

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

***Análisis del miR-204 en la regulación de la angiogénesis
a través de la modulación del factor de crecimiento de
fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

GILBERTO MANDUJANO LÁZARO

Director de tesis

Dr. Mario César López Camarillo

Ciudad de México, diciembre de 2016.

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas. Laboratorio de
Oncogenómica y Proteómica del cáncer

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez.

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la ciudad de México

Dra. Rosa Martha Yocupicio Monroy

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la ciudad de México

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

Instituto Politécnico Nacional

AGRADECIMIENTOS

El proyecto presentado forma parte de la línea de investigación “Análisis funcional del microRNA-204 en cáncer de mama” el cual es apoyado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de proyecto 222335.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico brindado para la realización la tesis presentada y por el apoyo para la impresión de este trabajo.

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico mediante la beca otorgada durante el periodo de Julio del 2014 a Julio del 2016 con No. de becario 336900.

El trabajo para la realización de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del cáncer en el Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección del Dr. Mario César López Camarillo al cual agradezco la oportunidad, apoyo y confianza brindada, además de los consejos y conocimientos adquiridos a lo largo de la estancia.

Agradezco a la Dra. Rosa Martha Yocupicio Monroy por sus consejos y asesorías además de los ánimos que me ofreció, a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por su apoyo y consejos, a la Dra. Laurence A. Marchat por sus puntuales y atinados comentarios y recomendaciones y a la M. en C. Rubiceli Medina Aguilar por sus observaciones a este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN.	1
1. Antecedentes Generales del tema.	1
1.1 Cáncer.	1
1.1.1 Carcinogénesis.	1
1.2 Cáncer de mama.....	2
1.2.1 Factores de riesgo.	6
1.3 Tipos de cáncer de mama.....	6
1.3.1 Subtipos de cáncer de mama.....	7
1.4 microRNAs.....	10
1.4.1 MicroRNAs: nuevos reguladores de la expresión génica.....	10
1.4.2 Biogénesis y Mecanismos de miRNAs.....	11
1.5 miRNAs y cáncer de mama.	15
1.6 Angiogénesis en cáncer.....	16
1.7 Familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).....	19
1.7.1 Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1).	21

2. Estado del arte.....	24
2.1 miRNAs y Angiogénesis en cáncer.....	24
3. Antecedentes particulares.....	26
4. Importancia de continuar con el estudio del tema.....	32
II. HIPÓTESIS	33
III. OBJETIVOS	33
1. Objetivo General.....	33
2. Objetivos específicos	33
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
V. METODOLOGÍA	35
5. 1 Manejo de líneas celulares.....	35
5.1.1 Cultivo celular.....	35
5.1.2 Mantenimiento de líneas celulares.....	35
5.1.3 Crioalmacenamiento de líneas celulares.....	36
5.1.4 Descongelamiento de líneas celulares.....	36
5.2 Reestablecimiento de la expresión del miR-204	36
5.2.1 Transfección del pre-miR-204.....	36
5.2.3 Extracción de RNA total.....	37
5.2.4 Análisis del restablecimiento de la expresión relativa del miR-204 por sondas taqman.....	38
5.3 Western blot.....	39
5. 3.1 Obtención de extractos proteicos totales y cuantificación.....	39

5.3.2 Electroforesis de proteínas desnaturalizadas	40
5.3.4 Transferencia de proteínas	40
5.3.5 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)	40
5. 3.6 Ensayo de inmunofluorescencia.	41
5.4 Clonación de las secuencias 3'UTR del gen FGF1	42
5.4.1 Amplificación de fragmentos de la región 3'UTR del gen <i>fgf1</i>	42
5.4.2 Clonación de las secuencias 3'UTR mutadas del gen <i>fgf1</i>	43
5.4.3 Ligación de insertos de región 3'UTR del gen <i>fgf1</i> en plásmido pmiR-report.....	43
5.5 Transformación celular.....	46
5.5.1 Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	46
5.5.2 Extracción de plásmido por lisis alcalina (Minipreps).....	46
5.6 Validación de blanco modulado por el miR-204 mediante construcciones pmiR-Luc-3'UTR <i>fgf1</i>	47
5.6.1 Transfección de la construcción en células MDA-MB-231 y co-transfección del pre-miR-204	47
5.6.2 Ensayo de medición de actividad de luciferasa.....	48
5.7 Ensayo de angiogénesis	48
5.7.1 Ensayo de formación de túbulos <i>in vitro</i> (Ensayo de angiogénesis).	48
5.7.2 Ensayo de formación de túbulos <i>in vitro</i> (Ensayo de Mimetismo Vasculogénico).	49
5.7.3 Silenciamiento de genes asociados a Mimetismo Vasculogénico.....	50
VI. Resultados	52

6.1 Análisis de la expresión de FGF1	52
6.1.1 Análisis de la expresión de FGF1 por PCR.....	52
6.1.2 Análisis de la expresión de FGF1 por Inmunofluorescencia	57
6.2 Análisis del efecto de la restauración del miR-204 en la expresión de FGF1 en células MDA-MB-231.	57
6.3 Diseño de oligos y preparación de plásmido pmiR-Report	64
6.4. Clonación de la región 3'UTR de <i>fgf1</i> y <i>fgf1-mut</i>	68
6.4.1 Clonación de la 3'UTR de <i>fgf1</i> wild type y mut.	68
6.4.2 Ensayo de luciferasa.....	69
6.5 Disminución de la expresión del FGF1 mediada por el miR-204 inhibe la angiogénesis y el mimetismo vacuolológico en células de cáncer de mama.....	76
6.5.1 Desarrollo e inhibición del mimetismo vasculológico respecto al tiempo .	81
6.5.2 El miR-204 inhibe el sinergismo vascular.	83
6.5.3 El mimetismo vasculológico está asociado a células altamente metastásicas.	85
6.5.4 El mimetismo vasculológico es dependiente de estrés hipóxico y factores pro-angiogénicos.....	87
6.5.5 Silenciamiento de <i>tgfr2</i> inhibe el mimetismo vasculológico.	91
VII. Discusión.	93
VIII. Conclusiones.	98
IX Referencias.....	99

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Amp: Ampicilina.

ANGPT1: Angiopoyetina 1.

CE: Célula endotelial.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

DMEM: Medio Dulbecco modificado por Eagle.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal.

FGF1: Factor de crecimiento de fibroblastos 1.

FGFR: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.

HER: Receptor del factor epidermal humano.

HUVEC: Células endoteliales de vena umbilical humana.

ICAM: Moléculas de adhesión intracelular.

LB: Medio de cultivo Luria-Bertoni.

miRNA: micro RNA.

µg: Micro gramos.

mL: mili litros.

µL: micro litros.

MMP: Metaloproteasa.

mRNA: RNA mensajero.

MV: Mimetismo vasculogénico.

ng: nanogramos.

pb: Pares de bases.

PBS: Buffer salino de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

qRT-PCR: PCR en tiempo real cuantitativa.

RE: Receptores de estrógeno.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAi: RNA de interferencia.

RNApol: RNA polimerasa.

RP: Receptores de progesterona.

SFB: Suero fetal bovino.

shRNA: short hairpin RNA.

TGFBR2: Receptor del factor de crecimiento transformante beta 2.

U: Unidades de enzima.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

UTR: Regiones no traducidas.

VCAM: Moléculas de adhesión vascular.

VEGF: Factor de crecimiento epidermal vascular.

WB: Western blot.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la mama.....	4
Figura 2. Tasa de mortalidad de mujeres por cáncer de mama en México.	5
Figura 3. Biogénesis de microRNAs.	14
Figura 4. Angiogénesis tumoral.	18
Figura 5. Estructura, señalización y desregulación de la señalización mediada por FGF/FGFR en cáncer.	20
Figura 6. Mapa de calor de expresión diferencial de miRNAs.	27
Figura 7. Clasificación GO de genes modulados por miR-204.	29
Figura 8. El miRNA-204 inhibe la formación de tubulos.....	31
Figura 9. Estrategia experimental a desarrollar.	34
Figura 10. Plásmido pmiR-report-Luc con los sitios para la 3'UTR de <i>fgf1</i>	45
Figura 11. Análisis de la expresión de FGF1 y GAPDH mediante RT-PCR. ..	54
Figura 12. Análisis de integridad de RNA total.	55
Figura 13. Análisis de la expresión de FGF1 y GAPDH mediante RT-PCR. ..	56
Figura 14. Expresión basal de FGF1.	59
Figura 15. Restauración de la expresión del miR-204 y análisis de su efecto en la expresión de FGF1.	60
Figura 16. Análisis de la restauración del miR-204 en la expresión de FGF1.	61
Figura 17. Expresión de FGF1 en células MDA-MB-231.....	63
Figura 18. Diseño de oligos de la región 3'UTR del gen FGF1.	65
Figura 19. Hibridación de oligonucleótidos.	66

Figura 20. Preparación del plásmido pmiR-REPORT.....	67
Figura 21. Clonación de la 3'UTR de <i>fgf1</i>	70
Figura 22. Ligación de la 3'UTR de <i>fgf1</i>	71
Figura 23. Extracción y digestión de contrucción pmiR-3'UTR <i>fgf1</i>	72
Figura 24. Ligación de la 3'UTR <i>fgf1</i> mut1.	73
Figura 25. Extracción y digestión de contrucción pmiR-3'UTR <i>fgf1</i> mut1.....	74
Figura 26. Ensayo de luciferasa de la 3' UTR <i>fgf1</i> en MDA-MB-231.....	75
Figura 27. Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	78
Figura 28. El miR-204 inhibe el mimetismo vascular detectado en las células MDA-MB-231.	79
Figura 29. Mapa de mimetismo vasculogénico en las células MDA-MB-231.	80
Figura 30. Desarrollo e inhibición del MV respecto al tiempo.	82
Figura 31. El miR-204 inhibe el sinergismo vascular.	84
Figura 32. Desarrollo del MV respecto al tiempo.	86
Figura 33. Mimetismo vascular en MDA-MB-231 es dependiente de VEGFA.	88
Figura 34. Modelo del Mimetismo Vasculogénico mediado por el miR-204....	89
Figura 35. Expresión de proteínas asociadas al mimetismo vasculogénico en células MDA-MB-231.	90
Figura 36. El shTGBR2 inhibe el mimetismo vasculogénico detectado en las células MDA-MB-231.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes modulados por el miR-204.	28
Tabla 2. Anticuerpos y dilución utilizada.	41
Tabla 3. Oligos para amplificar la 3'UTR de <i>fgf1</i>	42
Tabla 4. Oligos con la región mutada de la 3'UTR de <i>fgf1</i>	43
Tabla 5. Oligos utilizados para el silenciamiento de <i>tgfr2</i>	50
Tabla 6. Reacción de PCR para amplificación de oligos para FGF1 y GAPDH.	54
Tabla 7. Cuantificación del RNA total.	55

RESUMEN

El cáncer de mama es un padecimiento multifactorial formado por un conjunto de enfermedades heterogéneas relacionadas entre sí que dan como resultado el crecimiento y proliferación anormal del tejido en donde se desarrolla dando lugar a la formación de una masa tumoral que puede invadir tejidos adyacentes o distales mediante el proceso de metástasis. El cáncer de mama tiene una elevada incidencia en mujeres en América Latina y es la principal causa de muerte por cáncer teniendo una muerte por cáncer de mama cada dos horas. Pronósticos determinan que el número de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama aumentará en un 40% en América Latina. Para que exista la transformación de célula normal a célula cancerosa, se deben alterar diversos procesos que regulan los mecanismos de control en el crecimiento, división, diferenciación y proliferación celular. Entre los procesos alterados se encuentra la angiogénesis que se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de vasculatura pre existente, este proceso es vital para abastecer de nutrientes y oxígeno al tumor, además, sirve como una vía de eliminación de desechos así como una ruta para la diseminación de células tumorales a través de los vasos sanguíneos con la finalidad de colonizar e invadir tejidos distantes. Para que se desarrolle el proceso angiogénico, el tumor crece en un ambiente de estrés por la falta de oxígeno y nutrientes, este estrés permite una reprogramación genética que sintetiza y libera factores pro-angiogénicos que son captados por receptores en las células endoteliales que promueven el remodelamiento de la matriz extracelular y el desarrollo de la vasculatura pertinente que asista al crecimiento del tumor. Existen terapias anti-angiogénicas que evitan la función efectora de los factores pro-angiogénicos, sin embargo dichas terapias han resultado ineficientes o en su defecto promueven la regresión tumoral desarrollando un tumor más agresivo. Debido a esto se plantean el uso de terapias alternativas que reduzcan o eliminen la producción de factores que promuevan el desarrollo tumoral, en este contexto se han analizado el uso de microRNAs como nuevos agentes terapéuticos ya que los microRNAs son nuevos moduladores de la expresión génica que reducen la síntesis de proteínas a nivel mensajero debido a que un solo micro RNA puede

modular la expresión de varios transcritos. Previamente nuestro grupo de trabajo determinó que al restablecer la expresión del miR-204 en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 se modularon la expresión de factores pro-angiogénicos y por ende este micro RNA era un regulador de la angiogénesis. El presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el efecto del miR-204 en la regulación de la angiogénesis en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 a través del factor pro-angiogénico FGF1. Los resultados mostraron que el restablecimiento de la expresión del miR-204 disminuye la expresión a nivel proteína de FGF1 en condiciones de normoxia e hipoxia, así mismo el restablecimiento de la expresión del miR-204 abate la angiogénesis. Adicionalmente se encontró que células MDA-MB-231 sometidas a condiciones de hipoxia, en contacto con matriz extracelular a las 12 h de cultivo, forman una red de estructuras tubulares tipo capilar sin contacto con las células endoteliales, fenómeno denominado como mimetismo vasculogénico, este fenómeno es un nuevo mecanismo de perfusión y diseminación de nutrientes al tumor. El mimetismo vasculogénico desarrollado por las células tumorales, al estar en contacto con células endoteliales forman estructuras tortuosas e irregulares indicativo de sinergismo vascular. Al restablecer la expresión del miR-204 en células MDA-MB-231 abaten la formación de mimetismo vasculogénico y sinergismo vascular. Al analizar la expresión de proteínas en condiciones de hipoxia se encontró que TGFBR2 estaba sobre expresado, el grupo de trabajo demostró que esta proteína era blanco del miR-204 por lo que se determinó el efecto de su silenciamiento en el mimetismo vasculogénico encontrando que al silenciarlo, se inhibía el desarrollo de estructuras tubulares por la célula tumoral. Estos hallazgos determinan que el miR-204 no solo abate la angiogénesis sino también el mimetismo vasculogénico lo que sugieren que el miR-204 puede ser un agente terapéutico en cáncer de mama.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Antecedentes generales del tema.

1.1 Cáncer.

El cáncer es un padecimiento que se caracteriza fundamentalmente por una proliferación celular descontrolada asociado a diversas conductas humanas como la dieta, exposición a agentes tóxicos, o alteraciones genéticas. Las células cancerosas forman tumores malignos que invaden tejidos vecinos y posteriormente pueden colonizar tejidos distantes mediante el fenómeno denominado metástasis; esto lleva a la destrucción de tejidos y órganos vitales.

El termino cáncer ampara más de 100 formas de la enfermedad, de acuerdo al tejido afectado; incluso dentro de un mismo tejido, podemos encontrar muchas variedades de cáncer con distinta morfología y grado de malignidad. Las células normales crecen y proliferan sólo cuando reciben señales o estímulos provenientes de otras células del organismo (hormonas, factores de crecimiento, etc.). Sin embargo, las células cancerosas ignoran los controles normales de proliferación y en general crecen respondiendo a señales internas estimuladoras de la proliferación celular (1).

1.1.1 Carcinogénesis.

El origen de un tumor proviene del daño a una célula, la cual sufre alteraciones en su ADN (mutaciones, deleciones, inserciones, etc.) y éstas son transmitidas a sus clonas derivadas de la división celular lo que provocan cambios en la diferenciación, proliferación, crecimiento y migración en diversas etapas que en conjunto se denominan carcinogénesis. Estas etapas se denominan iniciación, promoción y progresión.

(a) Iniciación.

Durante la iniciación, los cambios genéticos en la célula proveen una ventaja en cuanto a crecimiento y división en comparación con una célula normal debido a la

exposición constante a un agente carcinógeno. Las anomalías genómicas promueven la transcripción de proto-oncogenes y apagan la expresión de genes supresores de tumor, así como de moléculas reguladoras. La expresión de proto-oncogenes permiten la síntesis de diversos factores de transcripción, de crecimiento y moléculas que promuevan la desregulada división celular, alterando los ciclos que permiten su control. Debido a ésta fase de síntesis temprana, se dice que esta etapa es reversible.

(b) Promoción.

En esta fase se da la expansión de células cancerosas debido a la exposición continua del organismo a un agente carcinogénico al cual se le denomina agente promotor. Este agente altera la transducción de señales mediada por la modificación génica y su expresión de receptores lo que influye en un incremento en la población celular.

(c) Progresión.

En la progresión, la célula cancerosa continúa acumulando mutaciones que le confieren la habilidad de modificar su proceso proliferativo y su capacidad de diferenciación. Esta fase es irreversible y hay aberraciones en los mecanismos mitóticos, alteraciones en el funcionamiento y tamaño de telómeros, metilaciones, etc., que le permite realizar una masa tumoral que posteriormente adquirirá la capacidad de migrar e invadir hacia tejidos vecinos o distales (2).

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama se origina por una transformación en las células del epitelio en el seno, dicha transformación causa un crecimiento y proliferación celular descontrolada, dependiendo del tejido o la parte del seno en la que se desarrolle en su etapa concluyente formará un tumor que puede propagarse. El seno está compuesto principalmente en su parte interna por tejido conjuntivo, adiposo y glandular. El tejido glandular está formado por ganglios linfáticos, lóbulos y lobulillos, además de conductos ductales lácteos; la transformación celular que

dará origen al cáncer de mama se da mayoritariamente en los conductos ductales y en las glándulas que producen leche dando lugar al carcinoma ductal y lobulillar respectivamente (figura 1) aunque también hay otros tipos de cáncer de mama menos comunes (3).

A nivel mundial se diagnostican 1.6 millones de casos nuevos de cáncer de mama por año y fallecen 522 mil personas anualmente por este padecimiento. En México el cáncer de mama es el principal tipo de cáncer en la población femenina mayor de 20 años con un 30.9 % en el 2012. 15 de cada 100 fallecimientos por tumores malignos son a causa del cáncer de mama, Coahuila presenta la mayor tasa de mortalidad con 24 por cada 100 mujeres (figura 2) (4).

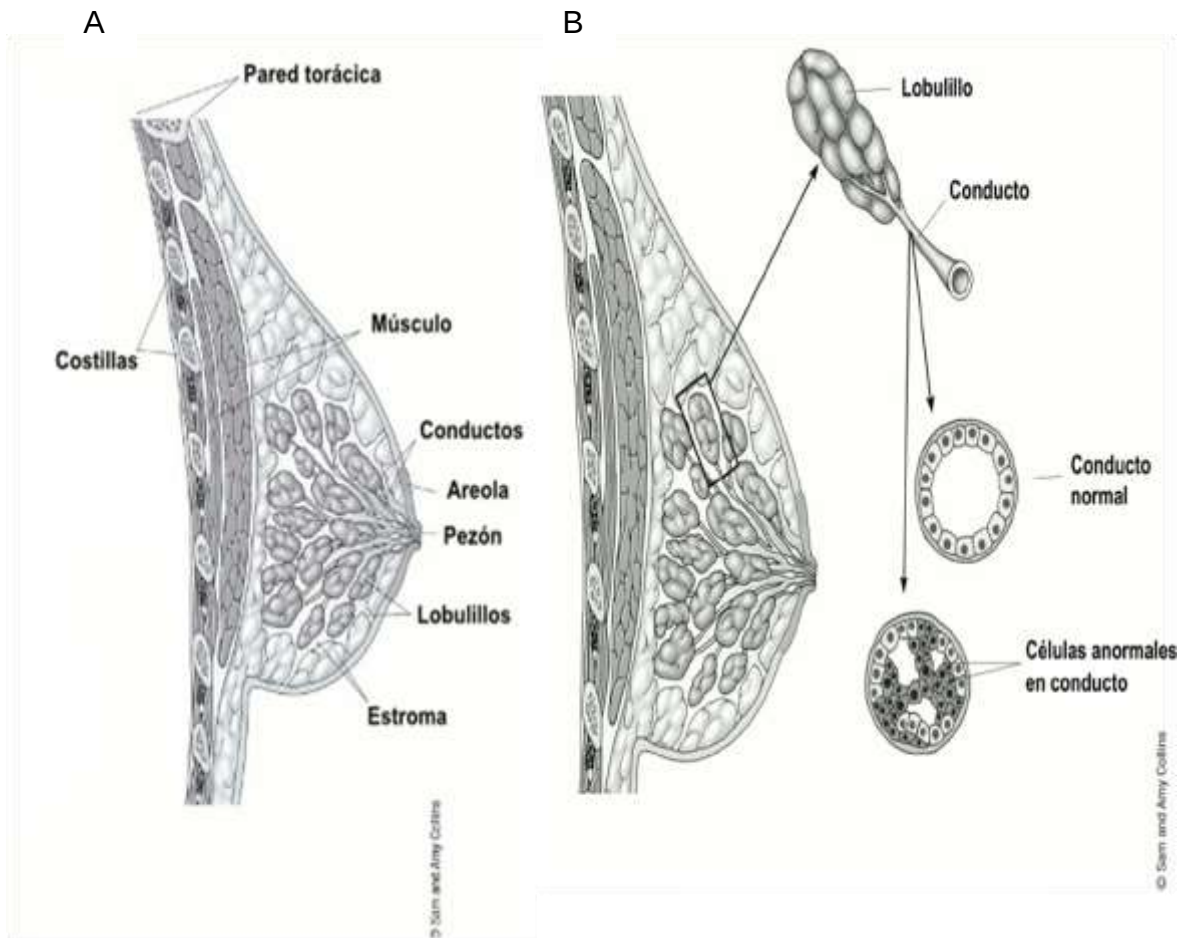


Figura 1. Anatomía de la mama. (A) Tejido normal del seno. Los componentes principales del seno son el tejido conjuntivo (músculo), tejido adiposo, conductos lácteos y lobulillos. (B) El cáncer de mama se origina mayoritariamente en los lóbulos y conductos lácteos. (Tomada y modificada de ACS, 2016).

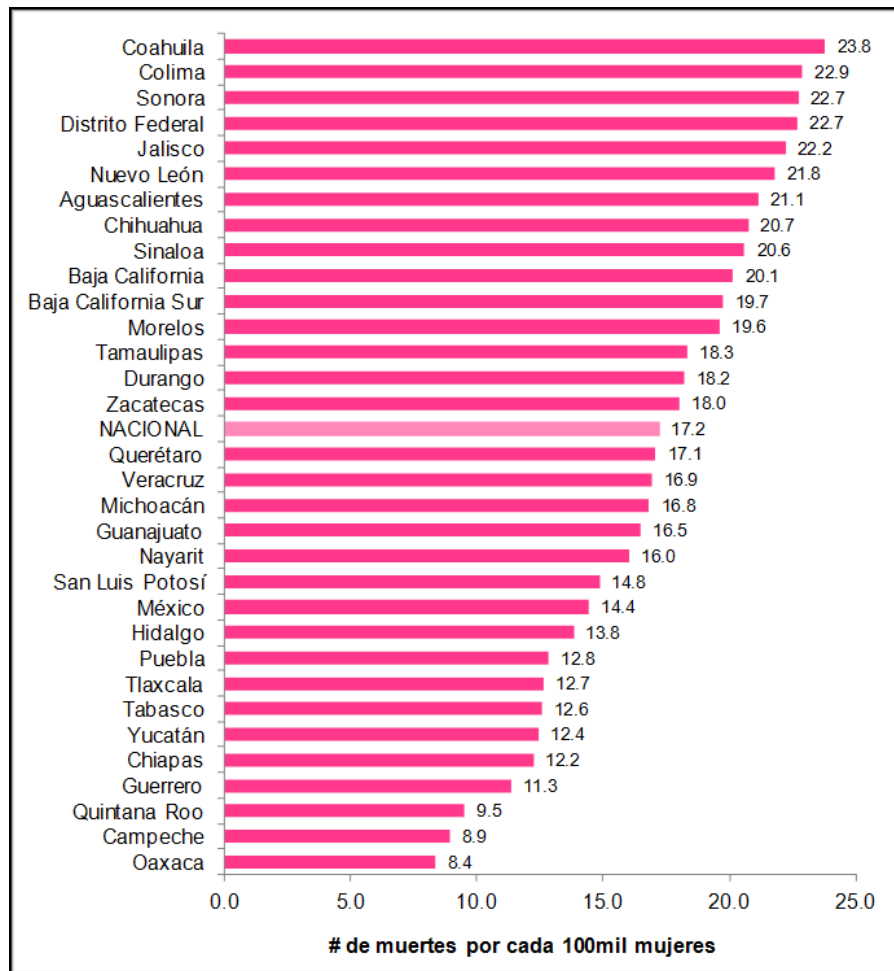


Figura 2. Tasa de mortalidad de mujeres por cáncer de mama en México.
Tasa de mortalidad de mujeres mayores de 25 años por cáncer de mama por entidad federativa, México, 2012. Fuente: CEAMEG, INEGI 2012.

1.2.1 Factores de riesgo.

En la actualidad, se conocen varios factores de riesgo asociados al cáncer de mama, la dieta, la exposición a agentes carcinógenos, edad, menopausia tardía, terapias hormonales, la sobre exposición y producción de hormonas como el estrógeno y progesterona, factores genéticos y hereditarios, menarquía temprana, nuliparidad y lactancia son algunos de los factores que propician el desarrollo del cáncer de seno (5).

1.3 Tipos de cáncer de mama.

El cáncer de mama de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se puede clasificar en distintos tipos de acuerdo a su capacidad invasiva e infiltrante en no invasores (in situ) e invasores. Dentro de los invasores se encuentran el carcinoma lobulillar y ductal, aproximadamente del 75% al 80 % de los tipos de cáncer son invasivos siendo el más frecuente el carcinoma ductal invasivo con un 80 % de los casos y con menor frecuencia está el carcinoma lobulillar con 10 % (6).

Otras clasificaciones se basan en el estadio clínico, la morfología celular y el análisis inmunohistoquímico. Perou y colaboradores realizaron el primer trabajo determinando cuatro subtipos basados en un perfil de expresión génica: luminal (A y B), HER2, tipo basal y normal (7). Sin embargo también es posible dividirlo en tres grupos principales basados en la presencia o ausencia de expresión de los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y factor de crecimiento epidermal 2 (HER2). Perfil de expresión genética reveló que dentro de los tumores RE+ existen dos subtipos: luminal A y luminal B. Los tumores RE- comprenden también dos subtipos: HER2 y tipo basal (8). Como última clasificación se encuentran aquellos clasificados como subtipo basal que no presentan la expresión de receptores (RE-, PR- y REH2-) los cuales son denominados triple negativo.

Del 20% al 30 % de pacientes con cáncer de mama, desarrollan metástasis, con una vida media de entre 2 a 4 años posterior a su detección, esto de acuerdo al subtipo que pertenezca (9).

1.3.1 Subtipos de cáncer de mama.

(a) Luminal A

Es el subtipo más común teniendo con un porcentaje del 50-60% del total de casos, caracterizado por la activación de la expresión de genes mediada por el factor de transcripción ER en el epitelio luminal del ducto mamario (10) , siendo el carcinoma lobular infiltrante el más usual. Ensayos con la técnica de Inmunohistoquímica determinó un perfil de expresión de RE, RP, Bcl-2 y citoqueratina (CK8/18), teniendo ausente la expresión de HER2 (RE+/HER-), baja expresión de Ki67 y una elevada expresión de GATA3 (11). Pacientes con este subtipo, presentan una buena prognosis. El patrón de distribución metastásico usual es en hueso (18.7%), sistema nervioso e hígado (menos del 10%). El tratamiento contra este subtipo se basa principalmente en una terapia hormonal de inhibidores de aromatasa en pacientes postmenopáusicos, moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs) como el tamoxifen y reguladores de RE como el fulvestrant (12). Como ejemplo de líneas celulares de este subtipo, se tienen las líneas MCF-7, T47D y SUM185.

(b) Luminal B

Comparado con el luminal A, este subtipo tiene un fenotipo más agresivo, elevado grado histológico y proliferativo, además de una mala prognosis. Presenta alrededor del 10-20% de porcentaje total de casos. El perfil de expresión usual está mediado por MKI67, ciclina B1, EGFR, RE y HER2 (RE+/HER+) y una elevada expresión de Ki67, sin embargo se puede encontrar en algunos casos un perfil de expresión RE+/HER- y una menor expresión de RE-/HER2 (13). El patrón de distribución metastásico es de hueso (30%) e hígado (13.8%), el tiempo de supervivencia una vez detectado es de 1.6 años. Debido a su baja respuesta a tratamientos como tamoxifen, el tratamiento se complementa con quimioterapia

neoadyuvante obteniendo una mejor respuesta, aún así presenta menor éxito en comparación con los subtipos HER+ o tipo basal (14), por ello los tratamientos cambian constantemente. Las líneas celulares que pertenecen a este subtipo son BT474, ZR-75

(c) HER2+

Caracterizado por una elevada expresión de HER2 y otros genes asociados a la ruta HER2, este subtipo de cáncer de mama representa entre el 20-50% del total de casos (9). Presenta una elevada expresión de genes asociados a la proliferación que le da un elevado porcentaje de fenotipo proliferativo (75%) además de un elevado grado histológico y una elevada tasa de mutación en p53 (>40%) (14). Un perfil de amplificación de tumores HER2, permitió realizar una subclasificación de este subtipo, una con una baja prognosis teniendo 12 % de supervivencia en 10 años, y otra con un porcentaje de 50-55% de supervivencia (15). Esto debido al desarrollo de un predictor de prognosis compuesto por 158 genes, el predictor de prognosis derivado de HER2 (HDPP) el cual estratifica la buena o mala prognosis del tumor basado en genes asociados con la respuesta inmune, invasión y metástasis. El tratamiento para este subtipo se basa principalmente en anti-HER2, mejorando el tiempo de supervivencia, reduciendo metástasis y actuando en etapas tempranas (16), además presenta una elevada respuesta a quimioterapia neoadyuvante. Líneas celulares SKBR3, MDA-MB-453 son ejemplos de este subtipo.

(d) Tipo Basal.

Es llamado así debido a la expresión similar de genes presentes en células normales de mioepitelio del seno como CK5, CK17, P-cadherina, caveolina 1 y 2, nestina, CD44 y EGFR, además de expresar en menor cantidad genes del epitelio luminal como CK8 y 18. Este subtipo representa el 10-20% del total de casos. Es caracterizado por aparición una etapa temprana con una elevada afectación en nodos linfáticos, alto grado histológico y un volumen de tamaño considerable del tumor en la etapa de diagnóstico (17). En cáncer tipo basal, tiende a ser un

carcinoma ductal infiltrante, necroso, expandible y presenta respuesta a linfocitos de estroma (18). El patrón de distribución metastásico es agresivo principalmente en órganos viscerales, sistema nervioso central y nodos linfáticos.

