speirs V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*;13(4):215.
27. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S. (2011). Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res*;13(6):225.

28. Hudder A. & Novak RF. (2008). miRNAs: effectors of environmental influences on gene expression and disease. *Toxicol Sci*;103(2):228-40.
29. Instituto Nacional de Estadística y Geografía: INEGI. (2016). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE).13p.
30. Instituto Nacional del Cáncer (NIH), consultado 12/02/19 en: [https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#\\_125](https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#_125).
31. Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK. (2012). Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chem Res Toxicol*; 25(1):61-73.
32. Klinge CM. (2018). Non-Coding RNAs in Breast Cancer: Intracellular and Intercellular Communication. *Noncoding RNA*.12;4(4).
33. Li XR, Chu HJ, Lv T, Wang L, Kong SF, Dai SZ. (2014). miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer. *FEBS Lett*;588(17):3298-307.
34. Lichtenstein AV. (2009). Carcinogenesis: evolution of concepts. *Biochemistry (Mosc)*. 74(4):353-61.
35. Lin S, Gregory RI. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*; 15(6):321-33.
36. Liu Q, Zhang H, Jiang X, Qian C, Liu Z, Luo D. (2017). Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis. *Mol Cancer*;16(1):176.
37. López-Camarillo C, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Pérez-Plasencia C, Del Moral-Hernández O, Castaneda-Ortiz EJ, Rodríguez-Cuevas S. (2012). MetastamiRs: non-coding MicroRNAs driving cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*. 13(2):1347-79.
38. Lowery A. J., Miller N., Devaney A., McNeill R.E., Davoren P. A., Lemetre C., Benes V., Schmidt S., Blake J., Ball G. and Kerin M. (2009). MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Research*; vol 11, no.3: 1-18.
39. Maillot G, Lacroix-Triki M, Pierredon S, Gratadou L, Schmidt S, Bénès V, Roché H, Dalenc F, Auboef D, Millevoi S, Vagner S. (2009). Widespread

- estrogen-dependent repression of micrnas involved in breast tumor cell growth. *Cancer Res*;69(21):8332-40.
40. Malumbres M. (2013). miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med*;34(4):863-74.
41. Martinez-Gutierrez AD, Catalan OM, Vázquez-Romo R, Porras Reyes FI, Alvarado-Miranda A, Lara Medina F, Bargallo-Rocha JE, Orozco Moreno LT, Cantú De León D, Herrera LA, López-Camarillo C, Pérez-Plasencia C, Campos-Parra AD. (2019). miRNA profile obtained by next-generation sequencing in metastatic breast cancer patients is able to predict the response to systemic treatments. *Int J Mol Med*. 44(4):1267-1280.
42. miRWalk. Consultado 20/04/19 en: <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/human/gene/9679/>
43. Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW. Consultado 10/02/19 en: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>
44. Organización Mundial de la Salud, consultado 12/02/2019, disponible en: <https://www.who.int/es/>
45. Ott M. & Verdin E. (2010). HAT trick: p300, small molecule, inhibitor. *Chem Biol*;17(5):417-8.
46. Peters JM, Gonzalez FJ. (2018). The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 165(2):272-276. doi: 10.1093/toxsci/kfy184.
47. Ravegnini G, Sammarini G, Hrelia P, Angelini S. (2015). Key Genetic and Epigenetic Mechanisms in Chemical Carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 148(1):2-13.
48. Redig AJ, McAllister SS. (2013). Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med*.;274(2):113-26.
49. Romero-Cordoba SL, Rodriguez-Cuevas S, Bautista-Pina V, Maffuz-Aziz A, D'Ippolito E, Cosentino G, Baroni S, Iorio MV, Hidalgo-Miranda A. Loss of function of miR-342-3p results in MCT1 over-expression and contributes to oncogenic metabolic reprogramming in triple negative breast cancer. *Sci Rep*. 2018 Aug 16;8(1):12252.
50. Ronchetti D, Lionetti M, Mosca L, Agnelli L, Andronache A, Fabris S, Deliliers GL, Neri A. (2008). An integrative genomic approach reveals coordinated expression of intronic miR-335, miR-342, and miR-561 with deregulated host genes in multiple myeloma. *BMC Med Genomics*; 1:37.

