



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Estudio de la relevancia funcional
del RNA largo no codificante
HOTAIR en el mimetismo
vasculogénico dependiente de
miR-204 en cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Allan Lozano Romero

DIRECTOR

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO



Ciudad de México, enero de 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[©]

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

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

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra, María Elizbeth Álvarez Sánchez UACM.

Secretario: Dr, Mario Cesar López Camarillo UACM.

Vocal: Dra, Elisa Irene Azuara Liceaga UACM.

1^{er}. Suplente: Dra, Martha Yocupicio Monroy

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario Cesar López Camarillo

Universidad Autónoma de la Ciudad

de México

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio Astudillo de la Vega por la oportunidad invaluable de permitirme realizar mis estudios y seguir aprendiendo. *"today's knowledge for tomorrow's cancer cure"*

A el Dr. César López Camarillo por su paciencia y dedicación para realizar este trabajo, por la oportunidad extraordinaria de pertenecer a su equipo de trabajo.

A las lectoras de mi tesis, Dra. Elizabeth Álvarez, Dra. Elisa Azuara y Dra. Martha Yocupicio, su ayuda a lo largo de mis estudios fue indispensable cada consejo y palabras de aliento fueron muy significativas para mí.

A todos los doctores que participaron en mi formación: Minerva Camacho, Mauricio Castañón, José Olivares, Selene Zárate, Lilia López y todos los demás profesores que entregan su tiempo y dedicación a la formación de estudiantes.

Al Dr. José Ali Flores Pérez por todo su apoyo, enseñanzas, paciencia y dedicación con la que tomó este largo camino de mi maestría.

A la Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz por todas sus enseñanzas, consejos, ayuda, apoyo académico y emocional.

A todo el personal de Nanopharmacia Diagnóstica que de manera directa o indirecta me ayudaron a realizar este trabajo. Sergio y Alma por su apoyo en el laboratorio.

A mis maravillosos compañeros de laboratorio, Estefanía, Martha, Iraiz, Yecenia, Yarely, Macrina, Rogelio, Fernando por toda su ayuda, apoyo y esfuerzo para lograr terminar este trabajo, Erik Lizárraga por su ayuda en el revelado de las inmunofluorescencias.

Al mejor personal de apoyo: Catalina, Viviana, Dana muchas gracias por todo lo que hicieron por mí y todos mis compañeros.

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en este logro y que no me alcanzan las hojas para mencionar a cada uno de ustedes muchas gracias por estar ahí siempre.

DEDICATORIAS

A mi amada esposa Ana Karen Ávila, eres la mujer más increíble que he conocido, eres un faro de luz que me guía por todas las dificultades de la vida, eres mi inspiración y motivación para enfrentar las adversidades de la vida. Gracias por ser mi compañera de vida. Te Amo.

A mis padres por haberme dado las bases para llegar hasta aquí, mi admiración por ustedes aumenta cada día que avanzo y me doy cuenta de todo lo que hicieron por mí.

A mis hermanos Israel, Erick y a mi cuñada Vanya por todos los momentos que compartimos en familia, por ser un ejemplo para seguir.

A mis sobrinos William y Diego, espero que esto les sirva de ejemplo en el futuro y no salgan tan cabezones como sus padres.

A mis amigos: Diego, Isaac, Ely y todos aquellos que por alguna razón no mencione su nombre, cada momento con ustedes ha sido invaluable y he aprendido algo de ustedes que sin duda me ha ayudado a construir mi vida hasta este momento.

Índice

Abreviaturas	5
Resumen	7
Abstract	8
1.1 El cáncer	9
1.3 Origen del cáncer	11
1.4 Genes relacionados con cáncer	12
1.5 Hallmarks del cáncer	13
1.5.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento	13
1.5.2 Insensibilidad a las señales anti-crecimiento	14
1.5.3 Evasión a los procesos de muerte celular programada (apoptosis)	15
1.5.4 Ilimitado potencial replicativo	16
1.5.5 Angiogénesis sostenida	16
1.5.6 Invasión a tejidos y metástasis	17
1.6 Epidemiología del cáncer.	19
1.7 Cáncer de mama	20
1.7 Tratamiento del cáncer de mama	25
2.0 Antecedentes Particulares	27
2.1 Mimetismo vasculogénico	27
2.1.1 El microambiente tumoral y el mimetismo vasculogénico	29
2.1.2 FAK como regulador del mimetismo vasculogénico	30
2.2 Los MicroRNAs en cáncer	34
2.2.1 MicroRNAs en cáncer de mama	35
2.2.2 El papel del miR-204 en el cáncer de mama	36
2.3 Los RNA largos no codificantes	38
2.3.1 La biogénesis de los lncRNAs	40
2.5 RNA largo no codificante HOTAIR en cáncer	44
3.0 Hipótesis del trabajo	48
4.0 Justificación del proyecto	49
5.0 Objetivo General	50
5.1 Objetivos particulares	50
6.0 Estrategia experimental	51

7.0 MATERIALES Y METODOS	53
7.1 Análisis de la expresión de HOTAIR en tumores de cáncer de mama	53
7.2 Mantenimiento de líneas celulares	53
7.3 Extracción de RNA.....	53
7.4 Transcripción reversa y reacción de la cadena polimerasa en tiempo real (RT-PCR).....	54
7.5 Determinación de la expresión relativa de HOTAIR	55
7.6 Transfección del inhibidor de HOTAIR	56
7.7 Ensayos de mimetismo vasculogénico	56
7.8 Ensayo de migración celular (Ensayo de herida).....	57
7.9 Ensayos de inmunofluorescencia.....	57
7.10 Predicción de interacción lncRNA HOTAIR y miR-204.....	58
7.11 Construcción de plásmido pMIR-report HOTAIR.....	58
7.12 Ensayo de gen reportero de luciferasa.....	59
7.13 Determinación de la actividad de Luciferasa.....	61
7.14 Extracción de proteínas.....	61
7.15 Ensayos de Western blot	62
8.0 Resultados	64
8.1 Análisis de la expresión de HOTAIR en tumores y tejido mamarios normal utilizando la base de datos de Oncomine	64
8.2 Expresión de HOTAIR en líneas celulares de cáncer de mama crecidas en condiciones de normoxia e hipoxia	66
8.3 Silenciamiento de la expresión de HOTAIR en las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t.....	68
8.4 Ensayos de mimetismo vasculogénico en líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t con HOTAIR inhibido.....	71
8.5 Ensayos de migración en líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t con HOTAIR silenciado.....	78
8.6 Análisis de la expresión de FAK en células MDA-MB-231 con HOTAIR inhibido por medio de IF	84
8.7 Comprobación de la interacción HOTAIR/miR-204 por ensayos de luciferasa. ...	86
8.8 Validación de FAK como blanco directo del angiomiR-204.	92
9.0 Discusión	98
10.0 Conclusiones.	103
11.0 Bibliografía	104

Índice de Figuras

Figura 1. Hallmarks del cáncer.....	18
Figura 2. Tejidos donde se presenta el cáncer de mama.....	24
Figura 3. Vías moleculares asociados a mimetismo vasculogénico.....	32
Figura 4. Funciones asociadas a los RNA largos no codificantes.....	42
Figura 5. Interacción de lncRNA con miRNA	43
Figura 6. Expresión de HOTAIR en adenocarcinoma de mama y en tejido circundante.....	65
Figura 7. Expresión relativa de HOTAIR en condiciones de normoxia e hipoxia con dos líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t.....	67
Figura 8. Análisis de la expresión de HOTAIR en células Hs578t en condiciones de normoxia e hipoxia	69
Figura 9. Ensayo de mimetismo vasculogénico en MDA-MB-231.....	74
Figura 10. Ensayo de mimetismo vasculogénico en Hs578t	76
Figura 11. Ensayos de migración celular por herida en MDA-MB-231.....	80
Figura 12. Cuantificación de la migración en MDA-MB-231.....	81
Figura 13. Ensayos de migración celular por herida en Hs578t	82
Figura 14. Cuantificación de la migración en Hs578t	83
Figura 15. Determinación de la proteína FAK por inmunofluorescencia.....	85
Figura 16. Predicción de la interacción entre HOTAIR y miR-204.....	88
Figura 17. Diseño del plásmido para comprobar la interacción de HOTAIR y miR-204.....	89
Figura 18. Cuantificación de la actividad de la luciferasa, comprobación de interacción HOTAIR- miR-204.....	90
Figura 19. Cuantificación de miR-204 en células control e inhibidas de HOTAIR,	91
Figura 20. Región semilla del miR-204 en la fracción 3'UTR de FAK.....	94
Figura 21. Diseño del plásmido para comprobar la interacción de 3'UTR de FAK y miR-204.....	95
Figura 22. Cuantificación de la actividad de la luciferasa, comprobación de interacción FAK- miR-204.....	96
Figura 23. Western Blot de FAK. Comprobación de la inhibición de FAK en presencia del miR-204.....	97

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación Molecular del Cáncer de Mama,.....	23
Tabla 2. Tipos de cáncer asociados con HOTAIR y los procesos de Hallmarks de cáncer.	45

Abreviaturas

3'UTR	Región no traducida 3'
ANGPT1	Angiopoyetina 1
B-Gal	Beta galactosa
cADN	ADN codificante
CE	Células endoteliales
CM	Cáncer de mama
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Nucleósido trifosfato
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
Eph2A	Receptor de ephrin tipo A 2
ERK1 / ERK2	Cinasa de regulación extracelular
ERO	Elemento de respuesta a hipoxia
FAC	Cuadro de tratamiento 5-fluoruracilo, Epirubicina y Ciclofosfamida
FAK	Cinasa de adhesión focal
FEC	Cuadro de tratamiento 5-fluoruracilo, Adriamicina y Ciclofosfamida
h	Horas
HER2	Factor de crecimiento epidermal 2
HIF-1α	Factor inducible de hipoxia 1 alfa
HOTAIR	Hox transcript antisense RNA
Ki67	Factor de proliferación celular
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
min	Minutos
miRNA	microRNA
ml	Mililitros
μl	Microlitros
MMP	Metaloproteasas
MRE	Elemento de regulación modular
mut	Mutado
MV	Mimetismo vasculogénico
ng	nanogramos
nt	Nucleótidos
°C	Centígrados
pmol	picomol
PAS	Ácido peryodico de Schiff
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción de la cadena de polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PTK	Receptor de tirosina cinasa
PR	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto

RB	Proteína Retinoblastoma
RE	Receptor de estrógeno
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA^m	RNA mensajero
RNA pol II	RNA polimerasa II
RP	Receptor de progesterona
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TA	Temperatura ambiente
TAC	Cuadro de tratamiento docetaxel, Adriamicina y Ciclofosfamida
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TrKB	Receptor de tirosina cinasa
UTR	Región no traducida
v	Voltaje
VE-cadherina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Factor de crecimiento epidermal vascular
VEGFR2	Receptor del factor de crecimiento epidermal vascular 2

Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte más frecuente de mujeres en México, un fenómeno que empeora el pronóstico de los pacientes con este tipo de cáncer es la presencia de mimetismo vasculogénico el cual se define como la formación de redes tridimensionales de células no epiteliales para la obtención de oxígeno y nutrientes. Se ha demostrado la participación de proteínas como FAK. Los miRNA son moléculas de RNA pequeños de 20-25 nucleótidos que tienen un papel como reguladores postranscripcionales, el miR-204 se ha demostrado que inhibe la formación de mimetismo vasculogénico y se tenían indicios de que el RNA mensajero que codifica para la proteína FAK era uno de sus blancos directos. Recientemente se ha reconocido a los RNA largos no codificantes como reguladores de la expresión génica, uno de los mecanismos descritos mediante el cual realizan la regulación es la interacción directa secuencia específica con los miRNA, llamada esponja de miRNA, un RNA largo no codificante que se ha reportado que está sobre expresado en cáncer es HOTAIR, HOTAIR está sobre expresado en cáncer de mama y tiene una región semilla al miR-204. En el presente trabajo se demostró que la inhibición de HOTAIR disminuía significativamente la formación de mimetismo vasculogénico, también se disminuía la migración celular y se observó que la inhibición de HOTAIR disminuía la expresión de la proteína FAK. Se demostró la interacción secuencia específica entre el miR-204 y el lncRNA HOTAIR con un ensayo de actividad de luciferasa. Por último, se comprobó que el RNA mensajero que codifica para la proteína FAK es un blanco directo de miR-204.

Abstract

Breast cancer is the most frequent type of cancer and the second cause of death in Mexican women, vasculogenic mimicry is a feature in cancer that worsen the prognostic. Vasculogenic mimicry is the formation of three-dimensional networks of non-epithelial cells to obtain oxygen and nourishment. There are several molecules involved in the development of vasculogenic mimicry, one of them is FAK. miRNA are small RNA molecules of 20-25 nucleotides that are post transcriptional regulators, miR-204 has been proved that inhibits vasculogenic mimicry and that FAK could be one of his targets. Recently long non-coding RNA are emerging as the new regulators of gene expression, one of the mechanisms for this regulation is that they act as a sponge of miRNA, HOTAIR is an oncogenic lncRNA that is upregulated in breast cancer and contains a seed region to miR204. In this work we analyse the inhibition of HOTAIR diminishes the presence of vasculogenic mimicry and cell migration. The inhibition of HOTAIR which also reduce the abundance of FAK protein. Using a luciferase assay we proved the interaction between miR-204 and HOTAIR. Finally, we demonstrated that FAK is a direct target of miR-204.

1.0 Introducción

1.1 El cáncer

El cáncer es el nombre que se le da a una colección de enfermedades relacionadas. En todos los tipos de cáncer las células afectadas inician a dividirse sin control e invaden tejido circundante. El cáncer puede iniciar en casi cualquier sitio del cuerpo humano. Normalmente las células crecen y se dividen para formar células nuevas con control y orden, cuando una célula envejece o se daña, muere y una nueva célula toma su lugar. Cuando aparece el cáncer este proceso ordenado se pierde. Las células viejas que deberían morir sobreviven y se empiezan a dividir sin necesidad. Estas células extras forman los crecimientos llamados tumores. Los tumores de cáncer son malignos, lo que significa que invaden tejido cercano al sitio de lesión primario. Además, mientras el tumor crece algunas células pueden separarse y viajar a sitios distantes a través de la sangre o linfa para formar nuevos tumores en lugares lejanos al tumor original (metástasis) (Amos, *et al*; 2012). Existen alrededor de 200 tipos de células en nuestro organismo y si bien el cáncer se puede desarrollar a partir de cualquier tipo de células existen más de 200 tipos de cáncer distintos los cuales se pueden clasificar con base en su origen en:

Carcinomas. Las células epiteliales forman los epitelios que recubren las superficies del organismo y el revestimiento de cavidades de los órganos huecos, la piel, las mucosas y las glándulas, esta clasificación de “carcinoma” se usa cuando las células epiteliales dan origen al tumor. Cuando el origen tumoral proviene de células epiteliales que recubren glándulas, este recibe el nombre de adenocarcinoma. Cuando se origina

de epitelios de superficie se clasifica como carcinoma epidermoide, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células transicionales. Debido a la gran extensión y al contacto directo con agente mutagénicos y/o carcinogénicos, los carcinomas son el tipo de cáncer más común de la población mundial, constituyendo aproximadamente un 85% de todos los tipos de cáncer. Dentro de los carcinomas de mayor incidencia se encuentran el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, y el cáncer de pulmón (Sonneborn *et al.*, 1947).

Leucemias. Se clasifican como leucemias a los cánceres originados en células de la médula ósea. Las características de este tipo de canceres presenta una proliferación descontrolada del número de leucocitos inmaduros en la médula ósea. Los cuatro tipos principales de leucemias son: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC). La leucemia es el cáncer infantil más común y la leucemia linfocítica aguda representa aproximadamente 72% de casos de leucemia infantil. La leucemia más común en adultos es la LMA seguida por la LLC, LMC y la LLA (Sonneborn *et al.*, 1947).

Linfomas. Los linfomas se originan de las células del sistema inmune, particularmente en el sistema linfático. A los linfomas también se les conoce como los tumores sólidos hematológicos para distinguirlos de las leucemias. Hay dos categorías básicas de linfomas; Linfoma de Hodgkin, que se caracteriza por la presencia de un tipo de célula llamada célula de Reed-Sternberg (célula gigante derivada de linfocitos B). La otra categoría es la de los linfomas no Hodgkin que incluye un grupo grande y diverso de cánceres de las células del sistema inmunitario. Los linfomas no Hodgkin pueden

dividirse aún más en cánceres que tienen una evolución o curso indolente (de crecimiento lento) y aquellos que tienen una evolución dinámica (de crecimiento rápido). (Sonneborn *et al.*, 1947).

Mielomas. Cando el origen del cáncer comienza en las células plasmáticas (glóbulos blancos que producen anticuerpos). También se llama enfermedad de Kahler, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas y mielomatosis. Este es el segundo cáncer sanguíneo más común en los Estados Unidos y representa el 1% de casos de cáncer en el mismo país (Sonneborn *et al.*, 1947).

1.3 Origen del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, causada por cambios en genes que controlan la manera en la que nuestras células funcionan, crecen y se dividen. Cambios genéticos pueden ser heredados de los padres. También pueden originar durante la vida de una persona como el resultado de errores durante la división celular o porque haya algún daño en el DNA ocasionado por factores ambientales. Las exposiciones ambientales incluyen sustancias químicas como el tabaco o radiación, como los rayos ultravioletas de sol. Cada persona tiene una combinación única de cambios genéticos. Conforme la enfermedad evoluciona nuevos cambios ocurren, incluso dentro del mismo tumor pueden existir células con diferentes combinaciones de cambios. En general las células de cáncer tienen un mayor número de cambios genéticos que las células normales, algunos cambios pueden ser ajenos al cáncer y otras en cambio pueden ser ocasionadas por el cáncer (Peacock *et al.*; 2002)

1.4 Genes relacionados con cáncer

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer suelen afectar tres tipos de genes, proto-oncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación de DNA.

Los proto-oncogenes están involucrados en crecimiento y división celular. Sin embargo, cuando estos genes se alteran en ciertas formas o son más activos de lo normal se convierten en genes que provocan cáncer u oncogenes, que permite a las células sobrevivir y crecer cuando no deberían. Los genes supresores de tumor también están involucrados en controlar el crecimiento y división celular. Células con alteraciones en estos genes pueden llevar a una división incontrolada. Los genes de reparación de DNA se encargan de reparar al material genético cuando existe algún daño, estas mutaciones tienden a llevar a la aparición de nuevas mutaciones en otros genes. Juntas estas mutaciones pueden causar que las células se vuelvan cancerosas. (Hannahan *et al*; 2011)

El cáncer se origina cuando las células de cierto organismo sufren cambios por factores endógenos o exógenos que cambian la manera de responder a ciertos estímulos, como la muerte celular programada o apoptosis. Los tejidos normalmente controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales de crecimiento que regulan el ciclo celular, asegurando una homeostasis en el número celular y mantenimiento de la arquitectura normal del tejido. Las células cancerosas en cambio mantienen procesos de división sostenidos formando células anormales que llevan a la formación de un tumor

1.5 Hallmarks del cáncer

Los hallmarks del cáncer comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de los tumores en humanos. Estos hallmarks constituyen un principio organizado y racional de las complejidades de las enfermedades neoplásicas. Los hallmarks se componen de: mantenimiento de señales proliferativas, evasión de señales de supresión de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad celular, inducción de la angiogénesis y activación de invasión y metástasis. En la figura 1 se muestran los hallmarks propuestos por Hannahan y Weinberg en 2011.

1.5.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento

En condiciones normales existe una fuerte regulación mediada por las señales de crecimiento; la mayoría de los factores de crecimiento son producidos por un tipo de célula en particular, estimulando la proliferación celular del mismo tipo celular. Una de las principales características de las células cancerosas es la capacidad de crecer ilimitadamente. Existen distintos mecanismos mediante los cuales las células tumorales son capaces de adquirir autosuficiencia a señales de crecimiento (Hanahan *et al.*, 2011).

Principalmente, las células tumorales adquieren la capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento, estimulando así su proliferación, mediante un mecanismo autocrino. Un mecanismo alternativo, de las células tumorales es mandar señales a las células normales, para la producción de factores de crecimiento y así utilizarlos (Lemmon *et al.*, 2010). Uno de los principales factores de crecimiento involucrados en cáncer es el factor de crecimiento

transformante beta (TGF- β) que se encuentra desregulado en distintos tipos de cáncer tales como mama, pulmón, colón, entre otros (Chen *et al.*, 2017; Murakami, 2017). Pero también se requiere de la participación de las rutas de señalización para que se lleve a cabo este proceso. Una de las principales rutas de señalización involucradas es de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que se encuentra alterada en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, la sobre-activación de esta vía promueve la proliferación celular en cáncer cervical. En la figura 1 se muestran los diferentes hallmarks del cáncer (Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

1.5.2 Insensibilidad a las señales anti-crecimiento

Además de estimular su crecimiento, las células tumorales también tienen la capacidad de evadir señales anti-crecimiento, este mecanismo depende de los supresores de tumor, los cuales van a actuar dentro de la célula mediante diferentes rutas. Los genes supresores de tumor más conocidos son; los que codifican para la proteína asociada a retinoblastoma (RB) y TP53 estos funcionan como controladores del ciclo celular (Hanahan *et al.*, 2011). La proteína RB se encuentra alterada en diversos tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, próstata, gástrico y mama; entre otros. La proteína RB es capaz de integrar señales antiproliferativas de distintos orígenes, tanto extracelular como intracelular, una de las principales funciones de RB es inhibir la progresión del ciclo celular (Burkhardt *et al.*, 2008; Deshpande *et al.*, 2005). Por otro lado, TP53 es una proteína que censa tanto el estrés celular como el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo tanto, si una célula estuviera

bajo estrés intenso o recibiera mucho daño al ADN, TP53 es capaz de detener el ciclo celular hasta que nuevamente haya condiciones normales en la célula o hasta que el daño generado al ADN haya sido reparado, pero si el daño es irreparable, TP53 puede activar el proceso de muerte programada y llevar a la célula comprometida a apoptosis. En la figura 1 se muestran los diferentes hallmarks del cáncer (Fischer *et al.*, 2017)

1.5.3 Evasión a los procesos de muerte celular programada (apoptosis)

Otra característica importante que adquiere el tumor es evadir la muerte celular programa o apoptosis. Para que las células puedan llevar acabo la apoptosis se requiere de la maquinaria apoptótica que está compuesta rio arriba de reguladores y rio debajo de efectores (Hanahan *et al.*, 2011). Los reguladores monitorean las condiciones ambientales tanto extracelular como intracelular, mandando señales de supervivencia o muerte celular. La vía de señalización de la apoptosis converge en la mitocondria donde las proteínas pro-apoptóticas despolarizan la membrana liberando al citocromo C, generando así la muerte de las células. Otro grupo de proteínas que participa en la apoptosis es la familia de las Bcl2 (Cory *et al.*, 2002). Bcl2 es una proteína pro-apoptótica que se encuentra desregulada en diferentes tipos de cáncer, tales como la leucemia linfocítica crónica y cáncer de mama. La función alterada de proteína Bcl-2 en la leucemia linfocítica crónica y otros tipos de cáncer se ha atribuido a la hipometilación de la región promotora en el gen *bcl-2*. También, se ha reportado que la represión del gen *bcl-2* se debe a miRNAs tales como el miR-15 y miR-

16. En la figura 1 se muestran los diferentes hallmarks del cáncer (Yip *et al.*, 2008).

1.5.4 Ilimitado potencial replicativo

Hasta el momento hemos explicado como las células tumorales adquieren ciertas capacidades, como son: autosuficiencia a señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento y evasión de la apoptosis. En un principio se creía que solo la autonomía de señales de proliferación debería ser suficiente para generar y mantener una gran cantidad de células tumorales. En células normales, se ha observado que las células poseen un programa celular autónomo intrínseco que limita su multiplicación, una vez que una población de células se ha multiplicado alrededor de 60 veces, estas detienen su crecimiento y entran en estado de senescencia. Interesantemente, las células tumorales son inmortales, es decir, pueden dividirse de manera ilimitada, esto se debe a su alta tasa de regeneración telomérica. En la figura 1 se muestran los diferentes hallmarks del cáncer (Marión *et al.*, 2017).