La principal característica de este subtipo es la ausencia de receptores usuales en cáncer de mama como RE, RP y HER, por lo que es llamado triple negativo. Presenta una mala prognosis con una elevada respuesta a la quimioterapia y una elevada tasa de mutación en p53y BRCA1 lo que explica la peligrosidad y pobre prognosis. El tratamiento para este subtipo de tumor está dado por inhibidores de PARP-1 (poly-ADP ribose-polymerase-1). Dentro de este subtipo se encuentran las líneas celulares MDA-MB-468 y SUM190.

(e) Baja expresión de Claudina.

Carece de RE, RP y HER por lo que también es denominado triple negativo pero a diferencia del subtipo basal tiene la característica de contar con una baja expresión de Claudina 3 y 4, otra característica es que presenta un enriquecimiento de marcadores asociados con la transición epitelio-mesenquimal, tiene una baja respuesta a la quimioterapia y está asociado a una pobre prognosis (19). Dentro de este subtipo se encuentran las líneas celulares MDA-MB-231 y BT549.

(f) Tipo normal.

Aún no está claramente caracterizado, sin embargo está categorizado en la clasificación de fibroadenomas y normal, representa entre 5-10% de casos totales. Expresan genes de tejido adiposo y carecen de expresión de RE, RP y HER2 por lo que también están catalogados como triple negativo sin ser considerados tipo basal. Presentan una prognosis intermedia y no responde a tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.

1.4 microRNAs

Un RNA no codificante (ncRNA) es cualquier molécula de RNA que funciona sin ser traducido a proteína, dentro de los ncRNA se encuentran los RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal (rRNA), RNA pequeño nuclear (snRNA), RNA de interferencia (siRNA) y los micro RNA (miRNA). Muchos de los genes que codifican los miRNA, están localizados principalmente en intrones de genes que codifican proteínas y en regiones intergénicas los cuales son transcritos por la RNAPol II, sin embargo algunos son transcritos por la RNAPol III y de igual manera codifican un RNA como producto final.

1.4.1 MicroRNAs: nuevos reguladores de la expresión génica.

Los miRNA son pequeñas secuencias de RNA de cadena sencilla que poseen una secuencia complementaria a transcritos de mRNA de otros genes que codificantes. Estos miRNA pueden jugar un rol crítico en el desarrollo, secreción de proteína y regulación génica. Así mismo pueden inhibir la expresión de genes blanco que codifican proteínas (20).

Los miRNA fueron primeramente observados en *C.elegans* los cuales fueron catalogados como pequeños transcritos de RNA con un tamaño de ~22 y~61 nucleótidos producto del gen *lin-4*; estos transcritos son complementarios a regiones repetidas 3' No traducidas (UTR por sus siglas en inglés) del gen *lin-14* inhibiendo su traducción por un mecanismo de antisentido (21), posteriormente Lau y colaboradores demostraron que dos pequeños RNAs temporales (stRNAs) productos de *lin-4* y *let-7* controlan el “timing” del desarrollo del gusano por medio de dos RNAs reguladores con una longitud de ~21-24 nucleótidos denominándolos miRNAs (22). Subsecuentemente, otros miRNAs fueron hallados en diversos organismos incluyendo el humano (23).

La supresión de la expresión de genes por medio de miRNA se basa en la complementariedad de sus bases en las regiones reguladoras de uno o más

mRNA, usualmente en la región 3'UTR. El alineamiento del miRNA al blanco mRNA, desencadena la degradación del mensajero transcrito por un proceso similar al RNA de interferencia (RNAi); además, en otros casos, la represión de la función génica se basa en una complementariedad parcial, esto da lugar a que un miRNA pueda tener más de un mRNA blanco, así mismo, muchos miRNAs pueden actuar en un mRNA, modulando coordinadamente la intensidad de la expresión génica en varios tejidos y células. Adicionalmente, los miRNAs pueden tener una amplia función en el ajuste fino de genes que codifican proteínas.

1.4.2 Biogénesis y Mecanismos de miRNAs.

La biogénesis en vertebrados se puede englobar en cinco pasos. Primero: El miRNA es generado como un largo pri-miRNA, mediado por la RNA Pol-II (24), el pri-miRNA es transcrito del genoma. Segundo: El largo pri-miRNA es escindido por un complejo microprocesador formado por dos componentes principales, Drosha y DGCR8/Pasha, una proteína con dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD), además el microprocesador cuenta con cofactores incluidos en la DEAD box RNA helicasa como son p68 (DDX5) y p72 (DDX17) cuya función es promover la fidelidad, especificidad y actividad del corte por Drosha (25). Este paso depende del origen del pri-miRNA, si éste está localizado en el intrón o en el exón, respectivamente (26). Tercero: El producto del procesamiento por Drosha da una secuencia de 70 a 100 nt de tallo y burbuja siendo un precursor denominado pre-miRNA. Tercero, el pre-miRNA es exportado fuera del núcleo al citoplasma por la Exportina 5 y Ran-GTP (27) (28). Cuarto: En el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por la RNasa III Dicer para producir una secuencia dúplex madura de aproximadamente 18-25nt denominado miRNA:miRNA*. Quinto: El miRNA dúplex es incorporado dentro del complejo efector de ribonucleoproteína RISC (RNA-induced silencing complex) cuyos componente principales son proteínas de la familia de Argonauta (AGO) (Figura 3). El núcleo de RISC es Argonauta (AGO) cuya característica es poseer dominio PAZ y PIWI, el dominio N-terminal también hallado en Dicer está compuesto por 130 aa, el dominio C-terminal PIWI es de aproximadamente 300 aa, estos dominios funcionan para el alineamiento y

estabilización de miRNAs en la secuencia blanco (29). Dicer, además de funcionar con el complejo RISC, trabaja en conjunto con otras proteínas miembro de la familia de AGO como HIV-1, respuesta de transactivación (TAR) y proteína de unión a RNA (TRBP) (30). El miRNA de cadena doble nuevamente es procesado para formar una secuencia madura de cadena sencilla y su cadena complementaria (miRNA*) es degradada, sin embargo eventualmente puede ser seleccionado para la regulación de la expresión génica (31). En el complejo RISC, AGO2 cataliza el corte del mRNA blanco del miRNA (32)

La diferencia entre la expresión de un miRNA ocurre por medio de diferentes procesamiento de promotores alternativos, estudios con mapeo de nucleosomas indican que un 25-33% de miRNAs intrónicos son transcritos por promotores independientes (33) (34), muchos miRNAs son codificados en tándem en un rango de 2 a 19 miRNAs con proximidad cercana (35). Varios miRNAs son codificados en intrónes y estos son procesados antes del splicing, estos pertenecen a un subconjunto de miRNAs intrónicos llamados “miRtrones” pertenecientes al procesamiento regulado por Drosha (36).

La expresión de miRNAs es tejido-específica y ésta es regulada por una red de complejos factores transcripcionales que modulan la expresión de mRNAs, por ejemplo, la diferenciación del músculo esquelético y cardíaco es mediada por la activación transcripcional de genes a través de la cooperación de factores de respuesta a suero (SRF) y factor potenciador de miocito 2 (MEF2), ambos promueven la expresión de miRNAs específicos de miocito como miR-1, miR-133, miR-206 y miR-208 (37).

El mecanismo de represión de la traducción mediado por la unión de miRNAs a su secuencia blanco puede incluir bloqueo de inicio de la traducción, represión después del inicio de la traducción, desadenilación acoplada a la degradación del transcrito y secuestro de ribosomas para la re-localización dentro de los P bodies (38). La interacción con miRNAs puede desestabilizar su blanco por medio del reclutamiento de complejo de deadenilación y decapping en el mRNA (39). En mamíferos, el requerimiento mínimo para la función efectora del miRNA es la

interacción de al menos 8 nucleótidos a la secuencia blanco, a esta secuencia del miRNA se le denomina secuencia o región semilla. La región semilla es determinante para el reconocimiento de su blanco, en otros casos donde la unión del miRNA es en la región central del blanco, la secuencia semilla es determinante para la estabilizar la interacción (40).

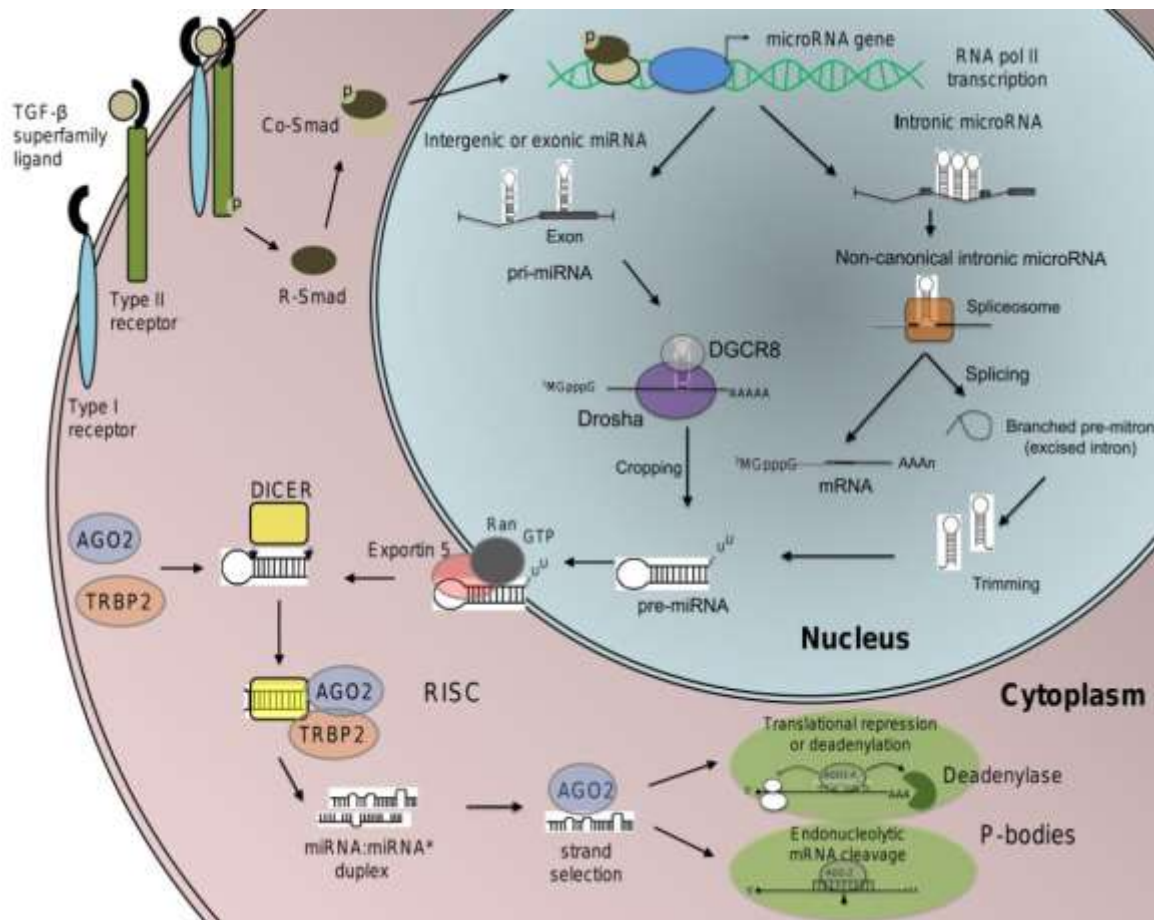


Figura 3. Biogénesis de microRNAs. Los miRNAs son transcritos por la RNA pol II que generan un largo transcrito denominado pri-miRNA, el cual es procesado por la endonucleasa Drosha/DGCR8 que genera un producto de ~70 pb denominado pre-miRNA, este pre-miRNA se une a la Exportina 5 para ser translocado al citoplasma donde es procesado por el complejo Dicer/TRBP con el propósito de generar un producto maduro que será un miRNA de una longitud de ~21 a 23 nt. Este miRNA se une a AGO2 formando el complejo RISC realizando su función efectora inhibiendo la traducción y/o promoviendo la degradación del mensajero. Tomada de López-Camarillo C., *et al* 2013

1.5 miRNAs y cáncer de mama.

La sobre expresión o represión de miRNAs se correlaciona con varios tipos de cáncer, este diferencial de expresión puede funcionar como supresor de tumor u oncogén, por lo cual puede fungir como herramienta molecular para el diagnóstico o tratamiento contra el cáncer (41).

A pesar de la detección, intervención y tratamiento, el cáncer de mama es uno de los más prevalentes en mujeres con un 41% de incidencia (42). El primer perfil de expresión de miRNAs en cáncer de mama reportado consistió en el uso de 245 miRNAs en 76 muestras de tumores de cáncer de mama y 10 controles de tejido normal. El resultado arrojó 29 miRNAs con patrón diferencial de expresión en muestras tumorales obteniendo perfiles de alta y baja expresión de miRNAs (43). Debido a la clasificación histopatológica y heterogeneidad del cáncer de mama, subpoblaciones celulares en los diferentes epitelios del seno presentan un perfil de expresión única, Sampere y colaboradores determinaron el perfil de expresión en muestras normales y tumorales encontrando que miR-145, miR-205 son expresados exclusivamente en células mioepiteliales, mientras Let-7a, miR-21, miR-141 y miR-214 se expresan en epitelio luminal. La disminución en la expresión de miR-145 y miR-205 está asociado a tejido tumoral en células mioepiteliales, se observó también una expresión reducida de let-7a en células malignas, mientras el miR-21 se encuentra sobre expresado en epitelio luminal en comparación con muestras de tejido normal (44). Distintos perfiles de mRNA son característicos en cada clasificación histológica en el cáncer de mama (45). El primer perfil de expresión de miRNAs en cáncer de seno reportado consistió en el uso de 245 miRNAs en 76 muestras de tumores de cáncer de mama y 10 controles de tejido normal. El resultado arrojó 29 miRNAs con patrón diferencial de expresión en muestras tumorales obteniendo perfiles de alta y baja expresión de miRNAs. Sampere y colaboradores determinaron el perfil de expresión en muestras normales y tumorales encontrando que el miR-145 y miR-205 son expresados exclusivamente en células mioepiteliales, mientras Let-7a, miR-21, miR-141 y miR-214 se expresan en epitelio luminal. La disminución en la

expresión de miR-145 y miR-205 está asociada a tejido tumoral en células mioepiteliales, adicionalmente, se observó una expresión reducida de let-7a en células malignas; el miR-21 se encuentra sobre expresado en epitelio luminal en comparación con muestras de tejido normal, Blenkiron y colaboradores realizaron las primeras comparaciones en el perfil de expresión de miRNAs en los diferentes subtipos de cáncer de mama, encontrando un perfil de expresión diferencial para cada subtipo permitiendo realizar una correcta clasificación de tumor basado solamente en la expresión de miRNAs (46).

Mackiewicz y colaboradores realizaron un perfil de expresión de miRNAs en líneas celulares de cáncer de mama tipo luminal (MCF-7), HER2+ (SK-BR-3) y basal (MDA-MB-231 y triple negativo) teniendo como control la línea celular MCF-10A (no tumorigénico) encontrando alterada la expresión de 21 miRNAs teniendo como principales a miR-200, miR-221 y miR-222 en triple negativo y basal en comparación con los controles, así mismo 19 de los 21 miRNAs tuvieron una expresión inversa en triple negativos (MDA-MB-231) y en luminales (HER2+) obteniendo un perfil de expresión único para cada clasificación (47).

1.6 Angiogénesis en cáncer.

La angiogénesis se refiere a la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasculatura ya existente, este fenómeno está asociado a procesos de migración, proliferación de células endoteliales (CEs), así como a la formación y organización de estructuras tubulares celulares que al unirse y madurar formarán nuevos vasos sanguíneos, este proceso es altamente regulado y es trascendental para el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis. La neovascularización involucra varios mecanismos para el desarrollo y formación de nuevos vasos sanguíneos y crecimiento tumoral (48). Los pasos principales en el proceso de angiogénesis son: 1) Precursoras de CEs originan vasos sanguíneos; 2) CEs se unen para formar pequeños capilares (vasculogénesis); 3) Plexo vascular es expandido por neovascularización; 4) Tejido es remodelado para formar una red y ramificación vascular organizada; 5) Los vasos formados por CEs son cubiertos por pericitos y células musculares lisas cuya función es modular la contracción y dilatación de los

vasos ofreciendo resistencia y controlando la perfusión de los mismos (50). Debido a que el oxígeno es distribuido por la sangre a las células de un organismo, las células deben estar localizadas entre 100 a 200 μm (en vertebrados) de un vaso sanguíneo para que esta pueda sobrevivir (50), por lo que para evadir la inanición, las células tumorales requieren promover la neovascularización para la distribución de oxígeno y nutrientes para su supervivencia, este proceso permite el desarrollo y crecimiento tumoral (51). Se ha planteado el bloqueo de la angiogénesis para explicar este fenómeno en tumores ya que se ha reportado que permanece latente por meses hasta su activación (52) donde moduladores pro-angiogénicos superan el equilibrio con moduladores anti-angiogénicos (Figura 4). La angiogénesis per se no está involucrada en carcinogénesis sin embargo es parte fundamental de la progresión tumoral (53), además de ser un componente esencial para desarrollar metástasis al crear un sitio de acceso para la migración de células transformadas incidiendo en la diseminación de células tumorales invadiendo otros tejidos cercanos y distales por medio de la propagación en vasos linfáticos, siendo esta invasión vascular y linfática posibles marcadores de pronóstico y diagnóstico en cáncer maligno (54).

Diversas proteínas participan en el mecanismo de formación de nuevos vasos sanguíneos. De estas, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF1) juega un papel determinante en la angiogénesis.

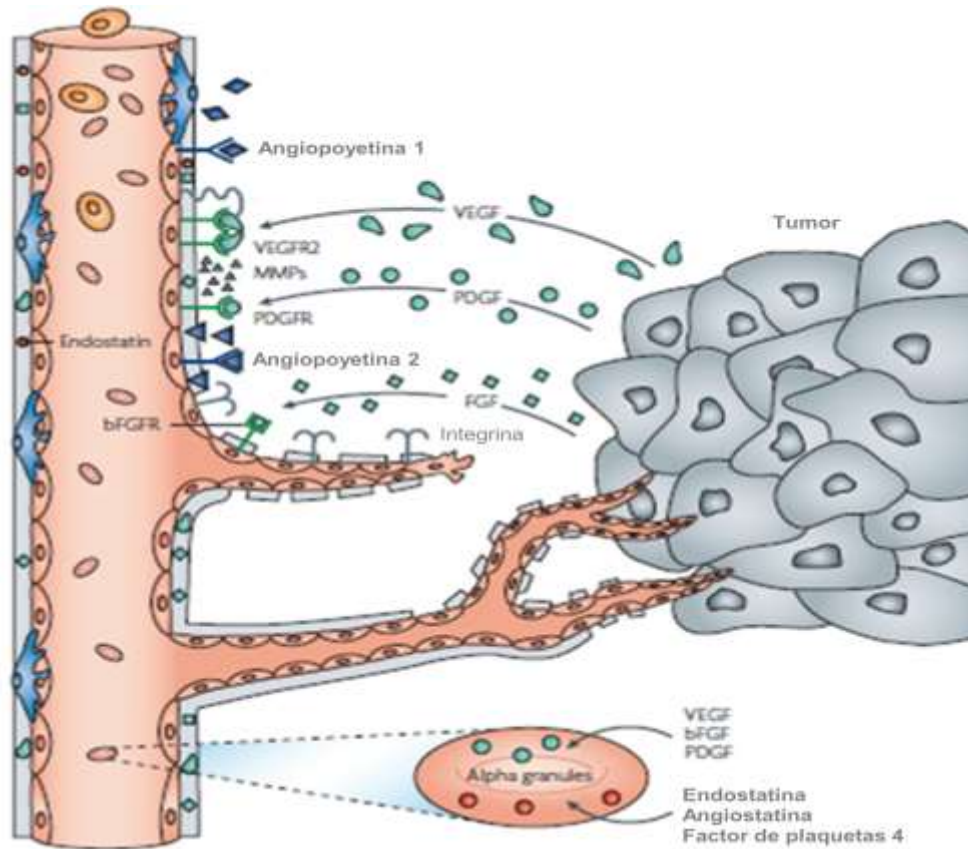


Figura 4. Angiogénesis tumoral. Factores pro-angiogénicos como angiopoyetina, VEGF, PDGF, MMP's y FGF son secretados por la célula tumoral, estos se unen a su receptor en la célula endotelial promoviendo la formación y migración de estructuras tubulares. Proteínas reguladoras de la angiogénesis como endostatina y angiostatina, son almacenadas en gránulos alfa de plaquetas modulando este proceso. Tomado y modificado de Folkman, 2008.

1.7 Familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

La familia de FGF consiste de 22 polipéptidos relacionados que son expresados en casi todos los tejidos y son multifuncionales. Estos polipéptidos pueden subdividirse en canónicos (cFGFs, FGF7-10, FGF16-20, FGF22), intracelulares (iFGFs, FGF11-14), y tipo hormonales (hFGFs, FGF19, 21 y 23) (55). Algunos FGFs, como el FGF1 y FGF2, tienen una potente actividad angiogénica y están implicados como promotores de angiogénesis en cáncer y otras enfermedades inflamatorias. Los FGFs son secuestrados en la matriz extracelular por proteoglicanos heparal sulfato (HPSG) para la señal de propagación, posteriormente son liberados a la matriz extra celular para unirse a receptores de superficie celular (FGFR) formando un complejo ternario de FGF-FGFR-HPSG (56). Los FGFs son mediados por cuatro receptores de tirosin quinasa: FGFR1, FGFR1, FGFR3 y FGFR4. La unión de FGF a su receptor lleva a la activación de cascadas de señalización intracelular. Las cuatro principales rutas de señalización que desencadena la activación de receptor son: 1) La señal Janus quinasa que es transductor y activador de transcripción (Jak/Stat), 2) fosfoinositidina fosfolipasa C (PLCY), 3) fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y 4) proteína quinasa mitógena activada /quinasa reguladora de señal extracelular (MAPK/Erk) (57,58,59). La desregulación de cualquier señalización incide en el desarrollo del cáncer (Figura 5). Los FGFs son potentes factores para muchos tipos de cáncer, en cáncer de seno, las células sobre expresan FGF1 o FGF4 crecen más rápido que células sin expresión de FGF *in vivo* (60). La activación de la señalización mediada por el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y su receptor (FGFR) es fundamental para desencadenar rutas de transducción de señales asociadas principalmente a sobrevivencia, proliferación y migración celular (61,62). Miembros de la familia de FGF están fuertemente ligados a la angiogénesis a través de una variedad de procesos de remodelación de la matriz extracelular como proliferación, diferenciación y migración de células endoteliales (63). La interacción de FGFs a sus receptores es facilitada por un cofactor la proteína de unión a FGFR, el cual está asociado a angiogénesis, la aplicación exógena de FGF1 activa FGFR1-4 y esto induce la proliferación vascular (64).

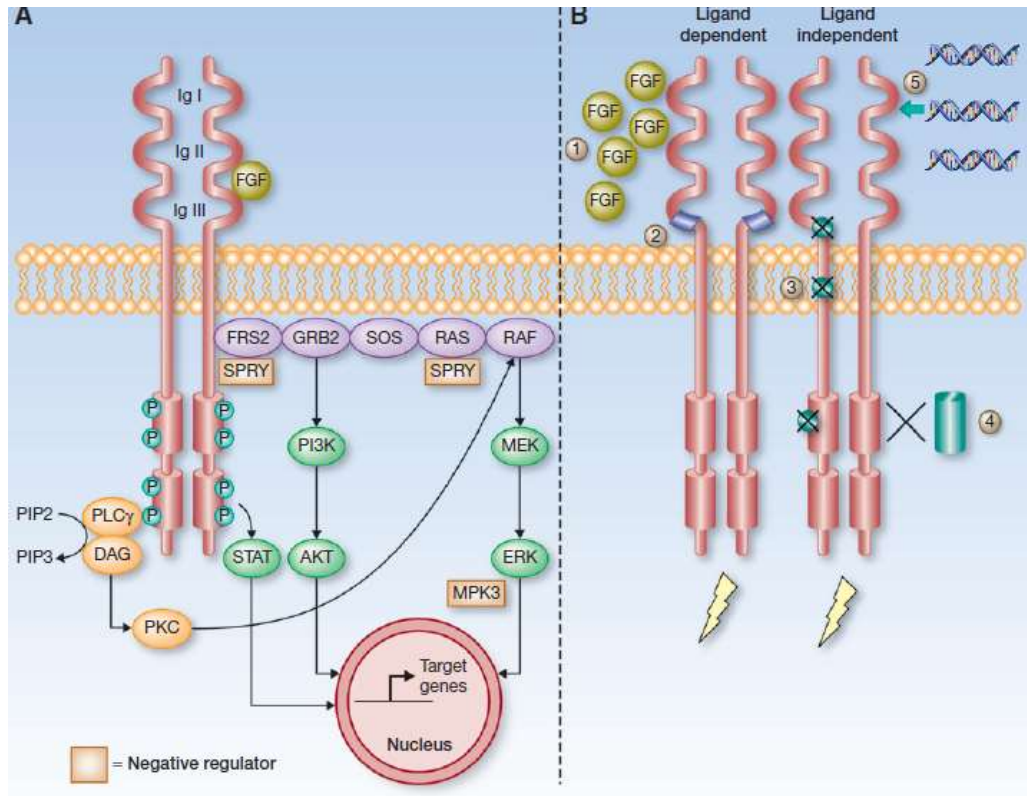


Figura 5. Estructura y desregulación de la señalización en cáncer mediada por FGF/FGFR. (A) Estructura básica de FGFR y su señalización río abajo. FGFRs son receptores transmembranales tipo tirosin quinasa con un dominio extracelular que comprende 3 dominios tipo Ig (Igl-III). El complejo formado por el ligando FGF, el heparal sulfato y el receptor causa dimerización y una transfosforilación en varios residuos de tirosina en la porción intracelular de FGFR. Esto da lugar a la activación de señalización interna en rutas MAPK, PI3K-Akt, STAT, MEK-ERK. (B) La desregulación en cáncer está mediada por la sobre producción de FGF (1) dando la activación de FGFR (2) desencadenando una hiper fosforilación (3) llevando a la dimerización del receptor y activando las quinasas o llevando a cabo una translocación (4). Un mecanismo adicional se da mediante la amplificación de un receptor resultando en una elevada expresión del mismo (5). Tomado y modificado de Brooks *et al.*, 2012.

1.7.1 Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1).

El Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) también conocido como FGF ácido, es un polipéptido no glicosilado de 155 aa, no tiene un péptido señal por lo tanto, se cree que su liberación puede ser mediada por la ruta secretoria no clásica. Bajo condiciones fisiológicas normales, la liberación de FGF1 apenas es detectada, sin embargo, su secreción se encontró en respuesta a condiciones de estrés como choque térmico, hipoxia (65,66) y falta de suero (67). FGF1 acoplado a su receptor en diferentes células, induce la activación de diversas rutas de señalización como Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt, PLC, p38MAPK, y JNK, entre otras. Su fosforilación es dependiente de la activación de MAPK quinasas (MEK1/2) y subsecuentemente MAPK (1/3) (ERK 2/1). La ruta ERK está involucrada en neurogénesis, proliferación celular, colesterolgénesis e invasión de tumor y metástasis inducida por FGF1 (68,69,70). Ensayos basados en la inhibición de PI3K/Akt indican el papel fisiológico de esta ruta en angiogénesis (71).

La señalización de FGF1/FGFR1 (autócrina y parácrina) presenta un papel crítico en la progresión de un cáncer, debido a que la activación mediada por FGF1 puede afectar el crecimiento del tumor además de estimular la angiogénesis. El FGF1 juega un papel importante en angiogénesis patológica y en enfermedades inflamatorias. La exposición transitoria del FGF1 estimula la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM (Moléculas de adhesión intra celular) y VCAM (moléculas de adhesión vascular) en células endoteliales e incrementa la adhesión de leucocitos polimorfo nucleares incrementando la migración transendotelial (72). La cascada de señalización p38MAPK, además de iniciar una ruta en respuesta a estrés, también juega un papel en crecimiento celular, diferenciación, arresto del ciclo celular y apoptosis. La ruta JNK1/2 se encontró que juega un papel crucial en el remodelamiento vascular (73).

El FGF1 presenta una elevada actividad para desarrollar un tumor maligno e incide en la progresión del tumor mediante la función autócrina y no autócrina en células NBT-II, determinando que las células autócrinas son altamente invasivas

dependientes de la unión de este factor a su receptor, el Receptor 1 del Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) (74).

FGF1 mediante su efecto autócrino o parácrino acoplado a su receptor puede jugar un papel en el crecimiento de un tumor maligno (75,76) y juega un papel crítico en la angiogénesis por la inducción del complejo ternario FGFR1-FGF1-integrina $\alpha\beta 3$ (77). La expresión de FGF1 está asociada con un incremento en la angiogénesis y una reducción en la supervivencia de pacientes en cáncer de ovario (78). Ensayos con fármacos teniendo como blanco al FGF1 en cáncer de ovario han demostrado beneficios en la supervivencia. El análisis de la expresión del FGF1 en muestras de tumor de cáncer de ovario determinó que su expresión está asociada a supervivencia. (79). Slattery y colaboradores demostraron que variantes en FGF1 están asociados a riesgo y supervivencia en cáncer de mama, la detección de estas variantes del FGF1 fueron significativamente asociadas con todas las causas de mortalidad en cáncer de seno (80). Análisis por Western blot demostraron la presencia del FGF1 en muestras de cáncer de seno excepto en muestras de tumores benignos como fibroadenoma (81). El FGF1 induce un incremento en la expresión de MMP-9 provocando la migración de células endoteliales, causando la invasión y metástasis en cáncer de seno, esto por el incremento de la fosforilación de Akt, desencadenando la translocación nuclear de NF-kappaBp65; además FGF1 incrementa la fosforilación de ERK en células ENU1564 aumentando la expresión de c-jun y c-fos provocando la translocación de c-jun e incidiendo en la activación de la ruta de señalización PI3K-Akt y MEK $\frac{1}{2}$ -ERK (82). Shi y colaboradores demostraron que la neutralización de la proteína FGF1 por un anticuerpo recombinante arresta el ciclo celular por el bloqueo de la ruta intrácrina en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-23 y MCF-7 esto influye en una reducción de la tumorigénesis, crecimiento tumoral y metástasis. Además de encontrar que el FGF1 está altamente expresado en MDA-MB-231 la cuál es altamente metastásica, también demostraron que la inhibición del FGF1 por medio de un péptido, abate la estimulación de proliferación celular, arresta el ciclo celular y bloquea la activación de Erk 1/2 y AKt mediada por este factor en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (83). FGF1 está

caracterizado como factor pro angiogénico, niveles del FGF1 detectados por ELISA en muestras de tejido tumoral de cáncer de seno fueron significativamente altos en comparación con muestras de tejido normal (84). Células MCF-7 transfectadas con FGF1 incrementaron la vascularización de tumores al ser insertadas en ratones desnudos (85).