51. Rupaimoole R, Slack FJ. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*; 16(3):203-222.
52. Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoohi R, Fereidooni F, Mansouri F, Modarressi MH. (2012). Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in Breast cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*;13(3):873-7.
53. Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 9(5):311-20.
54. Searle NE, Pillus L. (2018). Critical genomic regulation mediated by Enhancer of Polycomb. *Curr Genet*; 64(1):147-154.
55. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C, Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe Y, Yanagisawa K, Takahashi T. (2015). miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis*. 36(12):1464-73.
56. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*;451(7175):147-52.
57. TCGA Cancer Regulome tool (Software). Consultado 02/03/20 en: <http://explorer.cancerregulome.org/>
58. The Human Atlas consultado el 16/04/20, disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120616-EPC1>.
59. UniProt EPC1 consultado el 16/04/20, disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H2F5>.
60. Wang H, Wu J, Meng X, Ying X, Zuo Y, Liu R, Pan Z, Kang T, Huang W. (2011). MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis*. 32(7):1033-42.
61. Wang Y, Alla V, Goody D, Gupta SK, Spitschak A, Wolkenhauer O, Pützer BM, Engelmann D. (2016). Epigenetic factor EPC1 is a master regulator of DNA damage response by interacting with E2F1 to silence death and activate metastasis-related gene signatures. *Nucleic Acids Res*.44(1):117-33.
62. Wang Y, Toh HC, Chow P, Chung AY, Meyers DJ, Cole PA, Ooi LL, Lee CG. (2012). MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms. *FASEB J*;26(7):3032-41.

63. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 5(8):591-602.
64. Xie H, Li L, Zhu G, Dang Q, Ma Z, He D, Chang L, Song W, Chang HC, Krolewski JJ, Nastiuk KL, Yeh S, Chang C. (2015). Infiltrated pre-adipocytes increase prostate cancer metastasis via modulation of the miR-301a/androgen receptor (AR)/TGF- $\beta$ 1/Smad/MMP9 signals. *Oncotarget*;6(14):12326-39.
65. Xie Xiao, Liu Hongtao, Wang Mingsong, Ding Fangbao, Xiao Haibo, Hu Fengqing, Rui Hu & Ju Mei. (2015). miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Tumor Biol*. 1-8
66. Xue X, Fei X, Hou W, Zhang Y, Liu L, Hu R. (2018). miR-342-3p suppresses cell proliferation and migration by targeting AGR2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*; 412:170-178.
67. Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, Liu Y, Huang JD, Song E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer*; 10:117.
68. Yuhao Chen and Xiaowei Wang (2020) miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*. 48(D1): D127-D131.
69. Zhang H, Devoucoux M, Song X, Li L, Ayaz G, Cheng H, Tempel W, Dong C, Loppnau P, Côté J, Min J. (2020). Structural Basis for EPC1-Mediated Recruitment of MBTD1 into the NuA4/TIP60 Acetyltransferase Complex. *Cell Rep*; 30(12):3996-4002.
70. Zhao L, Zhang Y. (2015). miR-342-3p affects hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulating NF- $\kappa$ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun*;457(3):370-7.

## XII. APÉNDICE

### **Medio para mantenimiento de las células**

500 mL de DMEM, 50 mL de suero fetal bovino (Invitrogen) previamente inactivado durante 30 min a 56 °C y 5 mL de antibiótico Penicilina (10.000 U/mL)- Estreptomicina (10.000 µg/mL) (Invitrogen).

### **Buffer de fosfato salino (PBS 10X) pH 7.4**

80 g de NaCl, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.45 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) y 2 g KCl. Se disuelve y ajusta el pH con HCl, se afora con agua bidestilada hasta 1L y se esteriliza en autoclave.

### **PBS 1X– EDTA 0.2%**

500 mL PBS 1X pH 7.4 y 1 g EDTA. Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave.

### **Soluciones para extracción de proteínas**

Buffer 1: 10 mM Hepes pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH 8, 1% Nonidet P-40, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.1 mM fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), 2 µg/mL Aprotinina y 2 µg/mL Leupeptina

Buffer 2: 20 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>10, % Glicerol, 350 mM NaCl, 0.2 mM EDTA pH 8, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 2 µg/mL Aprotinina, 2 µg/mL Leupeptina

TNTE: 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (0.6 g), 150 mM NaCl (0.87 g), 0.5% Tritón X-100 (500 µL), 5 mM EDTA (0.186 g). Se afora a 100 mL con agua bidestilada.

### **Reactivo de Bradford**

50 mg de azul de Coomasie G-250, 25 mL de etanol al 100%, 50 mL de ácido fosfórico al 85 % y 500 mL de agua bidestilada. La solución se filtra con papel Whatman No. 1.

### **Soluciones para geles de Acrilamida (SDS-PAGE).**

Solución de Acrilamida/Bisacrilamida (30%: 0.8%): 29.2 g Acrilamida, 0.8 g Bisacrilamida se disuelve en 50 mL de agua destilada. Una vez disuelto se afora

hasta 100 ml con agua destilada. Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No. 1. Almacenar a 4°C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

1.5 M de Tris-HCl pH 8.8: 18.15 g de Tris base en 100 ml de agua destilada.

0.5 M de Tris-HCl pH 6.8: 6 g de Tris base en 100 mL de agua destilada.

Dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %: 100 g de SDS se disuelven en 1 L de agua destilada.