1.5.5 Angiogénesis sostenida

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de una red pre-existente (Carmeliet *et al.*, 2005). La angiogénesis es esencial en el desarrollo y crecimiento del tumor, cuando el tamaño del tumor es mayor a 2 mm, se genera un ambiente de hipoxia, por lo tanto, el tumor necesita de la formación de vasos sanguíneos para el suministro de nutrientes y oxígeno (Carmeliet *et al.*, 2005). Por lo que, cuando se genera un ambiente de hipoxia la célula

tumoral empieza a secretar factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento epidermal vascular (VEGF), el factor inducible de hipoxia (HIF), generando una quimiotaxis de las células endoteliales hacia las células tumorales estimulando su proliferación y migración. Por otra parte, las metaloproteasas (MMP's) favorecen a la degradación de la matriz extracelular (MEC) para la formación de los vasos sanguíneos. De manera importante la angiogénesis se acompaña de otros eventos celulares tales como la proliferación, motilidad celular e invasión mediados por la activación de rutas de señalización comunes tales como fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), VEGF, proteína cinasa B (AKT) y TGF β . En la figura 1 se muestran los diferentes hallmarks del cáncer (Carmeliet *et al.*, 2005).

1.5.6 Invasión a tejidos y metástasis

Lo que diferencia de un tumor benigno, de uno maligno, es que las células tumorales malignas adquieren la capacidad de invadir tejidos adyacentes y generar metástasis. Para esto, las células tumorales deben ser capaces de liberarse de las interacciones célula-célula, así como de su interacción con proteínas propias de la matriz extracelular; la capacidad de transformarse de un estado celular definido y especializado (célula epitelial) a un estado más dinámico, migrante, que presenta algunas características similares de las células madre (mesenquimal) esto último se le conoce como transición epitelial-mesenquimal (TEM). Una de las principales proteínas que participa en este proceso es e-cadherina. La e-cadherina es una proteína transmembranal perteneciente a la familia de las caderinas, que tiene como función mantener la

interacción célula-célula. En la figura 1 se muestran los diferentes hallmarks del cáncer (Gheldof *et al.*, 2013; Berx *et al.*, 2008)

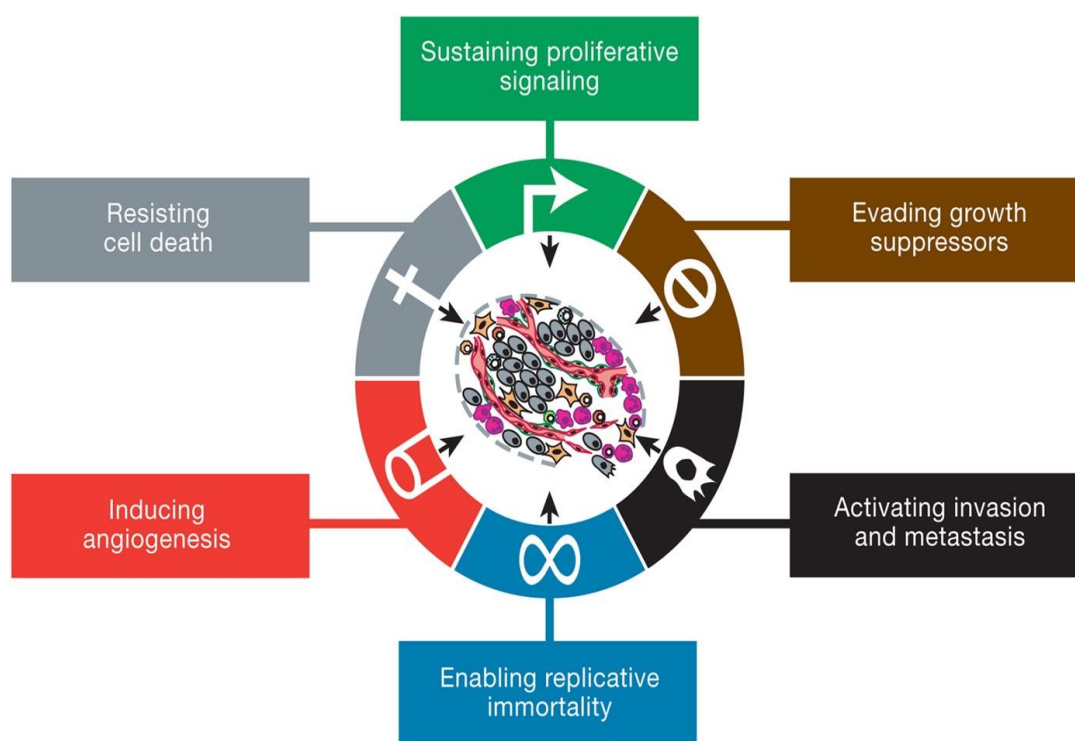


Figura 1. Hallmarks del cáncer propuestos por Hannahan y Weinberg en 2011. Se muestran los seis Hallmarks del cáncer propuestos por Hannahan y Weinberg in 2001, los hallmarks son procesos celulares que se van presentando en las células que llevan a convertirse en cancerosas.

1.6 Epidemiología del cáncer.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global y fue responsable de 9.6 millones de muertes en 2018, En el mundo, 1 de cada 6 muertes es a causa del cáncer. El 70% de las muertes por cáncer ocurren en países pobres o en vías de desarrollo. Mundialmente el gasto en tratamientos del cáncer es de 1.14 billones de dólares anualmente (OMS, 2018).

Desde hace varias décadas en el mundo, los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios como causa de mortalidad a nivel mundial representando un gran desafío para las economías y sistemas de salud (Organización Mundial de la Salud, 2017; González-González *et al*, 2009; Ángeles-Constantino, *et al*, 2009). México no ha sido la excepción, desde la década de 1960 el cáncer se ubicó entre las diez principales causas de muerte (Kuri-Morales *et al.*, 2011), siendo en 1960 y 1970 el sexto motivo de mortalidad ascendiendo diez años después al quinto puesto, para 1990 ocupó la segunda posición hasta 2004, periodo donde descendió un lugar mismo que ocupa hasta 2014, año en el que representó el 12.2% de las defunciones, únicamente por debajo de las enfermedades cardíacas (19.2%) y la Diabetes mellitus (14.8%), así mismo la mortalidad por neoplasias fue mayor en mujeres (13.97%) que en hombres (10.74%). El 43.7% de las muertes correspondieron a población en edad productiva (15-64 años) y 54.4% a población adulta mayor (65 años o más). Tumores como son próstata, tráquea bronquios y pulmón y estómago son los que más afectan al género masculino representando 36.1% de los fallecimientos, mama y cervicouterino constituyen el 25.7% de las defunciones en lo que se refiere a población femenina (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018). Las proyecciones de muertes por neoplasias a nivel mundial indican que de 2007 a 2030 la mortalidad aumentará en

45%, pasando de ocho millones a 11.5 (Organización Mundial de la Salud, 2017; Organización Mundial de la Salud, 2015); según cifras de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en ingles) y similar a nuestros resultados, tumores de mama, próstata y pulmón, son los de mayor impacto tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, sin embargo, en países desarrollados el cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte en mujeres, a diferencia de países en vías de desarrollo, como es el caso de México, donde el cáncer cervicouterino ocupa esta posición (Ferlay *et al.*, 2012).

1.7 Cáncer de mama

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres y la metástasis de este cáncer es la responsable de la mayoría de las fatalidades. El cáncer de mama comprende un grupo heterogéneo de enfermedades con un comportamiento clínico que es altamente variable, se origina cuando células en el seno (lobulares, las células en los lóbulos que producen la leche o ductales, las células que forman los ductos que transportan la leche del lóbulo al pezón) comienzan a crecer en forma descontrolada. En la figura 2 se muestra un diagrama de los sitios de lesión de cáncer de mama. En México, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en la población con un estimado de veinte mil casos nuevos en el 2016, lo que equivale al 13.8% de casos totales de cáncer. Aproximadamente la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer de mama fallecen, generalmente por metástasis y resistencia a la quimioterapia. (secretaria de salud, 2016).

El cáncer de mama se origina generalmente en las células lumbinales epiteliales, responsables de la formación de las glándulas productoras de leche, o en los conductos que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Con menos frecuencia, el cáncer puede originarse en los tejidos estromales, los cuales incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama. El desarrollo de perfiles moleculares de expresión génica mediante microarreglos de DNA demostró que el cáncer de mama puede clasificarse en al menos cinco subtipos (tabla 1): Luminal A, luminal B, HER2, basal y bajo en Claudina esto debido a la heterogeneidad.

Los tumores lumbinales son RE positivos, el subtipo luminal A es PR positivo y HER2 negativo, sin embargo, son los de mejor pronóstico; mientras que los tumores luminal B tienen un pronóstico desfavorable por ser PR positivos o negativos y HER2 positivos o negativos, pero con un alto porcentaje de expresión de Ki-67 (marcaje de proliferación) Los subtipos difieren en su complejidad genómica, alteraciones genéticas clave y pronóstico. Precedido por el cáncer de pulmón, el cáncer de mama permanece como la segunda neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial con una tasa de 39 por cada 100 000 habitantes. En mujeres es el tumor más recuente con 1.38 millones de casos nuevos por maño y la primera causa de muerte por cáncer, seguido por el cáncer cervicouterino, colorrectal y pulmonar (Eroles *et al*; 2010). Es la primera causa de muerte por cáncer con 5217 defunciones reportadas por año con una tasa de 10.1. En México entre los años 200 y 2006 se registraron 33,671 casos de cáncer de mama. En el año 2000 la tasa fue de 3.7 por 100 000 habitantes, aumentando en el 2006 a 8.4. El carcinoma lobular invasor es la segunda neoplasia más frecuente de la mama después del carcinoma ductal invasor que constituye el 5-

15% de todos los cánceres de mama diagnosticados, mientras que el carcinoma ductal invasor representa el 70-90% de los casos (Eroles *et al*; 2010).

El cáncer de mama se puede originar en diferentes tejidos del seno, la mayoría comienza en los conductos, cáncer ductal, o en los lóbulos que contienen las glándulas productoras de leche, cáncer lobular, en la figura dos se esquematizan los sitios. A nivel patológico se reconocieron las diferencias morfológicas desde hace muchos años, sin embargo, la mayoría de los casos caen en la misma categoría, pero presentan una biología molecular distinta con una prognosis y respuesta a tratamiento significativamente diferentes. Históricamente las decisiones para el manejo de los pacientes se han basado en datos como, características histológicas, tamaño del tumor, estatus de nodos linfáticos, expresión de receptor del factor humano de crecimiento epidérmico (HER2), expresión del receptor de estrógenos (ER) y triples negativos. (Provenzano *et al.*, 2018). El cáncer de mama se puede clasificar en cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2, basal y normal (Holliday *et al.*, 2011). En el cuadro 1 se puede observar la clasificación molecular del cáncer de mama.

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama

Clasificación	Expresión de receptores	Características moleculares
Luminal A	ER+,PR+/-, HER2-	Bajo Ki-67(< 14 %), respuesta endocrina
Luminal B	ER+,PR+/-, HER2+	Alto Ki-67, respuesta endocrina
HER 2	ER-, PR-, HER2+	Alto Ki-67, respuesta a quimioterapia.
Basal	ER-, PR-, HER2-	Alto Ki-67, expresión de EGFR y citoquinas 5 y 6
Baja claudina	ER-, PR-, HER2-	Alto Ki-67, E-caderina, baja Claudina 3, 4 y 7, respuesta a quimioterapia.

EGFR, receptor de factor de crecimiento epidermal; ER, receptor de estrógeno; HER2, receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2; PR, receptor de progesterona. Tomada de Wallden *et al*; 2015.

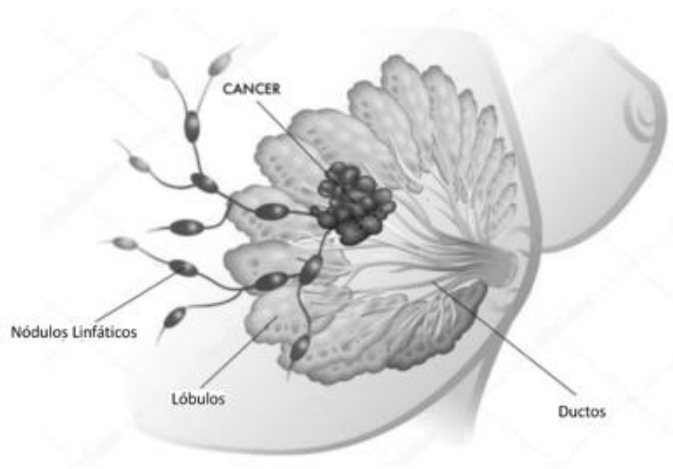


Figura 2. Tejidos donde se presenta el cáncer de mama. Se muestran los principales tejidos donde se puede iniciar el cáncer de mama los cuales son, los lóbulos que son los sitios donde se produce la leche, los ductos que son los canales que conducen la leche de los lóbulos al pezón, frecuentemente las lesiones primarias invaden los nódulos linfáticos cercanos a la mama. Tomado y modificado de Peacock, 2002.

1.7 Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento de CM se determina con base en la clasificación y estado del tumor. Generalmente se incluye la intervención quirúrgica, radioterapia y la administración de la combinación de fármacos quimioterapéuticos. Los tipos de terapia se dividen principalmente en tres tipos: neoadyuvante, adyuvante y paliativa. (Arnaout *et al*; 2018)

La terapia neoadyuvante está indicada antes de cualquier procedimiento quirúrgico, principalmente se enfoca a reducir el tamaño del tumor lo cual permite tener mayor éxito de cirugía, así como promover la sobrevivencia. El tratamiento neoadyuvante se basa en el uso de antraciclinas y se ha observado el aumento en la eficacia de la terapia neoadyuvante al agregar taxanos como docetaxel o paclitaxel (taxol) lo cual ha incrementado número de cirugías conservadoras (Arnaout *et al*; 2018).

La terapia adyuvante está indicada a pacientes que ya han sido intervenidos quirúrgicamente, en aquellas pacientes que presenten metástasis a los ganglios axilares en la pieza quirúrgica y en aquellas con ganglios positivos. Este tipo de terapia está enfocada a la eliminación de células cancerígenas remanentes, evitar enfermedad micro-metastásica, disminuir el riesgo de recurrencia e incrementar la supervivencia (Elizabeth Miller *et al.*, 2014). Los consensos internacionales recomiendan la utilización de tratamiento adyuvante cuando exista al menos uno de los siguientes factores: i) tumor mayor a 1 cm; ii) receptores hormonales negativos; iii) en pacientes menores a 35 años; iv) en pacientes que sobreexpresan el oncogen *HER2* y v) tumores con invasión vascular o linfática. El tratamiento adyuvante debe administrarse 1 a 4 semanas después de la intervención quirúrgica (Jesús *et al.*, 2010).

Los esquemas de quimioterapia recomendados deberán incluir antraciclinas y se consideran esquemas combinatorios efectivos aquellos que incluyen FAC (5 fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida) o FEC (5 fluororacilo, epirulicina y ciclofosfamida). Estudios recientes demuestran el beneficio de agregar taxanos (docetaxel o paclitaxel) particularmente, en pacientes con ganglios positivos, ya sea junto con el antracíclico, como el esquema TAC (docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida) o de manera secuencial como adriamicina y ciclofosfamida (AC) x 4 ciclos, seguido de docetaxel x 4 ciclos o paclitaxel x 12 ciclos (Bonadonna *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018).

La terapia paliativa. La terapia paliativa se utiliza en pacientes con una enfermedad diseminada o con recaída y está indicada de primera línea ante tumores que presentan receptores hormonales negativos, enfermedad visceral, corto intervalo desde la cirugía o sintomatología relacionada con la recaída o la metástasis. La elección del fármaco o la combinación de fármacos en la terapia paliativa está determinada por el tipo de receptores y parámetros como la edad, estado general de salud, localización de metástasis y agresividad de la enfermedad (Paepke S *et al.*, 2003).

2.0 Antecedentes Particulares

2.1 Mimetismo vasculogénico

La angiogénesis involucra células endoteliales existentes y la formación de vasos sanguíneos nuevos. La angiogénesis inicia en la médula ósea donde células progenitoras de endotelio son reclutadas para la colonización y diferenciación para formar vascularización en el tumor. El concepto de neovascularización fue descrito por primera vez en 1787 en el contexto de la biología embrionaria. El término de angiogénesis fue acuñado al principio del siglo XX, pero no fue aplicada a la biología de los tumores hasta décadas. La angiogénesis se forma en los tumores de diferentes formas, sin embargo, se ha demostrado que algunos tumores pueden crecer sin necesidad de la angiogénesis aun en condiciones de hipoxia, e incluso existen otros tumores que muestran tanto angiogénesis como regiones de vascularización no angiogénicas (Fernández-Cortes *et al.*, 2019). La angiogénesis tumoral es una condición importante en el crecimiento y evolución de los tumores. El mimetismo vasculogénico se refiere a la habilidad de algunas células malignas de iniciar procesos de desdiferenciación para adaptarse a múltiples fenotipos celulares, incluyendo propiedades tipo endotelial (Maniotis *et al.*, 1999). Estas células finalmente convergen en redes de *novi* tipo vasculares compuestas de eritrocitos que son capaces de contribuir a la circulación (Frenkel *et al.*, 2008). En este sentido, las células que se transforman con mimetismo vasculogénico son capaces de reproducir un patrón temprano del plexo vascular embrionario, proveyendo al ecosistema tumoral con un sistema circulatorio independiente de la angiogénesis. (Zuazo-Gaztelu *et al.*, 2018).

El proceso de mimetismo vasculogénico fue observado en células de melanoma altamente invasivas en 1999 cuyo fenotipo se revirtió a un estado tipo embrionario y se incrementó la plasticidad celular, incluyendo la expresión de genes asociados como *Ephrin-A2* y *VE-cadherin* (Hendrix *et al.*, 2003). La liberación de componentes de la matriz extracelular, hipoxia y la activación de metaloproteinasas transmembranales han sido descritas como promotores del mimetismo vasculogénico (Seftor *et al.*, 2005). Aunque la frecuencia de mimetismo vasculogénico es relativamente bajo en tumores, se le ha relacionado a agresividad tumoral, aumento en el riesgo de metástasis y una prognosis pobre en muchos tipos de cáncer como, mama, ovario, vejiga, entre muchos otros reportados (Sun *et al.*, 2006).

El mimetismo vasculogénico simula la vasculogenesis embrionaria sugiriendo que las células de los tumores malignos adquieren un fenotipo tipo embrionario. Análisis de la expresión génica mostraron que las células agresivas capaces de formar mimetismo vasculogénico tienen un perfil genético diverso, expresando genes de múltiples tipos celulares como: endoteliales, fibroblastos y endoteliales (Seftor *et al.*, 2002). Sin embargo, todavía hay mecanismos moleculares que no son muy conocidos para el desarrollo del mimetismo vasculogénico. La cadherina vascular endotelial (VE-cadherina), también conocida como cadherina 5 o CD144, es una proteína de adhesión célula-célula expresada comúnmente en las células endoteliales. La fosforilación de VE-cadherina en diferentes residuos puede modular las adhesiones celulares y permeabilización en contextos diferentes (Breier *et al.*, 2014). Se creía la expresión de VE-cadherina era exclusiva de células endoteliales, sin embargo, en las décadas pasadas se ha encontrado sobre expresada en varios tipos de tumores donde

contribuye a la agresividad y el mimetismo vasculogénico. De hecho, se encontró VE-cadherina en tumores altamente agresivos, pero no expresado en tumores no agresivos, la represión de la expresión de VE-cadherina lleva a la inhibición de la formación de mimetismo vasculogénico. Investigaciones recientes han demostrado que la proteína de adhesión focal (FAK) puede fosforilar a la VE-cadherina en el residuo Y658 en células endoteliales asociadas a tumor, esto nos habla de la importancia que tiene FAK como regulador de la unión célula-célula en las células endoteliales y por ende la posible metástasis de los tumores. (Jean *et al.*, 2014).

2.1.1 El microambiente tumoral y el mimetismo vasculogénico

La complejidad tumoral ha sido estudiada mucho más a fondo en las últimas décadas, lo que ha llevado al estudio no solo de las células tumorales sino también de los diferentes componentes que componen el microambiente tumoral (Nobre *et al.*, 2018). La baja concentración de oxígeno en los tumores, conocida como hipoxia tumoral ha sido asociada a malignidad, metástasis y resistencia a la terapia en el cáncer (Nobre *et al.*, 2018). La hipoxia se ha ligado también al mimetismo vasculogénico (Van der Schaft *et al.*, 2005). En carcinoma hepatocelular, la hipoxia promueve el mimetismo vasculogénico a través de la activación transcripcional de los genes *bcl-2* y *twist1*. La coexpresión nuclear de las proteínas Bcl-2 y Twist correlacionan con un aumento en la expresión de VE-cadherina. La misma expresión de VE-cadherina asociada al mimetismo vasculogénico (MV) puede ser inducida por hipoxia, específicamente por el factor inducible por hipoxia HIF-2 α .

La hipoxia se ha ligado a la formación de mimetismo vasculogénico por otras vías diferentes a VE-cadherina. Por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ERO) median la estabilización de la proteína HIF1 α el cual funciona como un proto oncogén que induce la formación *in vitro* de mimetismo vasculogénico en matrigel en células de melanoma (Comito *et al.*, 2011). El HIF promueve la formación de mimetismo vasculogénico también por el aumento en la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR). En células de cáncer de mama triple negativo, la hipoxia aumenta la subpoblación de células CD133⁺, comúnmente conocidas como células tipo stem (*stem-like*) a través de mecanismo mediados por Twist1. Esta población celular parece aumentar el MV ya que se ha encontrado principalmente en los tubos capilares que forman las redes tridimensionales.

2.1.2 FAK como regulador del mimetismo vasculogénico

FAK es una proteína con función de tirosina cinasa citoplasmática que es activada por el receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) e integrina para controlar la permeabilidad vascular. Se ha reportado que células agresivas de melanoma humano tienen una alta fosforilación constitutiva de VE-Cadherina en el residuo Y658 (pY658-VEC), esta fosforilación está mediada por FAK. pY658-VEC interacciona con el complejo de proteínas p120-catenina y con el represor transcripcional Kaiso en el núcleo. (Chen *et al.*, 2012). La inhibición de FAK lleva a la liberación de Kaiso, esto conlleva a la unión de Kaiso con sus sitios de unión y a la represión a sus genes blanco. La represión de los genes blanco de Kaiso (*ccdn1* y

wnt11) agravan el mimetismo vasculogénico (Delgado *et al.*, 2018). En la figura 3 se muestran los mecanismos moleculares asociados al mimetismo vasculogénico.