La sobre expresión de FGF1 por MCF-7 puede inducir micro depósitos transitorios de células tumorales en vasos sanguíneos y sufre una deficiencia en la extravasación en el parénquima lo que resulta en un fallo en la proliferación a sitios distantes, el incremento en la diseminación tumoral es resultado del aumento de la intravasación debido al número de vasos sanguíneos estimulados por FGF1. Además, la sobre expresión de FGF1 en tumores de mama produce una neo vascularización que puede incrementar la probabilidad de formar estructuras tubulares inmaduras, el efecto autócrino y parácrino de esta sobre expresión en combinación con el micro ambiente tumoral permite el efecto de diseminación tumoral, por lo que al inhibir la expresión de FGF1 se puede evitar el proceso de extra vasación (86). Adaptadores de la familia de Grbt se han utilizado como Inhibidor de la ruta del FGF1 bloqueando la interacción entre el FGF1 y su receptor FGFR en células MDA-MB-231 bloqueando la fosforilación y activación de ERK2, JNK1 y AKT (87). Estos hallazgos sugieren que el bloqueo de la expresión y función del FGF1 puede funcionar como blanco terapéutico contra el cáncer.

Otros mecanismos potenciales de regulación de la expresión del FGF1 pueden estar ocurriendo a nivel postranscripcional, entre ellos puede ser la regulación de FGF1 por acción de miRNAs.

2. Estado del arte.

2.1 miRNAs y Angiogénesis en cáncer.

La expresión diferencial de los miRNAs están implicados como importantes moduladores de la angiogénesis regulando la expresión de genes alterando la estabilidad, inhibición o traducción de mRNAs. Los miRNAs de células endoteliales (CEs) están involucrados en regular la respuesta celular a estímulos angiogénicos sugiriendo que los miRNAs pueden controlar las rutas de señalización en el proceso de angiogénesis, para ello se ha estudiado los perfiles de expresión de miRNAs en cultivo de células endoteliales con la finalidad de identificar su expresión diferencial y la relación en procesos angiogénicos, sin embargo no sólo los miRNA expresados en CEs son importantes en el proceso de angiogénesis, también los niveles de expresión diferencial de miRNAs en las células que interactúan con CEs (células circulantes en la sangre, células inflamatorias, células tumorales y células vasculares) afectan la señalización y producción de factores parácrinos involucrados en la angiogénesis (88). El papel de los miRNAs en angiogénesis se ha analizado por estudios *in vitro* determinando el papel del procesamiento de miRNAs por Dicer asociados a etapas de señalización vascular y angiogénesis. El silenciamiento de Dicer mediante siRNAs en células HUVEC incide en el desarrollo de estructuras capilares al tener un efecto antiproliferativo, además de disminuir la migración y abatir la expresión de factores pro-angiogénicos en células endoteliales. La sobre expresión de miRNAs en células endoteliales también inciden en el desarrollo tumoral, esto indica que en el desarrollo del cáncer existe un balance en la transcripción de miRNAs que pueden intervenir en el desarrollo o inhibición de la masa tumoral. Para elucidar el papel de miRNAs en la angiogénesis se han desarrollado estudios con miRNAs individuales y su influencia en la regulación en dicho proceso (89).

Reportes de estudios *in vitro* e *in vivo* determinan el papel del procesamiento de miRNAs por Dicer asociados a señalización vascular (90,91). Defectos en el funcionamiento de Dicer en ratones están relacionados con una deficiencia en la formación de vasos sanguíneos alterando la expresión de factores como VEGF y

sus receptores VEGFR1 y VEGFR2 (92). El primer intento de analizar el efecto de miRNAs en la angiogénesis en ensayos *in vivo* fue por la inyección subcutánea de Dicer a ratones desnudos knockdown en células HUVEC suspendidas en un matrigel demostrando con esto la reducción en la formación de brotes angiogénicos (93).

El primer análisis de expresión de miRNAs en CEs se llevó a cabo en células HUVEC identificando 15 miRNAs con una elevada expresión en receptores de factores angiogénicos (Flt-1, NRP-2, FGf-R, c-Met, y ckit). Ensayos de transfección del miR-221 y miR-222 en células HUVEC mostraron inhibición en la formación de estructuras tubulares vasculares (95), miR-17 y miR-92 actúan en blancos de factores angiogénicos secretados como trombospondina 1 (TSP1) (95). Blancos predichos para VEGF por múltiples miRNAs miR-15b, miR-16, miR-20a y miR-20b (96) y su transfección en líneas celulares pueden inhibir la expresión de VEGF, estos ensayos sugieren el uso de miRNAs como una herramienta para el bloqueo de angiogénesis.

Factores extracelulares pueden modificar la expresión, actividad y estabilidad de miRNAs mediante la síntesis o localización celular, por ejemplo, el factor de transcripción c-Myc activa el grupo de miRNAs de miR-17 a miR-92 cuyos mecanismos tienen un rol importante en la formación del tumor. Lipopolisacáridos (LPS) inducen la expresión de miR-146, miR-142 y miR-155 y TGF β induce la expresión y procesamiento de pri-miR-21 a pre-miR-21 por la modulación de la actividad de Drosha. Estudios adicionales indican la regulación de miRNAs de células endoteliales en respuesta a ciertos estímulos o estrés como hipoxia, suero y factores tumorales, por ejemplo, miR-15, miR-16 y mi-210 involucrados en angiogénesis son pronunciados en respuesta a hipoxia regulando la expresión de VEGF, así mismo, la sobre expresión de VEGF en células HUVEC modula la sobre expresión de los miR-191, miR-155, miR-31, miR-17, miR-18a y miR-20a, incidiendo en procesos como crecimiento tumoral, sobrevivencia y angiogénesis.

3. Antecedentes particulares

El grupo de trabajo determinó la expresión de 667 miRNAs en tumores ductales invasivos mamarios en pacientes mexicanas con el propósito de encontrar nuevos marcadores tumorales (Tesis Doctoral, Miguel A. Fonseca, Posgrado en Ciencias Genómicas UACM). Esto permitió identificar la expresión diferencial de 54 miRNAs, de estos, 34 fueron reprimidos y 20 sobreexpresados. Además, se observó que de los 34 reprimidos, la expresión del miR-204 se encontraba constantemente disminuida en todas las biopsias tumorales (Figura 6). Posteriormente se analizó la expresión del miR-204 en 6 líneas celulares de cáncer de mama encontrando que el miR-204 presentó un nivel de expresión bajo en todas las líneas celulares en comparación con los controles. El perfil transcripcional de la línea celular MDA-MB-231 transfectada con el miR-204 mostró que 549 genes fueron modulados, de estos 238 se reprimieron y 310 se indujeron (Figura 7).

De los genes reprimidos, 22 contienen sitios de unión al miR-204 en la región 3' UTR de acuerdo a las predicciones de blancos realizadas con el programa TargetScan. De manera interesante, entre los genes predichos se encuentra TGFBR2 (involucrado en señalización modulando procesos como proliferación, diferenciación, migración y producción de matriz extracelular y angiogénesis) y ANGPT1 (involucrado en modulación de angiogénesis, migración, proliferación), FGF1 (involucrado en la remodelación de la matriz extra celular) entre otros (Tabla 1).

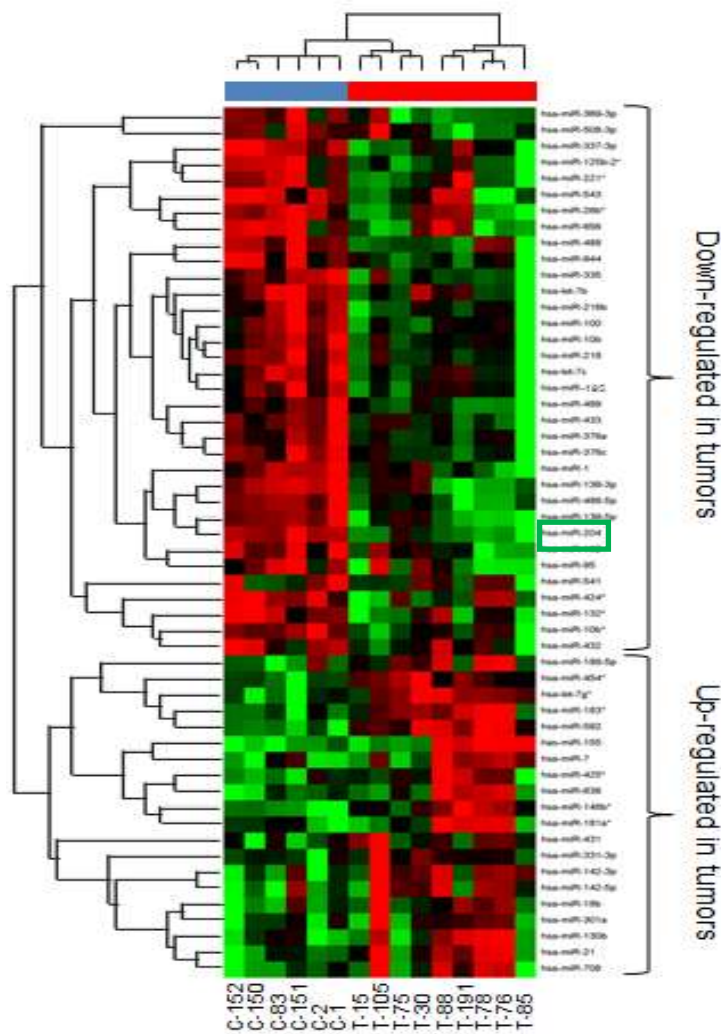


Figura 6. Mapa de calor de expresión diferencial de miRNAs. Perfil de expresión de miRNAs en tumores de mama obtenido por stem-loop RT-PCR registra la represión de la expresión (verde) del miR-204 (caja verde) en muestras de tumores invasivos (T) y tejido normal (C). Tomada de: Flores-Pérez *et al.*, 2016.

Tabla 1. Genes modulados por el miR-204 relacionados al proceso de angiogénesis.

Gen	Fold change	Sitios de unión para el miR-204	Nombre del gen	Función
EREG	-1.7167	1	Epiregulina	Miembro de la familia del factor de crecimiento epidermal, puede funcionar como ligando de EGFR, está involucrado en la ruta PI3K , contribuye a la tumorigénesis.
FOXC1	-1.8983	2	Forkhead box	Promueve invasión en cáncer de seno por inducción de la expresión de MMP7 y contribuye a la invasión microvascular en carcinoma hepatocelular primario. Regula la transición carcinoma epitelial-mesenquimal
PDPN	-1.7167	1	Podopalina	Asociada a fibroblastos está involucrada en el carcinoma ductal invasivo. Es parte del microambiente tumoral
ID1	-1.6089	0	Inhibidor de unión a DNA	Forma heterodímeros con miembros de la familia de factores de transcripción HLH. Participa en procesos de crecimiento celular, senescencia y diferenciación, promueve metástasis.
CTGF	-2.61720	0	Factor de crecimiento conectivo tisular	Es secretada principalmente por células endoteliales. Está involucrada en proliferación, diferenciación, adhesión celular, modula angiogénesis por interacción con VGFA
*FGF1	-1.66679	2	Factor de crecimiento de fibroblastos	Mantiene la matriz extracelular, diferenciación epitelial, progresión tumoral y metástasis
ANGPTL2	-1.3445	2	Angiopoyetina like 2	Proteína antagonista de ANGPT1 la cual inactiva el receptor Tie2 en cultivo de células endoteliales.

*Proteína pro angiogénica a estudiar. (Tesis Doctoral, Ali Flores, Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM).

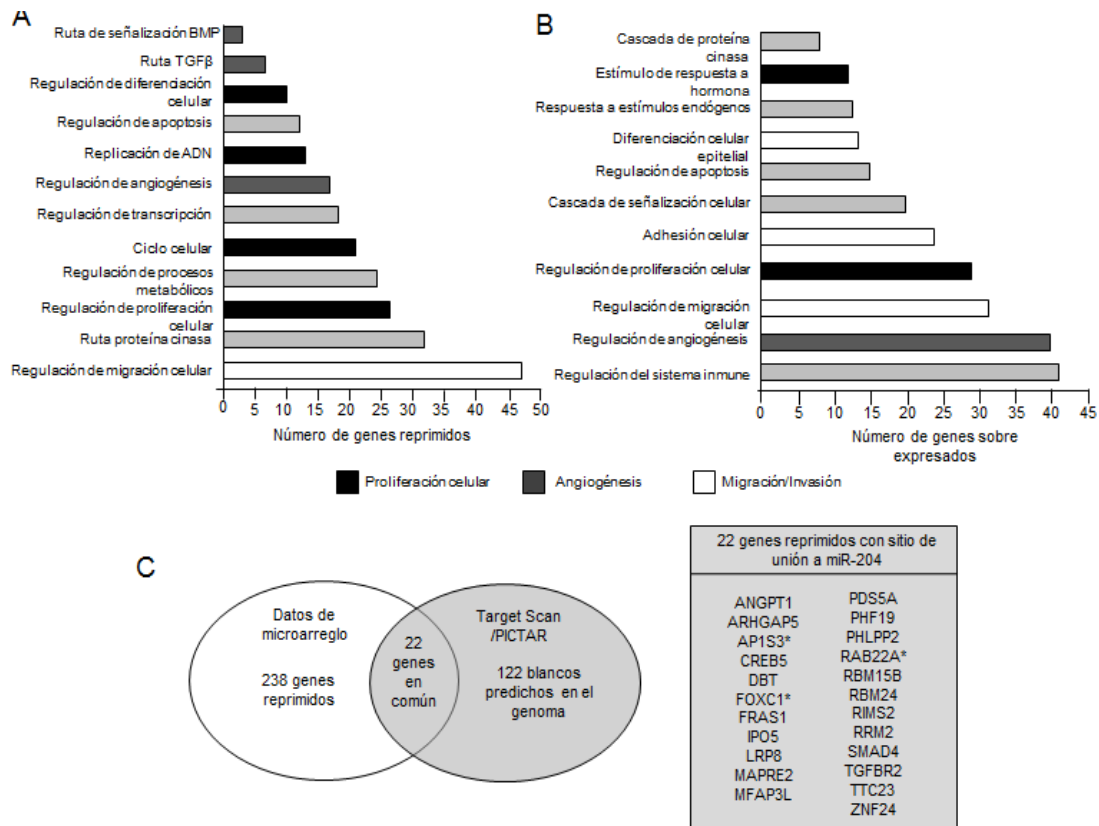


Figura 7. Clasificación GO de genes modulados por miR-204. Perfil transcripcional en células MDA-MB-231 (A) Rutas y procesos biológicos de genes reprimidos. (B) Rutas y procesos biológicos de genes sobre expresados. Clasificación de ontología de genes analizada utilizando software DAVID. Procesos de proliferación celular, migración y angiogénesis son denotados por sombreado. (C) Diagrama de Venn muestra la totalidad de genes modulados por el miR-204 usando micro arreglos de ADN en círculo blanco, 122 blancos del miR-204 predichos por software Target Scan/Pictar en círculo gris. La intersección de círculo indica 22 genes en común entre el micro arreglo y predicciones bioinformáticas. Tomada y modificada de: Flores-Pérez *et al.*, 2016.

Los datos del perfil transcripcional indican que los genes asociados a la angiogénesis ANGPT1, TGFBR2 fueron notablemente reprimidos por el miR-204. Por ello se desarrolló un ensayo *in vitro* de angiogénesis realizando un co-cultivo con células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) y MDA-MB-231 por 24 h. El ensayo evalúa la formación de estructuras tubulares basado en la habilidad de las HUVEC para formar estructuras capilares tridimensionales y formación de puntos de enraizamiento (Figura 8C). Los resultados muestran que la restauración de la expresión del miR-204 indujo una reducción en la formación de túbulos ($p < 0.05$), además de la formación de puntos de ramificación (Figura 8 D, F, G y H). Además se observó un efecto similar del co-cultivo con el control positivo de HUVEC tratadas con VEGFA recombinante (Figura 8 E) en comparación con controles de mono cultivo MDA-MB-231 y HUVEC (Figura 8 A y B). Estos resultados indican que miR-204 presenta actividad anti-angiogénica *in vitro* (97).

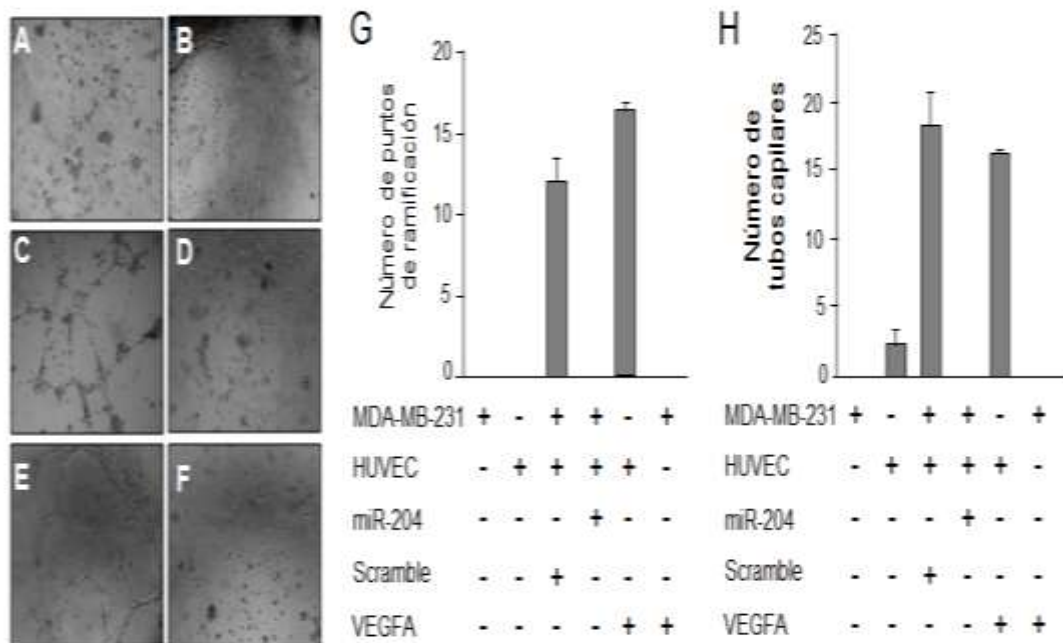


Figura 8. El miRNA-204 inhibe la formación de túbulos. (A) Monocultivo de células MDA-MB-231 en matrigel. (B) Mono cultivo de células HUVEC en matrigel. (C) Co-cultivo de MDA-MB-231 transfectadas con scramble y células HUVEC en matrigel. (D) Co-cultivo de células MDA-MB-231 transfectadas con pre-miR-204 y células HUVEC en matrigel. (E) Mono cultivo de células HUVEC con VEGFA. (F) Mono cultivo de células MDA-MB-231 con VEGFA en matrigel. (G) Representación gráfica de número de puntos de enraizamiento a 24 h en diferentes condiciones. (H) Número de túbulos capilares a 24 h en diferentes condiciones. Tomada y modificada de: Flores-Pérez *et al.*, 2016.

4. Importancia de continuar con el estudio del tema

A pesar del diagnóstico temprano y diversas terapias, la incidencia de cáncer de mama continúa en aumento, siendo las principales causas de mortalidad la resistencia al tratamiento, progresión de la enfermedad y metástasis. Debido a los efectos adversos de terapias agresivas en pacientes, es necesario desarrollar nuevos agentes terapéuticos no tóxicos contra el cáncer de mama que brinde la reducción o eliminación del tumor maligno e invasivo permitiendo elevar la calidad de vida de las mujeres que padecen esta enfermedad multifactorial. Patrones de perfiles de expresión de miRNAs y sus blancos efectores en pacientes con cáncer de mama muestran un camino para discernir las bases moleculares de este padecimiento, por lo cual, abren la posibilidad de intervenir en la regulación de procesos implicados en la tumorigénesis.

Reportes recientes del grupo de trabajo indican que el miR-204 reprime un grupo de genes relacionados a la proliferación, migración y angiogénesis en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama. Estos hallazgos indican que el miR-204 es un supresor de tumor con actividad anti-angiogénica, sin embargo, no se conocen cuales son las proteínas angiogénicas reguladas directamente por el miR-204. Los resultados obtenidos en el presente proyecto ayudarán a comprender el mecanismo de angiogénesis en cáncer de mama.

II. HIPÓTESIS

Si el miR-204 participa en la angiogénesis, su restauración en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 suprimirá la expresión del factor pro-angiogénico FGF1 y la angiogénesis *in vitro*.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Definir si el miR-204 regula la angiogénesis a través de la modulación directa del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Evaluar si el miR-204 inhibe la expresión del factor pro-angiogénico FGF1 en las células MDA-MB-231 en condiciones de normoxia e hipoxia.

3.2.2. Evaluar si el mRNA del gen FGF1 es un blanco directo del miR-204.

3.2.3. Evaluar si la disminución de la expresión del FGF1 mediada por el miR-204 inhibe la angiogénesis en células MDA-MB-231 en condiciones de normoxia e hipoxia.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

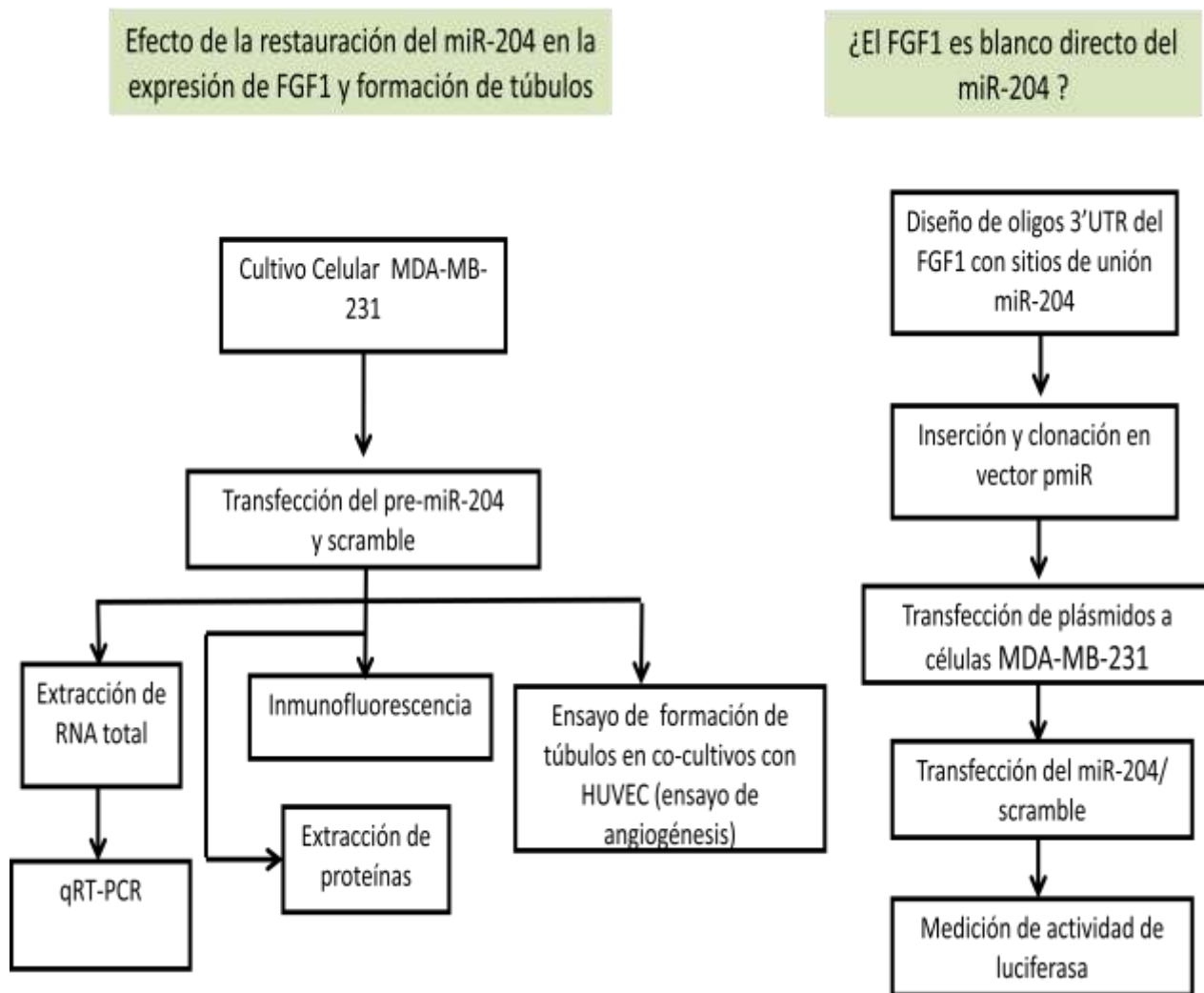


Figura 9. Estrategia experimental a desarrollar.

V. METODOLOGÍA

5. 1 Manejo de líneas celulares.

5.1.1 Cultivo celular.

Líneas celulares de cáncer de mama MDA-MD-231 (triple negativo) y MCF-7 (luminal A) fueron cultivadas 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) al 10% V/V (Gibco, Life Technologies) y con antibiótico penicilina/estreptomina, las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂.

Líneas celulares endoteliales de vena umbilical humana HUVEC fueron cultivadas en medio M200 suplementado con Large Vessel Endothelial Supplement (LVES) (Gibco Life Technologies), las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂.

5.1.2 Mantenimiento de líneas celulares.

Con el propósito de mantener las líneas celulares, se realizó un subcultivo, para ello se removió el medio del cultivo inicial y se realizó un lavado con Buffer Salino de Fosfato (PBS) 1X a pH de 7.0, después se adicionó PBS 1X-EDTA 6.8 mM a pH de 7.0 y se adicionaron 64 µL por cada 1.5 mL de PBS 1X-EDTA, la solución se distribuyó en las células con movimientos oscilatorios suaves y se incubó por 5 minutos a 37°C para que tuviera efecto la tripsina, para despegar las células se les dieron unos golpes suaves a las botellas de cultivo hasta ver la solución turbia y se les adicionó 1 mL de medio de cultivo suplementado para inactivar la tripsina. Se mezclaron por pipeteo las células despegadas con el medio y se recuperaron en un tubo de 15 mL para centrifugarlas a 1500 rpm/5min/4°C. El sobrenadante se descartó y la pastilla fue resuspendida en 1 mL de medio de cultivo fresco para ser distribuido en botellas de cultivo nuevas y estériles adicionando el medio de cultivo óptimo para cada línea celular.

5.1.3 Crioalmacenamiento de líneas celulares.

El procedimiento de tripsinización y desprendimiento de líneas celulares se realizó de manera similar al mantenimiento en botellas de cultivo con una confluencia mayor al 80%, sin embargo la diferencia radicó en que al obtener la pastilla, ésta se resuspendió en medio de crioconservación el cual contiene 900 μ L de medio suplementado con SFB y 100 μ L de Dimetil sulfóxido (DMSO), se mezclaron por pipeteo las células con el medio y se adicionaron en criotubos de 1 mL, posteriormente los cuales fueron incubados a -20°C por 30 min y después se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su posterior uso.

5.1.4 Descongelamiento de líneas celulares.

Los criotubos almacenados a -80°C fueron colocados a $4^{\circ}\text{C}/2\text{min}$ y posteriormente en baño a 37°C hasta la descongelación del medio, se transfirió el contenido del criotubo a un tubo de 15 mL, se centrifugó a 1500 rpm/5 min/ 4°C , se descartó el sobrenadante para obtener la pastilla y ésta se resuspendió en 1 mL de medio óptimo para cada línea celular el cual fue distribuido en botellas nuevas de cultivo a las que se le adicionó el medio correspondiente.

5.2 Reestablecimiento de la expresión del miR-204

5.2.1 Transfección del pre-miR-204.

Línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fue transfectada con el precursor del miR-204 (pre-miR-204) y con secuencia Scramble. Las células fueron cultivadas en botellas de cultivo de 25cm^2 hasta obtener una confluencia mínima del 80%, una vez teniendo la confluencia deseada se despegaron las células como se describió anteriormente para sembrar 250,000 células por pozo en placas de 6 pozos, se les adicionó 2.5 mL de medio DMEM suplementado y se dejó incubando a 37°C y 5% de CO_2 hasta el día siguiente para que las células se adhirieran al pozo. Al día siguiente en un tubo se mezclaron 5 μ L del agente de transfección siPORTTM Amine (Ambion) con 100 μ L de medio reducido en suero OptiMem 1X (Gibco), en otro tubo se mezclaron 7.5 μ L del pre-miR-204 o del pre-

miR-Neg-Ctrl (Scramble) a una concentración de 10 μ M con 100 μ L de medio reducido en suero OptiMem 1X (Gibco) para cada pozo a transfectar. Se incubaron ambos tubos 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se mezclaron los contenidos de ambos tubos en un solo tubo, se homogenizó por pipeteo y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para formar los complejos lípidos-premiR/Scramble, pasado el tiempo de incubación se adicionó la mezcla y 2.3 mL de medio DMEM suplementado para obtener una concentración final de 30 ng de precursor aproximadamente. Se mezcló por movimientos circulares suaves y se incubaron las placas en condiciones de normoxia a 37°C y 5% de CO₂ por 48 h. Para las condiciones de hipoxia las placas con la mezcla del complejo siPORT-premiR-204/Scramble y 2.3 mL de medio DMEM suplementado se colocaron inmediatamente en una cámara de hipoxia rústica o en una cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg) a 1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂ en incubación a 37°C por 48 h para su posterior desarrollo experimental o análisis. La expresión relativa del miR-204 fue evaluada por qRT-PCR con sondas TaqMan que se describirán en apartados posteriores.

5.2.3 Extracción de RNA total.

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos con distintos tratamientos (Transfectadas con pre-miR-204/Scramble y sin transfectar) en condiciones de normoxia e hipoxia por 48 h, una vez pasado el tiempo de incubación se adicionó 500 μ L de Trizol® Reagent (Ambion) a cada pozo, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se recuperó la suspensión celular en un tubo de 1.5 mL incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 300 μ L de cloroformo y se mezcló por inversión de 3 a 5 veces, se incubó cada tubo por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm y 4°C por 3 minutos, se recuperó la fase acuosa sin tocar la interfase en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL, a este se le adicionó 800 μ L de isopropanol para precipitar el RNA y se mezcló por inversión de 3 a 5 veces, se incubó cada tubo por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm y 4°C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 μ L de etanol al

75% dos veces, la pastilla se dejó secar en un lapso de 5 a 10 minutos, a la pastilla seca se le adicionó 50 µL de agua libre de nucleasas a 55°C, se dejó incubando por 3 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en la misma agua. Se cuantificó el RNA obtenido por espectrofotometría en equipo nanodrop y se analizó su calidad e integridad corriendo 1 µg de cada muestra por electroforesis en gel de agarosa/TAE al 1%.