Persulfato de Amonio (PSA) al 10 %: 1 g de PSA en 10 mL de agua. Realizar alícuotas y congelar a -20°C. Alícuota en uso almacenar a 4°C.

TEMED (Tetrametiletilendiamina): Almacenar a 4°C.

**Tabla 7. Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para preparar dos mini-geles:**

<b>Soluciones</b>	<b>Gel separador 10%</b>	<b>Soluciones</b>	<b>Gel concentrador</b>
<b>Acrilamida/Bis</b>	5 mL	Acrilamida/Bis	0.650 mL
<b>1.5 M Tris HCl pH 8.8</b>	3.70 mL	0.5 M Tris HCl pH 6.8	1.25 mL
<b>SDS 10%</b>	50 µL	SDS 10%	25 µL
<b>Agua</b>	6.25 mL	Agua	3.05 mL
<b>PSA 10%</b>	50 µL	PSA 10%	25 µL
<b>TEMED</b>	10 µL	TEMED	5 µL
<b>Volumen final</b>	15 mL		5 mL

#### **Buffer de carga para proteínas (2X)**

2.5 mL de Tris-HCl 0.5 M, 0.4 mg de SDS, 2 mL de glicerol, 200 µg de β-mercapto-etanol y 0.1 mg de azul de bromofenol en un volumen final de 10 mL, se ajusta el pH a 6.8.

#### **Tris-base + Glicina (10X)**

30 g de Tris-base y 144 g de glicina. Se afora a 1 L con agua destilada.

### **Buffer de corrida para electroforesis de proteínas 6X**

- 100 mL Tris-base + Glicina (10X) y 10% SDS. Se afora a 1 L con agua destilada.
- 7 mL de Tris HCl 4 X pH 6.8 (Solución A), 3 mL de glicerol, 1 g de SDS, 0.93 g de DTT- $\beta$ -mercaptoetanol al 0.2%, 1.2 mg de bromofenol. Se afora a 10 mL. Para la solución A: disolver 6.05 g de Tris-base en 40 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con HCl 1N, se mezcla y afora a 100 mL y se filtra con un filtro de 0.45  $\mu$ m. Se almacena a 4°C durante un mes.

### **Buffer de transferencia de transferencia (1X)**

100 mL de Tris-base + Glicina (10X) y 200 mL de metanol al 100%. Aforar a 1L con agua destilada.

### **Solución de Azul de Coomasie (1 L)**

Coomassie R-250 al 0.25%, 500 mL de metanol y 70 mL de ácido acético; aforar con agua bidestilada hasta 1 L.

### **Solución desteñidora**

50 mL de metanol al 100% y 70 mL de ácido acético. Aforar con agua bidestilada hasta 1 L.

### **Solución bloqueadora para Western blot**

5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4

### **Buffer de Trizma-base salino (TBS-10X)**

24.2 g de tris-base, 80 g de NaCl; se ajusta el pH a 7.6 con HCl y se afora a 1 L con agua bidestilada.

### **TBS + tween 20 (1X)**

3.5 g Tris, 8.7 g NaCl y 0.5 mL de Tween 20. Ajustar el pH a 7.6 y aforar a un litro con agua bidestilada.

### **Solución de Stripping**

Preparar una solución con 3.78 g de Tris y 300 mL de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH a 6.7 con HCl. Para 500 mL: 300 mL tampón Tris-HCl, 100 mL SDS al 10%, 4.472 mL β-mercaptoetanol y aforar hasta 500 mL con agua bidestilada.

### **TAE (50X)**

242 g de Tris-base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 37.2 g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O. aforar con agua hasta 1 L.

### **Geles de agarosa para ácidos nucleicos**

Gel de electroforesis de agarosa/TAE al 1-3% (según tamaño del fragmento de PCR). Añadir 2 μL de Sample Buffer 6X a los 10 μL de volumen final y cargar en el gel de 10-20 μL.

### **Soluciones para el proceso de clonación.**

Medio LB: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, agua para aforar a 1 L. Se ajusta el pH a 7.5 y se esteriliza por autoclave.

### Soluciones para lisis alcalina tradicional

- Solución I: 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA. Esteriliza por autoclave y se almacena a 4°C.
- Solución II: 0.2 M NaOH, SDS al 1%. Se prepara el día que se utiliza.
- Solución III: 5 M de acetato de potasio, pH 4.8. Se almacena a temperatura ambiente.

Buffer de alineamiento 1X de primers hibridados: 30 mM de HEPES pH 7.4, 100 mM de acetato de potasio y 2 mM de acetato de magnesio.

### **Agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).**

Agua Milli Q, Millipore DEPC 0,01%, añadir el DEPC bajo campana y dejar durante 16 horas a 37°C con agitación. Se esteriliza en autoclave para inactivar el DEPC que puede alterar los residuos de purinas del RNA por carboximetilación.