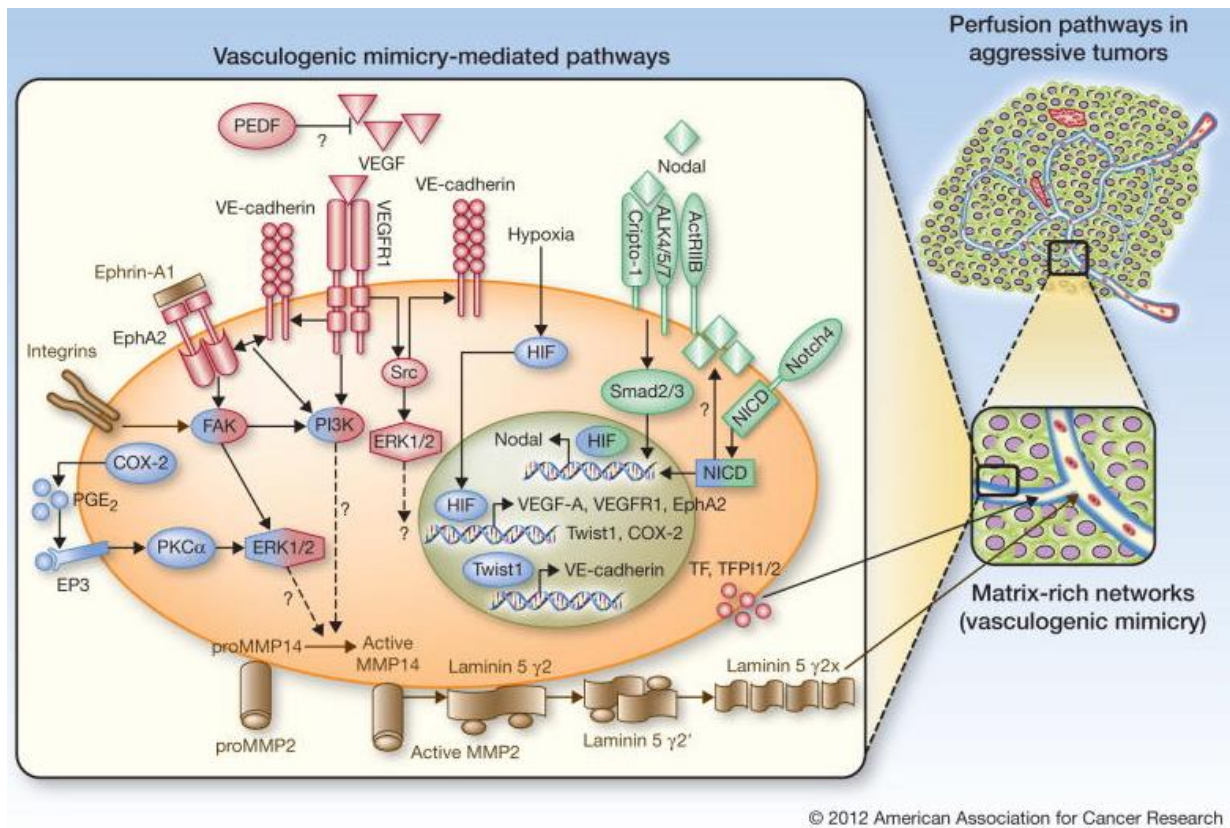


Figura 3. Vías moleculares asociados a mimetismo vasculogénico. Uno de los factores más importantes para la formación de MV es la hipoxia creada en el microambiente tumoral, esta lleva a la acumulación de ERO las cuales logran estabilizar a la proteína HIF el cual se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción para activar la transcripción de diferentes genes como: *vefg-a*, *vegfr*, *epha2*, *twist1* y *cox2*. La sobreexpresión de las proteínas VEGFR, VEGF, VE-cadherina aumentan la probabilidad de su activación desencadenando una cascada de señales con la activación de proteínas como γ FAK, PI3K, Src, ERK1/2. Las cuales conllevan a la activación de las metaloproteasas 2 y 14, las cuales una vez activas pueden escindir a la laminina 5γ2 en laminina 5γ2' y laminina 5γ2x, esta última está asociada a la remodelación de la matriz extracelular necesaria para la formación de los túbulos y redes tridimensionales. Otra vía por la que se ha descrito la formación de MV es la expresión de COX-2 la cual activa al receptor EP3 y este a su vez activa a PKCα, el cual puede activar a ERK1/2 desencadenando la activación de metaloproteasas que llevan al MV igual que en la vía anterior. La tercer vía es asociada

a las células tipo stem (stem-like) que se encuentran formando los túbulos del MV, estas células expresan genes como Nodal y Notch los cuales activan a sus receptores, Cripto-1 y ALK para el caso de Nodal, los cuales activan a Smad2/3 que se transloca al núcleo actuando como un factor de transcripción con los mismos blancos que HIF, Notch por su parte activa a su receptor NICD, el cual se internaliza en la célula llegando hasta el núcleo donde puede actuar como factor de transcripción llevando a la sobreexpresión de las proteínas asociadas al MV. Tomado de Kirschmann, 2013.

2.2 Los MicroRNAs en cáncer

Los miRNA pertenecen a una familia de pequeños RNA monocatenarios no codificantes de alrededor de 19-25 nucleótidos de largo, se pueden encontrar tanto en animales como en plantas y están involucrados en la regulación post-transcripcional (Oliveto *et al*; 2017; Catalanotto *et al*; 2016). En 1993 fueron descritos por primera vez por Victor Ambros y colaboradores, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. El grupo de investigadores estaba trabajando con el gen *lin-4* el cual es esencial para el desarrollo post-embriónico del nematodo. Lo único que sabían en ese tiempo era qué en la etapa larvaria, se creía que la proteína Lin-4 regula negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Sin embargo, ellos encontraron que, *lin-4* no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos RNA: uno de 22 nt y otro de aproximadamente 60 nt, este segundo podría formar una estructura de tallo y burbuja y ser el precursor del RNA más corto (Lee *et al*; 1993). Posteriormente, se descubrió que la manera en la que el *lin-4* regula la producción de la proteína LIN-14 es mediante la unión de la región 3' UTR del RNA mensajero de *lin-14* por complementariedad de bases, evitando así su traducción (Lagos-Quintana *et al*; 2001; Lee *et al*; 2001). Estos datos sugirieron que los miRNAs reprimen la expresión génica al unirse directamente a la región 3' no traducida de un ARNm blanco e inducen su degradación o inhiben su traducción del transcrito de manera específica (Eroles *et al*; 2016; Catalanotto *et al*; 2016).

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas no codificantes que regulan la expresión génica negativamente (Croce *et al*; 2009). Los miRNAs pertenecen a una familia de pequeños ARN (ácido ribonucleico) monocatenarios no codificantes de alrededor de 19-25 nucleótidos de largo, se pueden encontrar tanto en animales como

en plantas y están involucrados en la regulación post-transcripcional (Oliveto *et al.*, 2017; Catalanotto *et al.*, 2016). Los miRNAs están asociados a la represión transcripcional por un mecanismo de silenciamiento basado en el reconocimiento de secuencias de la región 3' no traducida (3'UTR) de los RNA mensajeros, una vez que se hibridan ambas cadenas, se reclutan complejos multienzimáticos que degradarán al mensajero. Se ha asociado la expresión aberrante de los miRNAs con procesos de tumorigénesis. Uno de los blancos más estudiados de los miRNAs es el miR-204, el cual se ha demostrado que su restauración afecta procesos como proliferación celular, migración, invasión y angiogénesis. Todos los anteriores son reconocidos como hallmarks del cáncer.

2.2.1 MicroRNAs en cáncer de mama.

Existen diferentes estudios donde identificaron miRNAs desregulados entre el tumor y el tejido mamario normal sugiriendo su uso potencial como clasificadores del cáncer de mama y para la generación de herramientas pronósticas. En un estudio donde se analizaron 76 tumores de mama y 34 tejidos normales se identificaron 29 miRNAs expresados diferencialmente en el tejido tumoral en comparación con el normal. Además, reportaron la expresión de miRNAs relacionados con características patológicas tales como la expresión del receptor de estrógenos y progesterona (miR-30), el estadio tumoral (miR-213 y miR-203) y la expresión diferencial de varias isoformas de let-7 que se asociaron con la expresión del receptor de progesterona (let-7c) y metástasis en los ganglios linfáticos (let-7f-1, let-7a-3, let-7a-2) (Lorio *et al.*, 2005). En otro estudio se incluyeron 683 muestras de pacientes con cáncer de mama

y 87 muestras normales. Interesantemente, se encontró que los miR-26a, miR-26b, miR-125a, miR-125b, miR-145, miR-486-5p y miR-99a presentaban funciones pro-apoptóticas y se encontraron reprimidos en pacientes con cáncer de mama comparados con el tejido mamario normal (Sharma *et al.*, 2016). Similarmente, la represión de la expresión del miR-145 está involucrado en el desarrollo y progresión de cáncer de mama, así como en la proliferación, migración y crecimiento del tumor (Liu *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2011). La restauración de la expresión del miR-145 en líneas celulares de cáncer de mama inhibe los Hallmarks del cáncer a través de la represión de la oncoproteína ROCK1, fascin-1, c-Myc, SMAD2/3 y IGF-1R, por lo que este miRNA podría ser utilizado como una herramienta terapéutica contra el cáncer de mama (Zheng *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2011).

Otro microRNA que se encuentra reprimido en cáncer de mama es el miR-944. La restauración de la expresión del miR-944 en líneas celulares de cáncer de mama inhibe la migración e invasión a través de la inhibición de SIAH1 y PTP4A1 (Flores-Pérez *et al.*, 2016).

2.2.2 El papel del miR-204 en el cáncer de mama

Existen diferentes evidencias de la participación del miR-204 en el cáncer de mama, por ejemplo. La sobre-expresión de BDNF/TrkB está implicada en un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, ya que promueve la migración e invasión favoreciendo la metástasis (Imam *et al.*, 2012). Otra vía de señalización implicada en un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama es STAT3/BCL-2 que participa en la apoptosis e invasión celular (Wang *et al.*, 2015). Esta vía, se encuentra activada

por la pérdida genómica del miR-204. La restauración de la expresión del miR-204 en líneas celulares de cáncer de mama, inhiben la proliferación, crecimiento celular, migración e invasión a través de sus genes blancos como *jak2*, *mx1*, *txnip* y *bndf* (Wang *et al.*; 2015; Imam *et al.*; 2012). Por otra parte, se ha observado que la desregulación de miR-204 es capaz de regular la diferenciación celular esto mediante la regulación negativa del factor de transcripción RUNX2 (Huang *et al.*, 2010). Esta proteína es esencial para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis ósea además actúa como un andamio para los ácidos nucleicos y los factores de regulación implicados en la expresión génica de proteínas que conforman el citoesqueleto. La deficiencia en la expresión de miR-204 en células progenitoras del mesénquima y células estomáticas de la medula ósea, inhibió la osteogénesis y promovió la adipogénesis alterando el proceso de diferenciación celular en estos tipos celulares (Huang *et al.*, 2010). También, el miR-204 está relacionado con la regulación del proceso de diferenciación celular denominado transición epitelial-mesenquimal, evento en el cual la células normales y tumorales son capaces de adquirir características propias de células mesenquimales como la pérdida de la polaridad celular así como de interacciones con otras células, un incremento en la capacidad de migración e invasión celular además una disminución de los procesos relacionados con activación de la apoptosis, reorganización y expresión de proteínas involucradas en la remodelación de citoesqueleto y la adquisición de características similares a las observadas en células madre (Lee *et al.*, 2016).

Zhang y colaboradores, demostraron que el restablecimiento de la expresión del miR-204 es capaz de revertir la transición epitelial-mesenquimal inducida por la proteína SIRT-1 la cual es blanco directo del miR-204 en células de cáncer gástrico, así mismo,

se demostró que la sobreexpresión del miR-204 promueve la resistencia a anoikis y esto promueve la invasión celular (Zhang *et al.*, 2013).

Se reportó además el papel del miR-204 en la vía ANGPT1/TFG β R2 de angiogénesis. El silenciamiento de TFG β R2 reprimió la proliferación y migración tumoral. Mientras que el silenciamiento de ambos (ANGPT1/TFG β R2) tenía un efecto inhibitorio en la angiogénesis. Utilizando la línea celular MDA-MB-231 que tenían una expresión elevada del miR-204, se logró inhibir el proceso de angiogénesis tumoral (Flores-Perez *et al.*, 2016). También se describió el papel del miR-204 sobre múltiples blancos asociados a mimetismo vasculogénico. El miR-204 puede estar participando como un elemento de regulación en las vías PI3K/AKT/FAK, las cuales son críticas para la formación de mimetismo vasculogénico (Salinas-Vera *et al.*, 2018).

2.3 Los RNA largos no codificantes

Desde el nacimiento y hasta la muerte, el DNA nuclear se encuentra altamente regulado, existen muchos procesos en el cuerpo humano que modulan altamente la cantidad y tiempo de expresión génica, que permite producir solo lo que la célula necesita. La regulación puede llevarse a cabo en cualquier paso durante el proceso de expresión génica, desde la formación de RNA en la transcripción hasta las modificaciones postraduccionales de las proteínas. Históricamente, la regulación era asociada a factores que afectaban al DNA como la metilación y la modificación de histonas o factores de transcripción específicos. Sin embargo, los RNA no codificantes han emergido como una clase extraordinaria de moléculas que regulan la expresión

de genes. (Bartel *et al.*, 2004). Los RNA no codificantes pueden potencialmente modular diferentes procesos celulares incluyendo la remodelación de cromatina, transcripción, modificaciones post transcripcionales y más importante regular muchas rutas de señalización al tener cientos de blancos simultáneos, esto los hace candidatos perfectos a jugar un papel clave en diferentes patologías. Existen una división de los RNA no codificantes, los menores a 200 nucleótidos o RNA no codificantes cortos y los mayores a 200 nucleótidos o RNA largos no codificantes, en el presente trabajo nos centraremos en estos últimos.

Recientemente, se ha demostrado que los RNA no codificantes tienen papeles importantes en múltiples procesos biológicos de manera directa o indirecta interfiriendo la expresión génica en varios tipos de cáncer (Yuan *et al.*, 2018). La mayoría del RNA transcritos por genes humanos es no codificante, incluyendo miRNA, RNA largos no codificantes, RNA circular, pRNA y tRNA. Con el desarrollo de tecnología que permitieron la secuenciación del RNA y la bioinformática, se descubrió que un gran número de RNA no codificante influyen en los niveles de expresión génica a través de modificaciones a la cromática, transcripción y procesos postranscripcionales. Los RNA no codificantes pueden dividirse de acuerdo con el tamaño, donde aquellos con menos de 200 nucleótidos son clasificados como RNA pequeños. (Guttman *et al.*, 2012).

Los RNA largos no codificantes (lncRNA) son comúnmente definidos como moléculas mayores a 200 nucleótidos. Fueron encontrados por primera vez en los productos transcritos de DNA de ratón por Okazaki (Okazaki *et al.*, 2002). Se identificó que los lncRNA eran transcritos por la RNA polimerasa II (RNA pol II) y sufrían cambios por splicing. Al inicio de los estudios se teorizaba que debían ser igual de diversos que los

RNA mensajeros (RNAm), pero al no tener la capacidad de codificar a alguna proteína eran descritos como “ruido” transcripcional. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que algunos lncRNA tienen un papel en la embriogénesis y diferenciación celular. Estos se expresan en tipos específicos de células y se localizan en compartimentos subcelulares específicos. El número total de lncRNAs identificados continúa aumentando gracias a las tecnologías de secuenciación de RNAseq y el análisis de bioinformática tales como las técnicas de predicción. De acuerdo con los últimos reportes de ENCODE se ha documentado que el genoma humano codifica para más de 120 000 transcritos diferentes de lncRNA. Aun así, falta mucha información como la identificación de nuevos lncRNA y en la caracterización funcional de los que ya conocemos.

2.3.1 La biogénesis de los lncRNAs

La biogénesis de los lncRNA es bastante complicada, hay muchas características compartidas entre los lncRNA y los RNAm, en especial su transcripción y procesamiento. La mayoría de los lncRNA son transcritos por la RNA polimerasa II, la mayoría sufren splicing, son poliadenilados y se les adiciona un cap en el extremo 5', aunque existen algunos que no sufren estas modificaciones (Youness *et al.*, 2019). Sin embargo, existen muchas diferencias que distinguen a los lncRNA de los RNAm. Existe evidencia que los lncRNA tienen una expresión menor que los genes que codifican a proteínas, pero en cambio los lncRNA tiene un patrón tejido específico mayor (Cabili *et al.*, 2011). La mayoría de los lncRNA se localizan en el núcleo a diferencia de los RNAm. Los lncRNA se originan en regiones intrónicas, exónicas,

intergénicas regiones promotoras 3', 5' UTR y regiones enhancer, algunas veces son transcritos bidireccionales. En particular, un grupo grande lncRNA son antisentidos de secuencias que transcriben y traducen para proteínas. Los RNA largos no codificantes (lncRNA, siglas en inglés) se definen como transcritos de RNA mayores a 200 nucleótidos localizados en las fracciones citosólicas o en el núcleo. La expresión aumentada de algunos lncRNA juega un papel crucial en diferentes tipos de cáncer, algunos ejemplos de lncRNA que se han visto involucrados son: HOTAIR, CCAT1 y MALAT1. La sobreexpresión, deficiencia o mutaciones en lncRNAs pueden estar involucradas en la evolución del cáncer a través de una gran variedad de mecanismos (Figura 4).

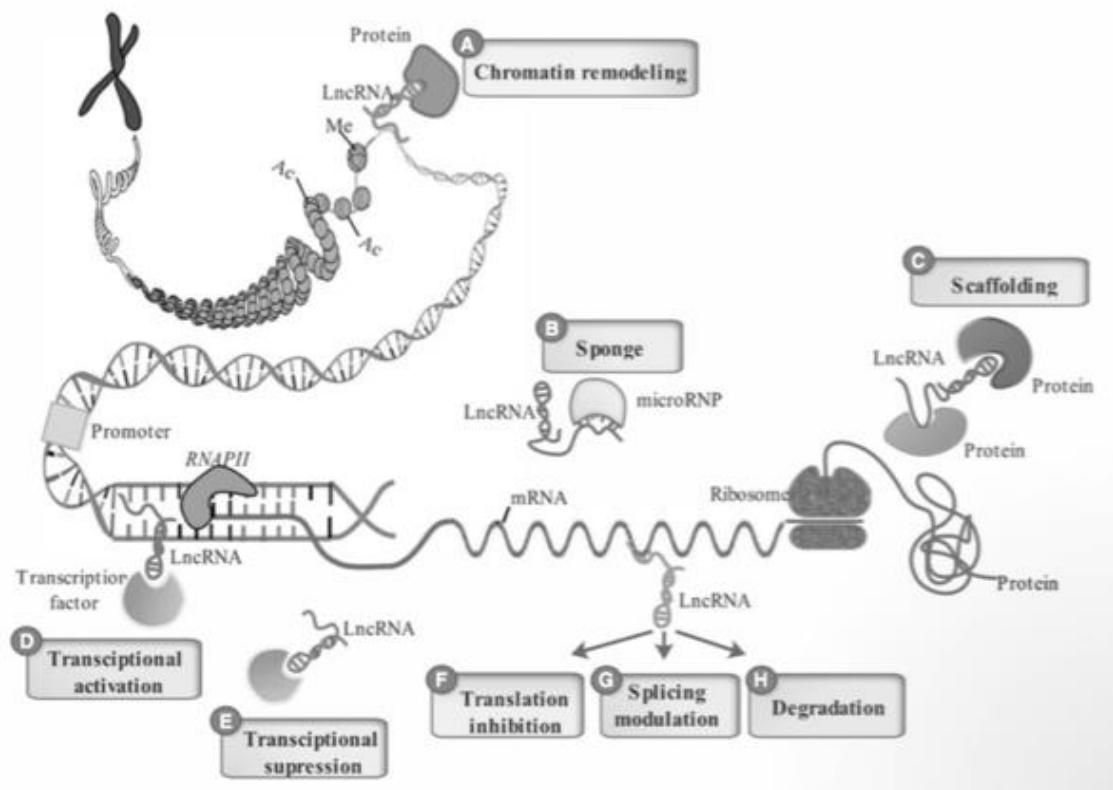


Figura 4. Funciones asociadas a los RNA largos no codificantes, se pueden observar las funciones de remodelaje de cromatina, como andamio de complejos multiprotéicos, como esponja de miRNA. Tomado y modificado de Saeede, 2017. Los lncRNA pueden actuar como competidores endógenos de RNA o “esponjas” de miRNA, los miRNA son pequeños RNA no codificantes de 19-24 nucleótidos los cuales se unen reconociendo elementos de respuesta a miRNA (MRE por sus siglas en inglés) en secuencias de RNA y regulando negativamente la expresión mediante la inhibición de la traducción induciendo la degradación del transcrito de RNA o su secuestro en los llamados P-bodies, algunos lncRNA contienen MRE, que se unen de manera competitiva a los miRNA. Así, los lncRNA afectan las funciones regulatorias de los miRNA y en consecuencia sus productos blancos (Svoronos, 2016). Se han reportado múltiples ejemplos de este efecto esponja de los lncRNA, UCC puede actuar como una esponja de miR-143 (Huang, 2017), el lncRNA CRNDE regula la evolución y quimioresistencia en cáncer colorectal modulando los niveles de expresión del miR-181a-5p (Han, 2017), HOXA11-AS promueve metástasis a hígado al funcionar como una esponja del mir125a (Chen, 2017).

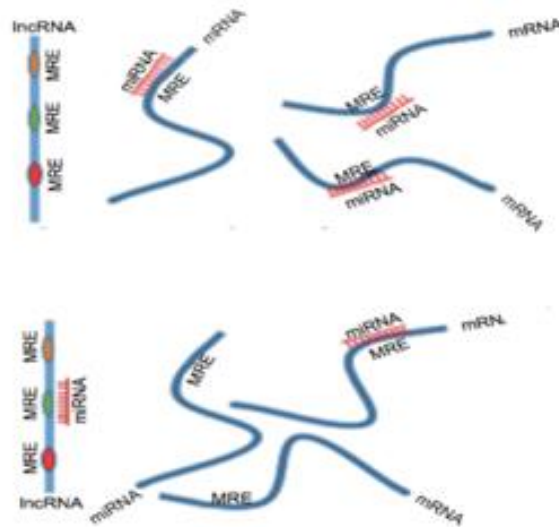


Figura 5. Interacción de lncRNA con miRNA a través de MRE para la inhibición de la regulación traduccional de los miRNA. Dentro de la secuencia de los lncRNA existen secuencias que pueden ser complementarias a secuencias dentro de los miRNA, al interaccionar estos elementos con los miRNA se da un secuestro de los miRNA y se evita su función, este proceso es conocido como esponja de miRNA. Un lncRNA puede tener muchos de estos sitios y puede interaccionar con diferentes miRNA, siendo un moduladores de la expresión génica. Tomado y modificado de Guttman, 2012

2.5 RNA largo no codificante HOTAIR en cáncer

El RNA intergenico antisentido de HOX, HOTAIR (por sus siglas en inglés HOX Antisense Intergenic RNA) fue descubierto recientemente, con un tamaño de 2.2 kb. Es un lncRNA que se asocia con el silenciamiento génico y la condensación de cromatina. Está localizado en el *locus* HOXC del cromosoma 12, flanqueado por *HOXC11* y *HOXC12*. HOTAIR, interactúa con muchos complejos implicados en la remodelación de cromatina como PRC2 y las desmetilasas de histonas LSD1. Aparte de los papeles bioquímicos en silenciamiento génico, HOTAIR parece estar sobreexpresado en varios tipos de cáncer como: cáncer colorectal (Kogo *et al.*, 2011), carcinoma hepatocelular (Geng *et al.*, 2011), cáncer pancreático (Kim *et al.*, 2012). La expresión elevada de HOTAIR está asociada a la metástasis y al crecimiento tumoral en diferentes tipos de cáncer. En estudios donde inhiben la expresión de HOTAIR se ha observado un decremento en la invasión tumoral. Se ha descrito la función de regulación de HOTAIR sobre varios genes supresores de tumor, por lo que su sobreexpresión conlleva a un aumento en la proliferación tumoral. Se ha comprobado la participación de HOTAIR en diferentes Hallmarks del cáncer (Tabla 2). HOTAIR es un lncRNA oncogénico que ha sido reportado que tiene una correlación entre su expresión, la agresividad y la presencia de metástasis (Gupta *et al.*, 2010).

Tabla 2. Tipos de cáncer asociados con HOTAIR y los procesos de Hallmarks de cáncer asociados.

Tipo de cáncer	Expresión	Funciones	Blancos moleculares	Referencia
Cáncer de pulmón	Elevada	Pronostico pobre, promueve proliferación, induce migración y resistencia a quimioterapia	p53, 14-3-3s FOXA1 / FOXA2 p21 miR-326	Zhia, 2016 Wang, 2017 Wang 2015 Liu 2013
Carcinoma hepatocelular	Elevada	Promueve migración celular a hígado, promueve crecimiento de células tipo stem	b-cadherina SETD2 miR- 218, RBM38 CCND1, miR-1	Gao, 2016 Li, 2015 Fu, 2015
Cáncer de próstata	Elevada	Promueve evolución de la enfermedad	AR, EZH2, DNMT1	Zhang, 2015 Ling 2017 Xiang, 2017
Cáncer de mama	Elevada	Promueve metástasis, promueve capacidad de recambio celular, pronostico pobre	p-AKT, p53, mirR-34a, miR-206	Zhou, 2017 Yu, 2017 Deng, 2017
Cáncer gástrico	Elevada	Pronostico pobre, promueve proliferación, migración, promueve transición epitelio mesenquimal	miR-126, miR- 152, PRC2	Yan, 2016 Song, 2015 Liu, 2015

Continuación tabla 2. Tipos de cáncer asociados con HOTAIR y los procesos de Hallmarks de cáncer asociados.