5.2.4 Análisis del restablecimiento de la expresión relativa del miR-204 por sondas taqman.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de RNA total por medio de la utilización de sondas stem-loop RT (Applied Biosystem) específicas para el miRNA-204 y el RNU44 utilizado como control, para ello se mezcló 3 µg de RNA total, 3 µL de primers RT, 0.2 µL dNTPs con dTTP (100 mM) a una concentración final de 20 mM, 1 µL de transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/µL) (ThermoFisher), buffer RT 10X a una concentración final de 1X, 0.2 µL de inhibidor de RNasa (20 U/µL), MgCl₂ (25 mM) a una concentración final de 22.5 mM y agua libre de RNasa cuanto bas para 20 µL, la retro transcripción se llevó a cabo en un Termociclador GeneAmp system 9700 (Applied biosystem) con el siguiente ciclado: 16°C por 2 minutos; 42°C por 1 minuto; 50°C por 1 segundo por 40 ciclos un ciclo de 85°C por 5 minutos y un final de 4°C ∞; terminado el tiempo de ciclado se realizó una PCR en tiempo real por la utilización de sondas TaqMan, por lo cual en una placa de 96 pozos se mezclaron 1.33 µL del producto de la retro transcripción, 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied biosystem) a una concentración final de 1X, 1 µL de cada sonda específica TaqMan Small RNA Assay 20X a una concentración final de 1X y agua libre de nucleasas cbp 20 µL. La reacción se llevó a cabo en equipo 7500 de Applied biosystem con el siguiente programa de ciclado: 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundo. Para el análisis de resultados se utilizó el método de ct (2-ΔΔct) utilizando como normalizador la expresión de RNU44 como control.

5.3 Ensayo de Western blot.

5.3.1 Obtención de extractos proteicos totales y cuantificación

Extracto proteico de líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 fue obtenido en condiciones de normoxia e hipoxia; para ello se removió el medio del cultivo inicial y se realizó un lavado con Buffer Salino de Fosfato (PBS) 1X a pH de 7.0, después se adicionó PBS 1X-EDTA 6.8 mM a pH de 7.0 y se adicionaron 64 μ L por cada 1.5 mL de PBS 1X-EDTA, la solución se distribuyó en las células con movimientos oscilatorios suaves y se incubó por 5 minutos a 37°C para que tuviera efecto la tripsina, para despegar las células se les dieron unos golpes suaves a las botellas de cultivo hasta ver la solución turbia y se les adicionó 1 mL de medio de cultivo suplementado para inactivar la tripsina. Se mezclaron por pipeteo las células despegadas con el medio y se recuperaron en un tubo de 15 mL para centrifugarlas a 1500 rpm/5 min/4°C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 450 μ L de buffer de lisis TNTE (Tris-HCl 50 mM a pH de 7.4, NaCl 150 mM. Tritón X-100 al 0.1 %, EDTA 1 mM) suplementado con 50 μ L de Complete Protease Inhibitor Cocktail 10X (Roche), la mezcla se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se dio un vortex por 5 minutos para que actuara el buffer de lisis. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12,500 rpm y 4°C por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL y se cuantificó la muestra por el método de Bradford, para ello se realizó una curva estándar con solución de BSA [1 mg/mL], la curva se leyó en un espectrofotómetro a una λ de 595 nm, los resultados se graficaron y se determinó el coeficiente de correlación lineal. Los resultados de absorbancia de las muestras fueron obtenidos por interpolación mediante la sustitución en la ecuación de la recta ($y = mx + b$) obtenida de los datos de la curva estándar sustituyendo los valores de y como los datos de la absorbancia de la muestra a 595 nm y x como la concentración de proteína.

5.3.2 Electroforesis de proteínas desnaturalizadas

Se llevó a cabo una separación de proteínas por la técnica de electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE) a una concentración de poliacrilamida de 10, 12, o 15 % en el gel separador según el tamaño de la proteína a detectar y un gel concentrador al 5%. Se utilizó una solución amortiguadora formulada con Tris 0.25 M- Glicina, 0.1 % de SDS a un voltaje de 100 v en la corrida.

5.3.4 Transferencia de proteínas

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD). Las membranas y el papel whatman se sumergieron en buffer de transferencia (Tris 0.025 M, Glicina 0.192M y metanol al 20%). Se armó un cassette y se colocó en equipo TransBlot (BIO-RAD) a 25 V y 1 Ampere por 30 minutos. Una vez pasado el tiempo de transferencia se realizó una tinción con rojo de Ponceau para determinar la transferencia y se retiró el rojo de Ponceau realizando lavados con PBS 1X. Las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas con una solución de PBS 1X-Tween 20 (0.05%) y leche al 5% incubándose toda la noche en agitación a 4°C, terminado el tiempo de bloqueo se retiró la solución bloqueadora y se realizaron 4 lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.05%) y un lavado con PBS 1X.

5.3.5 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

A las membranas bloqueadas se les adicionó un anticuerpo primario específico de la proteína a detectar diluido en PBS 1X-Tween 20 (0.05%) a una dilución final especificada en la Tabla 2, posteriormente se incubó en agitación toda la noche a 4°C, terminado el tiempo de incubación se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 4 lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.05%) y un lavado con PBS 1X, terminando los lavados se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano correspondiente a cada anticuerpo diluido en PBS 1X-Tween 20 (0.05%) de acuerdo a la Tabla 2 incubándose en agitación por una hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se retiró el anticuerpo

secundario y se realizaron 4 lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.05%) y un lavado con PBS 1X, terminando los lavados se reveló por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA), se dejó incubando por 5 minutos cubriéndose de la luz y la inmunodetección fue visualizada en un equipo ChemiDoc Imaging Systems (BioRad), realizando un análisis densitométrico de las bandas detectadas utilizando el software ImageJ y myImage Thermo Scientific.

Tabla 2. Anticuerpos y dilución utilizada.

Anticuerpo	Marca/No. Cat	Dilución	Ab Secundario	Dilución
Anti FGF1	CellSignaling/#3139	1:1000	Anti-Rabbit-HRP	1:2500
Anti TGBR2	Abcam/Ab61213	1:1000	Anti-Rabbit-HRP	1:2500
Anti MMP-2	Santa Cruz	1:1000	Anti-Rabbit-HRP	1:2500
Anti ANGPT1	Abcam/ab8451	1:1000	Anti-Rabbit-HRP	1:2500
Anti GAPDH	Cell Signaling/2125s	1:1000	Anti-Rabbit-HRP	1:2500

5. 3.6 Ensayo de inmunofluorescencia.

Células MDA-MB-231 fueron cultivadas hasta obtener una confluencia mínima del 80 %, una vez obteniendo la confluencia adecuada se recuperaron las células y se sembraron 250,000 células por pozo sobre un cubreobjetos en una placa de 6 pozos, se incubaron a 37°C y 5 % CO₂ hasta el día siguiente. Posterior al tiempo de incubación se sometieron a tres tratamientos: 1. Células transfectadas con el miR-204, 2. Células transfectadas con secuencia Scramble, 3. Células sin transfectar. El proceso de transfección se realizó de acuerdo al apartado 5.2.1. Se incubaron en dos condiciones: La primera en condiciones de normoxia a 37°C y 5 % CO₂; la segunda en condiciones de hipoxia (1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂) en una cámara de hipoxia rustica y modular (billupus-rothenberg) a 37°C, en ambas condiciones el tiempo de incubación fue de 48 h. Terminando las condiciones de hipoxia y normoxia se les retiró el medio a las células, se realizó un lavado con PBS 1X pH 7.0 y se adicionó 1 mL de Paraformaldehído al 4% diluido en PBS 1X pH 7.4 por pozo y se incubaron las células a 37°C por una hora para fijar las células. Se permeabilizaron las células adicionando tritón al 2% diluido en PBS 1X

pH 7.4, se incubó por cinco minutos a TA y se realizaron tres lavados con PBS 1X pH 7.4, posteriormente se realizó un bloqueo adicionando 1 mL de solución con PBS 1X-BSA a cada pozo y se incubó por 1 hora a 37°C, posterior al tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X pH 7.4, terminando los lavados se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-FGF1 a una dilución de 1:20 toda la noche a 4°C, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X y fueron incubadas por dos horas con el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa 546, el núcleo fue teñido con DAPI.

5.4 Clonación de las secuencias 3'UTR del gen FGF1

5.4.1 Amplificación de fragmentos de la región 3'UTR del gen *fgf1* por PCR punto final.

Predicción en la base de datos TargetScan determinaron las secuencias a utilizar que con los sitios de unión para el miR-204, se diseñó un par de oligos específicos para amplificar por PCR el fragmento de la secuencia 3'UTR del gen *fgf1* que tuviera los sitios de unión (Tabla 3). Para la reacción de PCR se utilizaron 200 ng de DNA genómico extraído por el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (promega) a partir de la donación de sujetos sanos y se utilizó el kit para PCR Master Mix (Roche). La mezcla de reacción se realizó adicionando 200 ng de DNA total de donadores, 10 µL de Master Mix 2x para una concentración final de 1x, 1 µL de oligo Forward a 10 µM, 1 µL de oligo Reverse a 10 µM y agua grado PCR cbp 20 µL. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador GeneAmp system 9700 (Applied biosystem) con el siguiente ciclado: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60.3 °C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, un ciclo de 72°C por 7 minutos y un ciclo final de 4°C ∞; terminando el tiempo de ciclado se analizó el producto de PCR teñido con GelRed 1X (biotium) por electroforesis en gel de agarosa/TAE al 1%.

Tabla 3. Oligos para amplificar la 3'UTR de *fgf1*.

Gen	Secuencia (5'->3')	Tamaño del producto (pb)
<i>fgf1</i>	FW- AGAAATCCCCCTTCAGAAC	419
	RV- CCAAAGCCTCTGCTTACCAG	

5.4.2 Clonación de las secuencias 3'UTR mutadas del gen *fgf1*.

Dos pares de oligos fueron diseñados con un tamaño de 70 pb correspondiente a un fragmento de la región 3'UTR del gen *fgf1* que tuviera cuatro cambio de bases en la región semilla en el sitio de unión para el miR-204 (Tabla 4), los oligos de la solución stock fueron llevados a una concentración equimolar de 1 µg/µL y se hibridaron las cadenas sentido y antisentido en una mezcla de 2 µL de oligo sentido, 2 µL de oligo antisentido más 46 µL de solución de alineamiento incubándose la mezcla a 98°C por 5 minutos y posteriormente una hora a 37°C. Terminando el tiempo de ciclado se analizó el dúplex teñido con GelRed 1X (biotium) por electroforesis en gel de agarosa/TAE al 2% para corroborar la hibridación, posteriormente se cuantificaron en equipo Nanodrop y se diluyeron a una concentración de 8 ng/ µL en agua libre de nucleasas para la reacción de ligación.

Tabla 4. Oligos con la región mutada de la 3'UTR de *fgf1*.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')
SENTIDO FGF1-B1-MUT1s	CTAGTAACCTTAGAAGGATGGCATCTCCATGTAGAATAAATGAAGACAAATGTGGCCAGCCGAGGAAGGCAGAATA
ANTISENTIDO FGF1-B1-MUT1as	AGCTTATTCTGCCTTCCTGCGGCTGGGCCACATTGTCTTCATTTATTCTACATGGAGATGCCATCCTTCTAAGTTA
SENTIDO FGF1-B2-MUT2s	CTAGTATGTGGATCTGGGGACTGAGTGTGGGAGTGCAGAGAAAGGACTGGCAACTGGCTGAGGGGATACCATAAAA
ANTI SENTIDO FGF1-B2-MUT2as	AGCTTTTTATGGTATCCCCTCAGCCAGTTGCCAGTCTTTCTCTGCACTCCCACACTCAGTCCCCAGATCCACATA

*Las secuencias sombreadas con rojo son las bases que fueron cambiadas para realizar la mutación correspondiente

5.4.3 Ligación de insertos de región 3'UTR del gen *fgf1* en plásmido pmiR-report.

La reacción de ligación se llevó a cabo mezclando la concentración de inserto vector 3:1 en 4 µL de buffer de ligas T4 5X (ThermoFisher), 50 ng de vector pmiR-report-luc (Applied Biosystem) (figura 10), 1U de T4 DNA ligasa (ThermoFisher) y agua cbp 20 µL, se utilizó como control negativo sustituyendo el inserto por 2 µL de solución de alineamiento. La mezcla de reacción se incubó toda la noche a 23°C, una vez terminando el tiempo de incubación, el producto de ligación se utilizó para transformar células competentes *E.coli* DH5α, el cual se selecciono

una colonia para expandir el plásmido en medio LB/ Ampicilina (1 μ L [0.1g/mL] por 1 mL de medio LB) y se realizó una extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina para purificar la construcción.

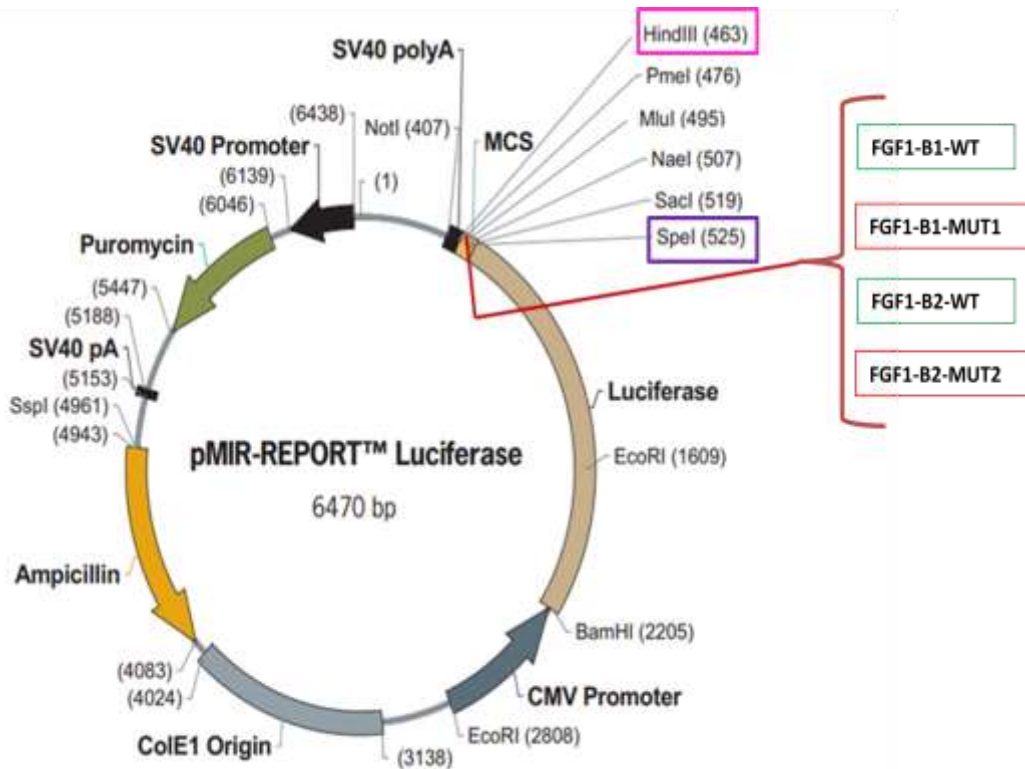


Figura 10. Plásmido pmiR-report-Luc con los sitios de inserción para la 3ÚTR de *fgf1*. Se muestra el mapa del vector pmiR-report con el gen reportero de luciferasa indicando los sitios de corte y los fragmentos a insertar en el pol -linker.

5.5 Transformación celular.

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

Células competentes *E.coli* DH5α se descongelaron por incubación en hielo y se añadieron 50 µL a la mezcla de ligación homogenizando por pipeteo. La mezcla se incubó por 30 minutos en hielo, posteriormente se le dió un choque térmico incubando 90 segundos a 42°C y se incubó nuevamente en hielo por 3 minutos. Terminando el tiempo de incubación se adicionó 200 µL de medio LB y se incubó a 37°C por 45 minutos a 250 rpm, terminado el tiempo se adicionó la mezcla con las bacterias transformadas en una placa con Agar/LB-Amp para obtener unidades formadoras de colonias (UFC).

5.5.2 Extracción de plásmido por lisis alcalina (Minipreps).

Unidades Formadoras de Colonias aisladas se inocularon en 5 mL de medio LB/Ampicilina (1 µL [0.1g/mL] por 1 mL de medio LB) y se incubó a 37°C por 16 horas a 200 rpm. Posterior a la incubación se tomaron 1.5 mL de la muestra y se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µL de solución 1 GTE fría (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) homogenizando con la micropipeta y se dejó incubando por 10 minutos a TA. Posteriormente se adicionó 200 µL de la solución 2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó por 5 minutos en hielo. Se adicionó 150 µL de solución 3 fría (AcK 5M pH 4.8) y se mezcló por inversión incubando en hielo por 5 minutos. Se centrifugó la muestra a 8500 rpm por 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril, se adicionó 0.8 mL de etanol al 95% y se dejó incubando por 10 minutos a TA. Se centrifugó la muestra a 8500 /10 min/ 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 75%, se dejó secar la pastilla sobre una toalla de papel y se resuspendió en agua estéril a 50°C, posteriormente se adicionó RNasa (1 µL RNasa [10mg/mL] por cada 30 µL) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Terminando el tiempo incubación con RNasa se analizó la extracción de plásmido teñido con GelRed 1X (biotium) por electroforesis en gel de agarosa/TAE al 1%

5.6 Validación de blanco modulado por el miR-204 mediante construcciones pmiR-Luc-3'UTR *fgf1*

5.6.1 Transfección de la construcción en células MDA-MB-231 y co-transfección del pre-miR-204

200,000 células MDA-MB-231 fueron sembradas por pozo en una placa de seis pozos, se le adicionó 2 mL de medio DMEM suplementado y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente. Posterior al tiempo de incubación se preparó una reacción de transfección para cada pozo de la siguiente manera: En un tubo de 1.5 mL se adicionaron 5 µg de la construcción pmiR-Luc-3'UTR *fgf1*, pmiR-Luc-3'UTR *fgf1* mutada y pmiR-REPORT β-gal (control), se adicionó 150 µL de medio OptiMEM se mezcló el contenido por pipeteo; en otro tubo de 1.5 mL se adicionó 9 µL de agente de transfección lipofectamina 2000 reagent (Invitrogen), se adicionó 150 µL de medio OptiMEM y se mezcló el contenido por pipeteo incubando la mezcla por 10 min/TA. Posterior al tiempo de incubación, se mezclaron ambos tubos en uno solo, se homogenizó por pipeteo y se incubó por 10 minutos a TA. Pasado el tiempo de incubación se le retiró el medio a las células, se realizaron dos lavados con PBS 1X pH 7.0 se les adicionaron 1.8 mL de medio DMEM sin suplementar y la mezcla del complejo lipofectamina-DNA correspondiente a cada pozo, se mezcló por movimientos oscilatorios y se incubaron las células por 4 horas a 37°C y 5 % CO₂, posterior al tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se adicionó 2 mL de medio DMEM suplementado. Terminando el tiempo de incubación, las células se incubaron en condiciones normales por 24h.

Posteriormente, las construcciones fueron co-transfectadas con el pre-miR-204 o Scramble siguiendo el protocolo de transfección descrito en el apartado 5.2.1. Después de la transfección, las células fueron incubadas en dos condiciones, la primera en condiciones de normoxia a 37°C y 5 % CO₂; la segunda en condiciones de hipoxia (1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂) en una cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg) a 37°C o rústica. En ambas condiciones el tiempo de incubación fue de 48 h.

5.6.2 Ensayo de medición de actividad de luciferasa.

La actividad de luciferasa fue medida utilizando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) diluyendo el buffer de lisis 5X (CCLR) en agua estéril para obtener una concentración de 1X. Las células con la construcción y transfectadas con los pre-miR fueron lavadas con PBS 1X y se adicionó 150 μ L de buffer de lisis 1X incubando en agitación por 5 minutos en hielo, posteriormente se transfirió el lisado celular a un tubo de 1.5 mL para dar un vortex de 10 a 15 segundos tres veces y se centrifugó a 12,000 g por dos minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL. Se adicionaron 100 μ L de Luciferase Assay Reagent II y 20 μ L de lisado celular por condición en un pozo distinto en una placa de 96 pozos de fondo opaco, se mezcló el contenido de cada pozo por pipeteo y se realizó la lectura de la placa en un luminómetro Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer (Thermo Scientific) con dos segundos de retardamiento antes de cada lectura de 10 segundos.

5.7 Ensayo de angiogénesis

5.7.1 Ensayo de formación de túbulos *in vitro* (Ensayo de angiogénesis).

250,000 células fueron sembradas por pozo en un aplaca de 6 pozos incubando a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente, pasado el tiempo de incubación se sometieron a tres tratamientos: 1. Células transfectadas con el miR-204, 2. Células transfectadas con secuencia Scramble, 3. Células sin transfectar.

El proceso de transfección se realizó de acuerdo al apartado 5.2.1. Se incubaron en dos condiciones: la primera en condiciones de normoxia a 37°C y 5 % CO₂; la segunda en condiciones de hipoxia (1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂) en una cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg) o rústica a 37°C, en ambas condiciones el tiempo de incubación fue de 48 h. Matriz extracelular (Matrigel) fue incubada en hielo y a 4°C por 12 h así como las puntas, tubos y placas a utilizar. La matrigel fue diluida adicionando 900 μ L de matriz extracelular y 100 μ L de PBS 1X pH 7.0 frío, la mezcla se homogenizó suavemente por pipeteo para evitar la formación de burbujas. Una vez teniendo la dilución, se adicionó lentamente 50 μ L de matrigel

diluida por pozo a utilizar en una placa de 96 pozos fría evitando la formación de burbujas, posteriormente se incubó a 37°C por una hora. Terminando el tiempo de incubación se adicionaron 10,000 células por pozo con distinto tratamiento (miR-204, Scramble y sin transfectar) en normoxia e hipoxia, se adicionaron 100 µL de medio DMEM sin suplementar y se incubaron en normoxia por 12 h a 37°C y 5% CO₂. Posterior al tiempo de incubación se adicionaron 10,000 células HUVEC en cada pozo de MDA-MB-231 con distinto tratamiento. Se utilizó como control células MDA-MB-231, células HUVEC en monocultivo y células MDA-MB-231 y HUVEC en monocultivo tratadas con VEGFA [10 ng/mL]. Se incubaron todas las condiciones en normoxia por 24 h a 37°C y 5% CO₂ documentando las formación de estructuras tubulares a las 6, 12 y 24 h. Al final se realizó la cuantificación de formación de estructuras tubulares y puntos de ramificación.

5.7.2 Ensayo de formación de túbulos *in vitro* (Ensayo de Mimetismo Vasculogénico).

Se sembraron 250,000 células por pozo en una placa de 6 pozos incubando a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente, pasado el tiempo de incubación se sometieron a tres tratamientos: 1. Células transfectadas con el miR-204, 2. Células transfectadas con secuencia Scramble, 3. Células sin transfectar. El proceso de transfección se realizó de acuerdo al apartado 5.2.1. Se incubaron en dos condiciones: la primera en condiciones de normoxia a 37°C y 5 % CO₂; la segunda en condiciones de hipoxia (1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂) en una cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg) o rústica a 37°C, en ambas condiciones el tiempo de incubación fue de 48 h. Matriz extracelular (Matrigel) fue incubada en hielo y a 4°C por 12 h así como las puntas, tubos y placas a utilizar. Se diluyó la matrigel adicionando 900 µL de matriz extracelular y 100 µL de PBS 1X pH 7.0 frío, la mezcla se homogenizó suavemente por pipeteo para evitar la formación de burbujas. Una vez teniendo la dilución, se adicionó lentamente 50 µL de matrigel diluida por pozo a utilizar en una placa de 96 pozos fría evitando la formación de burbujas, posteriormente se incubó a 37°C por una hora. Terminando el tiempo de

incubación se adicionaron 10,000 células por pozo con distinto tratamiento (miR-204, Scramble y sin transfectar) en normoxia e hipoxia, se adicionaron 100 µL de medio DMEM sin suplementar y se incubaron en normoxia por 12 h a 37°C y 5% CO₂, se documentó la formación de estructuras tubulares a las 3, 6, 9 y 12 h. Al final se realizó la cuantificación de formación de estructuras tubulares y puntos de ramificación.

5.7.3 Silenciamiento de genes asociados a Mimetismo Vasculogénico.

Para el silenciamiento se utilizó una construcción plasmídica utilizando el vector psilencer 5.6 U retro que tuviera insertada una secuencia nucleotídica diseñada que al expresarse formara un transcrito de estructura secundaria en forma de horquilla o short hairpin RNA (sh RNA), para lo cual se utilizaron dos pares de oligos para hibridar de acuerdo a la tabla 5 realizando el proceso de hibridación de acuerdo al apartado 5.4.2

Tabla 5. Oligos utilizados para el silenciamiento de *tgfr2*.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')
SENTIDO <i>tgfr2</i>	GATCCGGAGGAGAAGATTCTGAAGATTCAAGAGATCTTCAGGAATCTTCTCCTCCTTTTTGGAAA
ANTISENTIDO <i>tgfr2</i>	AGCTTTTCCAAAAAGGAGGAGAAGATTCTGAAGATCTTGAATCTTCAGGAATCTTCTCCTCCG

Una vez tenida la construcción, se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de seis pozos, se le adicionó 2 mL de medio DMEM suplementado y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente. Posterior al tiempo de incubación se preparó una reacción de transfección para cada pozo de la siguiente manera: En un tubo de 1.5 mL se adicionaron 5 µg de la construcción pSielncer 5.1 U6 retro- *Tgfr2*, se adicionó 150 µL de medio OptiMEM se mezcló el contenido por pipeteo; en otro tubo de 1.5 mL se adicionó 9 µL de agente de transfección lipofectamina 2000 reagent (invitrogen), se adicionó 150 µL de medio OptiMEM y se mezcló el contenido por pipeteo incubando la mezcla por 10 minutos a TA. Posterior al tiempo de incubación, se mezclaron ambos tubos en uno solo, se homogenizó por pipeteo y se incubó por 10 minutos a TA. Pasado el

tiempo de incubación se le retiró el medio a las células, se realizaron dos lavados con PBS 1X pH 7.0 se les adicionaron 1.8 mL de medio DMEM sin suplementar y la mezcla del complejo lipofectamina-DNA correspondiente a cada pozo, se mezcló por movimientos oscilatorios y se incubaron las células por 4 horas a 37°C y 5 % CO₂, posterior al tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se adicionó 2 mL de medio DMEM suplementado. Posterior al tiempo de incubación, las células se incubaron en condiciones normales por 24h.

Se incubaron en dos condiciones: la primera en condiciones de normoxia a 37°C y 5 % CO₂; la segunda en condiciones de hipoxia (1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂) en una cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg) a 37°C, en ambas condiciones el tiempo de incubación fue de 48 h, se evaluó el silenciamiento de los genes mediante inmunodetección por Western Blot de acuerdo al método utilizado en el apartado 5.3.5.

VI. Resultados

6.1 Análisis de la expresión de FGF1

6.1.1 Análisis de la expresión de FGF1 por PCR

Para determinar la expresión del Factor de crecimiento de fibroblastos 1, se realizaron diversas estrategias. La primera fue determinar su expresión mediante la amplificación de oligos específicos para un fragmento del mensajero con una longitud de 360 pares de bases. Se realizó una PCR punto final utilizando como templado cDNA de líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A, se utilizó como control DNA total de donantes sanos y GAPDH como control consitutivo.

Para la amplificación en DNA total, se obtuvo el amplificado de un fragmento de aproximadamente 360 pb correspondiente a FGF1 el cual concuerda con la predicción del diseño de oligos (Figura 11 A) así como un fragmento de 90 pb correspondiente al amplificado para GAPDH (figura 11 A) En la tabla 6 se muestra la reacción de PCR para amplificación de oligos para FGF1 y GAPDH.

Para la amplificación de oligos en líneas celulares de cáncer de mama, primero se realizó una extracción con Trizol de RNA de líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A. Se analizó la calidad e integridad del RNA mediante la cuantificación en un equipo Nanodrop y visualización mediante electroforesis en un gel de Agarosa/TAE al 1%. En la figura 12 se observa la integridad del RNA extraído de las diferentes líneas celulares en el cual se aprecia las sub unidades 28S y 18S además de no presentar degradación del mismo, referente a la calidad, en la tabla 7 se observa el radio para cada línea celular, el cual es cercano a 2.0 lo que se traduce en una pureza aceptable en el RNA, esto nos determina que el RNA extraído es de buena calidad y puede ser utilizado para la reacción de PCR.

Una vez teniendo el RNA de buena calidad se realizó una retrotranscripción para producir cDNA de cada muestra, para ello, se utilizó oligo dT y Random primer para determinar en cuál de estos se producía un mejor amplificado para FGF1 y GAPDH. En la figura 13 se muestran los resultados para cada condición, se observa que en oligo dT se obtuvo un amplificado de aproximadamente 360 pb correspondiente a FGF1 en la línea celular MDA-MB-231, menor amplificado en MCF-7 y nulo amplificado en MCF-10 A, esto es correspondiente a lo reportado en la literatura, en Random primer no se obtuvo amplificado. Respecto a GAPDH se obtuvo amplificado de 90 pb en Random primer. Debido a que estos datos no fueron posibles reproducirlos, no fueron utilizados para determinar la expresión de FGF1 por medio de PCR, por lo que se planteó la estrategia de análisis de la expresión del factor por ensayo de inmunofluorescencia.

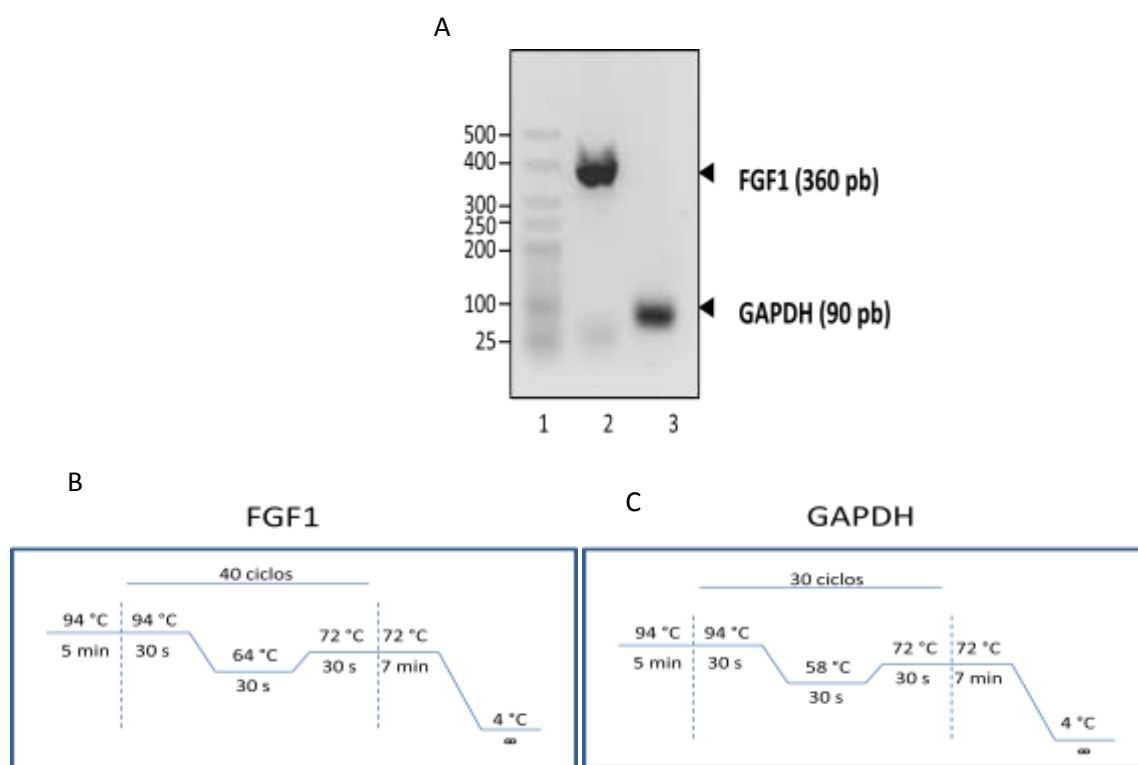


Figura 11. Análisis de la expresión de FGF1 y GAPDH mediante RT-PCR. (A) Carril 2: Amplificación de FGF1 en DNA genómico, Carril 3: Amplificación de GAPDH, Carril 1: Marcador hypper ladder 25 bp [200 ng]. (B) Programa de amplificación para FGF1. (C) Programa de amplificación para GAPDH. Gel de agarosa al 2 %.

Tabla 6. Reacción de PCR para amplificación de oligos para FGF1 y GAPDH.

Reacción	FGF1	GAPDH	Final
Mix 2x (Roche)	10 µl	10 µl	1X
Oligo S 10 µM	1 µl	1 µl	0.2 µM
Oligo AS 10 µM	1 µl	1 µl	0.2 µM
Templado (DNAg 100 ng)	3 µl	3 µl	100 ng
Agua	5 µl	5 µl	cbp 20
Total	20 µl	20 µl	

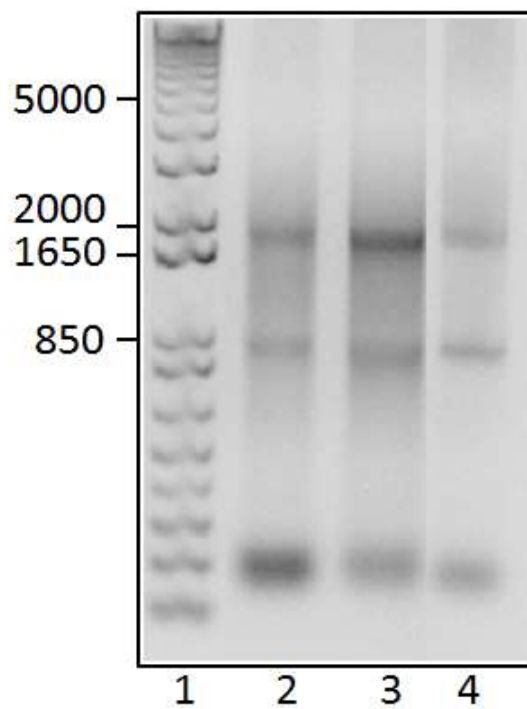


Figura 12. Análisis de integridad de RNA total. (1) Marcador 1 kb plus [200 ng]. (2) RNA de MDA-MB-231 [1 μ g], (3) RNA de MCF-10A [1 μ g], (4) RNA de MCF-7 [1 μ g]. Gel de agarosa al 1 %.

Tabla 7. Cuantificación del RNA total.

Línea celular	ng/ μ l	260/280	260/230
MDA-MB-231	126.6	2.17	0.78
MCF-10A	205.7	2.43	0.43
MCF-7	1043.9	1.77	0.34

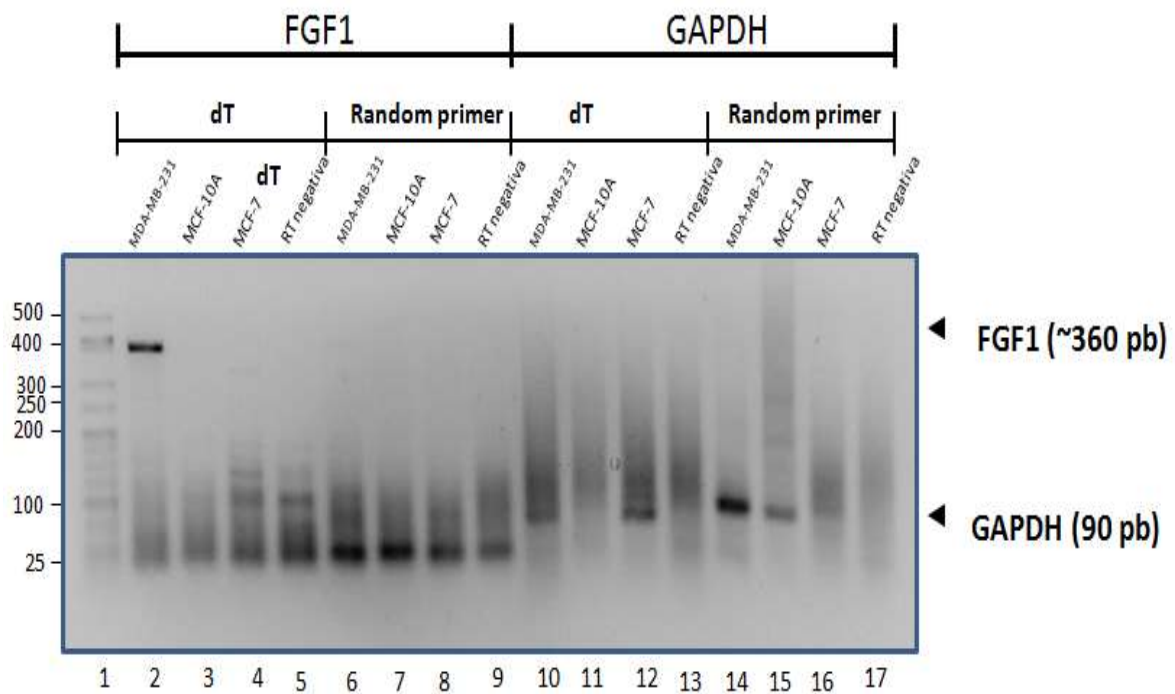


Figura 13. Análisis de la expresión de FGF1 y GAPDH mediante RT-PCR. Carril 2-9: Amplificado de FGF1 en cDNA en diversas líneas celulares. Carril 10-17: Amplificación de GAPDH. Carril 1: Marcador hypper ladder 25 bp [200 ng]. Gel de agarosa al 2 %.

6.1.2 Análisis de la expresión de FGF1 por Inmunofluorescencia

La expresión basal del FGF1 fue analizada por ensayo de inmonofluorescencia en línea celular MDA-MB-23, para lo cual, se realizó un cultivo celular hasta obtener una confluencia del 80%, se recuperaron las células, se fijaron en paraformaldehído se incubaron con el anticuerpo anti-FGF1y se tiñeron con el fluoróforo Alexa 546 y el núcleo fue teñido con DAPI. Primero se probaron diferentes diluciones del anticuerpo primario para determinar en qué dilución presentaba una mejor señal de fluorescencia. En la figura 14 A se muestra el control el cual es muestra sin el anticuerpo primario, esto para determinar alguna señal de fondo, en la figura 14 B se muestra que la dilución 1:20 fue la óptima en la que se obtuvo una señal de fluorescencia asociada al nivel de expresión de FGF1. En condiciones de normoxia la expresión de FGF1 fue asociada al nivel de intensidad de la fluorescencia en células sin transfectar (figura 16 A) detectándose principalmente el factor disperso en el citoplasma.

6.2 Análisis del efecto de la restauración del miR-204 en la expresión de FGF1 en células MDA-MB-231.

Células MDA-MB-231 cultivadas en condiciones de normoxia fueron transfectadas con el miR-204 para analizar su efecto en la expresión de FGF1 como se muestra en la figura 16 B la intensidad de la fluorescencia disminuyó considerablemente en células transfectadas, este hecho está asociado a la disminución de la expresión del factor mediado por el efecto del miR-204. Se evaluó la eficacia de la transfección del pre-miR-204 para evaluar el restablecimiento de la expresión del miR-204, para ello se realizó una extracción de RNA a las células MDA-MB-231 transfectadas con el precursor del miR-204 y posteriormente validar la transfección por qRT-PCR. En la figura 15 se observa la validación de la transfección y la restauración de la expresión del miR-204 en células MDA-MB-231.

Posteriormente, células MDA-MB-231 fueron cultivadas en condiciones de estrés hipoxico con el propósito de sobre expresar el factor FGF1 y determinar el nivel de expresión, este fue evaluado analizando la intensidad de la señal fluorescencia. En la figura 16 C se puede observar que hay un incremento del nivel de la intensidad de la fluorescencia en células sometidas a hipoxia hasta 13 veces en comparación con las condiciones basales en normoxia (Figura 16 E), así mismo se observa una mayor dispersión del factor en el citoplasma. Células MDA-MB-231 cultivadas en condiciones de hipoxia fueron transfectadas con el miR-204 para analizar su efecto en la expresión de FGF1, como se muestra en la figura 16 B y D se observa que hay una disminución en la señal de fluorescencia asociado al nivel de expresión de proteína mediado por el efecto del miR-204 en condiciones de normoxia e hipoxia respectivamente. Esto habla que la restauración de la expresión del miR-204 reduce la expresión de la proteína FGF1 en condiciones basales de normoxia y en condiciones de estrés por hipoxia.

Para validar los ensayos de inmunofluorescencia se realizó un ensayo de Western blot en extractos protéicos de células MDA-MB-231 en diferentes condiciones de normoxia e hipoxia así como transfectadas con el miR-204 y secuencia Scramble. En la figura 17 se observa que hay un aumento en la expresión relativa 1.8 veces mayor de FGF1 en células sometidas a hipoxia. Al restablecer la expresión del miR-204, hay una reducción en la expresión de la proteína en condiciones de normoxia e hipoxia.

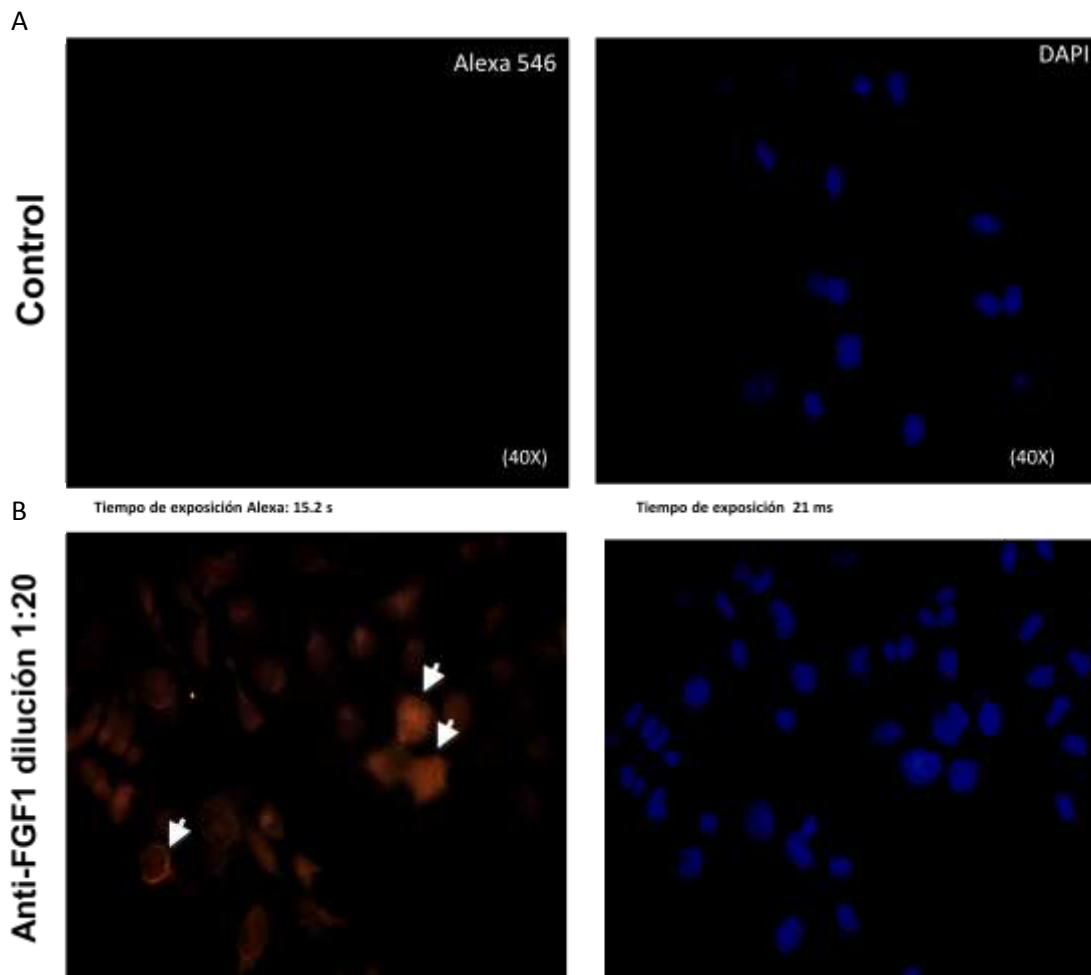


Figura 14. Expresión basal de FGF1. Inmunofluorescencia de células MDA-MB-231 en diferentes condiciones. (A) Control: MDA-MB-231 sin transfectar en condiciones de normoxia. (B) MDA-MB-231 en condiciones de normoxia con dilución 1:20 de anticuerpo anti-FGF1.

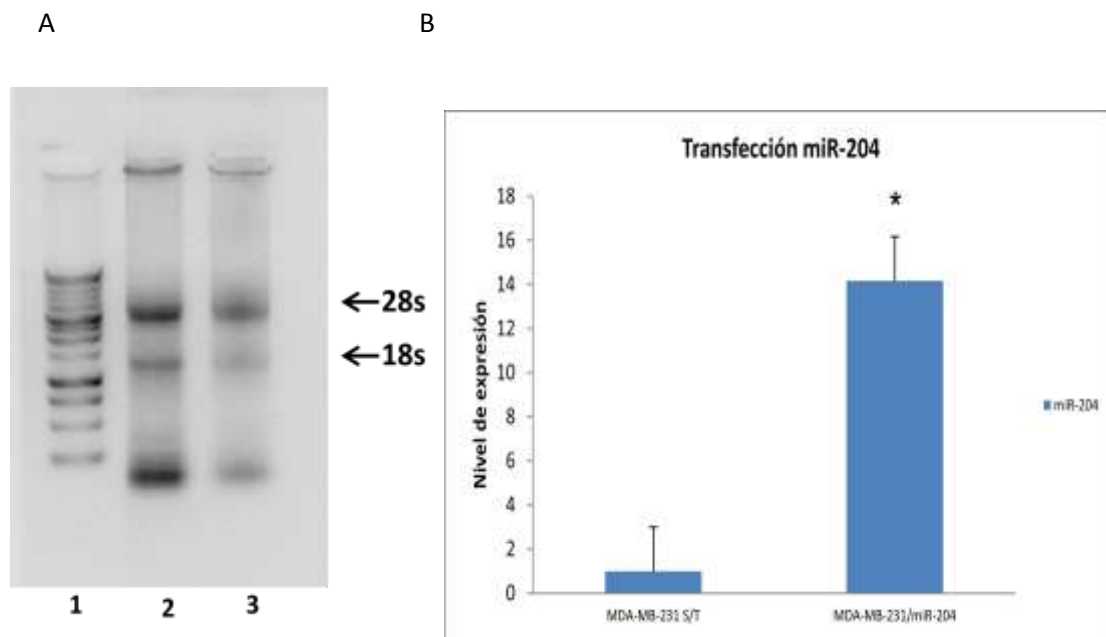


Figura 15. Restauración de la expresión del miR-204 y análisis de su efecto en la expresión de FGF1. (A) Análisis de integridad de RNA de células transfectadas. (1) Marcador 1Kb [200 ng], (2) Células MDA-MB-231 transfectadas con 10 μ M del pre-miR 204 [1 μ g], (3) MDA-MB-231 sin transfectar [1 μ g], las flechas indican las sub unidades ribosomales. (B) Validación de la transfección del pre-miR 204 por PCR tiempo real. Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con 10 μ M del premiR-204 (* $p < 0.05$).

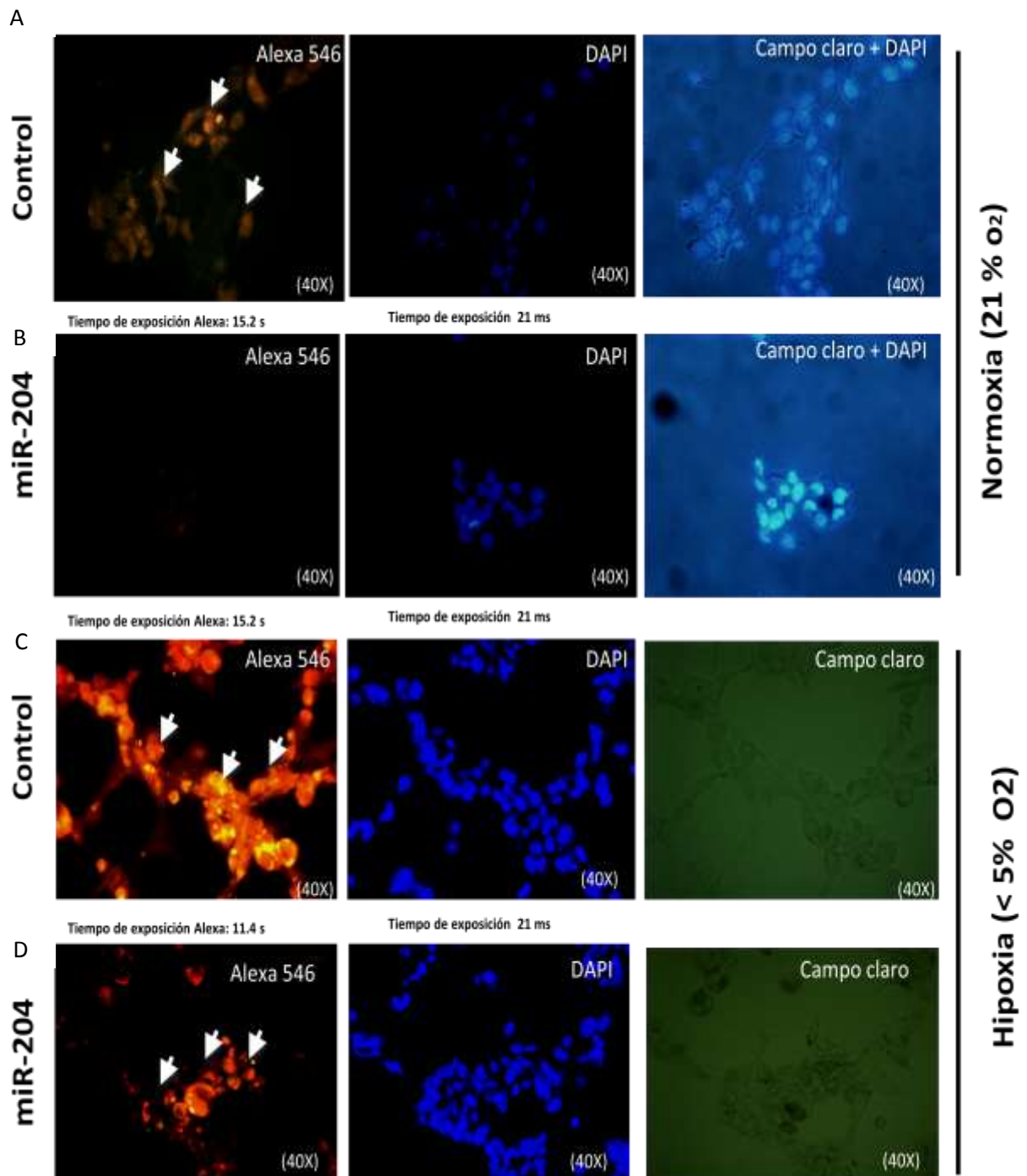


Figura 16. Análisis del efecto de la restauración del miR-204 en la expresión de FGF1. Inmunofluorescencia de células MDA-MB-231 en diferentes condiciones. (A) Control: MDA-MB-231 sin transfectar en condiciones de normoxia. (B) MDA-MB-231 en condiciones de normoxia transfectadas con el miR-204 (continua).

E

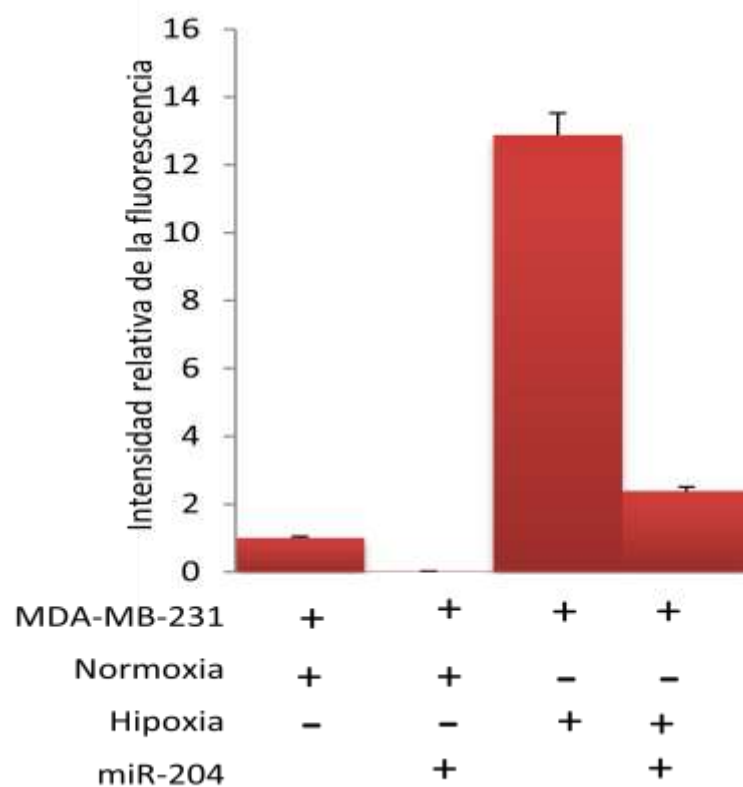


Figura 16. Análisis del efecto de la restauración del miR-204 en la expresión de FGF1 (continuación). (C) MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia aumenta la expresión de FGF1. (D) MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia transfectadas con el miR-204. (E) Análisis densitométrico de la señal de fluorescencia en MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia, normoxia y en células transfectadas con el miR-204 ($p < 0.05$). Se analizaron 10 células en 4 campos utilizando el Software ImajeJ.

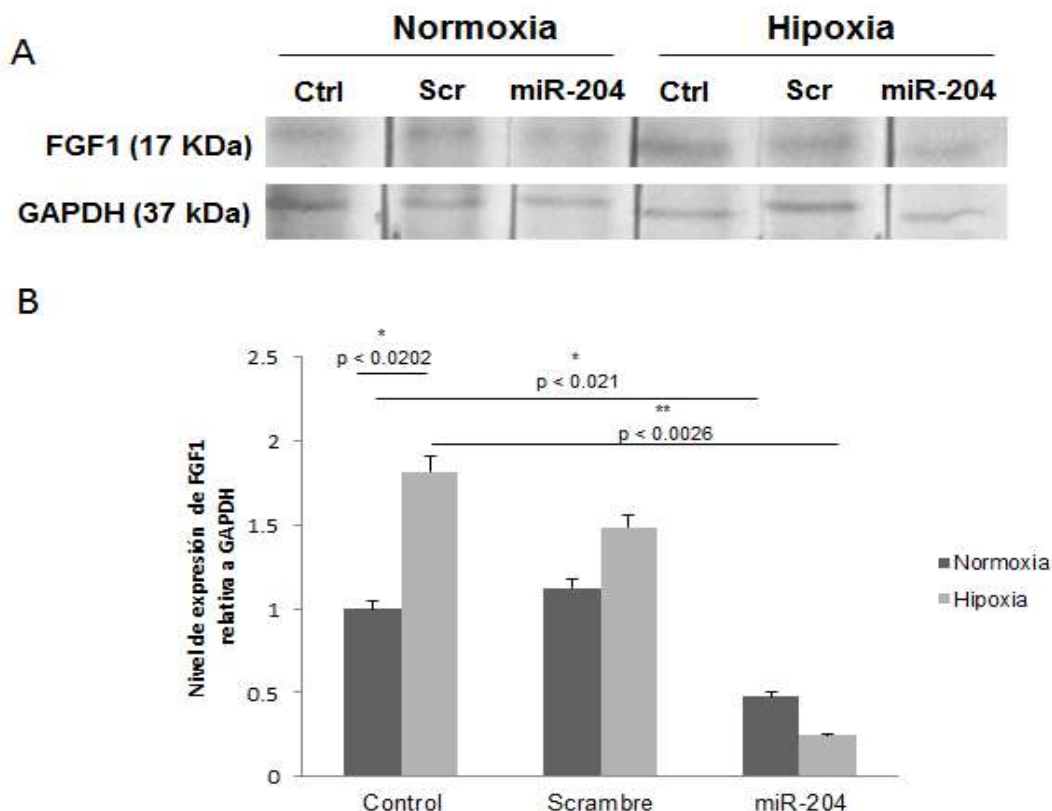


Figura 17. Expresión de FGF1 en condiciones de normoxia e hipoxia en células MDA-MB-231. (A) Western blot de extracto de proteínas en condiciones de normoxia e hipoxia, Ctrl: Células sin transfectar, Scr: Células transfectadas con Scramble, miR-204: Células transfectadas con el miR-204. (B) Cuantificación de expresión de FGF1 en diversas condiciones. Análisis cuantitativo de blots realizado por software myImage Analysis de Thermo Scientific. El Análisis estadístico fue realizado por el software GraphPad con prueba de t-student.

6.3 Diseño de oligos y preparación de plásmido pmiR-Report para ensayo de luciferasa

Para determinar si FGF1 es un blanco directo del miR-204, se realizó un ensayo de luciferasa mediante la inserción de un fragmento de la región 3'UTR que contenga los sitios de unión para el miR-204 en el vector pmiRreport el cual tiene el gen reportero de la luciferasa la transfección del precursor del miR-204 va a incidir en la modulación de la expresión de FGF1 y su efecto va a influenciar en la actividad de luciferasa. Se realizó la búsqueda de la secuencia del sitio de unión para el miR-204 en el software libre en la red TargetScan, los resultados de la búsqueda arrojaron que el gen *fgf1* posee dos sitios de unión en la región 3'UTR para el miR-204. Una vez obtenida la secuencia se cotejó la misma en la secuencia del gen disponible en la base de datos del genbank para posteriormente diseñar dos pares de oligos para hibridar con una longitud de 70 pb que tuvieran en el centro la secuencia del sitio de unión para el miR-204 (figura 18), adicional a la secuencia se le añadieron las bases correspondientes al sitio de corte de extremos cohesivos correspondientes a las enzimas de restricción Hind III y SpeI para la ligación en el vector pmiRreport, en la figura 19 se observa la hibridación de los oligos sintetizados.

Posterior a la hibridación de los oligos, se preparó el plásmido pmiRreport, para ello se partió de una construcción donde el vector a utilizar tenía un fragmento insertado de aproximadamente 250 pb correspondiente a una región de la 3'UTR del gen AAMP, se realizó una doble digestión enzimática en la construcción con las enzimas Hind III y SpeI para liberar el inserto correspondiente a AAMP y linealizar el plásmido para su purificación (figura 20) y uso para realizar la ligación de la región 3'UTR del gen *fgf1*.

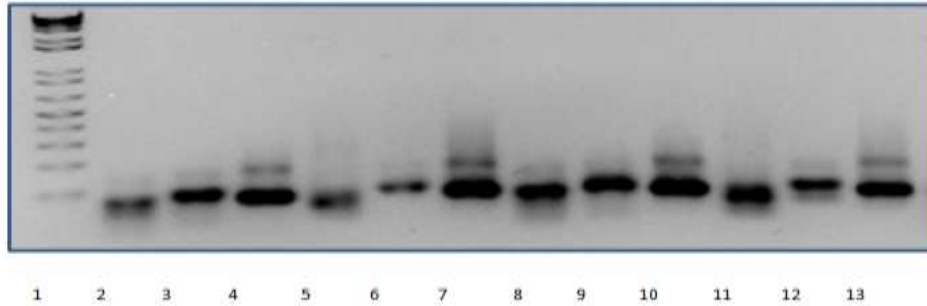


Figura 19. Hibridación de oligonucleótidos. (1) Marcador 25pb [200 ng]. (2) FGF1-B1-WTs [1 µg] (3) FGF1-B1-WTas [1 µg] . (4) oligos hibridados FGF1-B1-WT 3 µL. (5) FGF1-B2-WTs [1 µg]. (6) FGF1-B2-WTas [1 µg]. (7) oligos hibridados FGF1-B2-WT [1 µL]. (8) FGF1-B1-mut1s [1 µg]. (9) FGF1-B1-mut1as [1 µg]. (10) Oligos hibridados FGF1-B1-mut1 [1 µL]. (11) FGF1-B2-mut2s [1 µg] (12) FGF1-B2-mut2as [1 µg]. (13) oligos hibridados FGF1-B2-mut2 [1 µL]

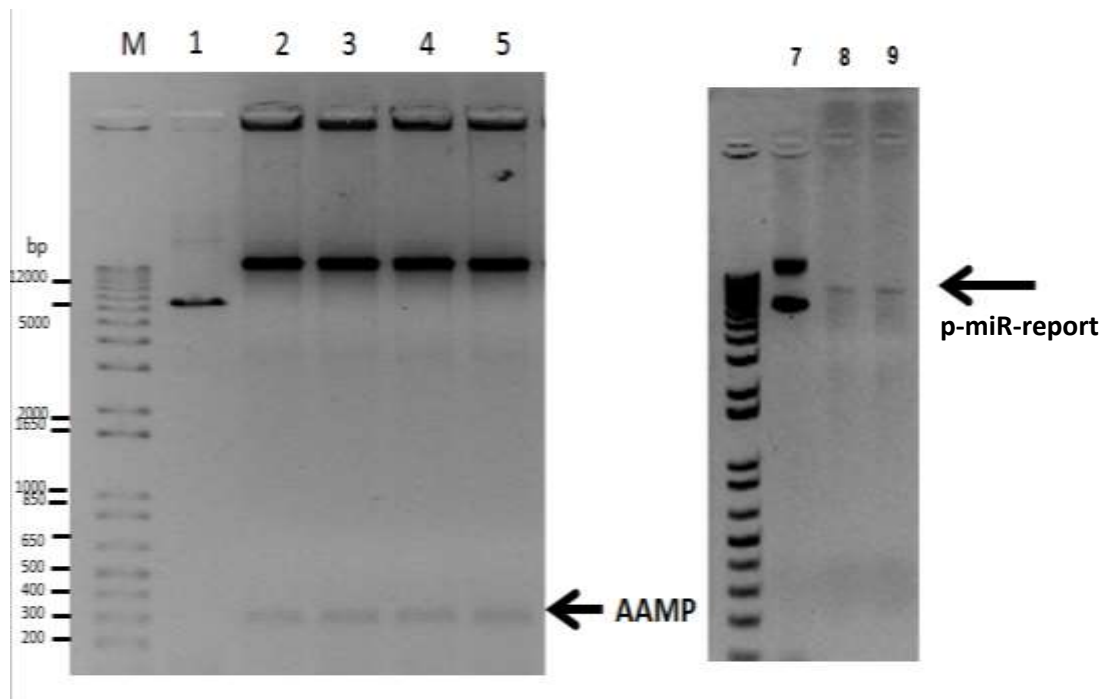


Figura 20. Preparación del plásmido pmiR-REPORT a partir del p-miR-3'UTR -AAMP. (1) Control: Muestra de lisis alcalina pmiR-AAMP tratada con RNAsa [1 µg]. (2 -5) Plásmido pmiR-AAMP cortado [3 ug]. (7) pmiR-AAMP (8 y 9) pmiR-AAMP digerido y purificado, (M) Marcador 1 Kb [200 ng]. Gel de agarosa al 1%.