Tipo de cáncer	Expresión	Funciones	Blancos moleculares	Referencia
Cáncer Colorrectal	Elevada	Pronostico negativo, promueve migración e invasión, reduce radio sensibilidad	PRC2, EGFR, miR-218	Kogo,2011 Huang,2017 Li,2017
Cáncer Cervical	Elevada	Induce radio resistencia, promueve migración celular	p21, NOTCH1, miR-148a, miR17-5p, mTOR	Sun,2016 Ji,2017 Zhang,2015
Cáncer de Ovario	Elevada	Promueve metástasis tumoral, promueve migración	NF-KB, MAPK1, Wnt, EZH2	Ozes,2016 Yiwei,2015 Li,2015
Cáncer Endometrial	Elevada	Promueve tumorigénesis endometrial.	Beclin-1, MDR, Pgp	Sun,2015
Carcinoma oral de células escamosas	Elevada	Incrementa invasión y migración	EZH	Wu,2015
Carcinoma nasofaríngeo	Elevada	Promueve angiogénesis	VEGFA, FASN, MMP9, p21	Fu,2016 Ma,2017
Carcinoma laríngeo de células escamosas	Elevada	Promueve tumorigénesis endometrial.	PTEN, EZH2	Li,2013 Zheng,2017
Carcinoma eso- faríngeo de células escamosas	Elevada	Promueve proliferación celular	WIF-1, Snail, b-cadherina	Ge,2013 Da,2017
Leucemia mieloide aguda	Elevada	Pronostico pobre	EZH2, miR-193a	Zhang,2017 Xing,1987
Linfoma difuso de células B grandes	Elevada	Promueve crecimiento celular e inhibe apoptosis	p-AKT, p-Pi3K, p-NFkB	Yan,2016

Continuación tabla 2. Tipos de cáncer asociados con HOTAIR y los procesos de Hallmarks de cáncer asociados.

Tipo de cáncer	Expresión	Funciones	Blancos moleculares	Referencia
Cáncer de vejiga	Elevada	Agrava resistencia adquirida	MRP1, AKT, P13k	Wang,2016
Glioblastoma	Elevada	Promueve ciclo celular y evolución tumoral	EZH2	Zhang,2015
Osteosarcoma	Elevada	Pronostico pobre, inhibe apoptosis y promueve proliferación	MMP9, p53, Bcl-2	Wang,2015 Zheng,2016
Carcinoma renal	Elevada	Promueve proliferación celular e invasión	EZH2	Wu,2014

3.0 Hipótesis del trabajo

Si el RNA largo no codificante HOTAIR tiene un papel como inhibidor competitivo endógeno (efecto esponja) sobre el miR-204, liberara de la regulación negativa a sus genes blancos involucrados en el mimetismo vasculogénico tales como FAK. Por tanto, si se inhibe la expresión de HOTAIR, el miR204 quedará libre de la represión y podrá actuar sobre sus genes blancos inhibiendo el mimetismo vasculogénico.

4.0 Justificación del proyecto

El cáncer de mama es la segunda causa de muertes en mujeres a nivel global. En trabajos previos del equipo de trabajo se ha demostrado la participación del miR-204-5p, supresor de tumor, en procesos de angiogénesis (Flores-Pérez *et al.*, 2016) y en mimetismo vasculogénico (Salinas-Vera *et al.*, 2018). HOTAIR es un lncRNA implicado en muchos tipos de cáncer y se ha reportado sobreexpresado en tumores primarios de mama (Bhan *et al.*, 2013) y en condiciones de hipoxia (Bhan *et al.*, 2017). También se conoce la inhibición competitiva endógena de los lncRNA sobre los miRNA, por lo que es necesario investigar la participación del HOTAIR como esponja del mir-204-5p evitando que este realice su función supresora de tumor e inhibiendo el mimetismo vasculogénico.

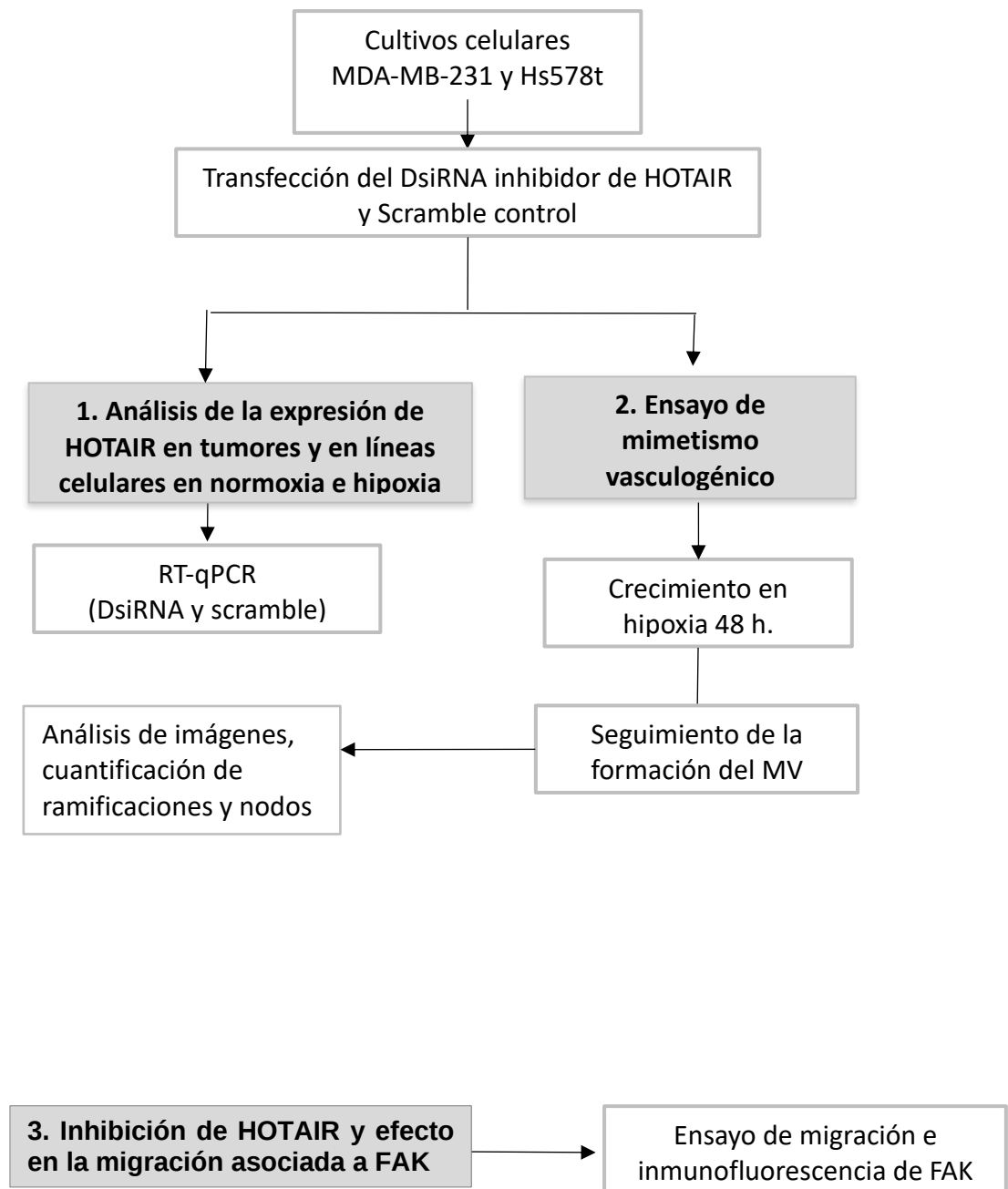
5.0 Objetivo General

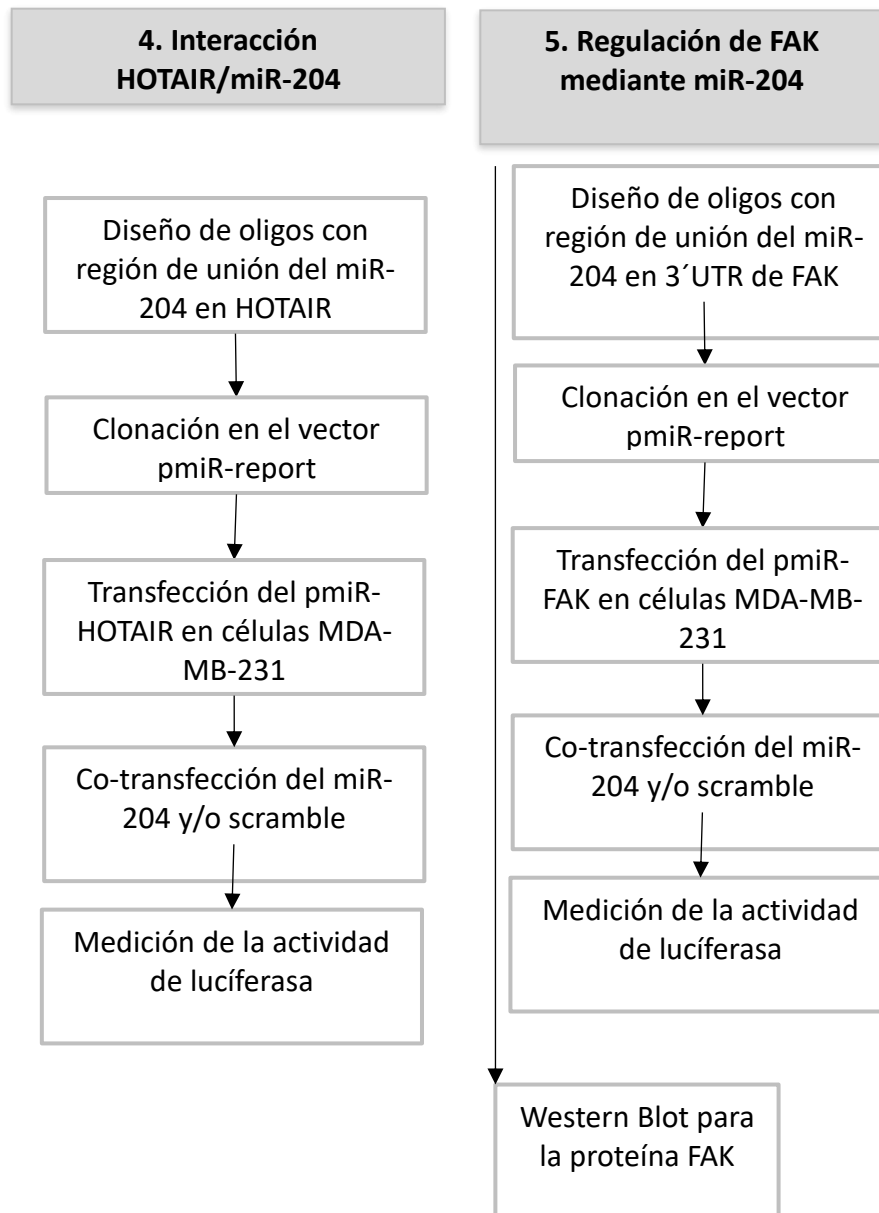
Determinar la participación del RNA largo no codificante HOTAIR en el mimetismo vasculogénico.

5.1 Objetivos particulares

1. Analizar los niveles de expresión del lncRNA HOTAIR en diferentes líneas celulares de cáncer de mama
2. Evaluar el efecto de la inhibición del lncRNA HOTAIR en mimetismo vasculogénico en cáncer de mama
3. Comprobar la inhibición competitiva endógena del lncRNA HOTAIR sobre el mir-204
4. Estudiar el efecto de la inhibición del lncRNA HOTAIR en rutas de señalización asociadas a mimetismo vasculogénico

6.0 Estrategia experimental





7.0 MATERIALES Y METODOS

7.1 Análisis de la expresión de HOTAIR en tumores de cáncer de mama

Se utilizó un set de datos disponibles en la base de datos Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>). Se obtuvo un set de 593 pacientes con cáncer de mama con datos de expresión de RNA pareados con datos de expresión de tejido adyacente al tumor aparentemente sano. Los datos fueron filtrados y procesados para obtener la expresión de HOTAIR por sitio de lesión y tejido circundante sano. Los resultados se expresaron como una gráfica comparativa.

7.2 Mantenimiento de líneas celulares

La línea celular triple negativo adherente de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC: HTB 26) y triple negativo Hs578t (ATCC HTB 126) se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gluta-MAX-I, bajo en glucosa y glutamina (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 % (Gibco, Life Technologies), penicilina y estreptomicina (0.5 %). Se incubó / 37°C y con una atmósfera de 5 % CO₂.

7.3 Extracción de RNA

La extracción del RNA total de la línea celular MDA-MB-231 cultivada en placas de 6 pozos. Primero, se despegaron las células, colocando 0.75 ml de PBS-EDTA pH 7.0 y 32 µl de tripsina 0.25 % (Gibco) por pozo y se incubaron durante 5 min / 37 °C, pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1,200 rpm / 4 °C durante 5 min,

posteriormente se les retiró el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 ml de PBS pH 7.0 , se centrifugó nuevamente a 1,200 rpm / 4 °C durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se obtuvo una pastilla de células, a las que se les agregó 1 ml de trizol y se mezcló por pipeteo, se recuperó el lisado celular en un tubo cónico para microcentrífuga de 1.5 ml, se incubó durante 5 min a T.A, se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de trizol utilizado y se mezcló por agitación vigorosa durante 15 segundos, se incubó el tubo durante 3 min / T.A y se centrifugó a 12,500 rpm por 25 min a 4°C. Posterior a la centrifugación, se recuperó la fase acuosa cuidando de no mezclar las otras fases, y se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml, se le adicionaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN y se incubó en hielo durante 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 12,500 rpm durante 25 min / 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1ml de etanol al 75 % y se dejó secar durante 5 min. Posteriormente, fue resuspendido en 20 µl de agua libre de RNAsas. Finalmente, el RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1%.

7.4 Transcripción reversa y reacción de la cadena polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

100 ng de RNA serán transcritos usando un primer específico looped-RT, 0.15 µL dNTPs (100 mM), 1 µL de transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/µL), 1.5 µL de buffer, 0.19 µL de inhibidor de RNasa (20 U/µL) y 4.16 µL de agua libre de RNasa. La dilución de retrotranscripción (1:15) será mezclada con 10 µL de master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No AMpErase UNG, 2X), 7.67 µL de agua libre de RNasa y 1 µL de sonda PCR.

7.5 Determinación de la expresión relativa de HOTAIR

Se obtuvo RNA total de las líneas celulares en dos condiciones, células cultivadas en normoxia y células cultivadas en hipoxia ($>1\%$ O₂). Las células confluentes fueron tratadas con Trizol y cloroformo, después del protocolo de extracción de RNA se cuantificó en un nanodrop y se corrió en un gel de agarosa al 3% para verificar su integridad. Las muestras que pasaran este control de calidad fueron utilizadas para las determinaciones por qPCR. Para la determinación de la expresión de HOTAIR se realizó una qPCR con Sybr Green (Qiagen) utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 226 nucleótidos de la posición 426 a 652 de la secuencia de HOTAIR. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

HOTAIR Fwd RTPCR: 5'-ACGAAGGTGAAAGCGAACCA-3'

HOTAIR Rv RTPCR: 5'-GTTCATGTGGCGAGCTAGGA-3'

El programa de amplificación por PCR que se utilizó fue: Inicialización: 95°C, 15 min. Desnaturalización: 94°C, 15 s. Alineación: 60°C, 30 s. Extensión 72°C, 30 s. Número de ciclos: 40. Los análisis se realizaron por triplicado en un equipo 9700 (Applied Biosystems), los resultados se analizaron como $\Delta\Delta C_t$ y se realizó un ensayo ANOVA para determinar diferencias estadísticamente significativas empleado el software de análisis estadístico GraphPad.

7.6 Transfección del inhibidor de HOTAIR

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y Hs578t fueron transfectadas con el inhibidor de HOTAIR, así como con la secuencia scramble. Un día previo a la transfección, 250,000 células MDA-MB-231 y Hs578t fueron sembradas por pozo en placas de 6 pozos. Al día siguiente, en un tubo de 1.5 ml se mezclaron 100 μ l de medio reducido OptiMem con 5 μ l del agente de transfección siPORT™ Amine (Applied Biosystems) para cada pozo se transfectó, al mismo tiempo, en otro tubo de 1.5 ml se mezclaron 100 μ l de medio reducido OptiMem con 7.5 μ l de DsiRNA HOTAIR o del scramble a una concentración de 10 (μ M) y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente durante 10 min, transcurrido el tiempo, se pasó la mezcla de un tubo al otro y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Consecutivamente, esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (con un volumen final 2.5 ml/pozo). Se agitó suavemente, se incubó a 37°C y 5% de CO₂. 24 horas después las células fueron utilizadas para los consecuentes experimentos.

7.7 Ensayos de mimetismo vasculogénico

Para determinar el efecto de la inhibición de HOTAIR en el mimetismo vasculogénico 250,000 células MDA-MB-231 y Hs578t se sembraron y transfectaron con el DsiRNA HOTAIR y scramble como se describió anteriormente, se sometieron a condiciones de hipoxia (1 % O₂) durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se realizó un cultivo en 3D, para ello la matriz extracelular, las placas de 96 pozos y las puntas fueron incubadas a 4°C un día antes. 900 μ L matriz extracelular se mezclaron con 100 μ l de PBS 1x, la mezcla se homogenizó lentamente por pipeteo en hielo evitando la formación de burbujas. 50

ul e matrigel diluida se distribuyó por pozo en una placa de 96 pozos fría evitando la formación de burbujas en los pozos. La placa se incubó 1 h / 37°C, pasado este tiempo se adicionaron 10,000 células MDA-MB-231 o Hs578t para cada condición, sin transfectar, transfectadas con el inhibidor y el control negativo scramble, se incubaron en medio DMEM sin complementar. Adicionalmente, todos los grupos fueron incubados a 37 °C, 5% CO₂ y 1 % O₂, por 12 h. Se tomaron imágenes a las 0 h, 3 h, 6 h, 9 h. Se realizó el conteo de los túbulos formados, así como los puntos de ramificación

7.8 Ensayo de migración celular (Ensayo de herida).

En placas de 24 pozos que contenían 100 mil células se transfectaron en las tres condiciones como se describió anteriormente y se esperó a que tuvieran un 80% de confluencia formando monocapa y después se realizó la herida. Se documentó la migración tomando fotografías en tres tiempos: 0 horas, 24 horas y 48 horas. Se midió el área de la herida y su disminución a través del tiempo, se graficó la disminución del área y su inverso como porcentaje de migración. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se utilizó una prueba ANOVA para comprobar si había diferencia estadísticamente significativa.

7.9 Ensayos de inmunofluorescencia.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles y se dejaron crecer hasta la formación de la monocapa, una vez que estaban listas para trabajar fueron fijadas con paraformaldehído al 4% después se lavaron con PBS 1x por tres veces. Después

se permeabilizaron con PBS-Triton al 1% y se lavaron tres veces con PBS 1x. Una vez que se tenía las células permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo anti-FAK (1:500) y Faloidina rodaminada (1:2000) por 45 min. Después se lavaron con PBS 1x por tres veces. Después se incubaron con DAPI (1:2000) por 2 min, se lavó el DAPI y se colocaron en cubreobjetos sellando con vecta shield. Las laminillas fueron reveladas con un microscopio confocal Leica TCS SP8, las inmunofluorescencias fueron reveladas en el laboratorio de inmunología de la facultad de ciencias químico-biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

7.10 Predicción de interacción lncRNA HOTAIR y miR-204

Para analizar la interacción entre HOTAIR y el miR-204 se utilizó la base de datos miR Walk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) esta base nos permite buscar en la secuencia de HOTAIR sitios de unión teóricos con miR-204.

7.11 Construcción de plásmido pMIR-report HOTAIR

Se diseñaron 4 pares de oligonucleótidos correspondientes a un fragmento de 89 pb de HOTAIR, dos pares de oligonucleótidos correspondieron a la secuencia silvestre de HOTAIR que contiene la región semilla complementaria al miR-204 y los otros 2 pares de oligonucleótidos contienen una mutación en la región semilla complementaria al miR-204. Cada par de oligonucleótidos se re-suspendió a una concentración de 500 pmol y se le adiciono el amortiguador de hibridación a un volumen final de 20 μ L y se hibridaron a 95 °C durante 5 min, 70 °C durante 15 min / 37 °C durante 45 min posteriormente, el dúplex (sentido/antisentido) se diluyó a una concentración final de

50 nanogramos por microlitro (ng/μl) y se corrió en un gel de agarosa al 2 % para verificar la hibridación. Una vez que los insertos fueron diluidos a 0.5 ng/μl, se preparó la reacción de ligación (0.5 μl de T4 ADN ligasa (5 U/μl), 2 μl de amortiguador de ligasa T4 5x, 1 μl del vector pmiR-repor-luc (25 ng), para la relación 1:3 se le agregaron 1.38 μl del inserto (0.5 ng/l), para la relación 1:5 se le agregaron 2.3 μl del inserto (0.5 ng/μL) y se llevó a un volumen final de 10 μl con agua libre de nucleasas. Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto. Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 14°C. Los productos de las reacciones de ligación fueron empleados para transformar células *E. coli* DH5α competentes. Todas las construcciones fueron expandidas y purificadas por lisis alcalina, posteriormente se secuenciaron

7.12 Ensayo de gen reportero de luciferasa

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones pmiR-report. Para realizar el ensayo se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 se sembraron por pozo en una placa de 6 pozos y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente las células fueron transfectadas mediante lipofección en condiciones de esterilidad: (Reacción de transfección para un pozo), en un tubo de 1.5 ml se colocaron 5 μg de las construcciones pmiR-HOTAIR wt o pmiR-HOTAIR mut y se mezclaron con 150 μl de OptiMEM, por otro lado en otro tubo de 1.5 ml se colocaron 9 μl de lipofectamina 2000 reagent (invitrogen) y se mezcló con 150 μl de OptiMEM. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. 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 10 min a

temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos Lipofectamina- DNA. Durante el tiempo de incubación se les retiro el medio a las células y se lavaron 2 veces con PBS pH7.0, se les adicionó 1.8 ml de medio DMEM sin complementar. Pasado el tiempo de incubación se le adicionaron los complejos lipofectamina-DNA (200 μ l) correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 4 h en condiciones normales. Pasado el tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se les adicionó 2000 μ l de DMEM debidamente complementado, las células se incubaron en condiciones normales durante 24h. Como normalizador se utilizó el plásmido pMIR-REPORT β -gal.

Después del tiempo de incubación con las construcciones pmiR-3'UTR las células fueron cotransfectadas con el pre-miR-204 o el scramble o solo agente de transfección. para ello en un tubo de 1.5 ml se mezclaron 100 μ l de medio reducido Opti-Mem con 5 μ l del agente de transfección lipofectamina 2000 reagent (Invitrogen) por cada pozo a transfectar, a la par en otro tubo de 1.5 ml se mezclaron de 100 μ l de medio reducido Opti-Mem con 7.5 μ l del precursor pre-miR-204 o scramble a una concentración de 10 μ M y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se mezcló el contenido de cada tubo en uno solo, y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó durante 10 min más, posteriormente esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (2.3 ml). Se agitó suavemente con movimientos circulares durante 1 min y se incubo durante 24 h / 37 °C y 5 % de CO₂.

7.13 Determinación 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 amortiguador de lisis 5x (CCLR) en agua a temperatura ambiente, las células se lavaron con PBS pH7.0. 150 µl del amortiguador de lisis 1x se le adicionaron a las células y se mantuvieron en agitación durante 5 min en hielo, después se transfirió el lisado de células a un tubo de 1.5 ml y se agitó con vortex 3 veces 10-15 seg, finalmente el lisado celular se centrifugo durante 2 min a 12,000 g / 4°C, se recuperó el sobrenadante, en una placa de 96 pozos de fondo opaco y se colocaron 100 µL de Luciferase Assay Reagent II y 20 µL de lisado celular; se mezcló por pipeteo, la lectura de la placa se realizó en equipo un luminómetro Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer (Thermo Scientific) con 2 seg de retardamiento antes de cada lectura seguida de lecturas de 10 s para cada pozo.

7.14 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, se lavaron tres veces los cultivos celulares con PBS 1x pH7.0 frío, luego se incubaron con amortiguador de lisis TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) y se realizó un raspado en cada pozo para recuperar las células. A continuación, se centrifugaron a 12,500 rpm durante 10 min / 4°C y se recuperó el sobrenadante en microtubos de 1.5 ml.

7.15 Ensayos de Western blot

90 µg de proteínas fueron separadas en un SDS-PAGE al 10%. Para correr el gel se empleó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se realizó la transferencia en la membrana nitrocelulosa (MILLIPORE). Transcurrido el tiempo la membrana, el gel, los papeles whatman y esponjas se incubaron 15 min en la solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y, 20 % de metanol). Se armó el cassette y se realizó la transferencia en el Trans-Blot (BIORAD) / 25 V, 1.0 A / 40 min. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó tinción con rojo Ponceau, inmediatamente después se lavó la membrana con PBS 1x pH 7. Posteriormente, las membranas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó la membrana con PBS-Tween20 (0.05%) durante 5 min, tres veces, y se agregó el anticuerpo primario (Anti-FAK 1:500) en PBS 1x-Tween20 0.05%, se incubó toda la noche / 4°C, en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS 1x-Tween20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido en PBS 1x-tween20 al 0.05%, se incubó durante 1 h / T.A en agitación. Después de la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con PBS 1x-tween20 al 0.05% y se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 5 min con el reactivo ECL (Amherham Pharmacia Biotech, USA). Cada membrana fue analizada en el equipo ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). Las bandas detectadas en las membranas se

les realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo Cientific)

8.0 Resultados

8.1 Análisis de la expresión de HOTAIR en tumores y tejido mamarios normal utilizando la base de datos de Oncomine

Como primer punto en el proyecto se buscó el modelo que se utilizaría para estudiar el efecto de la inhibición de HOTAIR en líneas celulares, para dicho propósito se estudió los niveles de expresión de HOTAIR en tejido tumoral de mama y compararlo con los niveles de expresión de los tejidos circundantes sanos. La expresión de HOTAIR es mayor en tejidos tumorales que en tejido adyacente sano. Se determinó que en pacientes con cáncer de mama el tejido tumoral tiene una expresión elevada en comparación con el tejido circundante sano. Esto confirma diferentes reportes anteriores que confirmaban que HOTAIR es un oncogén que se ve sobre expresado en cáncer de mama de manera significativa en comparación con los tejidos sanos.

Se realizó el análisis de un set de datos públicos disponibles en ONCOMINE con información de RNAseq y datos de expresión de HOTAIR de manera pareada entre tejido tumoral de los pacientes y tejido circundante sano. En la figura 6 se muestran los datos de expresión de miR-206 junto con los datos de expresión de proteína FAK. El tratamiento de datos nos permite observar una diferencia significativa entre la expresión de HOTAIR en el tejido tumoral y en los tejidos sanos.

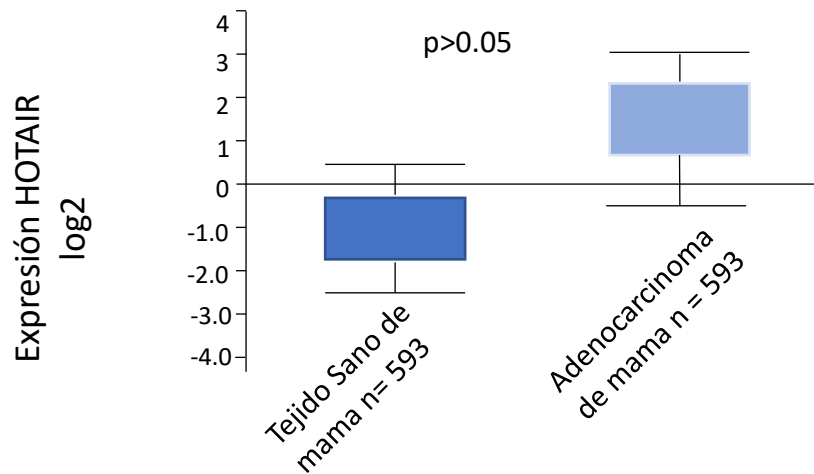


Figura 6. Expresión de HOTAIR en adenocarcinoma de mama y en tejido circundante. Datos de expresión de HOTAIR de 593 pacientes obtenidos mediante RNA seq de la base de datos Oncomine. Los datos de los 593 pacientes se encuentran pareados entre tejido tumoral y tejido sano adyacente al tumor, se puede observar que la expresión en los tejidos sanos es significativamente menor ($p > 0.05$) a la expresión en los tumores. Todos los datos corresponden a adenocarcinoma de mama y los datos de tejido sano es de tejido adyacente al tumor.

8.2 Expresión de HOTAIR en líneas celulares de cáncer de mama crecidas en condiciones de normoxia e hipoxia

Se utilizaron principalmente dos líneas celulares llamadas MDA-MB-231 y Hs578t, fueron elegidas por provenir de cáncer de mama triple negativo, el subtipo de cáncer de mama donde se ha observado la formación de mimetismo vasculogénico, en trabajo pasados ya se había reportado este fenómeno en estas líneas celulares, pero, no se conocía los niveles de expresión de HOTAIR, ya que el mimetismo vasculogénico se genera en respuesta a una condición de hipoxia se decidió medir la expresión de HOTAIR en dos condiciones: Normoxia e hipoxia. Ya está reportado que HOTAIR contiene un motivo de unión a HIF, lo cual aumenta sus niveles de expresión en condiciones de microambiente sin oxígeno, por lo que era necesario determinar el cambio de expresión en las condiciones y evaluar si el inhibidor comercial (DsiRNA HOTAIR) podía reprimir la expresión en niveles significativos.

La determinación nos permitió conocer que en ambas líneas celulares la expresión de HOTAIR se veía aumentada significativamente en condiciones de hipoxia de 1.5 veces al doble de niveles de expresión. Esto es congruente con los antecedentes y nos permite concluir que las líneas celulares que se eligieron pueden ser de utilidad para el proyecto. En la figura 7 se muestran los niveles de expresión de HOTAIR en ambas líneas celulares (MDA-MB-231 y Hs578t) tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.

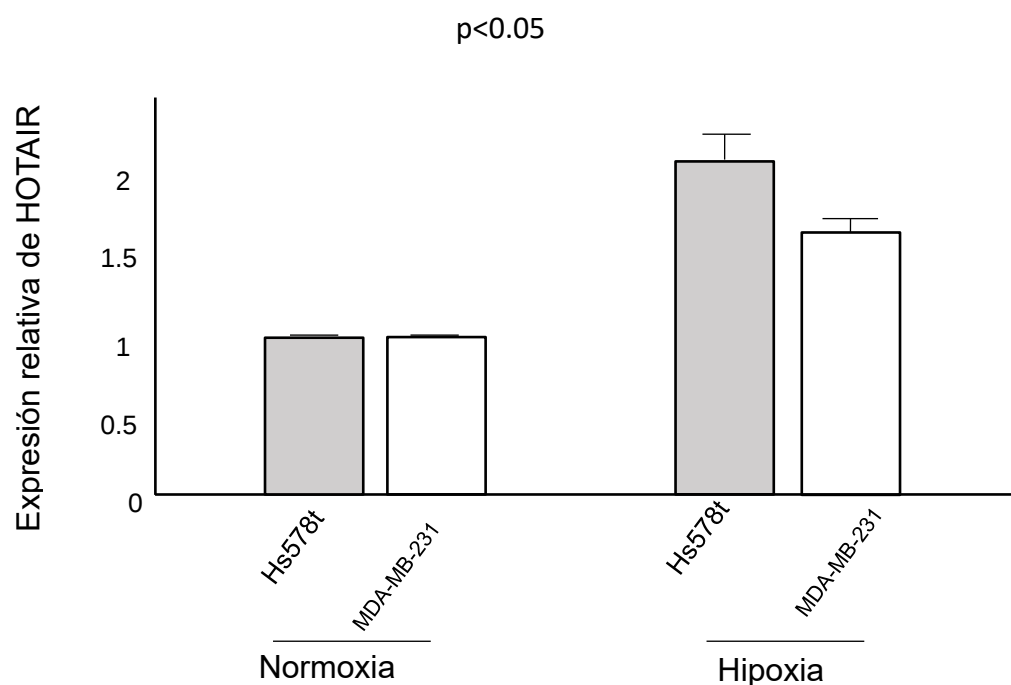


Figura 7. Expresión relativa de HOTAIR en condiciones de normoxia e hipoxia con dos líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t. Se realizó el ensayo por PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos diseñados y Sybr Green para la determinación. Los resultados fueron normalizados con la expresión de normoxia y se muestra el cambio en expresión cuando las células son sometidas a hipoxia. Los ensayos fueron realizados por triplicado, los datos de $\Delta\Delta Ct$ fueron procesados en GraphPad y se realizó un ensayo de ANOVA para determinar si la diferencia era significativa obteniendo una $p < 0.05$

8.3 Silenciamiento de la expresión de HOTAIR en las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t.

Para poder evaluar la inhibición de HOTAIR es necesario contar con un inhibidor, usualmente se pueden fabricar los inhibidores de tipo siRNA, sin embargo, se decidió utilizar un inhibidor comercial DsiRNA HOTAIR (IDTDNA). El método de acción del inhibidor consiste en un RNA de doble cadena con estructura de tallo burbuja que al ser transfectado en las células por medio de la lipofectamina, comienza un procesamiento por el complejo de proteínas de DICER para eliminar la estructura secundaria de burbuja, dejando un RNA de doble cadena que puede ser reconocido por el complejo de las proteínas argonautas (AGO1-4) las cuales separan las cadenas dejando un complejo RISC funcional y específico para el blanco, en este caso HOTAIR. Después de analizar los resultados de la PCR en tiempo real se concluye que el inhibidor de HOTAIR es capaz de silenciar aproximadamente el 50% de la expresión de HOTAIR tanto en condiciones de normoxia e hipoxia. Siendo en condiciones de hipoxia tres veces mayor la expresión del RNA largo no codificante, pero, aun en estas condiciones el inhibidor logra una diferencia significativa en comparación con la muestra control sin transfectar. En la figura 8 se muestran los resultados de la expresión de HOTAIR y el efecto de la inhibición de HOTAIR en las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t.

En conclusión, el inhibidor DsiRNA HOTAIR, disminuye la expresión del lncRNA HOTAIR tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia y se puede utilizar el inhibidor para los experimentos siguientes.

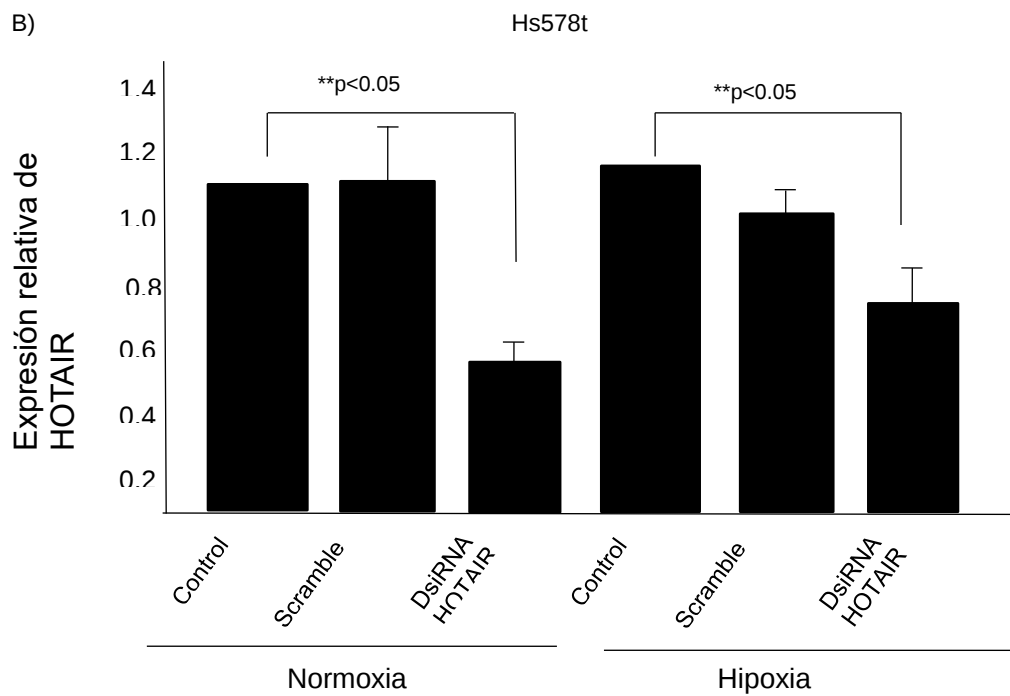
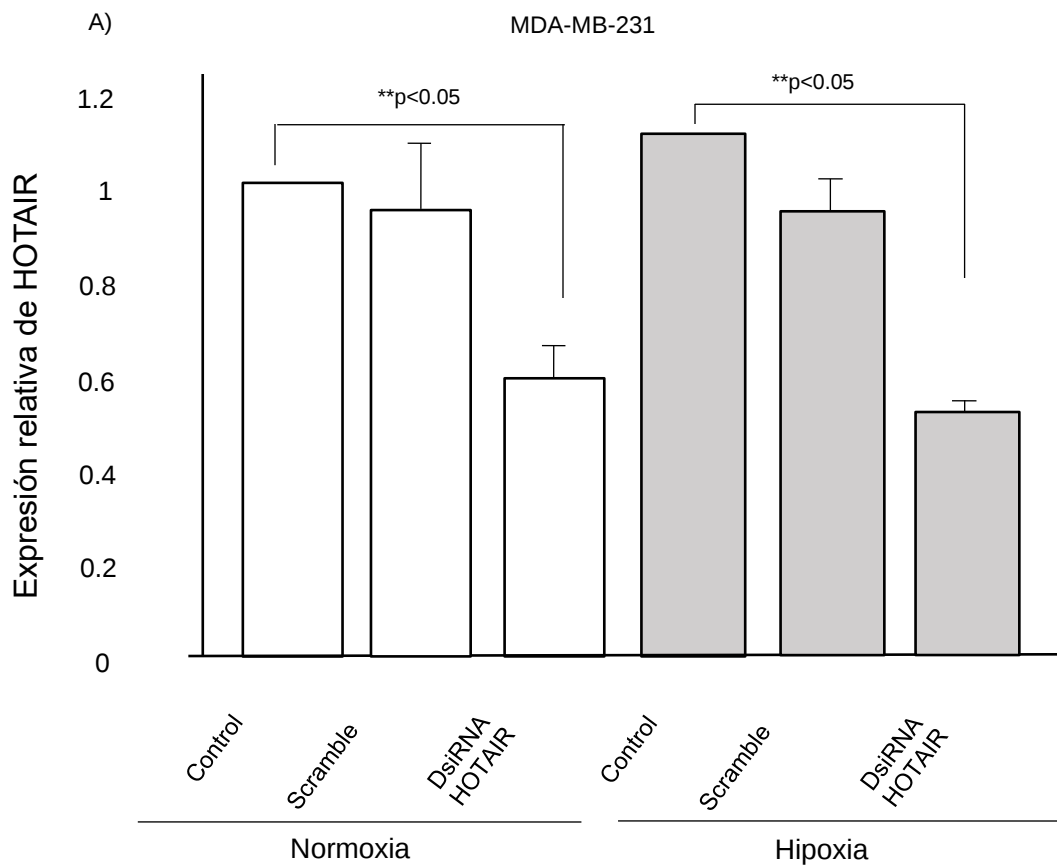


Figura 8 Análisis de la expresión de HOTAIR en células Hs578t en condiciones de normoxia e hipoxia. Los resultados se obtuvieron por PCR en tiempo real utilizado

oligonucleótidos y Sybr green para la determinación de la expresión de HOTAIR, los resultados fueron normalizados contra las células sin transfectar y se midió la diferencia entre el control y las células con HOTAIR inhibido, todos los resultados son el promedio de muestras por triplicado y se realizó el análisis de ANOVA con el software GraphPad. El panel A se observa la expresión de HOTAIR en MDA-MB-231 tanto en normoxia y en hipoxia y en el panel B se observa la expresión de HOTAIR en Hs578t.

8.4 Ensayos de mimetismo vasculogénico en líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t con HOTAIR inhibido.

Una vez que se determinó la inhibición de HOTAIR en las líneas celulares se procedió a la realización de ensayos de mimetismo vasculogénico en células transfectadas con el inhibidor y células sin transfectar como control, como un control adicional células transfectadas con un scramble de RNA. Los resultados obtenidos nos muestran que las células tanto MDA-MB-231 y Hs578t muestran una disminución en la formación de tubos y nodos en comparación con las células control. Estas líneas celulares ya habían sido reportadas como formadoras de MV por nuestro equipo de trabajo (Salinas-Vera, 2018) por lo que fueron elegidas para el desarrollo de los experimentos.

El mimetismo vasculogénico es uno de los fenómenos que en los pacientes empeoran su pronóstico. Para estudiar el mimetismo vasculogénico se sembraron 100 mil células sobre una matriz sólida (matrigel) y se documentó la formación de redes tipo capilares durante 9 horas tomando fotografías cada 3 horas. Se contaba con antecedentes del grupo de trabajo que reportaban la formación de mimetismo vasculogénico en MDA-MB-231, sin embargo, no se conocía el efecto que pudiera tener la inhibición de HOTAIR en el mimetismo. En la figura 9 panel A, se puede observar imágenes representativas del ensayo de mimetismo vasculogénico a diferentes tiempos y en las diferentes condiciones, se puede apreciar como en las células sin transfectar como en las células transfectadas con el scramble de RNA la formación de tubos y nodos inicia desde la segunda toma de imágenes ($t=3h$), en contraste las células transfectadas con el inhibidor de HOTAIR no muestran formación de tubos capilares. Hasta las nueve

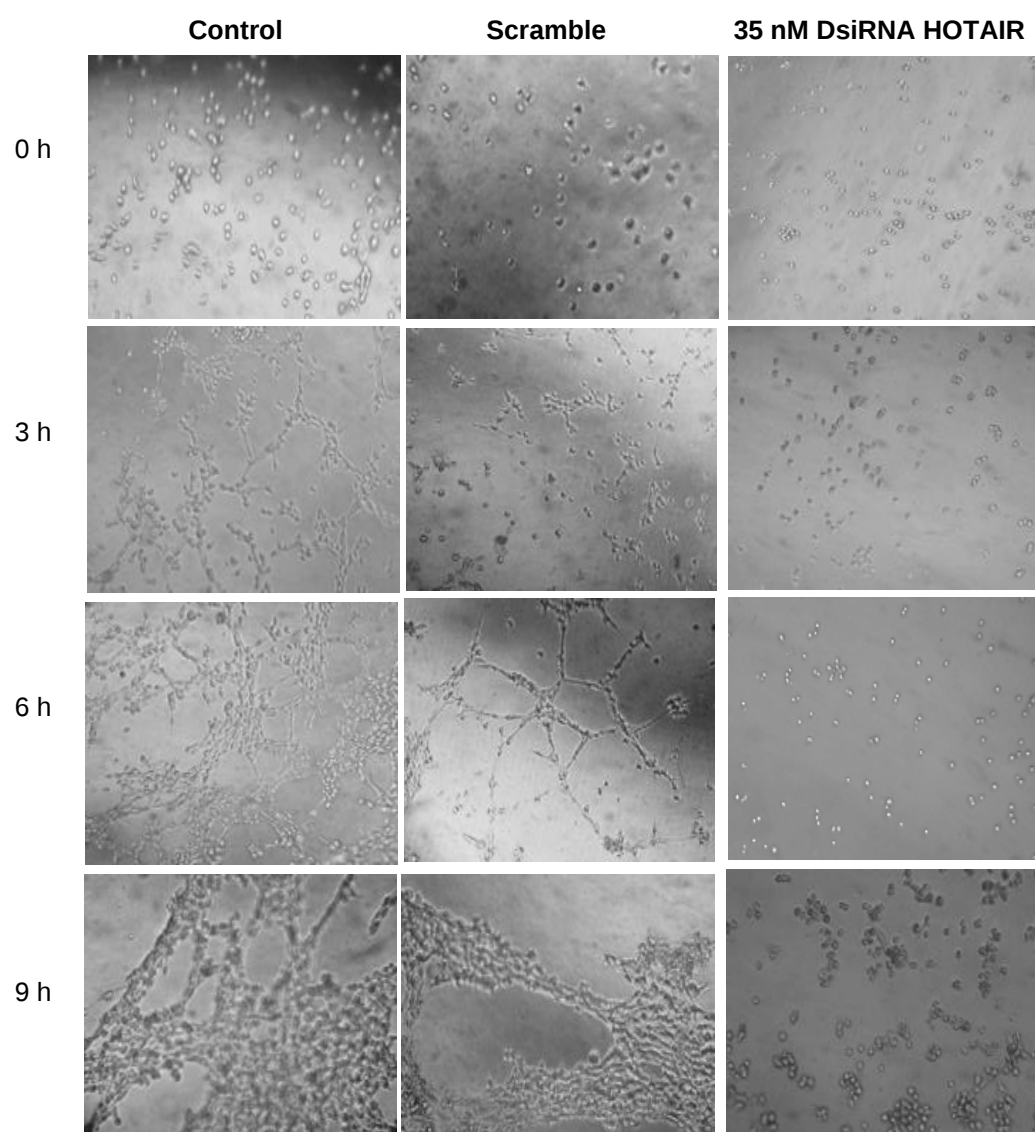
horas se puede observar un gran número de tubos capilares en el control y en el scramble mientras que con el inhibidor no se pueden apreciar.

Era necesario comprobar el mismo comportamiento en otra línea celular diferente, Hs578t fue tratada de la misma manera que MDA-MB-231. En la figura 10 se puede observar la formación de las redes tridimensionales en las células control en comparación con las células transfectadas con el inhibidor de HOTAIR, aunque en esta línea si se observó una mínima formación de redes en las células con HOTAIR inhibido, esto puede deberse a que estas células expresaban más HOTAIR en condiciones de hipoxia en comparación con MDA-MB-231.

Las células transfectadas con DsiRNA HOTAIR mostraron una disminución significativa en comparación con las células control en ambas líneas celulares estudiadas. Con estos resultados podemos concluir que la inhibición de HOTAIR reduce significativamente la formación de mimetismo vasculogénico en líneas celulares.