6.4. Clonación de la región 3'UTR de *fgf1* y *fgf1-mut*.

6.4.1 Clonación de la 3'UTR de *fgf1* wild type y mut.

Para clonar la región 3'UTR de *fgf1* wild type se llevo a cabo una reacción de PCR tiempo final utilizando los oligos diseñados para amplificar un producto de ~419 pb en ADN genómico que tuviera los sitios de unión para el miR-204, en la figura 21 A se observa el producto de PCR con el amplificado esperado de ~419 pb correspondiente a la 3'UTR de *fgf1*. La banda correspondiente al amplificado deseado fue cortada y purificada a partir del gel de agarosa, posteriormente fue sometida a una reacción de doble digestión con 10 U de enzima Hind III y Spe I respectivamente para finalmente purificar a partir del gel de agarosa el fragmento de ~419 pb de la 3'UTR de *fgf1* con los extremos cohesivos listos para la reacción de ligación.

Una vez teniendo el producto purificado de PCR de la 3'UTR de *fgf1* y el plásmido cortado y purificado, se preparó la reacción de ligación a una relación 1:3 vector inserto incubando a 23°C toda la noche en placas con agar LB/amp para realizar la construcción *fgf1*WT-pmiR report. Se obtuvieron 2 colonias en la placa 1 (figura 22) y 1 colonia en la placa 2.

Para determinar si estas colonias correspondían a la construcción *fgf1*WT-pmiR report, se llevó a cabo una PCR colony realizando la reacción en las mismas condiciones que se obtuvo el amplificado utilizando como templado cada colonia obtenida en las placas 1 y 2.

En las tres colonias sometidas a la reacción de PCR colony se obtuvo el amplificado de ~419 pb correspondiente a la 3'UTR de *fgf1*, los fragmentos obtenidos fueron comparados con el control en el amplificado de ADN genómico (figura 21 B). Para confirmar que el amplificado corresponde a la 3'UTR de *fgf1* el plásmido fue expandido cultivando las colonias positivas en 5 mL de medio LB/Amp y cultivadas toda la noche a 37°C a 200 rpm. El plásmido fue extraído por lisis alcalina (figura 23 A) y sometido a una doble digestión con 10 U de enzimas Hind III y Spe I. El inserto liberado fue de ~419 (figura 23 B) el cual es similar al

fragmento obtenido por PCR en ADN genómico y en la PCR colony por lo que se puede argumentar que el fragmento liberado corresponde al fragmento clonado de la 3'UTR de *fgf1*.

Para clonar la región 3'UTR de *fgf1*-mut se utilizaron los oligos hibridados con las regiones mutadas para cada sitio de unión para el miR-204 y se llevo a cabo una reacción ligación con el vector pmiR report cortado y purificado. Se preparó la reacción de ligación a una relación 1:3 y 1:12 vector inserto incubando a 23°C toda la noche en placas con agar LB/Amp para realizar la construcción *fgf1* mut-pmiR report. Se obtuvieron 12 colonias en la placa con relación 1:12 correspondiente al fragmento para el primer sitio de unión mut1 (figura 24) en la relación 1:3 no se obtuvieran colonias así como para el segundo sitio de unión mut2.

Para determinar si estas colonias correspondían a la construcción *fgf1* *mut1*-pmiR report, el plásmido fue expandido cultivando las colonias positivas en 5 mL de medio LB/amp y cultivadas toda la noche a 37°C a 200 rpm. El plásmido fue extraído por lisis alcalina (figura 25 A) y sometido a una doble digestión con 10 U de enzimas Hind III y Spe I. El inserto liberado fue de ~76 pb (figura 25 B) el cual corresponde al fragmento clonado de la 3'UTR de *fgf1*.

6.4.2 Ensayo de luciferasa.

Para determinar si FGF1 era blanco del miR-204 se realizó un ensayo de luciferasa con las construcciones realizadas de la 3'UTR de *fgf1* midiendo la actividad de luciferasa a las 24 h de co-transfección con el miR-204, en la figura 26 se observa que las células transfectadas con la construcción pmiR-LUC-3'UTR FGF1 y cotransfectadas con el miR-204 hubo una disminución en las unidades expresión relativa de luciferasa en comparación con los controles, en la construcción pmiR-LUC-3'UTR FGF1mut1 co-transfectada con elmiR-204 no hubo un efecto en la actividad de luciferasa lo cual habla que FGF1 es un blanco directo del miR-204. Se utilizó la construcción pmiRAAMP como control positivo y un plásmido no relacionado como control negativo.

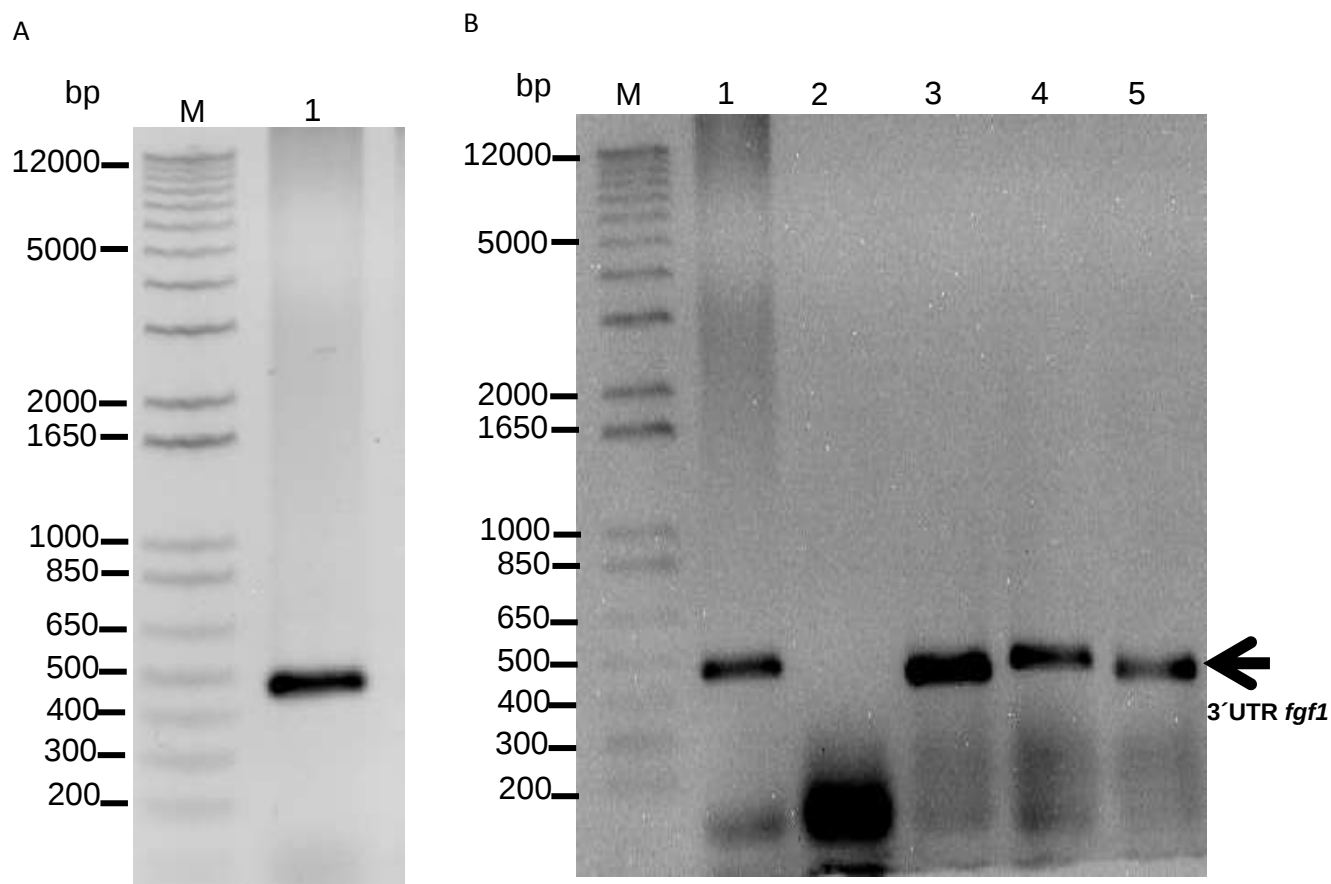


Figura 21. Clonación de la 3'UTR de *fgf1*. (A) Carril 1: Producto de PCR de ADN genómico con el amplificado de la 3'UTR de FGF1 (B) Producto de PCR colony de colonias obtenidas. Carril 1: Control positivo (ADN genómico). Carril 2: Control negativo. Carril 3: Colonia 1. Carril 4: Colonia 2. Carril 5: Colonia 1 placa 2, la flecha indica el amplificado de la 3'UTR de *fgf1*. M: Marcador 1 Kb [300 ng]. Gel de agarosa al 1 %.

A

B

Reacción de ligación FGF1 3'UTR

	1:13 (μ L)	Final
Inserto (FGF1)	2.9	9.7 ng
Annealing Solution	-	1X
Agua	3	cbp 20 μ L
Buffer 5 X	4	1X
Vector pmiR	9.1	50 ng
T4ligasa	1	1 U
Resultado / UFC	2	

**Condiciones: 23°C, O.N.**

Figura 22. Ligación de la 3'UTR de *fgf1*. (A) Reacción de ligación de la 3'UTR-B1-Mut1. (B) Colonias obtenidas en placas con agar-LB/Amp en la relación 1:3 inserto vector.

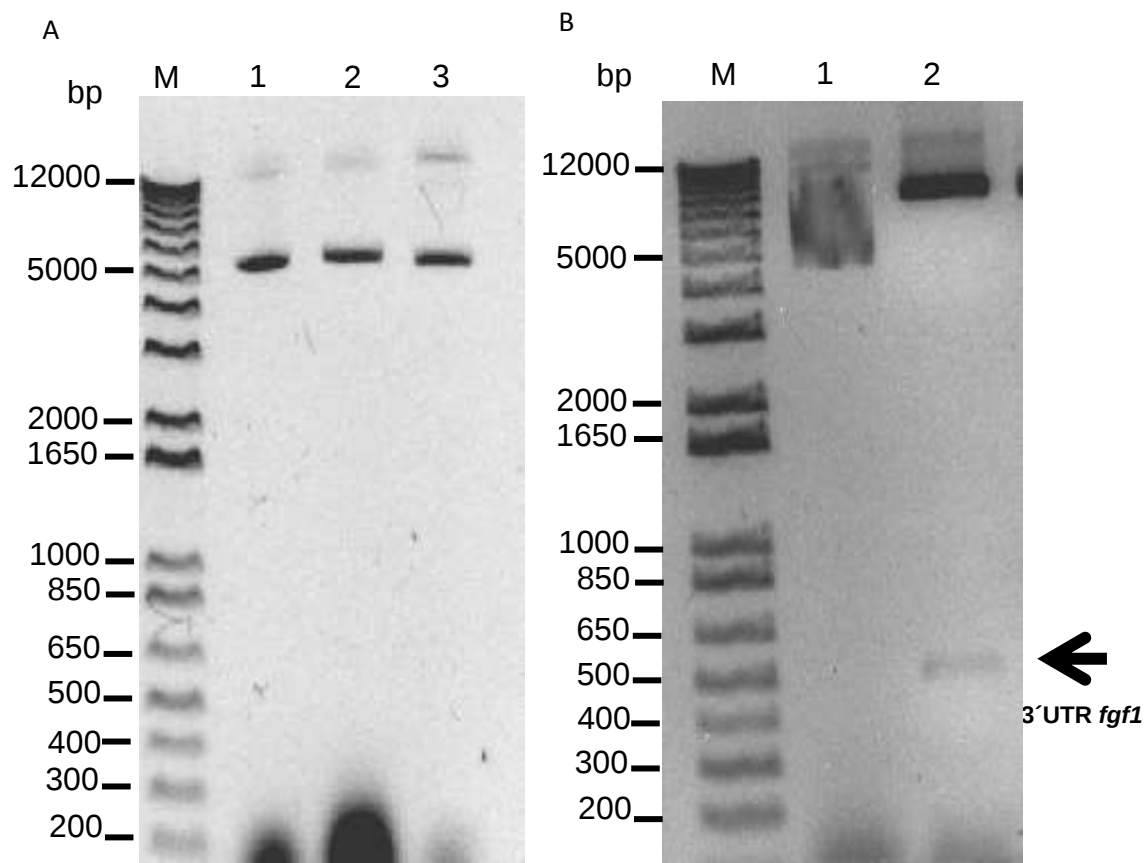


Figura 23. Extracción y digestión de construcción pmir-3'UTR *fgf1*. (A) Extracción de plásmido por lisis alcalina de las colonias positivas con la construcción pmir report-3'UTR *fgf1*. Carril 1 y 2, colonias 1 y 2 de placa 1. Carril 3: Colonia 1 de placa 2. (B) Doble digestión con 10 U de enzimas Hind III y Spe I de la construcción. Carril 1: Construcción pmir report-3'UTR *fgf1* sin digerir. Carril 2: Plásmido digerido donde se observa el Inserto liberado correspondiente a la 3'UTR de *fgf1*. M: Marcador 1 Kb [300 ng] Gel de agarosa al 1%.

A

B

Reacción de ligación FGF1 3'UTR B1-Mut1

	1:12 (μ L)	Final
Inserto (FGF1 mut1)	2	7 ng
Annealing Solution	-	1X
Agua	6.6	cbp 20 μ L
Buffer 5 X	4	1X
Vector pmiR	6.4	50 ng
T4ligasa	1	1 U
Resultado / UFC	12	

**Condiciones: 23°C, O.N.**

Figura 24. Ligación de la 3'UTR *fgf1* mut1. (A) Reacción de ligación de la 3'UTR-B1-Mut1. (B) Colonias obtenidas de la reacción de ligación en placas con agar-LB/Amp en la relación 1:12 inserto vector.

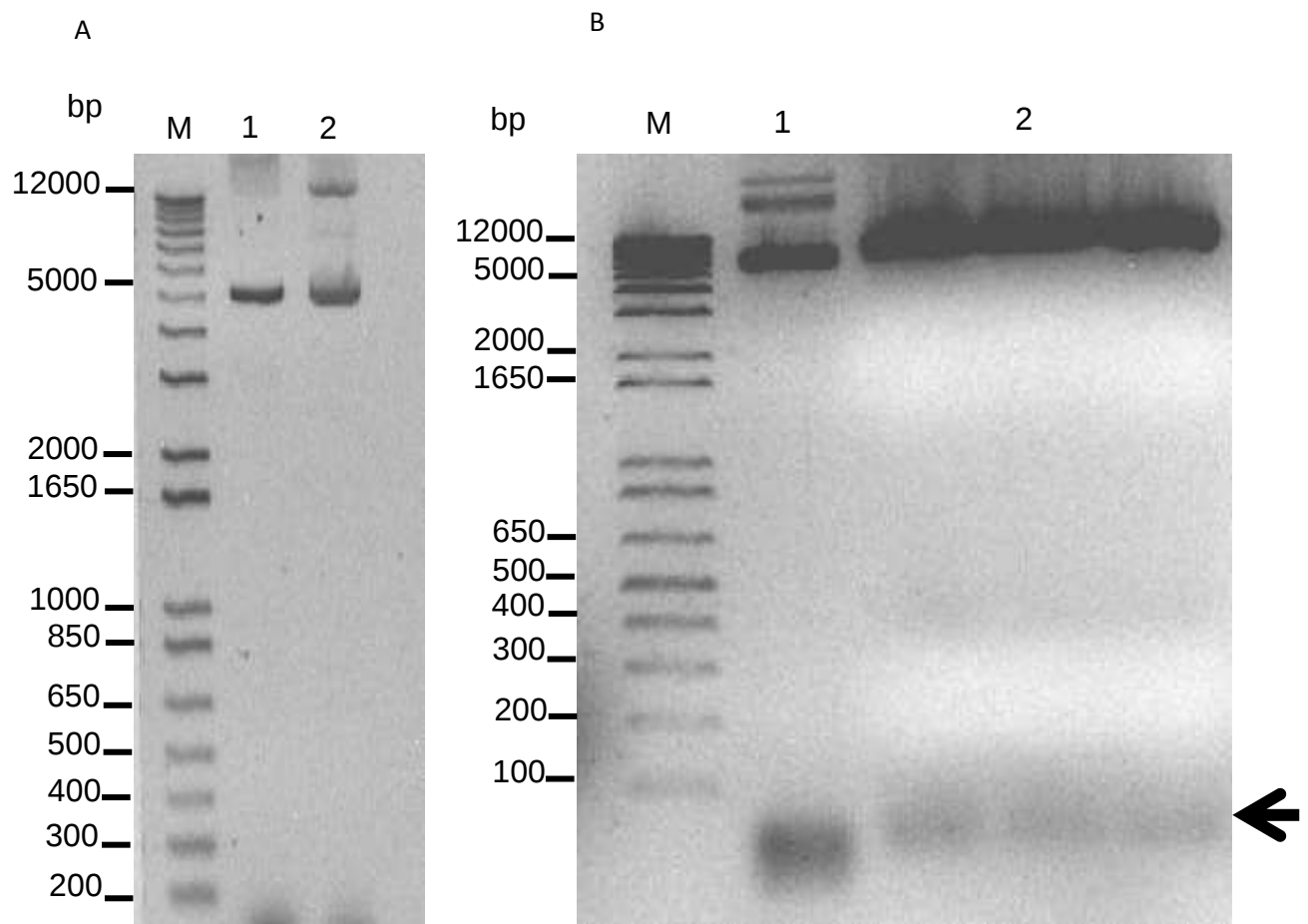


Figura 25. Extracción y digestión de construcción pmiR-3'UTR *fgf1* *mut1*. (A) Extracción de plásmido pmiR-3'UTR *fgf1* *mut1* por lisis alcalina de 2 colonias. Carril 1 y 2, DNA plasmídico de colonias 1 y 2 con la construcción *fgf1* mutada. (B) Doble digestión de la construcción *fgf1* mutada con 10 U de enzimas Hind III y Spe I. Carril 1: Construcción pmiR report-3'UTR *fgf1mut1* sin digerir, Carril 2: Plásmido digerido con el Inserto liberado correspondiente a la 3'UTR de *fgf1mut1*. M: Marcador 1 Kb [300 ng]. Gel de agarosa al 1%.

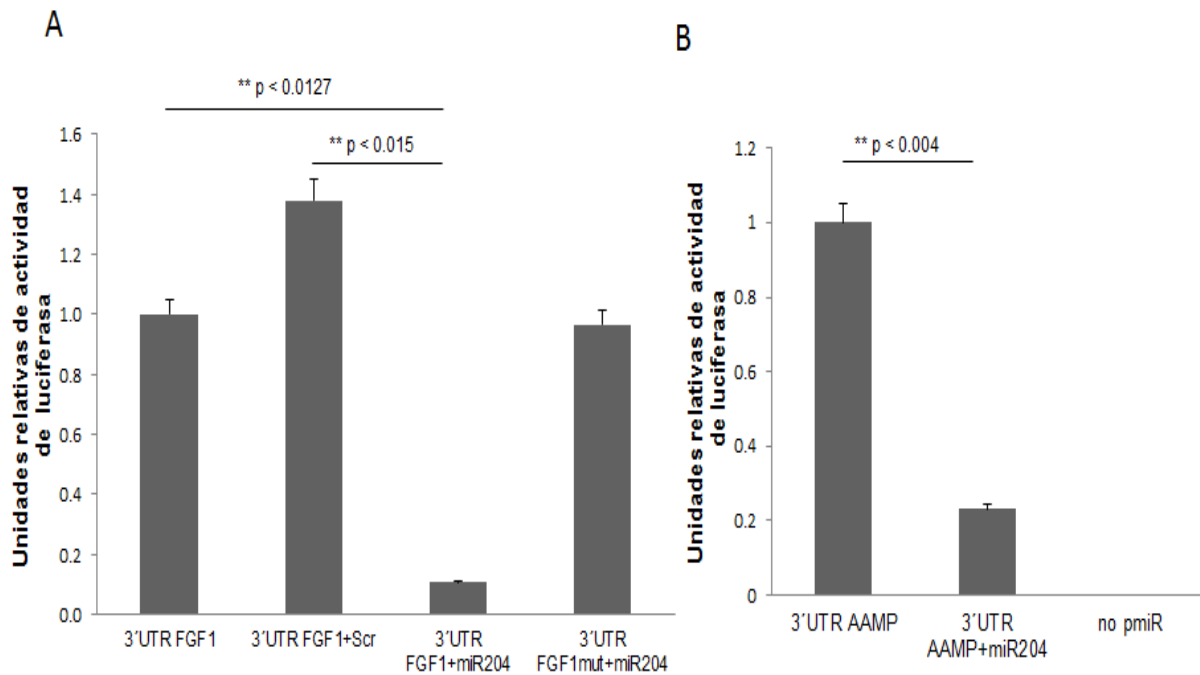


Figura 26. Ensayo de luciferasa de la 3'UTR *fgf1* en células MDA-MB-231. (A) Células MDA-MB-231 transfectadas con la construcción pmiR-3' UTR FGF1, co-transfectadas con el miR-204, secuencia Scramble y construcción pmiR-3' UTR FGF1mut co-transfectada con el miR-204. (B) La construcción pmiR3'UTR AAMP fue utilizada como control positivo y un plásmido no relacionado como control negativo. El Análisis estadístico fue realizado por el software GraphPad con prueba de t-student para experimentos independientes.

6.5 Disminución de la expresión del FGF1 mediada por el miR-204 inhibe la angiogénesis y el mimetismo vacuolológico en células de cáncer de mama.

Para determinar si el restablecimiento de la expresión del miR-204 y su reducción en la expresión de FGF1 regula la angiogénesis se realizó un ensayo de formación de túbulos (ensayo de angiogénesis), para realizar el ensayo, células MDA-MB-231 fueron cultivadas en condiciones de hipoxia y normoxia y posteriormente ser cultivadas en matrigel en co-cultivo con células HUVEC, como control se realizó un monocultivo en matrigel de MDA-MB-231 para ambas condiciones.

En condiciones de normoxia se desarrolló la formación de estructuras tubulares tipo capilar en co-cultivo con HUVEC en matrigel, fenómeno característico de la angiogénesis clásica (figura 27 A); en monocultivo con matrigel, las células tumorales no desarrollaron estructuras tubulares, lo que era un resultado esperado debido a que las células tumorales no estuvieron en contacto con células endoteliales formadoras de estructuras capilares (figura 27 A). Sin embargo en células MDA-MB-231 sometidas a condiciones de estrés hipoxico en monocultivo en normoxia con matrigel desarrollaron estructuras tubulares tipo capilar independiente de células endoteliales, fenómeno descrito como **mimetismo vasculológico**; al realizar un co-cultivo con las células endoteliales HUVEC, se formaron estructuras tubulares tipo capilar tortuosas e irregulares realizando un tipo de sinergismo vascular originado por las estructuras capilares pre-formadas por la células tumorales en estrés hipoxico (figura 27 B).

Para evaluar el efecto del restablecimiento de la expresión del miR-204 en el mimetismo vasculológico, células MDA-MB-231 fueron transfectadas con 30 nM del miR-204 y Scramble en condiciones de hipoxia y normoxia, como control se utilizó células MDA-MB-231 sin transfectar, posteriormente se cultivaron por 12 horas en matrigel. Células en normoxia transfectadas con el miR-204 y Scramble no desarrollaron mimetismo vasculológico, por lo cual no hubo efecto a evaluar referente al restablecimiento de la expresión del miR-204.

En condiciones de hipoxia, células MDA-MB-231 sin transfectar y transfectadas con la secuencia Scramble, desarrollaron estructuras tubulares (figura 28 B); sin embargo, en las células transfectadas con el pre-miR-204 hubo una reducción en la formación de túbulos y puntos de ramificación en comparación con las células sin transfectar (figura 28 B, C y D), lo que habla del efecto del miR-204 en la inhibición del mimetismo vasculogénico.

Para caracterizar el desarrollo de estructuras tubulares en el mimetismo vasculogénico desarrollado en células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia, se realizó un mapa de mimetismo vascular utilizando el analizador de angiogénesis del software ImageJ con el propósito de identificar las redes y segmentos formados por las estructuras tubulares, así como identificar los nodos y uniones maestras para cada tratamiento, en la figura 29 se observa el mapa de mimetismo para cada condición, resaltando la predicción de redes y segmentos que pudieron haberse formado en el caso de las células transfectadas con el pre-miR-204 tomando como base los nodos formados.

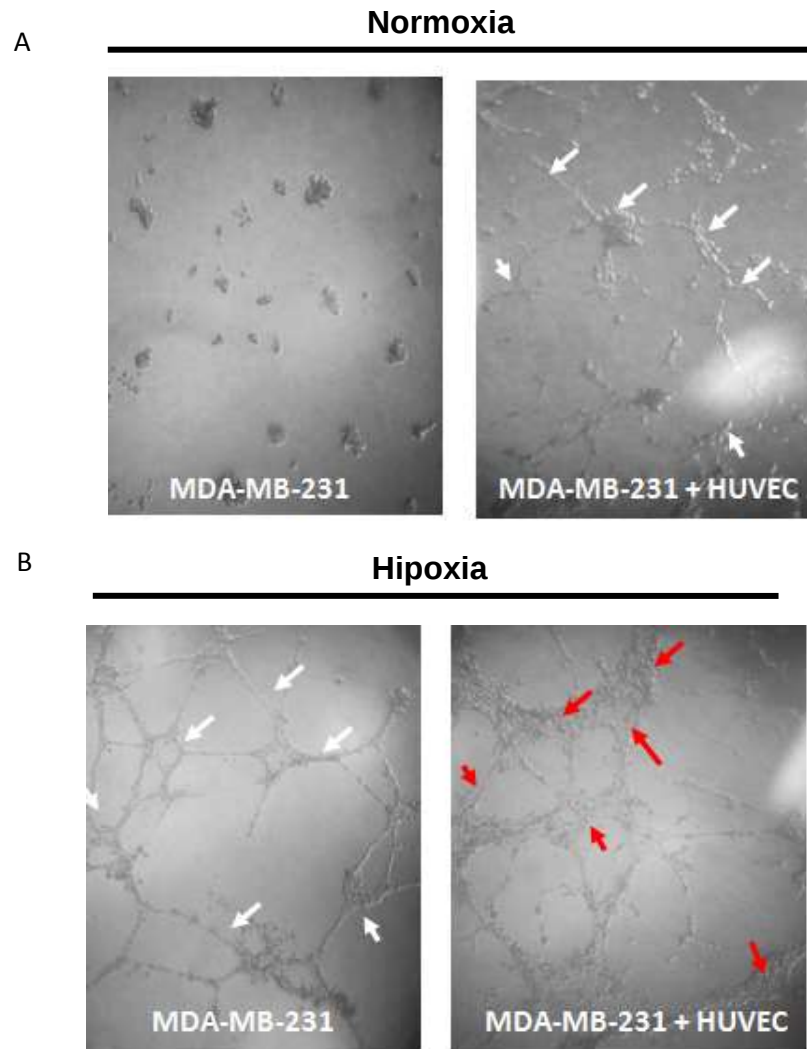


Figura 27. Ensayo de angiogénesis *in vitro*. (A) Células tumorales exhiben actividad pro-angiogénica debido a que induce a las células HUVEC para formar estructuras tubulares tipo capilar en condiciones de normoxia sobre una matriz extra celular. (B) Células tumorales, sin contacto con las HUVEC, forman estructuras tubulares tipo capilar en condiciones de hipoxia sobre una matriz extra celular indicativo de **mimetismo vascular**. Células MDA-MB-231 en mimetismo vascular inducen a las células HUVEC a formar estructuras capilares tortuosas y gruesas, las flechas señalan los túbulos formados.

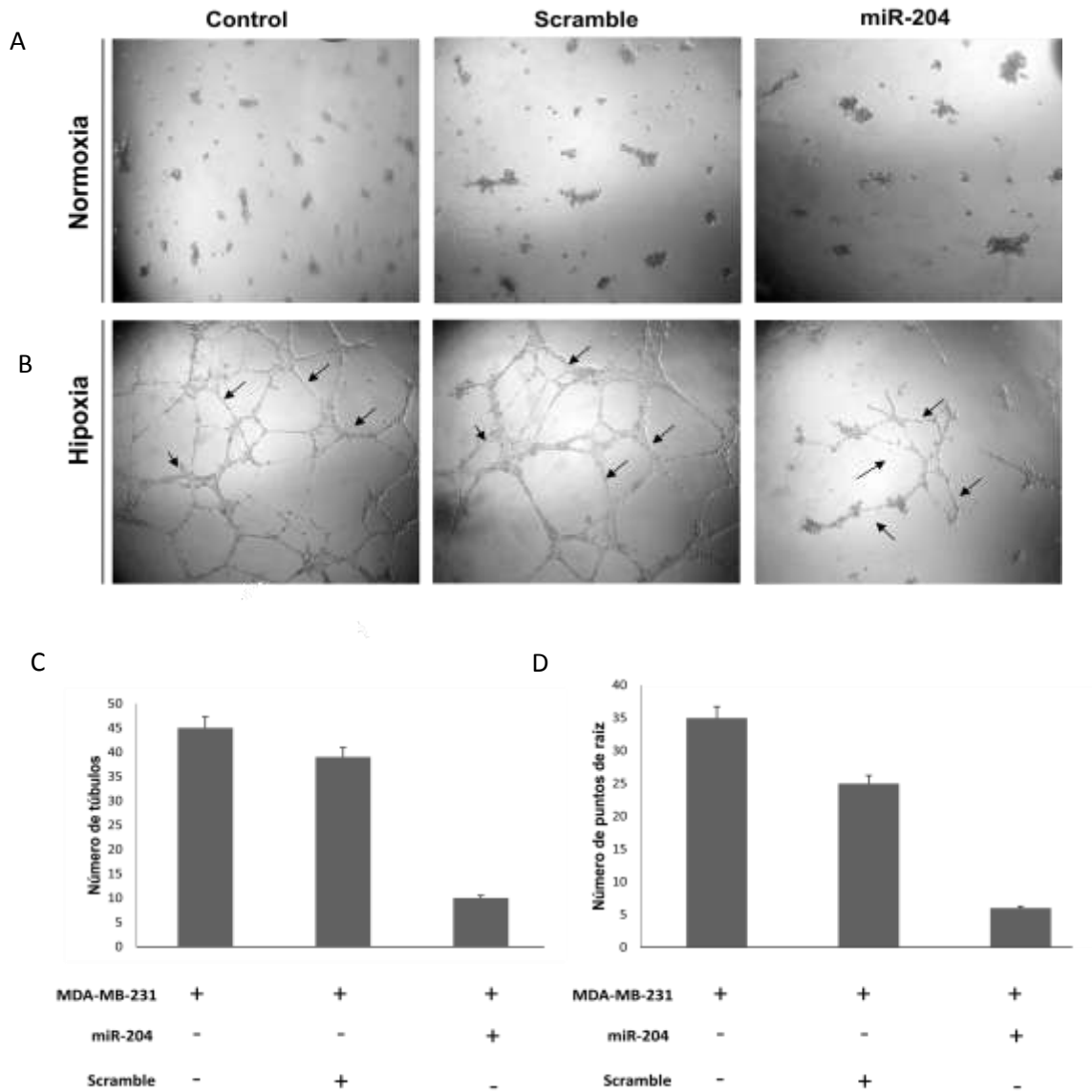


Figura 28. El miR-204 inhibe el mimetismo vascular detectado en las células MDA-MB-231. (A), Células MDA-MB-231 en normoxia no desarrollan mimetismo vasculogénico. (B) Células MDA-MB-231 en hipoxia sin transfectar, transfectadas con Scramble y miR-204, las flechas muestran las estructuras tubulares formadas por las células tumorales. (C) Cuantificación de número de túbulos. (D) Cuantificación de puntos de ramificación ($p < 0.05$).