A)

MDA-MB-231



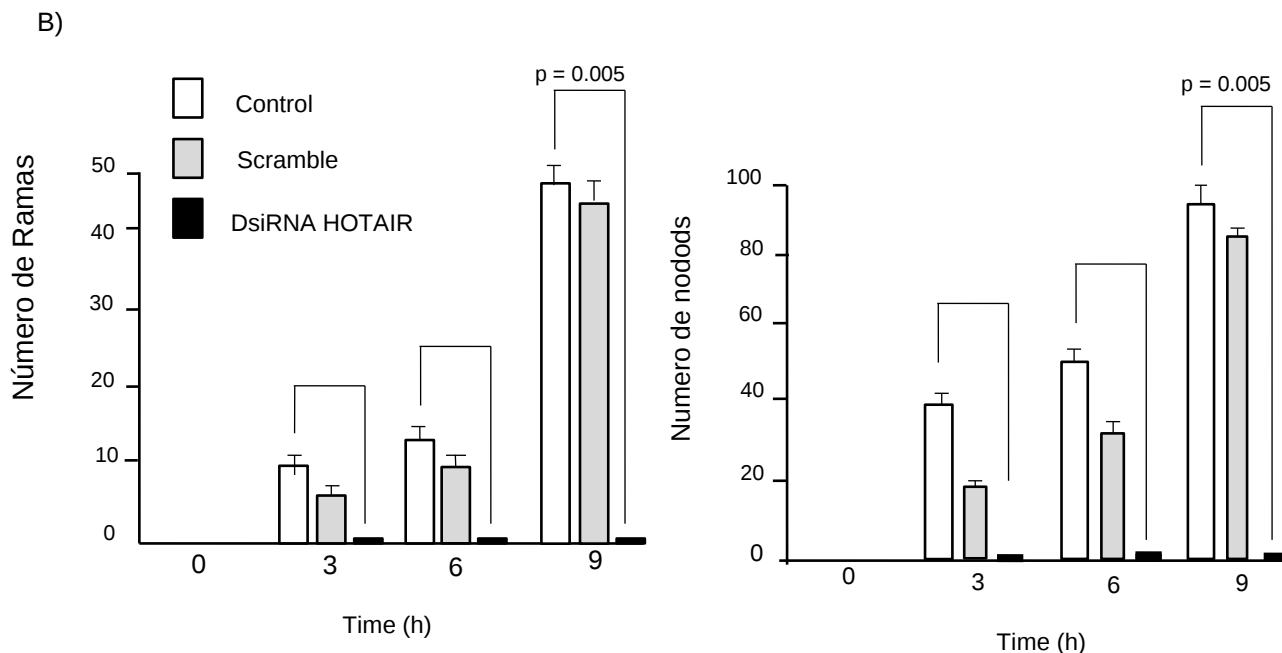
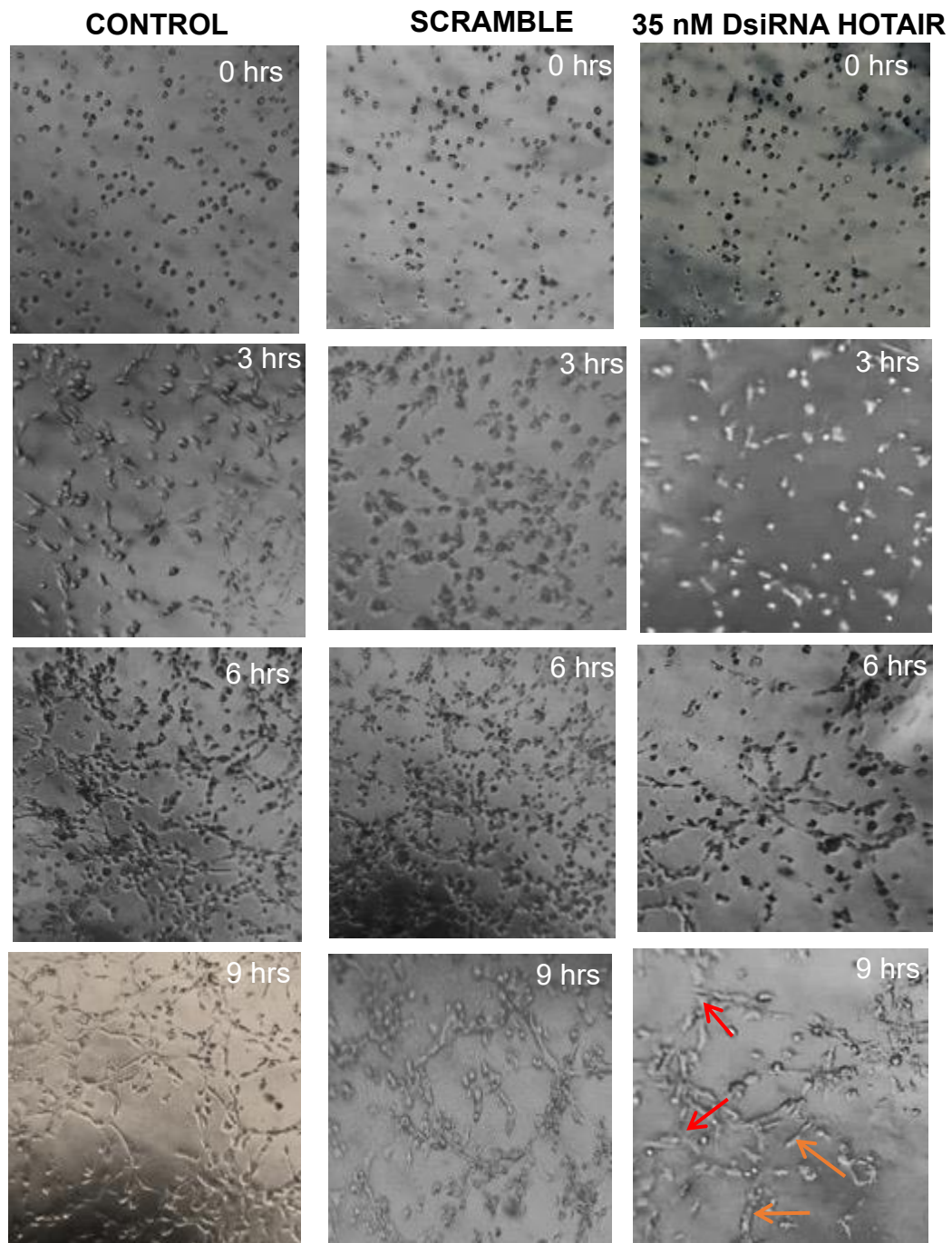


Figura 9. Ensayo de mimetismo vasculogénico en MDA-MB-231. Se sembraron 10 mil células MDA-MB-231 en las tres condiciones, control, transfectadas con scramble de RNA y transfectadas con 35 nM de DsiRNA HOTAIR, se fue documentando la formación de redes tridimensionales y nodos a través del tiempo con fotografías, en el panel A se muestran imágenes representativas de cada condición por tiempo. El análisis de las imágenes se realizó contando el número de tubos capilares y nodos en 3 campos por cada tiempo y por dos diferentes observadores, los valores obtenidos fueron promediados y se muestran en el panel B. Se encontró una diferencia significativa entre el control y las células con HOTAIR inhibido ($p > 0.005$)

A)

Hs578t



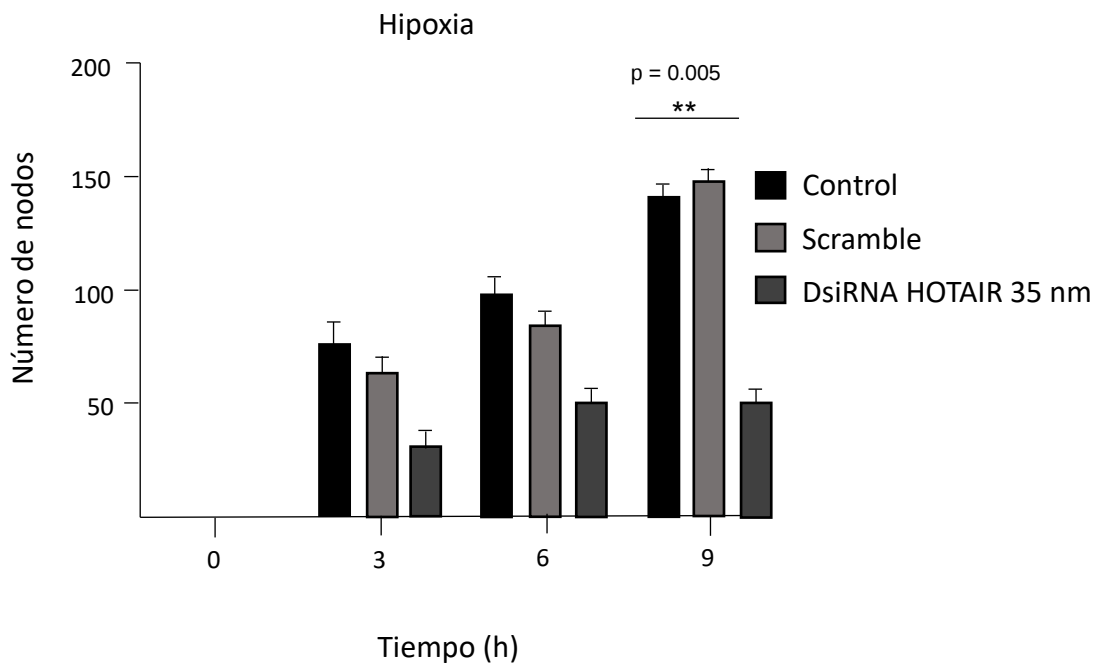
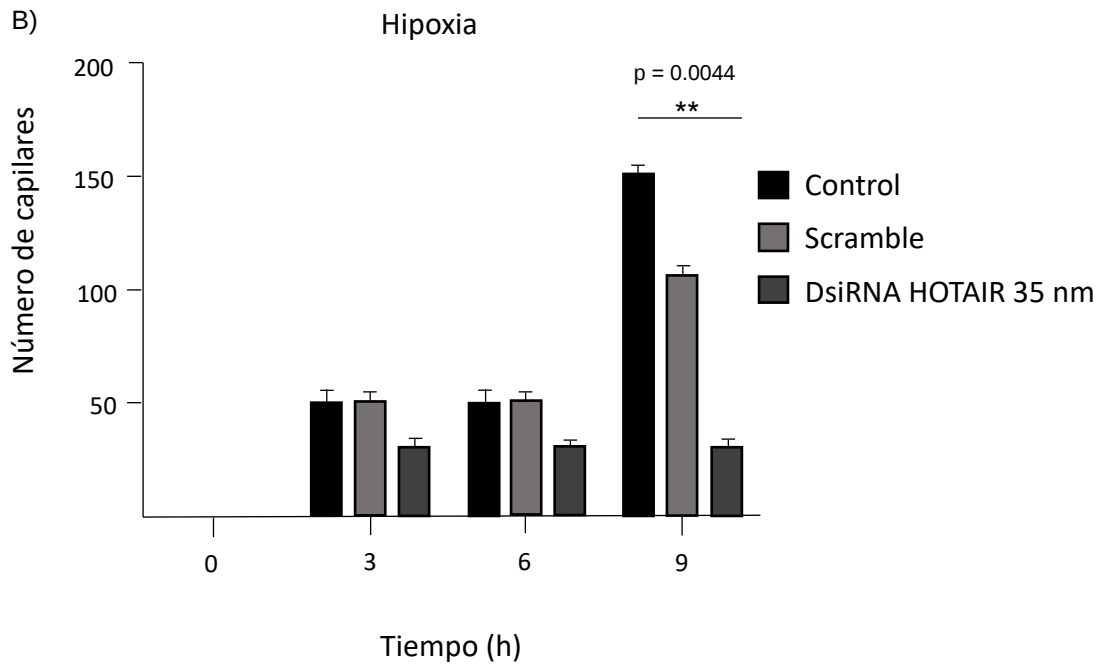


Figura 10. Ensayo de mimetismo vasculogénico en Hs578t. Se sembraron 10 mil células Hs578t en las tres condiciones, control, transfectadas con scramble de RNA y

transfectadas con 35 nM de DsiRNA HOTAIR, se fue documentando la formación de redes tridimensionales y nodos a través del tiempo con fotografías, en el panel A se muestran imágenes representativas de cada condición por tiempo. El análisis de las imágenes se realizó contando el número de tubos capilares y nodos en 3 campos por cada tiempo y por dos diferentes observadores, los valores obtenidos fueron promediados y se muestran en el panel B. Se encontró una diferencia significativa entre el control y las células con HOTAIR inhibido ($p > 0.005$)

8.5 Ensayos de migración en líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578t con HOTAIR silenciado.

Para corroborar si la inhibición del mimetismo vasculogénico está relacionado con la interferencia de HOTAIR nos propusimos. Uno de los mecanismos por los que inicia el mimetismo vasculogénico es la migración celular, donde las células se alinean para formar los tubos capilares. Ya que las líneas celulares mostraban una menor formación de mimetismo cuando se transfectaban con inhibidor de HOTAIR nos preguntamos si la migración celular se vería afectada por lo que se realizaron ensayos de migración celular por herida.

250 mil células son sembradas para formar una monocapa, después se realizó una herida a esta monocapa y se documentó durante 48 horas como las células migraban para intentar reestablecer la monocapa. En la figura 11 se muestran los resultados con MDA-MB-231 donde se observó que las células con HOTAIR inhibido tienen una disminución significativa en su capacidad de migración, se puede observar que a las 24 horas las células control habían migrado más que las células con HOTAIR inhibido. En la figura 12 se muestra el tratamiento de los datos obtenidos con las imágenes, se realizó una cuantificación midiendo el área de la herida en todos los tiempos, el área en el tiempo 0 fue considerada como el 100% y su inverso el porcentaje de migración, a las 24 horas las células control habían migrado y cubierto 35% de la herida mientras que las células con HOTAIR inhibido solo migraron 10%, a las 48 horas las células control sin transfectar lograron cerrar completamente la herida mientras que las células con HOTAIR inhibido solo lograron migrar 25%.

Los resultados fueron confirmados en una segunda línea celular. Hs578t. Las células fueron tratadas de la misma manera que la línea celular anterior, en la figura 13 se

puede observar el mismo comportamiento donde las células con HOTAIR inhibido tienen una capacidad de migración significativamente disminuido en comparación con las células control.

En la figura 14 muestra la cuantificación que se realizó de la misma manera, midiendo el área de la herida a través del tiempo y su disminución. El área inicial fue considerada como el 100% y su inverso el porcentaje de migración. Las células transfectadas con el inhibidor de HOTAIR solo migraron el 30% a las 48 horas mientras que las células control ya habían cerrado la herida completamente.

Los resultados obtenidos muestran claramente como hay una disminución significativa en la migración celular en las células transfectadas con inhibidor de HOTAIR, las cuales migraron hasta 60% menos que las células control sin transfectar. Esto puede ser resultado de la disminución en las proteínas asociadas a la migración nosotros proponemos a FAK.

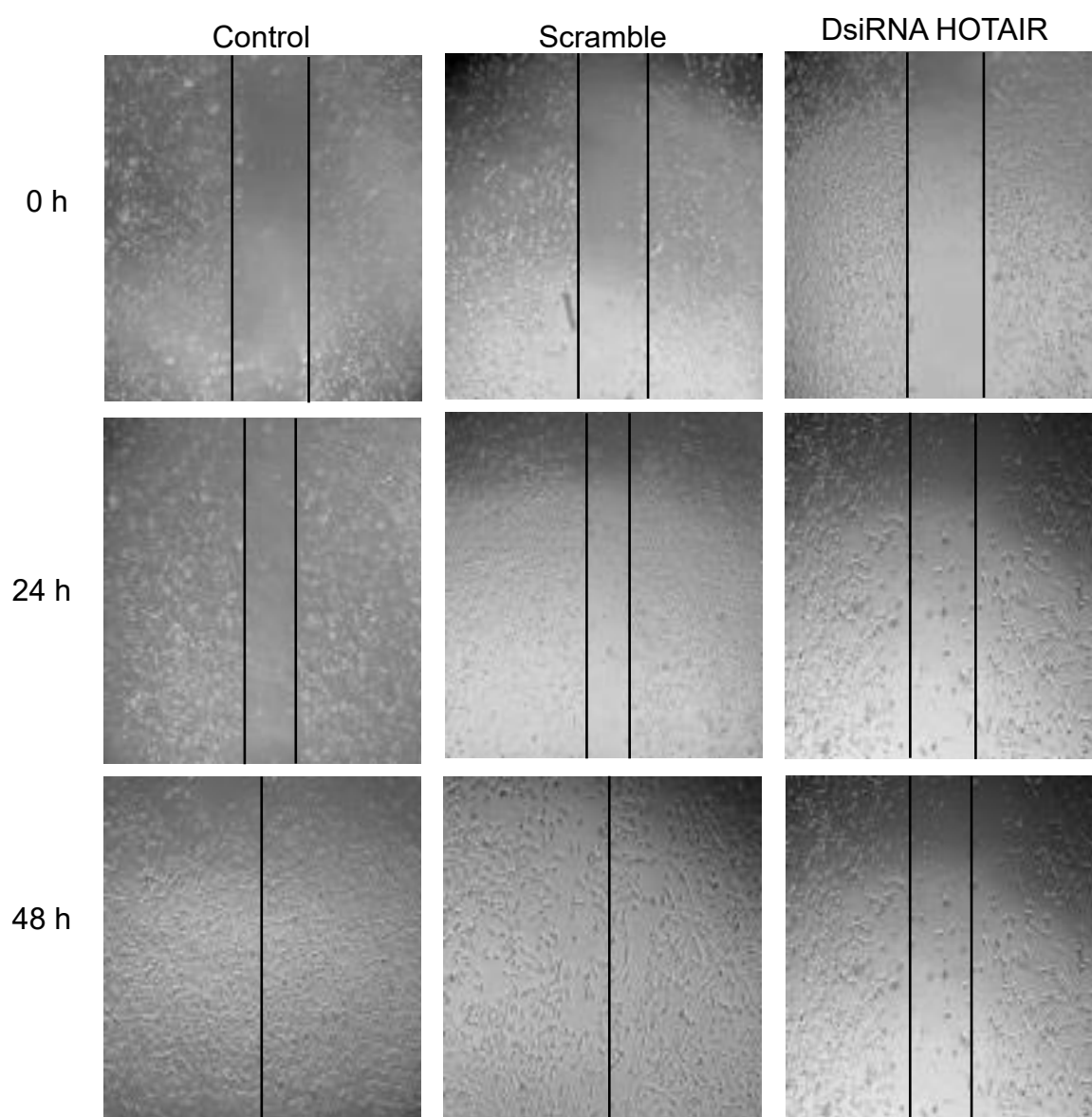


Figura 11. Ensayos de migración celular por herida en MDA-MB-231. Se colocaron 250 mil células y se dejaron crecer hasta formar una monocapa, después se realizó una herida y se monitoreo la migración de las células, se fotografiaron las tres condiciones hasta que uno llegara a cerrar la herida completamente.

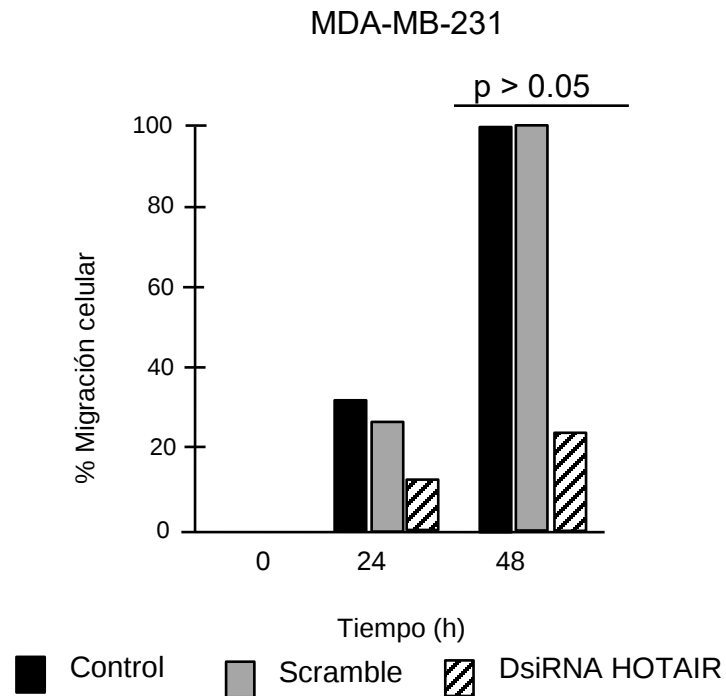


Figura 12. Cuantificación de la migración en MDA-MB-231. Se midió el área de herida y como se disminuía con el paso del tiempo. El área de la herida es considerada como el 100% y el inverso del porcentaje cubierto el porcentaje de migración, finalmente los resultados fueron comparados para verificar si había una diferencia significativa. Se puede observar que las células control y scramble lograron migrar y cubrir el 100% de la herida después de 48 horas en comparación con células con HOTAIR inhibido las cuales solo migraron en un 20% para cubrir el área de la herida.

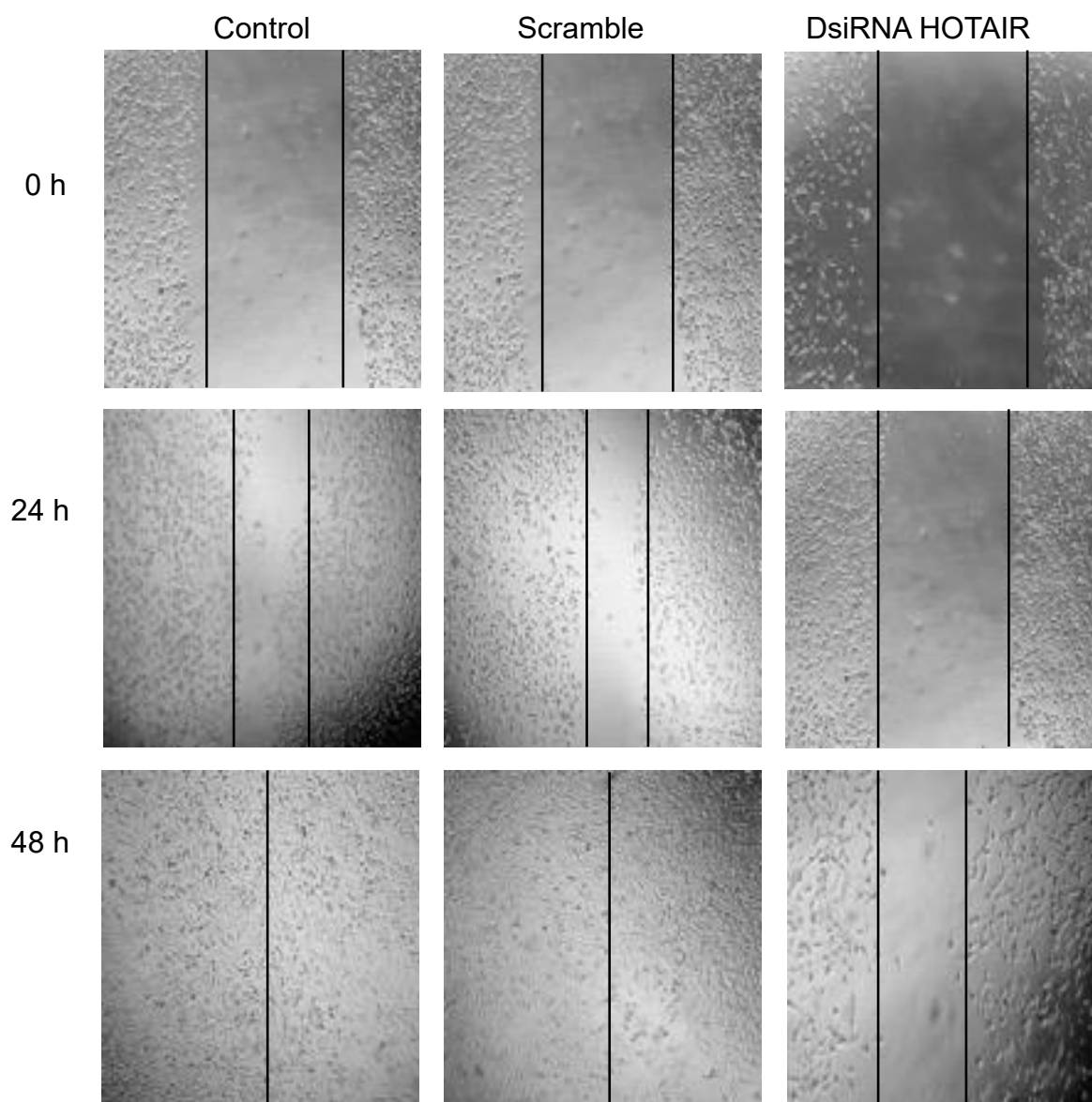


Figura 13. Ensayos de migración celular por herida en Hs578t. Se colocaron 250 mil células y se dejaron crecer hasta formar una monocapa, después se realizó una herida y se monitoreo la migración de las células, se fotografiaron las tres condiciones hasta que uno llegara a cerrar la herida completamente.

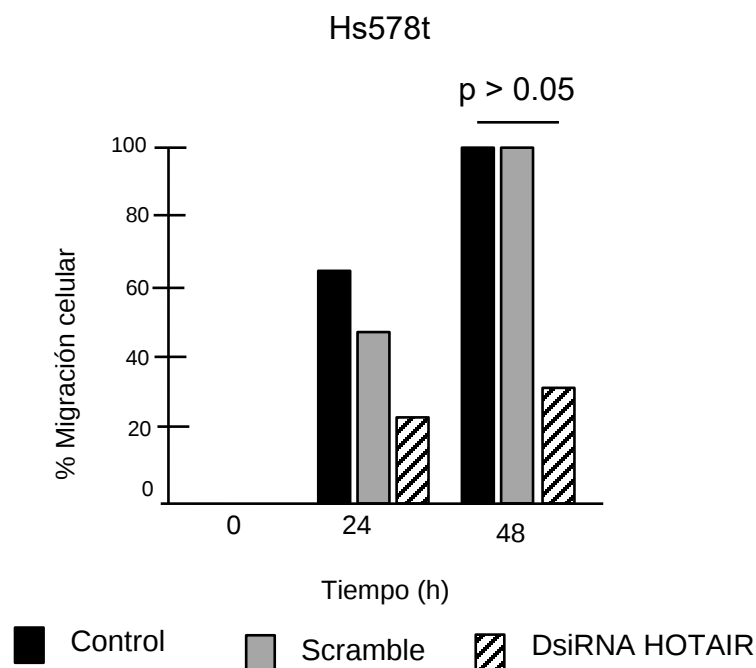


Figura 14. Cuantificación de la migración en Hs578t. El área de la herida es considerada como el 100% y el inverso del porcentaje cubierto el porcentaje de migración, finalmente los resultados fueron comparados para verificar si había una diferencia significativa. Se puede observar que las células control y scramble lograron migrar y cubrir el 100% de la herida después de 48 horas en comparación con células con HOTAIR inhibido las cuales solo migraron en un 20% para cubrir el área de la herida. Se observa que a las 24 horas las células control ya habían migrado para cubrir más del 60% de la herida mientras que las células con HOTAIR inhibido solo lo hacían en el 20%, después a las 48 horas las células control ya habían ocupado el 100% de la herida mientras que las células inhibidas solo lograron menos del 40%.

8.6 Análisis de la expresión de FAK en células MDA-MB-231 con HOTAIR inhibido por medio de IF

Una vez que se confirmó la inhibición de la migración celular nos propusimos investigar que proteína podría ser una de las afectadas, un candidato es la proteína de adhesiones focales (FAK) ya que está implicada en la migración celular y la formación de adhesiones focales. Reportes previos describen que tiene un papel importante en el mimetismo vasculogénico y reportes de nuestro equipo de trabajo lo señalan como un posible blanco del miR-204. Para comprobar esto se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-FAK para observar su distribución en dos condiciones, células control sin transfectar y células transfectadas con el inhibidor de HOTAIR. Se encontró una distribución de FAK en todas las células y se lograron observar algunas adhesiones focales, en comparación las células con HOTAIR inhibido mostraban una distribución menor de FAK, mas localizada en el núcleo y no se pudieron observar las adhesiones focales.

En la figura 15 se pueden observar los resultados de la inmunofluorescencia, en la imagen de la izquierda se muestran las células control sin transfectar y en el de la derecha las células transfectadas con el inhibidor de HOTAIR. Se observa que en las células control la distribución de FAK es más uniforme en las células y la presencia de algunas adhesiones focales marcadas con flechas, las células transfectadas con el inhibidor de HOTAIR se observa una distribución más pobre de FAK en las células, así como la perdida de las adhesiones focales.

Se puede concluir que la inhibición de HOTAIR disminuye significativamente la migración celular y la cantidad de proteína FAK. Esto puede ser que sea a través de esponja de miR-204 la cual es un posible blanco directo de FAK

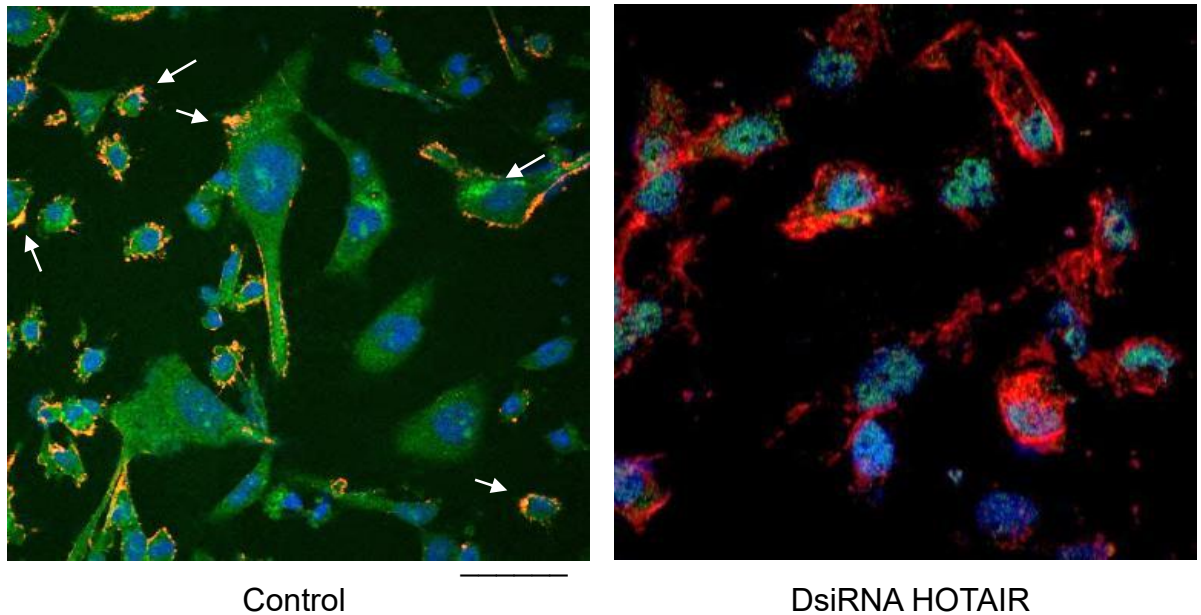


Figura 15. Determinación de la proteína FAK por inmunofluorescencia. En verde se muestra la proteína FAK, en rojo la actina polimerizada del citoesqueleto teñida con faloidina rodaminada y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Las células fijaron con paraformaldehído y después se permeabilizaron, después fueron marcadas con antiFAK al que después se le colocó Alexa-488, posteriormente se colocó la faloidina y el DAPI. Se muestran con flechas la presencia de adhesiones focales características de la actividad de FAK.

8.7 Comprobación de la interacción HOTAIR/miR-204 por ensayos de luciferasa.

Nosotros proponemos que HOTAIR está actuando como esponja del miR-204, interactuando con este y liberando a los genes blanco del miR-204 de su represión postranscripcional. Para comprobar esta hipótesis fue necesario comprobar que existía una interacción secuencia específica entre HOTAIR y miR-204. Para lograrlo el primer paso fue determinar la presencia de una región de HOTAIR que fuera complementaria a una secuencia de miR-204. Existen diferentes softwares que nos permiten predecir la interacción entre lncRNA y miRNA. Se eligió trabajar con miRWALK porque contenía datos de HOTAIR y nos permitió hacer el análisis con miR-204. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos en la base de datos donde se predice un sitio complementario de 8 nt en la posición 131-145 de HOTAIR. Una vez que se contó con la posible región semilla se procedió a sintetizar oligonucleótidos que contuvieran la región semilla. Se sintetizaron dos pares, el primero con la secuencia de la región semilla complementaria a miR-204 y otro con la secuencia de la región semilla mutada. Los oligonucleótidos fueron hibridados para formar un fragmento de doble cadena y posteriormente fueron ligados a un vector reportero de luciferasa pMir-Report y secuenciados para confirmar la presencia de nuestro fragmento dentro del plásmido. En la figura 17 se muestra el diseño del plásmido que sería transfectado en las células para la determinación de actividad de la luciferasa. Los plásmidos fueron purificados y transfectados en células MDA-MB-231 donde después se realizaron los ensayos de medición de actividad de luciferasa.

En la figura 18 se muestran los resultados del ensayo de medición de actividad de la luciferasa, se puede observar que la actividad está conservada en los plásmidos que contienen el inserto de HOTAIR y en los plásmidos que contienen el inserto wt en

presencia de un scramble de RNA, sin embargo, se observa la disminución significativa en los plásmidos que contienen la región semilla de HOTAIR interactuando con el miR-204, para comprobar que no se debiera a uniones inespecíficas se colocó el plásmido con la región semilla mutada y también se observa una actividad de luciferasa completa

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que hay una interacción secuencia específica entre HOTAIR y miR-204. HOTAIR puede hacer efecto esponja sobre el miR-204 liberando a sus blancos de la represión postranscripcional

Para corroborar los datos se realizó la medición de la expresión de miR-204 en las células que tiene HOTAIR inhibido. Actualmente no se conoce con claridad lo que pasa cuando interactúan los lncRNA y los miR-204 por lo que no se puede describir el mecanismo mediante el cual se pueda decir que HOTAIR afecta los niveles de abundancia del miR-204. En la figura 19 se muestran los resultados de la cuantificación de la abundancia de miR-204 y el efecto que tiene la inhibición de HOTAIR sobre el miR-204.

HOTAIR hsa-miR-204-5p 0.974 mT TB InE mP			
<u>Gene Details</u>			
Chromosome:	12		
Transcript:	ENST00000455246		
Biotype:	antisense		
Gene id:	ENSG00000228630		
Gene Name:	HOTAIR		
UCSC graphic:			
Expression:	Cell Line	Tissue	Category
	HeLa	Cervix	Cancer/Malignant
<u>miRNA Details</u>			
Name:	hsa-miR-204-5p		
Sequence:	uuccuuugucauccaugccu		
MirBase ID:	MIMAT0000265		
Related Diseases:			
Binding Category	Transcript Position	Binding Score	Conservation
Bmer	131-145	0.059	4
Position on chromosome:	12:53963878-53963893		
Conserved	panTro2,rheMac2,oryCun2,bosTau4		

Figura 16. Predicción de la interacción entre HOTAIR y miR-204. Se encontró una posible región semilla en la posición 131-145 de HOTAIR que pudiera estar interactuando con miR-204. La predicción de esta región se realizó con los parámetros automáticos de la base de datos utilizada.

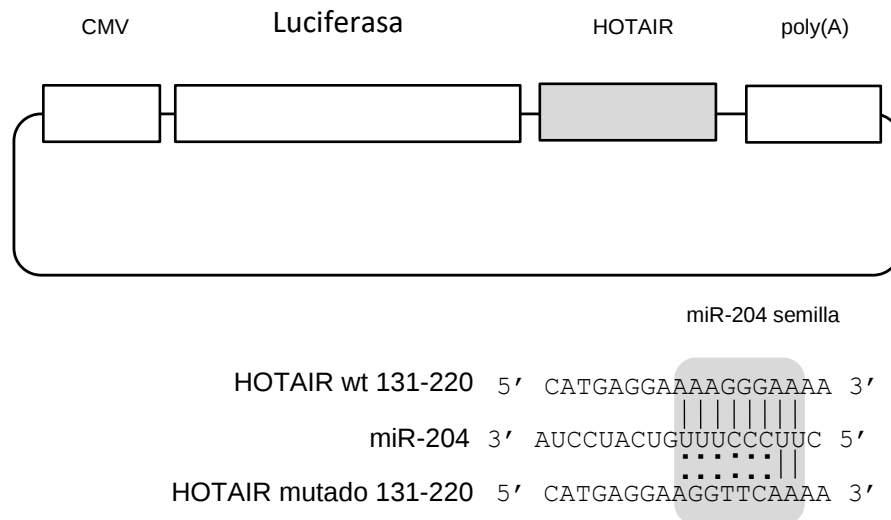


Figura 17. Diseño del plásmido para comprobar la interacción de HOTAIR y miR-204. Se logró la inserción de los fragmentos de HOTAIR en el plásmido, se puede observar que tenemos dos insertos diferentes uno con la región semilla mutada y otro con la región semilla intacta para poder corroborar la interacción con el miR-204.

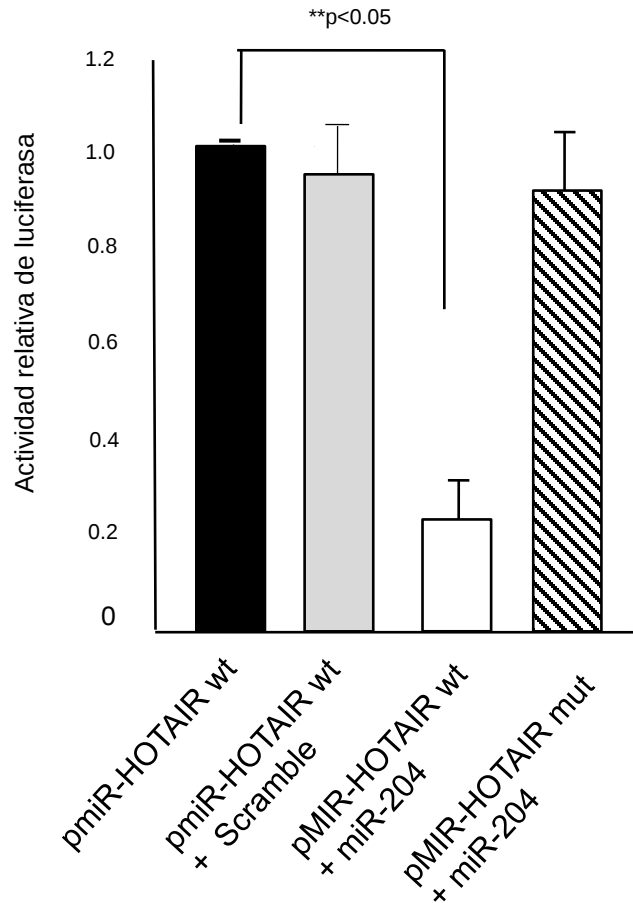


Figura 18. Cuantificación de la actividad de la luciferasa, comprobación de interacción HOTAIR- miR-204. Se muestran los datos de los ensayos de medición de actividad de la luciferasa, todos los resultados están normalizados a la actividad de las células transfectadas con el plásmido pmiR-HOTAIR wt representado con una barra negra, en la barra gris se observa la actividad de estas células, pero interaccionando con un scramble de RNA. La barra blanca es la actividad de luciferasa en células transfectadas con el plásmido pmiR-204 wt y cotransfectadas con el miR-204. Por último, la barra a rayas es la actividad de plásmido pmiR-HOTAIR mut y el miR-204. Se realizaron los experimentos por triplicado y se calculó la diferencia significativa ($p<0.05$) utilizando el software GraphPad

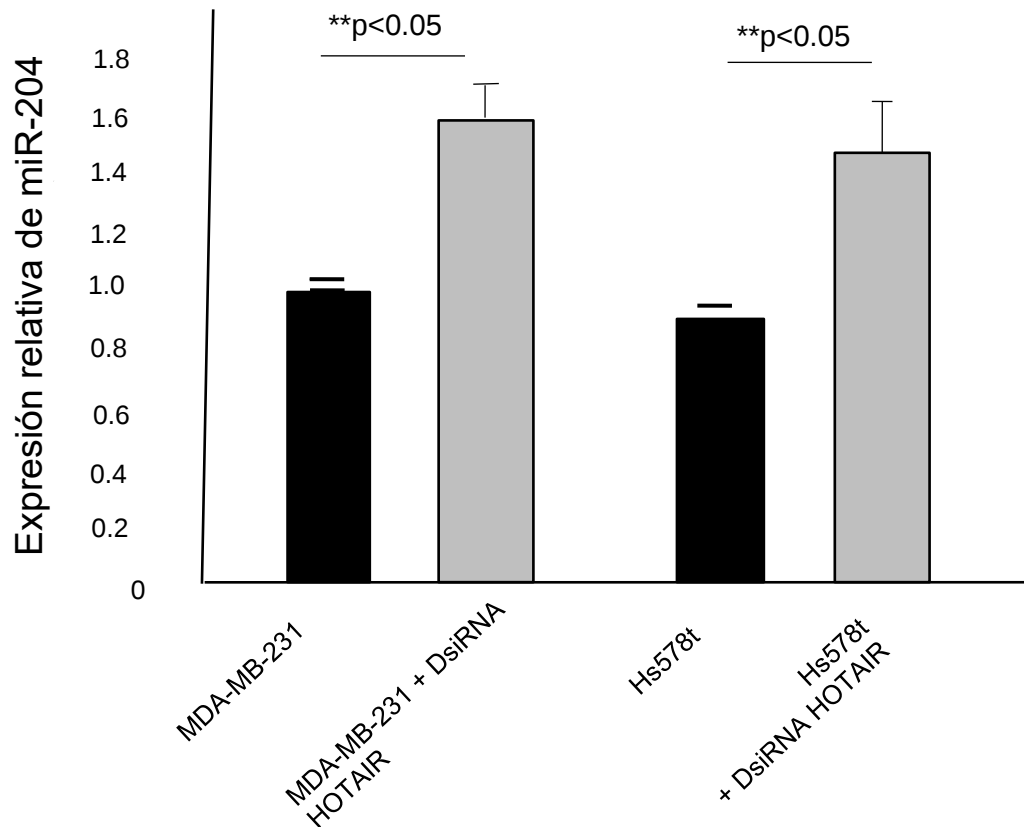


Figura 19. Cuantificación de miR-204 en células control e inhibidas de HOTAIR, la abundancia de miR-204 aumenta significativamente. En negro se muestran la cuantificación de las líneas normales tanto MDA-MB-231 y en gris la cuantificación de las líneas con HOTAIR silenciado. Las determinaciones se realizaron por PCR en tiempo real con sondas TAQMAN para la cuantificación de miR-204. Los experimentos se realizaron por triplicado y se graficaron con ayuda de GraphPad y se calculó la diferencia significativa ($p<0.05$).

8.8 Validación de FAK como blanco directo del angiomiR-204.

En trabajos previos del equipo de trabajo se había encontrado evidencia que mostraba que FAK era un blanco directo del miR-204 sin embargo no se había confirmado esto. Para determinar si el gen FAK es blanco del miR-204 se comparó la secuencia de la 3' UTR de FAK con la secuencia del miR-204 utilizando el software MirDB (<http://www.mirdb.org/>). Se predice un sitio de unión en la posición 878-884 para el miR-204 y FAK, en la figura 20 se muestra el resultado de la predicción de la interacción. Ya que se identificó la región semilla, se sintetizaron dos pares de oligonucleótidos que contenían la región semilla identificada en el paso anterior, el primer par contenía la región semilla y el segundo par contenían una mutación dentro de la región haciendo que se perdiera la semilla. Los oligonucleótidos fueron hibridados para formar un fragmento de doble cadena y posteriormente fueron ligados a un vector reportero de luciferasa pMir-Report y secuenciados para confirmar la presencia de nuestro fragmento dentro del plásmido. En la figura 21 se muestra el diseño del plásmido que se construyó para los ensayos de medición de la actividad de la luciferasa.

Los plásmidos fueron purificados y transfectados en células MDA-MB-231 donde después se realizaron los ensayos de medición de actividad de luciferasa. En la figura 22 se puede observar que la actividad de la luciferasa está conservada en los plásmidos que contienen el inserto de FAK y en los plásmidos que contienen el inserto wt en presencia de un scramble de RNA, sin embargo, se observa la disminución significativa en los plásmidos que contienen la región semilla de FAK interactuando con el miR-204, para comprobar que no se debiera a uniones inespecíficas se colocó

el plásmido con la región semilla mutada y también se observa una actividad de luciferasa completa

Con estos resultados se concluye que FAK y miR-204 interaccionan de manera secuencial específica comprobando que FAK es un blanco directo de miR-204. Sin embargo, se realizó el ensayo a nivel proteínico por medio de un western blot para determinar si la abundancia de la proteína FAK disminuía en células con la expresión de miR-204 rescatada. En la figura 23 se muestran los resultados donde se puede apreciar una disminución en la abundancia de la proteína FAK cuando se restaura la expresión del miR-204, se realizó la medición densitométrica de la imagen para cuantificar la disminución de la expresión y se encontró que se disminuía en 60% la expresión.

Los resultados nos permiten concluir que a nivel de proteína la abundancia de FAK también se disminuye en células transfectadas con el miR-204 y comprobar que el gen *FAK* es blanco directo del miR-204.

MicroRNA and Target Gene Description:

miRNA Name	hsa-miR-204-3p	miRNA Sequence	GCUGGGAAGGCAAAGGGACGU
Target Score	75	Seed Location	878
NCBI Gene ID	5747	GenBank Accession	NM_001199649
Gene Symbol	PTK2	3' UTR Length	1092
Gene Description	protein tyrosine kinase 2		

3' UTR Sequence

```

1  gcctccccta ggagcacgto ttgctaccct cttttgaaga tgttctctag ccttccacca
61  gcagcgagga attaacccctg tgtcctcagt cgcagcact tacagctcca acttttttga
121 atgaccatct ggttgaaaaa tctttctcat ataagtttaa ccacactttg atttgggttc
181 attttttgtt ttgttttttt caatcatgat attcagaaaa atccaggatc caaatgttg
241 cgtttttcta agaataaaaa ttatatgtaa gcttttaagc atcatgaaga acaatttatg
301 ttcacattaa gatacgttct aaagggggat ggccaagggg tgacatctta attcctaaac
361 taccttagct gcatagtgga agaggagagc atgaagcaaa gaattccagg aaaccaaga
421 ggctgagaat tcttttgtct accatagaat tattatccag actggaattt ttgtttgtta
481 gaacaccctt cagttgcaat atgctaattc cactttacaa agaataataa agctatatat
541 tgaagacttg agttatttca gaaaaaacta cagccctttt tgtcttacct gccttttact
601 ttctgttgga tatgtgaagc attgggtcgg gaactagctg tagaacacaa ctaaaagctc
661 atgtcttttt tcacagaata atgtgccagt tttttgtagc aatgttattt ctcttggaag
721 cagaaatgct ttgtaccaga gcacctccaa actgcattga ggagaagttt cagaaccatc
781 ccttttttcc attttttatat aatttataaa gaaagattaa agccaagttg actattttac
841 agccactgga gttaactaac cttccttgtt atctgtcttc cttc ccag gagaga atgaagcaaa
901 acaggaattt ggtttttctt tgatgtccag ttacaccatc cttctgttta attttgaaaa
961 aatataccct cccttttagtt tgttggggga tataaattat tctcaggaag aatataatga
1021 actgtacagt tactttgacc tattaaaaag gtgttaccag taaagttctt gttgtaatat
1081 ccttaaaaaa aa

```

Sitio de unión del miR-204 en la región 3' UTR del gen FAK

Figura 20. Región semilla del miR-204 en la fracción 3'UTR de FAK. Se utilizó la base de datos miRDB para determinar la posible interacción de la fracción 3'UTR del gen *FAK* con el miR-204. Se utilizaron los parámetros preestablecidos en la página.

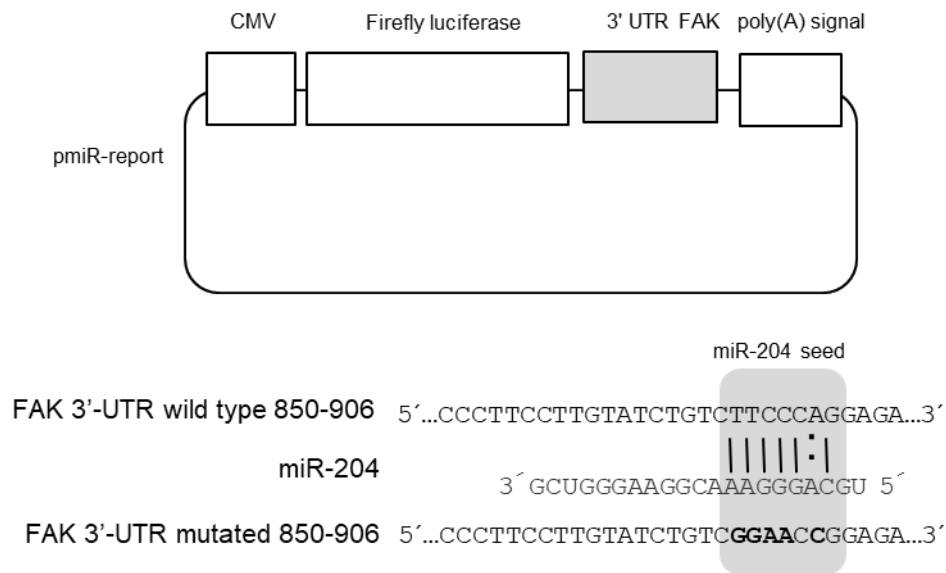


Figura 21. Diseño del plásmido para comprobar la interacción de 3'UTR de FAK y miR-204. Se logró la inserción de los fragmentos de FAK en el plásmido, se puede observar que tenemos dos insertos diferentes uno con la región semilla mutada y otro con la región semilla intacta para poder corroborar la interacción con el miR-204.