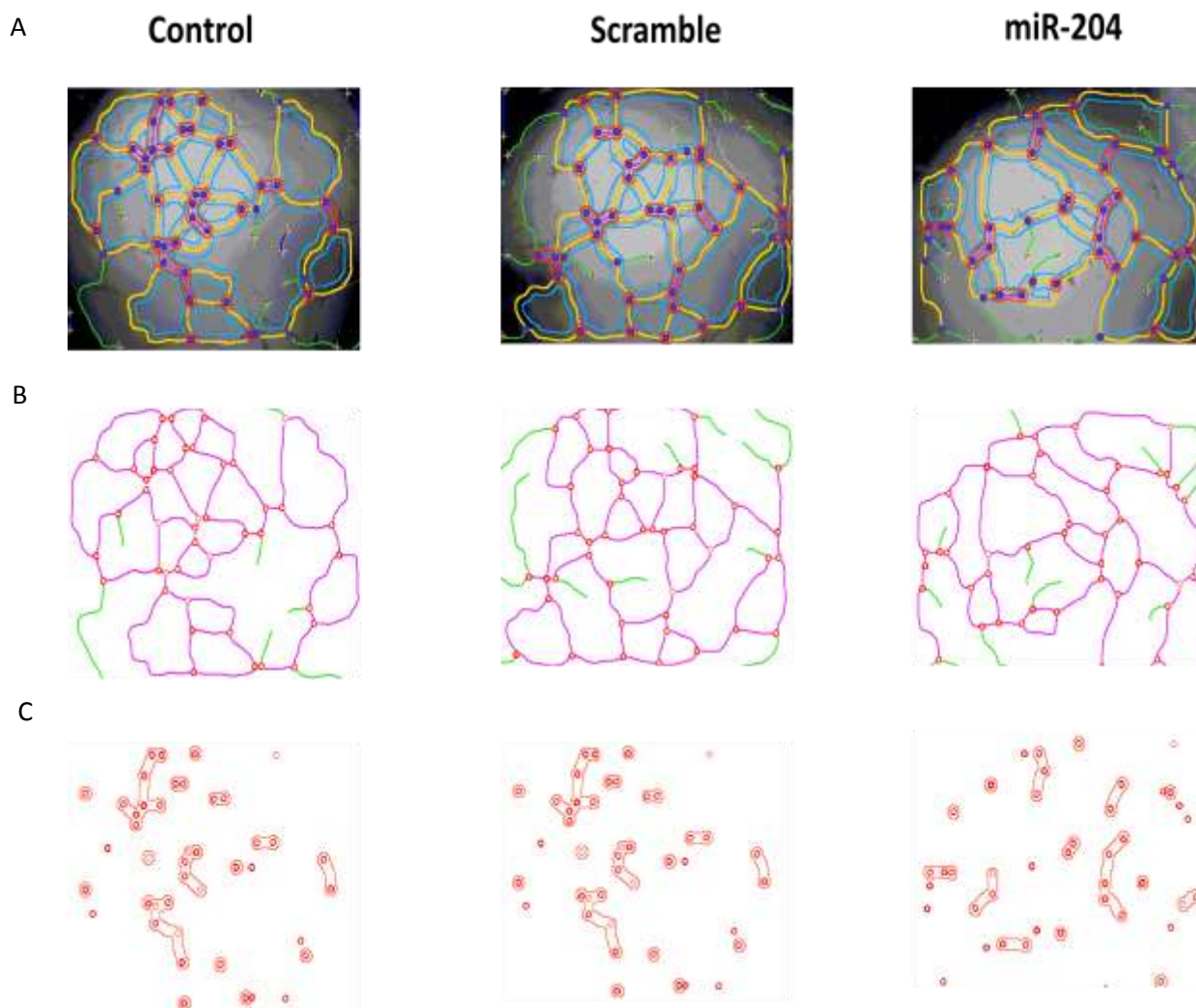


Figura 29. Mapa de mimetismo vasculogénico en las células MDA-MB-231.

(A), Mapa completo de red de estructuras tubulares de células MDA-MD-231 en condiciones de hipoxia con diferentes tratamientos (azul:malla, amarillo: segmentos delimitados por dos uniones, verde: rama, círculos azules: nodos, magenta: uniones maestras). (B) Segmentos de estructuras tubulares en diferentes condiciones, se observa la predicción de estructuras en células transfectadas con el miR-204(magenta: segmentos, verde: ramas). (C) Mapa de nodos y uniones maestras de MV en diferentes tratamientos. Software ImageJ.

6.5.1 Desarrollo e inhibición del mimetismo vasculogénico respecto al tiempo

Para evaluar el efecto del restablecimiento de la expresión del miR-204 en el mimetismo vasculogénico respecto al tiempo, se realizó un monitoreo del tiempo cada tres horas hasta un tiempo final de 12 horas de incubación en matrigel de células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia y normoxia transfectadas con el pre-miR-204, Scramble y sin transfectar con el propósito de determinar el tiempo de formación de estructuras tubulares en células sin transfectar y el tiempo de inhibición de estructuras tubulares en células transfectadas con el pre-miR-204.

En células sometidas a condiciones de hipoxia, respecto al tiempo de formación de túbulos en células sin transfectar, a las 3 horas se da un arreglo y ordenamiento en las células, a las 6 horas se comienza a formar la red de estructuras tubulares, a las 9 horas se desarrolla el mimetismo vascular y finalmente a las 12 horas las estructuras tubulares quedan definidas y delimitadas; en las células transfectadas con la secuencia scramble, el comportamiento de formación de túbulos es similar a las células sin transfectar. En células transfectadas con el pre-mir-204 a las tres horas se da un arreglo celular parecido a las células sin transfectar, sin embargo a las 6 horas no hay un desarrollo puntual de estructuras tubulares, a las 9 y 12 horas la formación de estructuras tubulares es mínima en comparación con las células control delimitando un efecto del miR-204 en la inhibición del desarrollo y formación del mimetismo vasculogénico a partir de las 3 horas de cultivo en matrigel (figura 30).

En células sometidas a condiciones de normoxia, a partir de las 3 horas parece existir un arreglo celular, a partir de esa hora y hasta las 12 horas de cultivo se forman unas pequeñas estructuras, sin embargo no son delimitadas, organizadas e interconectadas para formar una red característica del mimetismo vasculogénico.

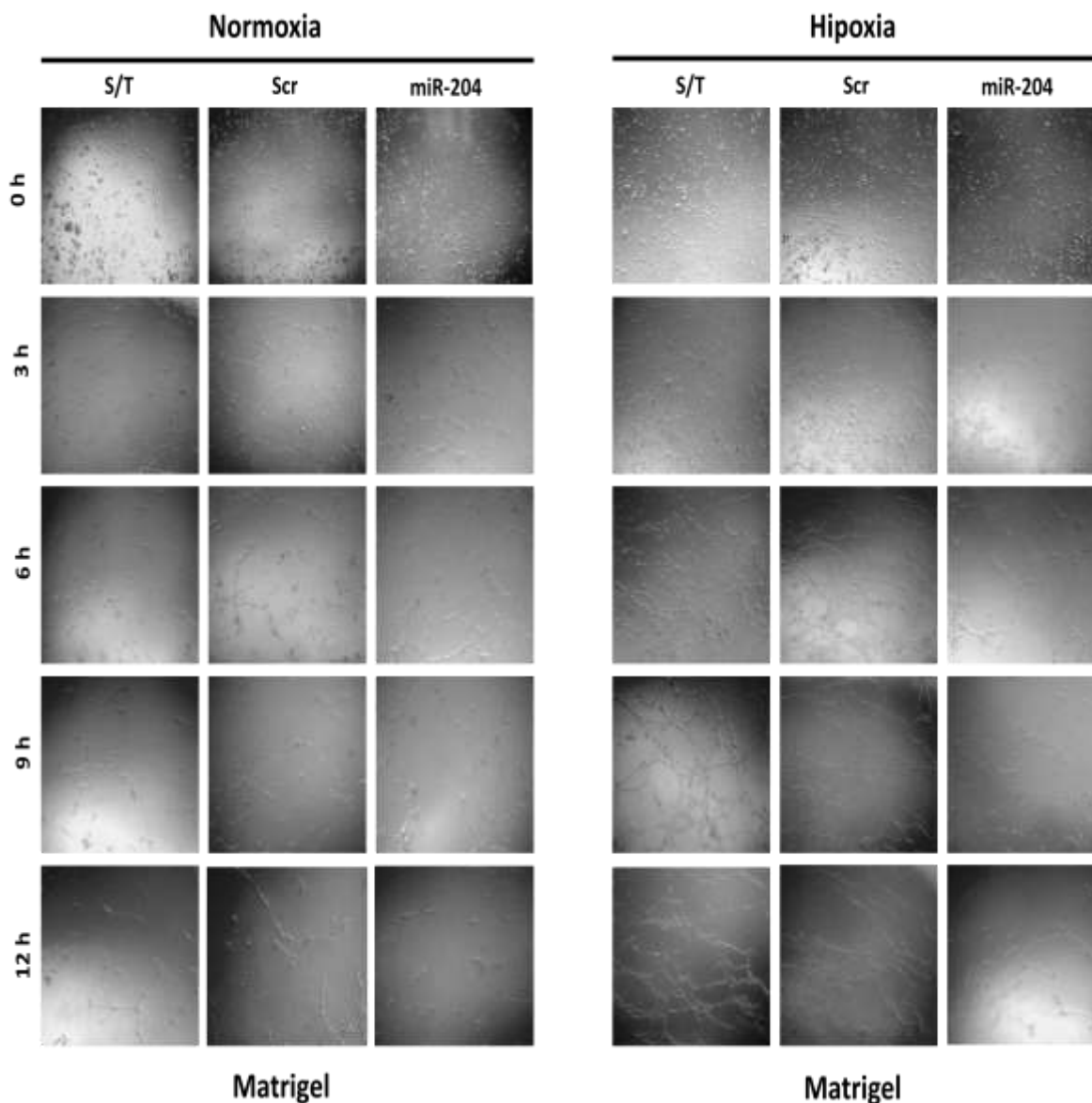


Figura 30. Desarrollo e inhibición del MV respecto al tiempo. Formación de estructuras tubulares del MV en células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia y transfectadas con el miR-204 y secuencia Scramble. En condiciones de normoxia no se observa la formación de estructuras tubulares delimitadas

6.5.2 El miR-204 inhibe el sinergismo vascular.

Como se había descrito anteriormente, células MDA-MB-231 en mimetismo vasculogénico en co-cultivo con células HUVEC, forman estructuras tortuosas e irregulares, esto debido a un posible sinergismo vascular entre ambas. Para determinar si el miR-204 inhibe no solo el MV sino también el sinergismo vascular, células MDA-MB-231 fueron transfectadas con el pre-miR-204 en condiciones de hipoxia por 48 h. Posteriormente fueron cultivadas en matrigel por 12 h en condiciones de normoxia para finalmente, realizar el co-cultivo con células HUVEC realizando un monitoreo en la formación de estructuras tortuosas a las 6,12 y 24 h del co-cultivo en normoxia. En la figura 31, se observa que el sinergismo formado se mantiene a las 24 h en co-cultivo con las células MDA-MB-231-HUVEC, este proceso no es alterado en las células transfectadas con la secuencia Scramble; sin embargo, en células MDA-MB-231 donde se restableció la expresión del miR-204, hubo una inhibición casi en su totalidad en la formación de mimetismo vasculogénico así como de estructuras tortuosas debido al sinergismo vascular, por lo que podemos señalar que el miR-204 inhibe este sinergismo que promueve el desarrollo de estructuras tubulares tortuosas, como control se utilizó células MDA-MB-231 en normoxia en co-cultivo con HUVEC y un monocultivo de HUVEC con el factor pro-angiogénico VGFA, donde se esperaba el desarrollo de estructuras tubulares características de la angiogénesis clásica.

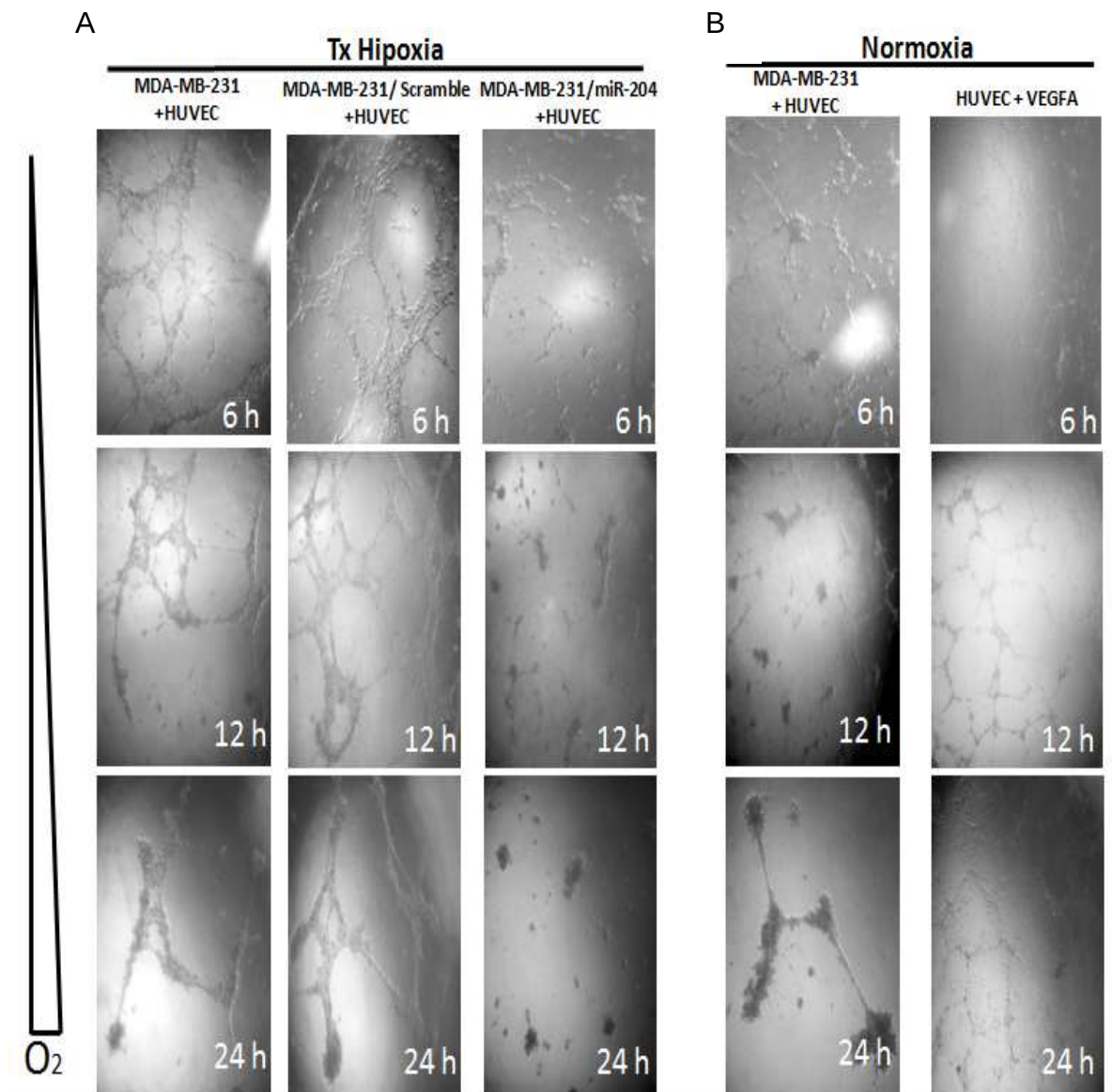


Figura 31. El miR-204 inhibe sinergismo vascular. (A) Células MDA-MB-231 en mimetismo vasculogénico en co-cultivo con células HUVEC sobre matrigel en condiciones de normoxia, transfectadas con secuencia Scramble y con el miR-204. (B) Células MDA-MB-231 en normoxia en co-cultivo con HUVEC sobre matrigel y células HUVEC+VEGFA como control.

6.5.3 El mimetismo vasculogénico está asociado a células altamente metastásicas.

Para determinar si el mimetismo vasculogénico estaba asociado a células altamente metastásicas, se realizó un monocultivo en matrigel de líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (altamente metastásicas) y MCF-7 (pobremente metastásicas), las cuales poseen diferentes características morfológicas, genéticas e inmunohistoquímicas, por lo cual se comportan de manera distinta en la progresión e invasión del tumor. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia por 48 h para después ser sembradas y cultivadas en matrigel por 12 h con el propósito de observar el desarrollo del mimetismo en cada cultivo y condición.

El resultado obtenido fue que las células MDA-MB-231 en hipoxia en contacto con la matrigel desarrollan MV a partir de las 6 h (figura 32 A) ; sin embargo las células MCF-7 en condiciones de hipoxia y normoxia no desarrollaron la formación de estructuras tubulares tipo capilar en cultivo con Matrigel (Figura 32 B), esto parece indicar que el mimetismo vasculogénico es característico de células altamente metastásicas, el resultado puede estar asociado a un elevado incremento en la síntesis y liberación de proteínas que favorecen la formación de estructuras tubulares por parte de la célula MDA-MB-231 debido a sus características genéticas y en respuesta a condiciones de estrés como la falta de oxígeno que permiten el desarrollo del mimetismo.

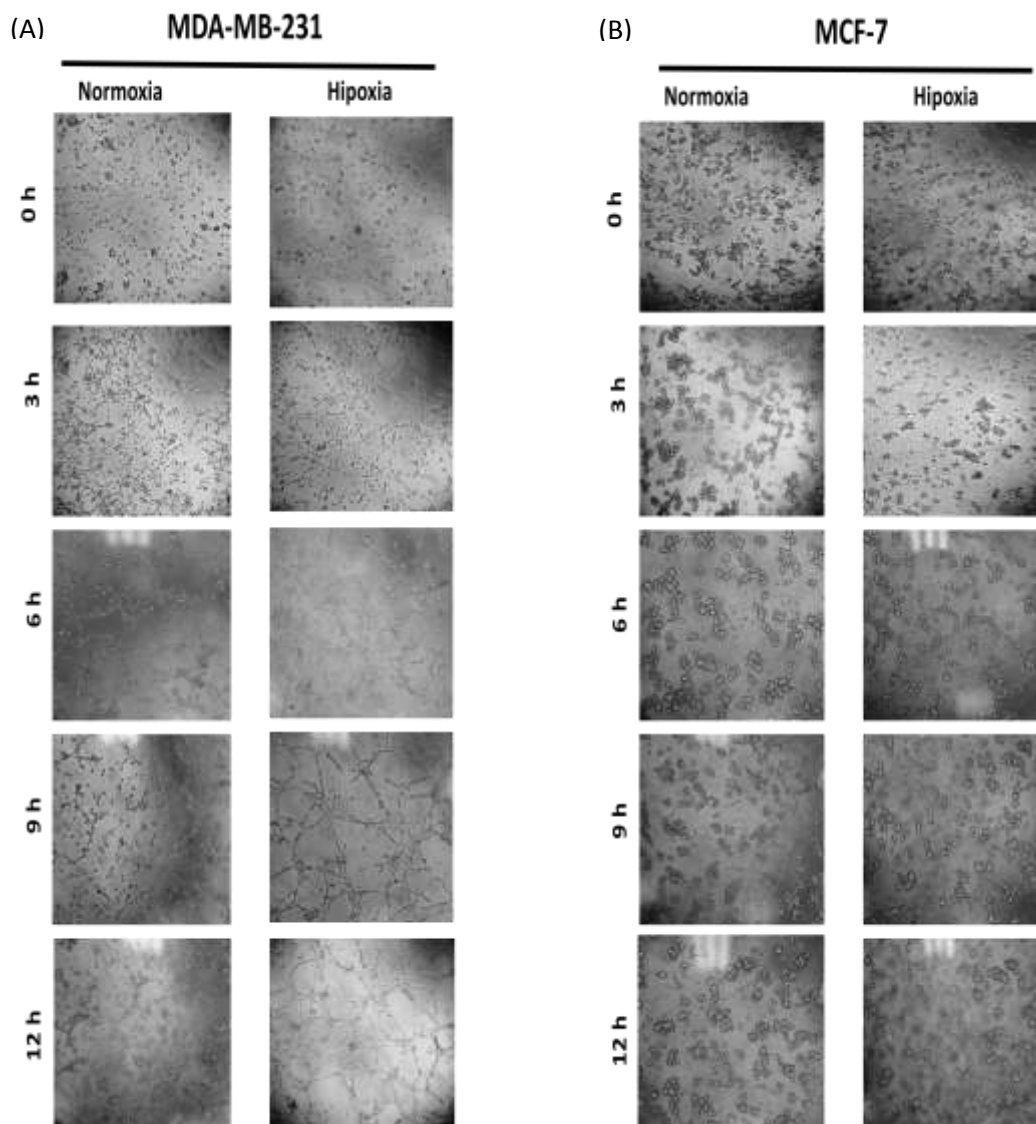


Figura 32. Desarrollo de MV respecto al tiempo. (A) Células MDA-MB-231 sometidas a estrés hipóxico y en normoxia cultivadas en matrigel en normoxia por 12 h. (B) Células MCF-7 en estrés hipóxico y en normoxia cultivadas en matrigel en normoxia por 12 h.

6.5.4 El mimetismo vasculogénico es dependiente de estrés hipóxico y factores pro-angiogénicos.

Para determinar si el mimetismo vasculogénico es dependiente de factores pro-angiogénicos, se realizó un ensayo de mimetismo vasculogénico donde se realizó el cultivo de células sometidas a estrés hipoxico en matrigel por 36 h en normoxia para determinar si al restablecer las condiciones de oxígeno incidía en el desarrollo y mantenimiento de estructuras tubulares. Como se observa en la figura 33 A el restablecimiento del cultivo en condiciones de normoxia disminuye el desarrollo y mantenimiento del mimetismo vasculogénico, lo que nos dice que éste fenómeno es dependiente del estrés hipoxico en las células tumorales. A la par se desarrolló un ensayo de mimetismo vasculogénico en donde a estructuras tubulares preformadas a las 12 h en matrigel se les adicionó el factor pro-angiogénico VEGFA con el propósito de determinar si éste fenómeno es dependiente de factores asociados a la angiogénesis clásica. En la figura 33 B se observa que una vez desarrollado el mimetismo, este se mantiene a las 6, 12 y 24 h en cultivo con VEGFA (36 totales de cultivo) a pesar de las condiciones de cultivo en normoxia en comparación con el cultivo sin VEGFA, lo que nos indica que el mimetismo vasculogénico puede ser dependiente de factores pro-angiogénicos que promuevan el desarrollo de estructuras tubulares tipo capilar por las células tumorales altamente metastásicas. Como control se desarrolló un ensayo de mimetismo vasculogénico de células MDA-MB-231 en normoxia en cultivo con VEGFA, como se observa en la figura 33 C, no hubo desarrollo de mimetismo vasculogénico. Derivado del resultado obtenido se desarrolló un modelo de trabajo mediado por el miR-204, el cual comparte algunos de los factores pro-angiogénicos que son blancos directos del miR-204 que puedan regular el mimetismo vasculogénico (figura 34). Se realizó una inmunodetección por ensayo de Western blot para validar este modelo de trabajo, por lo que se obtuvieron extractos protéicos de células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia y normoxia. En la figura 35 A y B se observa que TGFBR2 está sobre expresado en condiciones de hipoxia y que al silenciarlo tiene un efecto en la expresión de MMP-2, lo cual puede influir en el desarrollo del mimetismo vasculogénico.

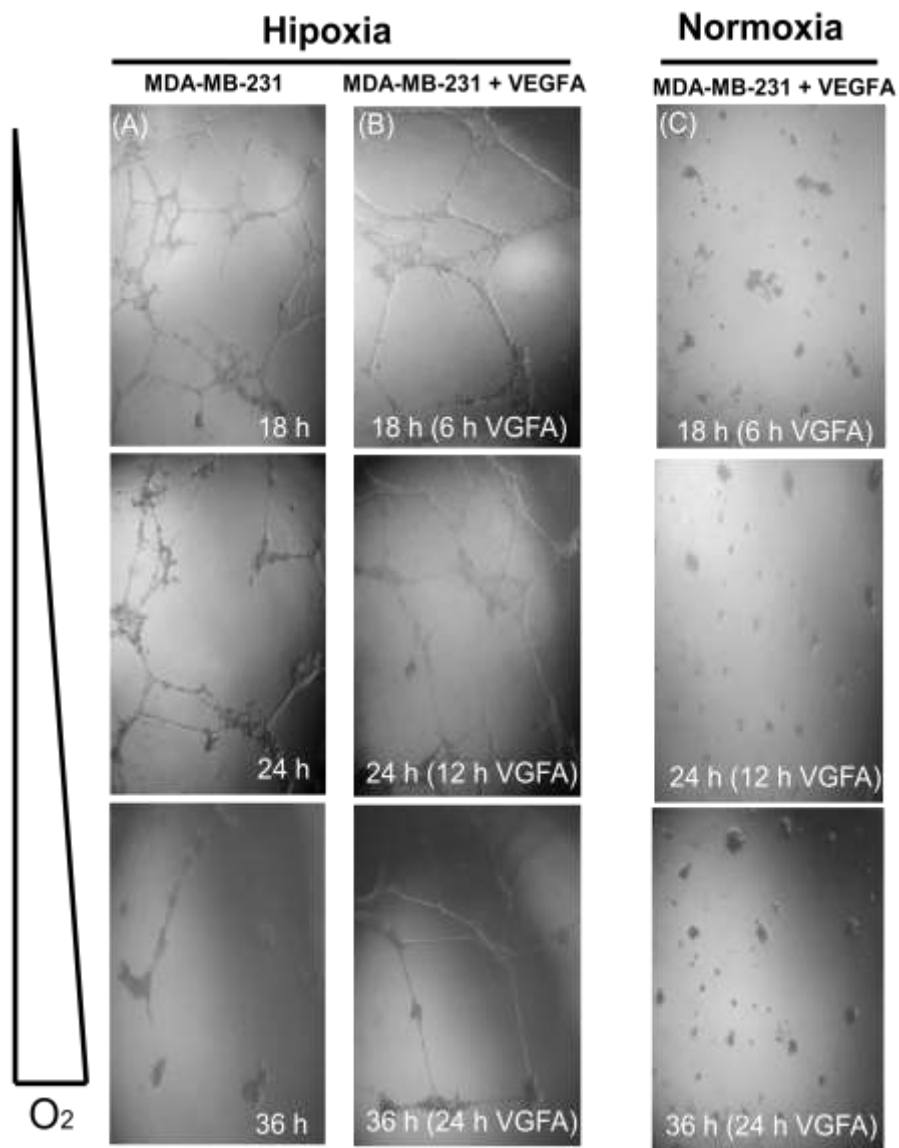


Figura 33. Mimetismo vascular en MDA-MB-231 es dependiente de VEGFA.

(A) El mimetismo vascular disminuye conforme aumenta el tiempo de incubación en el matrigel y la concentración de O_2 aumenta. (B) El mimetismo vascular se mantiene en presencia de VEGFA, aun al restablecer el oxígeno, sugiriendo que los mecanismos responsables de MV son dependientes de factores angiogénicos. (C) No hay desarrollo de MV en células MDA-MB-231 en normoxia

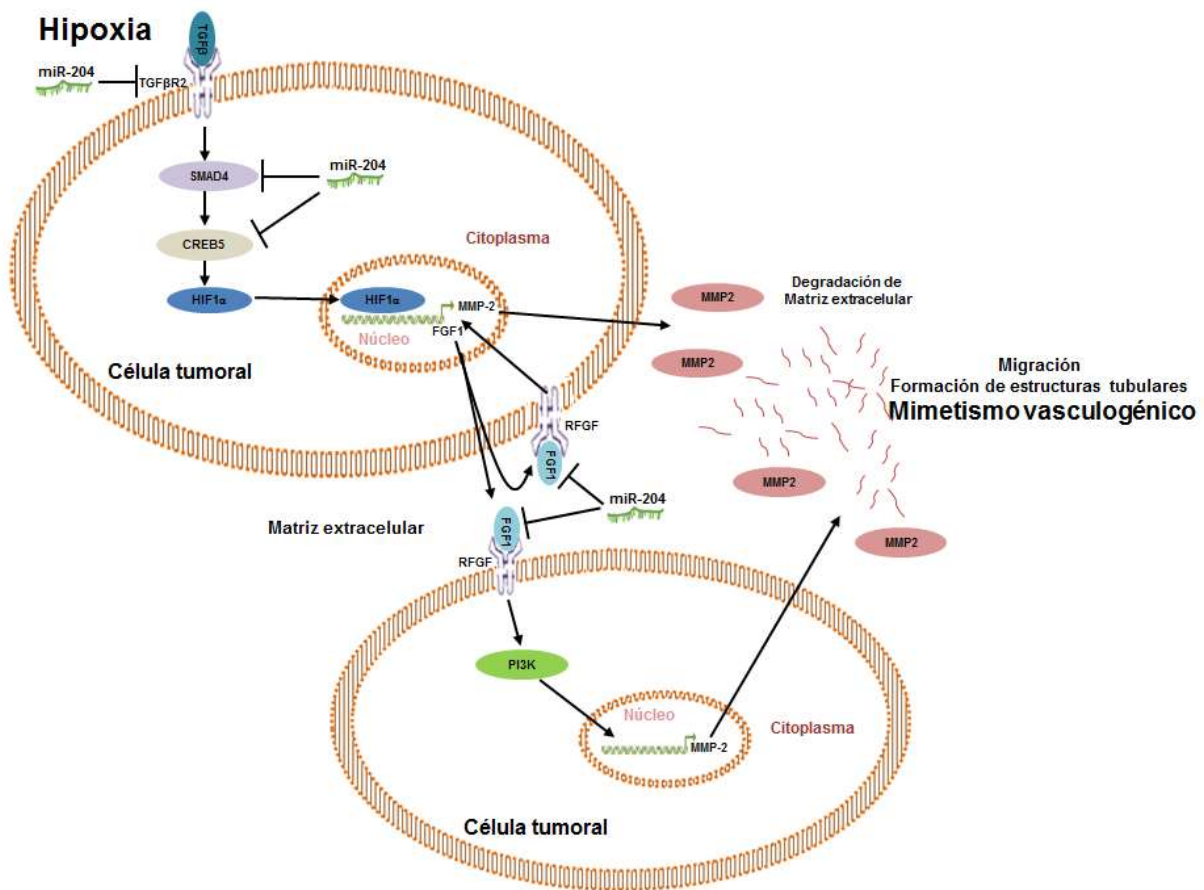
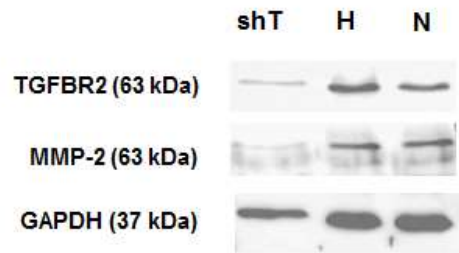


Figura 34. Modelo del Mimetismo Vasculogénico mediado por el miR-204. La hipoxia tumoral es el detonante para la sobre expresión de factores pro-angiogénicos que promuevan la proliferación, migración e invasión que dan como resultado final el desarrollo del mimetismo vasculogénico. El miR-204 reduce la expresión de dichos factores como TGFBR, CREB5 y FGF1, que son parte de la cascada de inducción para el desarrollo del fenotipo del mimetismo. Al restablecer la expresión del miR-204 reduce la traducción de los factores pro-angiogénicos lo que incide en la inhibición del mimetismo vasculogénico.