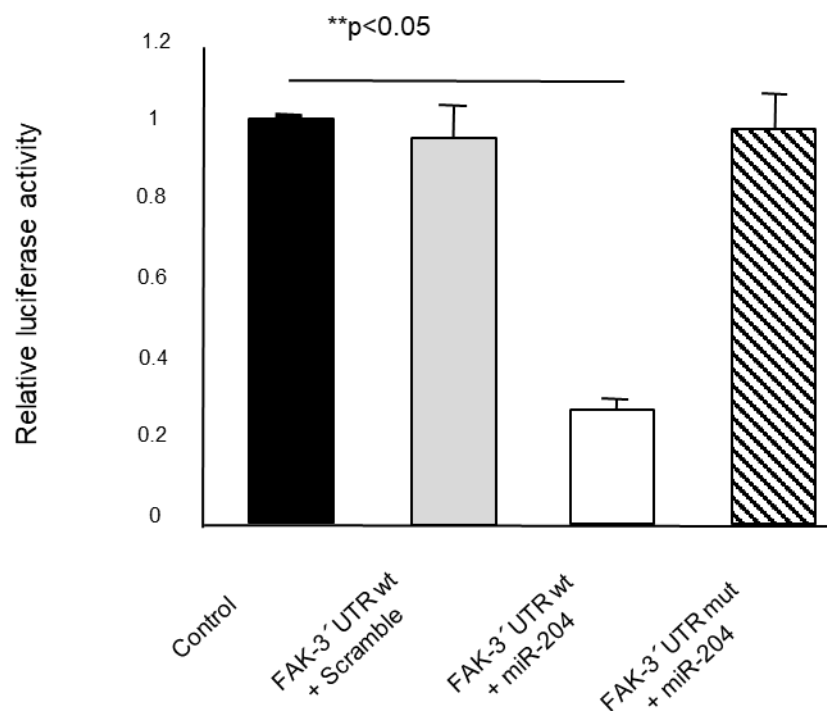


Figura 22. Cuantificación de la actividad de la luciferasa, comprobación de interacción FAK- miR-204. Se muestran los datos de los ensayos de medición de actividad de la luciferasa, todos los resultados están normalizados a la actividad de las células transfectadas con el plásmido pmiR-FAK wt representado con una barra negra, en la barra gris se observa la actividad de estas células, pero interaccionando con un scramble de RNA. La barra blanca es la actividad de luciferasa en células transfectadas con el plásmido pmiR-204 wt y cotransfectadas con el miR-204. Por último, la barra a rayas es la actividad de plásmido pmiR-FAK mut y el miR-204. Se realizaron los experimentos por triplicado y se calculó la diferencia significativa ($p<0.05$) utilizando el software GraphPad

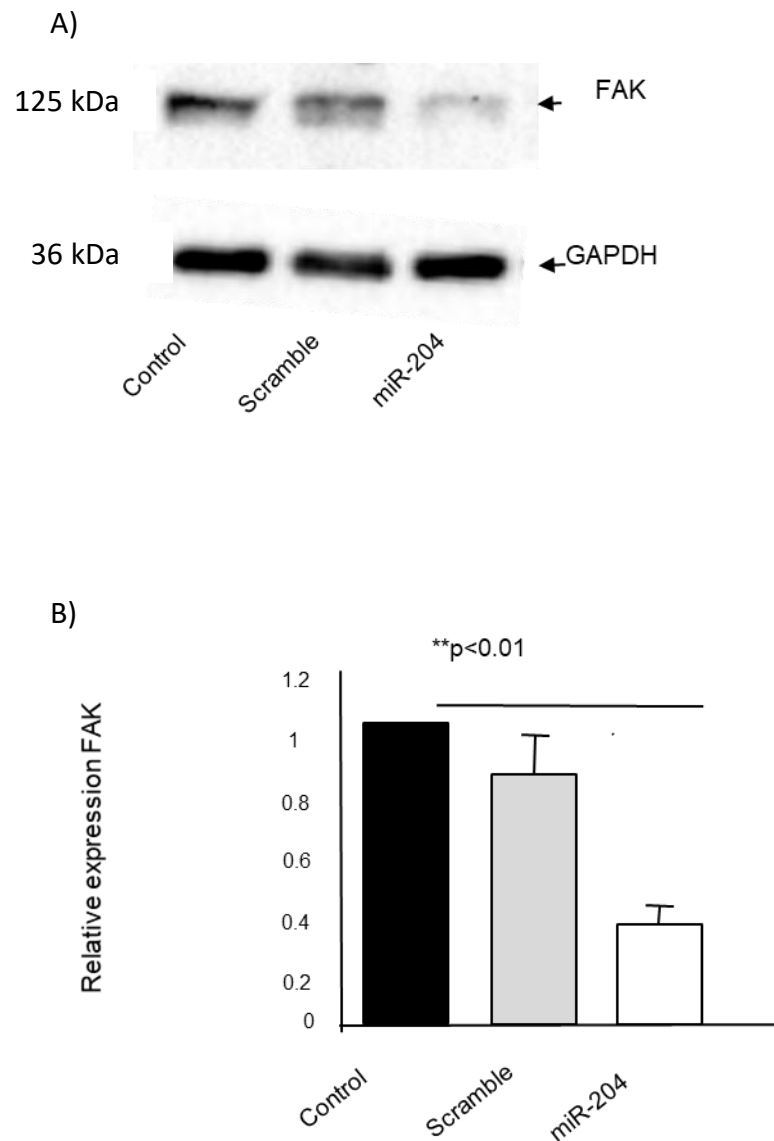


Figura 23. Western Blot de FAK. Comprobación de la inhibición de FAK en presencia del miR-204. Se observa una disminución de la expresión de FAK en células con miR-204 restaurado, se utilizó a GAPDH como control y se realizaron análisis densitométricos para medir la disminución de la expresión de manera cuantificable. En el panel A se muestra la imagen de la membrana de nitrocelulosa revelada donde se observó la disminución de la expresión. En el panel B se muestra la cuantificación del análisis densitométrico para la cuantificación de la expresión de FAK.

9.0 Discusión

La sobreexpresión de HOTAIR en tejidos tumorales ya había sido reportado en carcinoma hepatocelular (Cheng, *et al*; 2018), en cáncer de ovario (Chang, *et al*; 2018) y en cáncer de mama (Han, *et al*; 2018) por lo que nuestros resultados concuerdan con la información ya publicada, la sobreexpresión de HOTAIR incluso ha sido relacionada con resistencia a la terapia con tamoxifen (Xue, *et al*; 2015) HOTAIR es un RNA largo no codificante con actividad oncogénica, se sobre expresa en un tercio de los tumores de mama por casi 125 veces más de niveles de concentración comparado con tejido epitelial de mama sano.

Para estudiar la inhibición de HOTAIR se utilizó un inhibidor comercial de RNA de doble cadena el cual es procesado por DICER y después reconocido por el complejo de proteínas argonautas, este tipo de inhibidores comerciales ya habían sido reportados (Kim, *et al*; 2004; Rose, 2005). El inhibidor específico de HOTAIR fue reportado anteriormente (Özes, *et al*; 2016) con una función de silenciamiento de aproximadamente el 80%, en nuestro estudio no logramos una inhibición de esa magnitud, sin embargo, en el estudio publicado se trabajó con líneas de cáncer de ovario, por lo que la diferencia puede deberse a niveles de expresión aumentada en las líneas celulares de mama y la concentración utilizada era mayor (10 μ M) en comparación con la concentración que nosotros utilizamos (35 nM). Nuestros resultados son suficientes para lograr una diferencia significativa en las células transfectadas con el inhibidor de DsiRNA HOTAIR.

La vascularización que realizan los tumores durante el cáncer es uno de los fenómenos más estudiados tanto para entenderlo como para proponerlo como un blanco terapéutico, antes se creía que solo la angiogénesis, formación de vasos formales

creadas por células endoteliales, era el único mecanismo por el cual un tumor podía obtener oxígeno y nutrientes necesarios para el mantenimiento de las células tumorales, sin embargo, después se encontró otro mecanismo por el cual se podía mantener el flujo de oxígeno y nutrientes pero formada por células tumorales en lugar de células endoteliales, este fenómeno es conocido como mimetismo vasculogénico.

El mimetismo vasculogénico es un fenotipo de vascularización tumoral de gran importancia ya que su presencia tiene significancia clínica para los pacientes que se traduce en una menor tasa de sobrevida y una mayor probabilidad de metástasis. Se ha reportado la formación de mimetismo vasculogénico en líneas celulares de mama triple negativo (Zeng, *et al*; 2015) y en nuestro equipo de trabajo también se ha reportado la formación de mimetismo vasculogénico (Salinas-Vera, *et al*; 2018), la participación de FAK en el mimetismo vasculogénico también había sido reportada (Zang, *et al*; 2015), esto aunado a resultados previos de nuestro equipo de trabajo donde se encontró que había una expresión diferencial de FAK en células que formaban MV en comparación con células que no forman MV, por esta razón nosotros propusimos esta proteína como nuestro modelo de estudio. La participación de un lncRNA en el mimetismo vasculogénico también ha sido reportada (Li, *et al*; 2017) aunque con MALAT1 diferente a HOTAIR, hasta el momento no se cuentan con antecedentes del papel que podría jugar HOTAIR en el mimetismo vasculogénico.

Un mecanismo que está directamente involucrado en el mimetismo vasculogénico es la migración celular, la cual es necesaria para que las células se alineen y formen los tubos tipos capilares, la inhibición de HOTAIR mostró disminuir la migración celular.

HOTAIR es un lncRNA oncogénico que se ha demostrado que se encuentra elevada su expresión en diferentes tipos de cáncer. HOTAIR tiene mecanismos de acción descritos de remodelación de cromatina interactuando con complejos proteínicos como PRC2 y LSD1, sin embargo, también se conoce su potencial como esponja de miRNA donde libera a los blancos de dichos miRNA de su represión.

En el presente trabajo se demostró la interacción de HOTAIR con el miR-204 el cual se había demostrado anteriormente que disminuía significativamente el mimetismo vasculogénico, aparte de eso se demostró que la inhibición de HOTAIR disminuye significativamente la migración celular, la cual es necesaria para formar las redes tridimensionales que forman el mimetismo vasculogénico. Se comprobó otro blanco molecular del miR-204, FAK el cual tiene un papel ya descrito dentro del MV.

Adicionalmente se midió los niveles de expresión del miR-204 en presencia del inhibidor de HOTAIR, donde se obtuvo que en las células transfectadas con el inhibidor se detecta 1.5 veces más la concentración del miR-204. Todavía no se sabe mucho sobre la interacción entre los lncRNA y los miR para dilucidar por cual mecanismo es que los largos no codificantes están influyendo sobre los niveles de expresión de los micro RNA. Sin embargo, se conoce de su efecto esponja y está descrito en otros trabajos la reducción en los niveles de miRNA en presencia de RNA largos no codificantes.

Una vez que demostramos la inhibición del mimetismo vasculogénico y la disminución de la migración celular nosotros proponemos que la forma en la que estos fenómenos interactúan es que HOTAIR está atrapado al miR-204 en un efecto esponja, sin

embargo, es necesario comprobar que HOTAIR interacciona con el miR-204. Uno de los métodos utilizados para la comprobación de las interacciones entre dos moléculas en este caso el RNA largo no codificante y el miR-204 son los ensayos de medición de actividad de la luciferasa utilizando un plásmido comercial pmiR-report el cual tiene la secuencia para la proteína de la luciferasa de las luciérnagas. Se encontró una secuencia complementaria entre el RNA largo no codificante y el miR-204. Los resultados de la actividad de la luciferasa nos permiten concluir que la región semilla interactúa con el miR-204 aunque es necesario comprobar estos resultados in vivo con alguna técnica que nos permita dilucidar esta interacción en células vivas como RIP.

En trabajos previos ya se había hablado de que FAK es una cinasa que tiene un papel importante en el mimetismo vasculogénico y en reportes de nuestro grupo de trabajo se demostró que FAK podía ser un blanco directo del miR-204, en este trabajo nos dimos a la tarea de comprobar que FAK fuera un blanco directo de miR-204. FAK es una cinasa de adhesión focal que tiene función en la migración celular, en el mimetismo vasculogénico y en la invasión de tejidos.

Por último, se realizó la comprobación de FAK como blanco del miR.204 el cual ya había sido sugerido como un blanco con anteriores resultados del equipo de trabajo, pero era necesario comprobarlo.

Lo primero que se realizó fue un ensayo de luciferasa el cual nos comprobó que la región semilla en la región 3'UTR de FAK interacciona con el miR-204, después estos resultados fueron comprobados a nivel de proteína con un western blot, en este se comprobó que la cantidad de proteína disminuía significativamente en células transfectadas con un precursor de micro RNA 204.

Después se comprobó el resultado a nivel de proteína utilizando la técnica de Western Blot para determinar la abundancia de proteína en células transfectadas con miR-204. Se obtuvo una disminución significativa en la abundancia de la proteína FAK.

10.0 Conclusiones.

1. La inhibición de HOTAIR aumenta significativamente la abundancia de miR-204.
2. La inhibición de HOTAIR evita la formación de redes celulares en 3D en el estadio temprano del mimetismo vasculogénico.
3. La inhibición del HOTAIR inhibe la migración de las células MDA-MB-231.
4. La restauración del miR-204 inhibe significativamente la expresión de la proteína FAK sugiriendo que es un blanco directo.
5. La inhibición de HOTAIR disminuye significativamente la cantidad de FAK así como la presencia de las adhesiones focales.

11.0 Bibliografía

Amos KD, Adamo B, Anders CK. (2012) Triple-negative breast cancer: an update on neoadjuvant clinical trials. *Int J Breast Cancer*. 2012, 385978.

Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, et al. (2005) Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 7, R422-R435.

Berx G, van Roy F. (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring 1*, a003129.

Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hwang Y, Hicks D, Chen J. (2006) Ephrin-A1 facilitates mammary tumor metastasis through an angiogenesis-dependent mechanism mediated by EphA receptor and vascular endothelial growth factor in mice. *Cancer Res*. 66, 10315-10324.

Breier G, Grosser M, Rezaei M. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res*. (2014) 355:523–7. doi: 10.1007/s00441-014-1851-7

Burkhardt DL, Sage J. (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 8, 671-682.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes

miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 15524-15529.

carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition. *Anticancer Res*. 34, 1857-1864.

Carmeliet P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438, 932-936.

Carmeliet P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 3, 4-10

Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. (2016) MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*. 17, pii: E1712.

Chang, L., Guo, R., Yuan, Z., Shi, H., & Zhang, D. (2018). LncRNA HOTAIR Regulates CCND1 and CCND2 Expression by Sponging miR-206 in Ovarian Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1289–1303. doi:10.1159/000493408

Chen L, Fu H, Luo Y, Chen L, Cheng R, Zhang N, Guo H. (2017) cPLA2 α mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer through PI3k/Akt signaling. *Cell Death Dis*. 8, e2728.

Chen L, Fu H, Luo Y, Chen L, Cheng R, Zhang N, Guo H. (2017) cPLA2 α mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer through PI3k/Akt signaling. *Cell Death Dis.* 8, e2728.

Chen XL, Nam JO, Jean C, Lawson C, Walsh CT, Goka E, et al. VEGF induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell.* (2012) 22:146–57. doi: 10.1016/j.devcel.2011.11.002

Cheng, D, Sun, Q, Zhang, L, et al. The lncRNA HOXA11-AS functions as a competing endogenous RNA to regulate PADI2 expression by sponging miR-125a-5p in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(41):70642–70652.

Cheng, D, Sun, Q, Zhang, L, et al. LncRNA HOTAIR epigenetically suppresses miR-122 expression in hepatocellular carcinoma via DNA methylation. *EBiomedicine.* 2018. Oct;36:159-170.

Chiablaem K, Lirdprapamongkol K, Keeratichamroen S, Surarit R, Svasti J. (2014) Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular

Chung TK, Lau TS, Cheung TH, Yim SF, Lo KW, Siu NS, Chan LK, Yu MY, Kwong J, Doran G, et al (2012) Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *Int J Cancer.* 130, 1036-1045.

Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, et al. HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Metdependent invasive growth and

vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* (2011) 51:893–904. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.20105.042.

Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, Migliore C, Giordano S, Chiarugi P. (2011) HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 51, 893-904.

Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or- death switch. *Nat Rev Cancer.* 2; 647-656.

D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116 (2) (2004) 281–297.

Delgado-Bellido D, Fernandez-Cortes M, Rodriguez MI, Serrano-Saenz S, Carracedo A, Garcia-Diaz A, et al. VE-cadherin promotes vasculogenic mimicry by modulating kaiso-dependent gene expression. *Cell Death Differ.* (2018) 26:348–61. doi: 10.1038/s41418-018-0125-4

Fernández-Cortés M, Delgado-Bellido D and Oliver FJ. Vasculogenic Mimicry: Become an Endothelial Cell “But Not So Much”. *Front. Oncol.* (2019) 9:803. doi: 10.3389/fonc.2019.00803

Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, Bautista VP, Fuentes- Mera L, Romero-Zamora D, Maciel-Dominguez A, de la Cruz OH, Fonseca- Sánchez M, Ruíz-

García E, la Vega HA, López-Camarillo C. (2016) Suppression of cell migration is promoted by miR-944 through targeting of SIAH1 and PTP4A1 in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 16, 379.

Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, Bautista-Piña V, Hidalgo- Miranda A, Ocampo EA, Martínez MS, Palma-Flores C, Fonseca-Sánchez MA, López-Camarillo C. (2016) Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep*. 6, 34504.

Frenkel S, Barzel I, Levy J, Lin AY, Bartsch D-U, Majumdar D, et al. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uveal melanoma by confocal indocyanine green angiography. *Eye* (2008) 22:948–52. doi: 10.1038/sj.eye.6702783

Geng, Y. J., Xie, S. L., Li, Q., Ma, J., and Wang, G. Y. (2011) Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression, *J Int Med Res* 39, 2119-2128.

Graf, O; Thomas, H; Michael, H, et al. Follow-up of palpable circumscribed noncalcified Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*. 2012;482(7835):339–346.

Han P, Li JW, Zhang BM, et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer*. 2017;16(1):9.

Han, L., Zhang, H.-C., Li, L., Li, C.-X., Di, X., & Qu, X. (2018). Downregulation of Long Noncoding RNA HOTAIR and EZH2 Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation, Invasion, and Migration of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 33(6), 241–251. doi:10.1089/cbr.2017.2432

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57-70, 2000.

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer: The next Generation *Cell* 144 (1): 646,674 2011.

Hendrix MJC, Se or EA, Hess AR, Se or REB. Angiogenesis: vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* (2003) 3:411–21. doi:10.1038/nrc1092

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 1.

HuangFT,ChenWY,GuZQ,etal.Thenovellongintergenicnoncoding RNA UCC promotes colorectal cancer progression by sponging miR-143. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):e2778.

Jean C, Chen XL, Nam JO, Tancioni I, Uryu S, Lawson C, et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol.* (2014) 204:247–63. doi: 10.1083/jcb.201307067.

Kim, D.-H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M.-S., Choi, S., & Rossi, J. J. (2004). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*, 23(2), 222–226. doi:10.1038/nbt1051

Kim, K., Jutooru, I., Chadalapaka, G., Johnson, G., Frank, J., Burghardt, R., Kim, S., and Safe, S. (2012) HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer, *Oncogene* 32, 1616-1625.

Kogo, R., Shimamura, T., Mimori, K., Kawahara, K., Imoto, S., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Suzuki, A., Komune, S., Miyano, S., and Mori, M. (2011) Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers, *Cancer Res* 71, 6320-6326.

Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.

M.N. Cabili, C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev, J.L. Rinn, Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses, *Genes Dev.* 25 (18) (2011) 1915–1927.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Se or EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* (1999) 155:739–52. doi:10.1016/S0002- 9440(10)65173-5 *Nature* 2002; 420: 563–573. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01266>

Marión RM, López de Silanes I, Mosteiro L, Gamache B, Abad M, Guerra C, Megías D, Serrano M, Blasco MA. (2017) Common Telomere Changes during In Vivo Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis. *Stem Cell Reports*. 8, 460-475.

Murakami T, Hiroshima Y, Miyake K, Hwang HK, Kiyuna T, et al. (2017) Color- coded intravital imaging demonstrates a transforming growth factor-beta (TGF- β) antagonist selectively targets stromal cells in a human pancreatic cancer orthotopic mouse model. *Cell Cycle*.

Nobre AR, Entenberg D, Wang Y, Condeelis J, Aguirre-Ghiso JA. The different routes to metastasis via hypoxia-regulated programs. *Trends Cell Biol*. (2018) 28:941–56. doi: 10.1016/j.tcb.2018.06.008

Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60, 770 full-length cDNAs.

PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Cancer Prevention Overview (PDQ®): Health Professional Version. 2018 Aug 8. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-.

Özeş, A. R., Miller, D. F., Özeş, O. N., Fang, F., Liu, Y., Matei, D., ... Nephew, K. P. (2016). *NF- κ B-HOTAIR axis links DNA damage response, chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer. Oncogene, 35(41), 5350–5361.*

Peacock, J. Breast Cancer. Captone Press, Minnesota, 2002. Page 14.

Provenzano, Elena & A. Ulaner, Gary & Chin, Suet-Feung. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. PET Clinics. 13. 10.1016/j.cpet.2018.02.004.

R.A. Gupta, N. Shah, K.C. Wang, J. Kim, H.M. Horlings, D.J. Wong, M.C. Tsai, T. Hung, P. Argani, J.L. Rinn, Y. Wang, P. Brzoska, B. Kong, R. Li, R.B. West, M.J. van de Vijver, S. Sukumar, H.Y. Chang, Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis, Nature 464 (7291) (2010) 1071–1076.

Rose, S. D. (2005). Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. Nucleic Acids Research, 33(13), 4140–4156. doi:10.1093/nar/gki732

Salinas-Vera YM, Gallardo-Rincón D, García-Vázquez R, Hernández de la Cruz ON, Marchat LA, González-Barrios JA, et al. HypoxamiRs profiling identify miR-745 as a regulator of the early stages of vasculogenic mimicry in SKOV3 ovarian cancer cells. Front Oncol. (2019) 9:381. doi: 10.3389/fonc.2019.00381

Salinas-Vera YM, Marchat LA, García-Vázquez R, González de la Rosa CH, Castañeda-Saucedo E, Tito NN, et al. Cooperative multi-targeting of signaling networks by angiomiR-204 inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells. Cancer Lett. (2018) 432:17–27. doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.003

Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A, et al. Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma

microenvironment. *Cancer Res* (2005) 65:10164–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2497

Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM, et al. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. (2002) 19:233–46. doi: 10.1023/A:1015591624171

solid breast masses at mammography and us: can biopsy be averted? *Radiology*. 2007. 242:388-395.

Sonnenschein C, Soto AM: Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol* 18 (5): 372-7, 2008.

Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J, Guo H, Zhao X, et al. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* (2006) 16: 693–8. doi:10.3892/or.16.4.693

Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Res*. 2016;76(13):3666–3670.

van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system

stimulated by hypoxia. *Cancer Res.* (2005) 65:11520–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2468

Vogelstein B, Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10 (8): 789-99, 2004.

Xue, X., Yang, Y. A., Zhang, A., Fong, K.-W., Kim, J., Song, B., ... Yu, J. (2015). LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Oncogene*, 35(21), 2746–2755. doi:10.1038/onc.2015.340

Yang, S; Sun, Z; Show, Q; Wang, W; Wang, G; Song, J; Li, Z; Zhang, Z; Chang, Y; Xia, K; Liu, J; Yuan, W. MicroRNAs, long noncoding RNAs, and circular RNAs: potential tumor biomarkers and targets for colorectal cancer *Cancer Management and Research* 2018:10 2249–2257

Zang, M., Zhang, Y., Zhang, B., Hu, L., Li, J., Fan, Z., ... Yan, M. (2015). CEACAM6 promotes tumor angiogenesis and vasculogenic mimicry in gastric cancer via FAK signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(5), 1020–1028.

Zeng F., Ju R., Liu L., Xie H., Mu L., Zhao Y., Yan Y., Hu Y., Wu J., Lu W. Application of functional vincristine plus dasatinib liposomes to deletion of vasculogenic mimicry channels in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2015; 6: 36625-36642.

Zeynep, K; Hulya, K; Gulden, Y, et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: mammographic and sonographic evaluation. *Diagn Interv Radiol*. 2011. 17:232-238.

Zuazo-Gaztelu I and Casanovas O (2018) Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Front. Oncol*. 8:248. doi: 10.3389/fonc.2018.0024