A



B

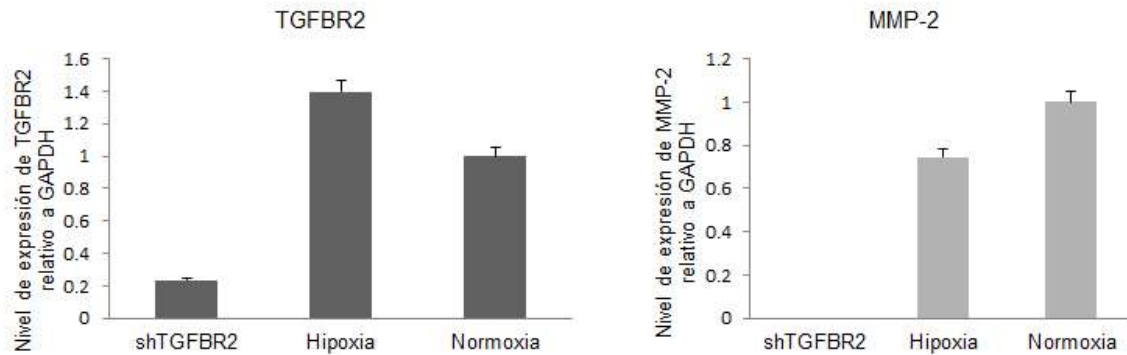


Figura 35. Expresión de proteínas asociadas al mimetismo vascular en células MDA-MB-231. (A) Western blot de extracto de proteínas en diferentes condiciones N= Normoxia, H=Hipoxia, shT= células transfectadas con sh TGFBR2. (B) Cuantificación de expresión de las proteínas TGFBR2 y MMP2. ($p < 0.05$). Análisis cuantitativo de blots realizado por software myImage Analysis de Thermo Scientific.

6.5.5 Silenciamiento de *tgfbr2* inhibe el mimetismo vasculogénico.

Con el propósito de determinar si el silenciamiento del gen *tgfbr2* tenía un efecto en el desarrollo del mimetismo vasculogénico, células MDA-MB-231 fueron transfectadas con 5 µg de la construcción psilencer-*tgfbr2*, incubadas en condiciones de hipoxia y normoxia por 48 h para posteriormente realizar un monocultivo en matrigel y evaluar la formación de estructuras tubulares tipo capilar por la célula tumoral.

En la figura 36 A se observa que en células transfectadas con la construcción psilencer-*tgfbr2* sometidas a condiciones de hipoxia no hubo formación y desarrollo de estructuras tubulares en comparación con las células sin transfectar las cuales desarrollaron el mimetismo vasculogénico; para determinar que el efecto fuera por el silenciamiento y no por el agente de Transfección, se realizó un cultivo con lipofectamina, el cual no tuvo efecto en la viabilidad celular y desarrollo del mimetismo. En las células cultivadas en normoxia, no hubo desarrollo de mimetismo vasculogénico en las tres condiciones (transfectadas, sin transfectar y con lipofectamina) lo que nos indica el papel de la hipoxia y TGFBR2 en la formación de estructuras tubulares así como la inhibición de las mismas por el efecto del silenciamiento de *tgbr2*.

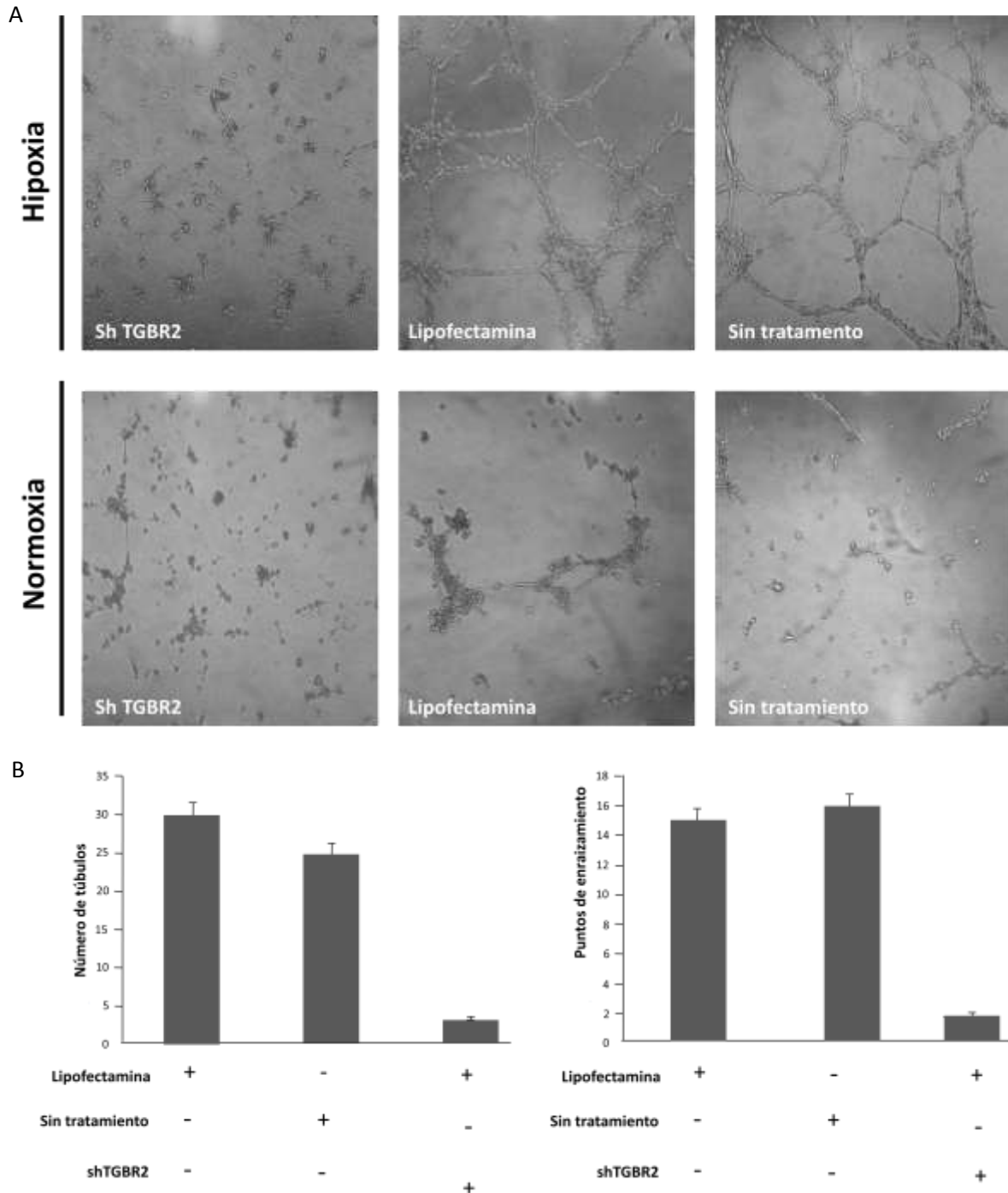


Figura 36. El shTGBR2 inhibe el mimetismo vascular detectado en las células MDA-MB-231. (A) Células MDA-MB-231 en hipoxia transfectadas con el shTGFBR2 no desarrollan mimetismo vasculogénico en comparación con células sin transfectar, células en normoxia no desarrollan mimetismo. (B) Cuantificación de número de túbulos y de puntos de ramificación ($p < 0.05$).

VII. Discusión.

El presente trabajo tuvo como intención analizar el restablecimiento de la expresión del miR-204 y su efecto en la angiogénesis por medio de la modulación del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en células de cáncer de mama MDA-MB-231, se analizó la expresión de FGF1 en condiciones de normoxia e hipoxia, así como el efecto del miR-204 en ambas condiciones. El estímulo de hipoxia fue evaluado en células tumorales y su efecto en el desarrollo de estructuras tubulares tipo capilar.

La expresión basal del factor fue evaluada mediante PCR obteniendo una expresión mayor en células MDA-MB-231 en comparación con MCF-7 este resultado fue similar por lo reportado por Shi y colaboradores en el 2014, sin embargo, no fue posible reproducir este resultado por esta técnica, debido a esto se optó por realizar la detección de la proteína por ensayos de inmunofluorescencia.

Los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia indican que las células tumorales MDA-MB-231 cuando son sometidas a estrés hipoxico sobre expresan el factor de crecimiento FGF1 hasta 13 veces más en comparación con las células en normoxia, lo que muestran que la hipoxia es un factor estimulante para incrementar la síntesis y liberación del FGF1 de acuerdo con lo reportado por Carreira y colaboradores en el 2001, esto fue confirmado por Western blot donde se encontró que FGF1 en hipoxia tuvo un nivel de expresión 1.8 veces mayor en comparación con células en normoxia. FGF1 se localiza disperso en el citoplasma, lo cual habla sobre su secreción y acción parácrina para tener su efecto como estimulador de la angiogénesis al ser captado por su receptor tanto en células tumorales como en células endoteliales promoviendo la angiogénesis y por ende la diseminación del tumor mediante el fenómeno de metástasis, estos resultados concuerdan con lo reportado por Yoshimura en 1998 y Mori y colaboradores en el 2012.

Nuestro grupo de trabajo reportó que el miR-204 modula un grupo de genes asociados a la estimulación del proceso angiogénico en cáncer de seno, debido a esto se evaluó el efecto del miR-204 en la expresión de FGF1 y su consecuencia en la angiogénesis. Cuando se restablece la expresión del miR-204 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 en normoxia e hipoxia, hay una disminución en la intensidad de la señal de fluorescencia asociado a la presencia de la proteína, lo que indica el papel de la modulación en la expresión de FGF1 mediado por el miR-204.

La clonación del fragmento de la 3'UTR fue realizada por PCR con los dos sitios de unión para el miR-204, se confirmó la clonación por PCR colony así como por doble digestión liberando el fragmento correspondiente a ~419 pb, adicionalmente se realizó la clonación del primer sitio de unión con mutaciones en la región semilla, como perspectiva se realizará la secuenciación para confirmar las clonas. En el ensayo de luciferasa se registró una disminución en la actividad de luciferasa en células transfectadas con el pre-miR-204 lo que determina que FGF1 es blanco directo del miR-204.

Para desarrollar el efecto de la modulación de FGF1 en la angiogénesis, se eligió el estímulo de hipoxia en el cultivo celular debido a que en el microambiente tumoral está presente este estrés y por lo mismo tiene un efecto en la expresión de factores pro-angiogénicos (entre ellos FGF1) que estimulen la formación de estructuras tubulares en un soporte de matriz extracelular. Los datos obtenidos muestran que las células MDA-MB-231 sometidas a estrés hipóxico por 48 h y cultivadas en matrigel, desarrollan estructuras tubulares tipo capilar sin la necesidad de estar en contacto con las células endoteliales, este fenómeno es llamado mimetismo vasculogénico, el término fue acuñado y reportado por primera vez en melanoma por Maniotis y colaboradores en 1999 (98). El mimetismo vasculogénico se define como el desarrollo de estructuras tubulares tipo capilar por células tumorales independiente del contacto con células endoteliales. Este fenómeno ocurre en diversos tipos de cáncer incluyendo el cáncer de seno (99) y estimula la activación de genes que sintetizan proteínas capaces de degradar y

remodelar la matriz extracelular para desarrollar estructuras tubulares tipo capilar por parte de la célula tumoral que promuevan la perfusión de nutrientes, oxígeno y faciliten la diseminación tumoral desarrollando metástasis (100). El mimetismo vasculogénico es característico de tumores altamente metastásicos y agresivos teniendo un mal pronóstico y baja sobrevivencia en pacientes que presentan este fenómeno (101).

Nuestros datos proponen que células de cáncer de mama MDA-MB-231 cultivadas en condiciones de hipoxia, desarrollan mimetismo vasculogénico a partir de las 6 h sobre un soporte de matrigel en comparación con células MCF-7 las cuales son pobremente metastásicas, estos datos concuerdan con lo reportado por Basu y colaboradores en el 2006, sin embargo ellos realizaron sus ensayos dando un estrés celular a base de falta de nutrientes, una diferencia adicional es que en nuestra investigación realizamos un monitoreo cada tres horas por 12 horas encontrando que el mimetismo en células MDA-MB-231 se desarrolla casi en su totalidad a partir de las 6 horas en comparación con Basu que el inicio del desarrollo lo reporta a partir de las 7 horas.

Reportes indican que las terapias anti-angiogénicas clásicas pueden fallar incurriendo en la progresión tumoral en un ambiente hipóxico (102) por lo que el uso de microRNAs puede ser una estrategia alternativa en terapias contra fenómenos agresivos como el mimetismo vasculogénico.

Al realizar el ensayo de mimetismo vasculogénico con células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-204 en condiciones de hipoxia, encontramos que el restablecimiento de la expresión del miR-204 tiene un efecto en la disminución del desarrollo de estructuras tubulares tipo capilar lo que habla que este microRNA no solo tiene efecto en la angiogénesis clásica sino también en el mimetismo vasculogénico.

Al realizar un co-cultivo de células en mimetismo vasculogénico con células endoteliales, encontramos que se forman estructuras tortuosas e irregulares realizando una especie de sinergismo vasculogénico, al parecer las células

endoteliales cubren a las estructuras tubulares pre-formadas estableciendo una especie de cobertura a los mismos, desconocemos el significado biológico de este fenómeno, pero al parecer, esto podría facilitar e incrementar la perfusión y diseminación de nutrientes así como proveer protección a las terapias anti-angiogénicas haciendo más agresivo e invasivo al tumor.

El miR-204 logró abatir el desarrollo de estructuras tubulares tortuosas formadas por las células endoteliales inhibiendo el sinergismo vasculogénico entre ambas células promotoras de la vascularización, estos hallazgos indican que el miR-204 puede ser un agente terapéutico alternativo no solo al proceso angiogénico sino también a tumores que desarrollen mimetismo y sinergismo vasculogénico.

Para determinar si el mimetismo vasculogénico era dependiente del estrés hipóxico y factores pro-angiogénicos, se realizó un ensayo de mimetismo vasculogénico donde se mantuvo a las células MDA-MB-231 en mimetismo en un cultivo en normoxia por 24 h y adicionalmente en un cultivo adicional se le adicionó VEGFA el cual es un factor pro-angiogénico altamente estudiado, los resultados obtenidos mostraron que al aumentar el tiempo de cultivo de células en mimetismo en normoxia se iba perdiendo el desarrollo y mantenimiento de estructuras tubulares formadas por las células tumorales, caso contrario en las células con VEGFA que a pesar de las condiciones de normoxia, se mantuvo el mimetismo hasta las 24 h de cultivo en normoxia. Esto nos habla que el mimetismo es dependiente de una condición de estrés hipoxico que permite a la célula tumoral la síntesis exacerbada de factores que promuevan el desarrollo y mantenimiento de estructuras tubulares, dichos factores pueden ser similares a los pro-angiogénicos. Zhang y colaboradores en el 2016 demostraron que el mimetismo vasculogénico desarrollado en glioma por astrocitos puede ser inhibido por un agente que bloquea a TGF- β 1 evitando que esta proteína sea captada por su receptor TGBR2 y desarrolle el mimetismo vasculogénico en glioma (103); Flores-Pérez en el 2016 demostró que el miR-204 inhibe el proceso angiogénico clásico a través de la modulación de TGBR2. Debido a esto se decidió evaluar la expresión de otros factores pro-angiogénicos en el mimetismo vasculogénico en

células de cáncer de mama MDA-MB-231 que fueran blancos directos del miR-204 reportados como TGFBR2 con el propósito de determinar si algunas proteínas y rutas eran compartidas entre el proceso angiogénico y el mimetismo vasculogénico.

Los resultados obtenidos en este proyecto demostraron que TGBR2 está sobre expresado en células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia. Por su importancia en el proceso angiogénico y debido a los antecedentes planteados, se evaluó si esta proteína era crucial en el desarrollo del mimetismo vasculogénico para lo cual se realizó un ensayo con células MDA-MB-231 transfectadas con un shTGFBR2 para silenciar al gen *tgbr2* y determinar el efecto de su silenciamiento en el mimetismo vasculogénico. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de *tgfr2* abatió en su totalidad la formación de estructuras tubulares tipo capilar desarrollado por las células MDA-MB-231, lo que indica que TBGBR2 es indispensable para el desarrollo de mimetismo vasculogénico en cáncer de seno, adicionalmente hubo una reducción en la síntesis de MMP-2, proteína asociada a la degradación de la matriz extracelular. Esto explica que existen proteínas que son compartidas en el proceso angiogénico y en el mimetismo vasculogénico, además determina que el miR-204 modula la expresión directa de proteínas como FGF1 y TGBR2 e indirecta como MMP-2 que participan tanto en el proceso de angiogénesis como en el desarrollo de mimetismo vasculogénico en cáncer de seno, lo que las hace blancos terapéuticos y habla del papel del miR-204 como un posible agente terapéutico en el tratamiento contra el cáncer de mama altamente metastásico.

VIII. Conclusiones.

La proteína FGF1 se localiza principalmente en el citoplasma en las células tumorales MDA-MB-231 y aumenta su expresión en condiciones de hipoxia en comparación con normoxia en las células MDA-MB-231.

El miR-204 inhibe la expresión de FGF1 en condiciones de normoxia e hipoxia, sugiriendo que FGF1 es un blanco directo del miR-204.

Las células tumorales, sin contacto con las HUVEC, forman estructuras tubulares tipo capilar en condiciones de hipoxia sobre una matriz extra celular indicativo de mimetismo vasculogénico.

El mimetismo vasculogénico está asociado a células altamente metastásicas triple negativo MDA-MB-231 desarrollándose a partir de las 6 h en cultivo con matrigel en comparación con las luminales MCF-7 que no desarrollan este fenómeno.

Las células MDA-MB-231 en mimetismo vasculogénico inducen a las células HUVEC a formar estructuras capilares tortuosas y engrosadas, las células al ser tratadas con el miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico detectado en MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia y el sinergismo vascular.

Las estructuras tubulares preexistentes del MV se inhiben en condiciones de normoxia, sin embargo, el mimetismo vascular se mantiene en presencia del factor pro-angiogénico VEGFA, aun al restablecer el oxígeno, sugiriendo que los mecanismos responsables de MV son dependientes de factores angiogénicos.

Blancos validados del miR-204 como FGF1 y TGFBR2 están sobre expresados en condiciones de hipoxia, su inhibición por silenciamiento de TGFBR2 impide el desarrollo del mimetismo vasculogénico en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

Por lo anterior con los datos antes mencionados, podemos concluir que el miR-204 es un posible agente terapéutico en cáncer de mama.

IX Referencias.

1. Aranda A., M. A. (1999). Genética y Biomedicina Molecular: Organización Estructural y Funcional del DNA en el Núcleo Celular. En M. A. Aranda A., *Genética y Biomedicina Molecular: Organización Estructural y Funcional del DNA en el Núcleo Celular*.(pág. Capitulo 12). México.
2. Boada, L.D. (2004). Principios Generales de Carcinogénesis: Carcinogénesis química y hormonal. *Biocáncer*, 2-4.
3. Society, A. C. (5 de 24 de 2016). ACS. Recuperado el 23 de 9 de 2016, de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002284-pdf.pdf>
4. INEGI., I. N. (Octubre de 2012). *INEGI*. Recuperado el 13 de 07 de 2015, de <http://www.inegi.org.mx>.
5. Torres-Arreola, L. d., & Doubova., s. V. (2007). Cáncer de mama. Detección oportuna en el primer nivel de atención. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. , 157-166.
6. Castellanos, S. H., Balboa, P. G., Tovar, I. L., Casas, M. A., & Lamadrid., J. V. (2009). Cáncer de mama. *Anales de Radiología México* , 117-126.
7. Perou, C. M., Sorlie, T., Elisen, M. B., & et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406- , 747-752.
8. Zepeda-Castilla E., R.-M. E.-H.-V.-M. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Ciruj* 78. , 87-93.
9. Eroles, P; Bosch, A; Pérez-Fidalgo, A; Llunch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*. 38. , 698-707.

10. Sorlie, T; Perou, C M; Tibshirani, R; et al. 2001 Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98. 10869-74
11. Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., & et al. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 28. , 3271-7.
12. Guarneri, V., & Conte, P. (2009). Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist*. 14. , 645-56.
13. Chenag, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., & et al. . (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 101. , 736-50.
14. Parker, J. S., Prat, A., Cheang, M. C., & et al. (2009). Breast cancer molecular subtypes predict response to anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Cancer Res*. 69.
15. Staaf, J., Ringner, M., Vallon-Christersson, J., & et al. (2010). Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 28. , 1813-20.
16. Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., & et al. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 353. , 1659-72.
17. Bosch, A., Eroles , P., Zaragoza , R., Vina, J. R., & Lluch, A. (2010). Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and curent lines of research. *Cancer Treat Rev*. 36. , 206-15.
18. Livasy , C. A., Karaca, G., Nanda, R., & et al. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 19. , 264-71.

19. Speirs, D. L. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* , 13:215.
20. Ying, S.-Y. (2006). MicroRNA Potocols. En S.-Y. Ying, *MicroRNA Potocols* (págs. 1-5). New Jersey : Human Press.
21. Lee R.C., F. R. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementary to lin-14. . *Cell* 75 , 843-854.
22. Lau N.C., L. L. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science*. 294. , 858-862.
23. Lagos-Quintana M., R. R. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9 , 175-179.
24. Lee Y., K. M. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 23 , 4051-4060.
25. Gregory, R.I., Yan. K.P., Amuthan. G., Chendrimada. T., Doratotaj B., cooch N, et al., (2004). The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432. 235-240-
26. Lee, Y. A. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425 , 415-419.
27. Yi R., Q. Y. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17 , 3011-3016.
28. Lund E., G. S. (2003). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* , 95-98.
29. Murphy, D., Dancis, B., & Brown, J. R. (2008). The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis. *BMC Evolutionary Biology*. 8.
30. Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., GAtignol , A., et al. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* , 961-967.

31. Okamura, K., Phillips , M. D., Tyler, D. M., Duan, H., Chou, Y. T., & Lai, E. C. (2008.). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3'UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol.* 15. , 354-363.
32. Meister , G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschli, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 15. , 185-197.
33. Oszolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X. S., Roeder, R. G., et al. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 22. , 3172-83.
34. Corcoran, D. L., Pandit, K. V., Gordon, B., Bhattacharjee, A., Kaminski, N., & Benos, P. V. (2009). Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One.* 4. , e5279.
35. Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* 11. , 241-247.
36. Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* 448. , 83-86.
37. van Rooj, E., Liu, N., & Olson, E. N. (2008.). microRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* 24. , 159-166.
38. Pillai, R. S., Bhattacharyya , S. N., & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs:how many mechanism? *Trends Cell Biol.* 17. , 118-126.
39. Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103. , 4034-4039.

40. Suárez , Y., & Sessa, W. C. (2009). MicroRNAs As Novel Regulators of Angiogenesis. *Circ Res.* 104. , 442-454.
41. Esquela-Kerscher A., S. J. (2006). Oncomirs-microRNA with a role in cancer. *Nature Review Cancer* , 259-269.
42. DeSantis , C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., et al. (2014.). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64. , 252-71.
43. Iorio, M. V., Ferracin , M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbian, S., et al. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65., 7065-70.
44. Sampere, L. F., Christensen , M., Silaharoglu, A., Bak, M., Heath, C. V., Schwartz , G., et al. (2007.). Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulation in breast cancer. *Cancer Res.*
45. Sotiropoulos, C., & Pusztai, L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 380. , 790-800.
46. Blenkiron, C., Goldstein, L. D., Thorne, N. P., Spiteri, I., Chin, S. F., Dunning, M. J., et al. (2007.). MicroRNA expression profiles of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* , R214.
47. Mackewicz , M., HuppiK, H. A., Dorsey, T. H., & Caplen, N. J. (2011). Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res Treat.* , 663-79.
48. Spannuth, W. A., Sood, A., & Coleman, R. L. (2008). Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nature Review.* 4., 194-204.
49. Martinez-Ezquerro , J. D., & Herrera, L. A. (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología.* 1., 83-96.

50. Carmeliet, P., & Jalin, R. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 407., 249-257.
51. Semenza, G. (2003). Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*. 54., 17-28.
52. Folkman, J. (2003.). Fundamental concepts of the angiogenesis process. *Curr Mol Med*. 3. , 643-651.
53. Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438. , 932-936.
54. Partanen, T. A., & Paavonen, K. (2001.). Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. . *Microsc Res Tech*. 55. , 108-121.
55. Itoh N., O. D. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn*. 237, 18-27.
56. Brooks A.N., K. E. (2012). Molecular Pathways: Fibroblast Growth Factor Signaling: A New Therapeutic Opportunity in Cancer. *Clin Cancer Res*; 18(7), 1855-1862.
57. Lanner F, R. J. (2010). The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*. 137, 3351–3360.
58. Beenken A., M. M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 8., 235–253.
59. Brooks A.N., K. E. (2012). Molecular Pathways: Fibroblast Growth Factor Signaling: A New Therapeutic Opportunity in Cancer. *Clin Cancer Res*; 18(7), 1855-1862.
60. Okunieff P., F. B. (2003). Fibroblast growth factors (FGFS) increase breast tumor growth rate, metastases, blood flow, and oxygenation without significant change in vascular density. *Adv Exp Med Biol*. 530., 593–601.

61. Powers, C. M. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 7,, 165-197.
62. Ornitz, D. a. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, *REVIEWS* 3005.
63. Presta M., D. P. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*;16, 159–178.
64. Husseman J., P. S. (2012). The Role of Vascular Endothelial Growth Factors and Fibroblast Growth Factors in Angiogenesis during Otitis Media. *Audiol Neurotol*, 148–154.
65. Carreira M.C., M. L. (2001). The comparative release of FGF1 by hypoxia and temperature stress. *Growth Factors*. 18, 277-85.
66. Jackson, S. F. (1992.). Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. . *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no. 22., 10691-5.
67. Shin J.T., S. R. (1996). Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1312, no. 1., 27-38.
68. Chen W.S, C. S. (2010.). The signals of FGFs on the neurogenesis of embryonic stem cells. *J Biomed Sci*, vol. 17, 33.
69. Lungu G., L. C. (2008). FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF-kappaB and activating protein-1. *Mol Carcinog*, vol. 47, no. 6., 424-35.
70. Newman D.R., C. M. (2004). Heparin affects signaling pathways stimulated by fibroblast growth factor-1 and -2 in type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 287, no. 1, 191-200.

71. Forough R., B. W. (2005). Role of AKT/PKB signaling in fibroblast growth factor-1 (FGF-1)-induced angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). *J Cell Biochem*, vol. 94, no. 1., 109-16.
72. Presta M., D. P. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*;16, 159–178.
73. P. Li, S. O. (2004). Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, vol. 97, no. 4, 1550-8.
74. Billottet C., E. N. (2004). Targets of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) and FGF-2. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 15, 4725–4734.
75. Yoshimura N., H. S. (1998). The expresión and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol* 89(1), 28-34.
76. Chandler, L. S. (1999). Prevalent expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors and FGF2 in human tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 81, 451-458.
77. Mori S., T. V. (2012). A Dominant-Negative FGF1 Mutant (the R50E Mutant) Suppresses Tumorigenesis and Angiogenesis. *PLoS ONE* 8(2), e57927.
78. Birrer M.J., J. M. (2007). Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization analysis identified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 25(16), 2281–2287.
79. Smith G., M. N. (2012). Individuality in FGF1 expression significantly influences platinum resistance and progression-free survival in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 107., 1327–1336.
80. Slattery M.L., J. E. (2013). Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB,FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and

survival: The Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* 140(3), 587–601.

81. Yoshimura N., H. S. (1998). The expresión and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol* 89(1), 28-34.
82. Lungu G., L. C. (2008). FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF-kappaB and activating protein-1. *Mol Carcinog*, vol. 47, no. 6., 424-35.
83. Shi H., F. C. (2014). The FGF-1-specific single-chain antibody scFv1C9 effectively inhibits breast cancer tumour growth and metastasis. *J. Cell. Mol. Med. Vol 18. No 10.*, 2061-2070.
84. Reif M., L. S. (1997). Expression of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor B-1, Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotrophin in Human Primary . *CANCER RESEARCH*. 57., 963-969.
85. Zhang L., K. S. (1997). MCF-7 breast carcinoma cells overexpressing FGF-1 form vascularized, metastatic tumors in ovariectomized or tamoxifen-treated nude mice. *Oncogene*. 15., 2093- 2108.
86. Zhang L., K. S. (1999). Overexpression of Fibroblast Growth Factor 1 in MCF-7 Breast Cancer. *CANCER RESEARCH*. 59., 5023–5029.
87. Cailliau K., P. D. (2005). FGF Receptor Phosphotyrosine 766 is a Target for Grb14 to Inhibit MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Signaling. *ANTICANCER RESEARCH*. 25, 3877-3882.
88. Fish , J. E., & Srivastava, D. (2009). MicroRNAs: Opening a NEw Vein in Angiogenesis Research. *Sci Signal* .

89. Suárez , Y., & Sessa, W. C. (2009). MicroRNAs As Novel Regulators of Angiogenesis. *Circ Res.* 104. , 442-454.
90. Kuehbachner, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.*101. , 59-68.
91. Suarez, Y., Fernandez-Hernando , C., Yu, J., Gerbe, S. A., Harrison, K. D., Prober, J. S., et al. (2008). Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl AcadSci USA.* 105., 14082-14087.
92. Yang, W. J., Yang, D. D., Na, S., Sandusky, G. E., Zhang, Q., & Zhao, G. (2003). Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem.* 280. , 9330-9335.
93. Kuehbachner, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.*101. , 59-68.
94. Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Cittili, L., Woods , K., et al. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVEC. *Blood.* 108. , 3068-3071.
95. Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., et al. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* 38. , 1060-1065.
96. Hua, Z., Lv, Q., Ye, W., Wong , C. K., Cai, G., Gu, D., et al. (2006). MiRna-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *Plos One.*
97. Flores-Pérez, A., Marchat, L. A., Rodríguez-Cuevas, S., Bautista-Piña, V., Hidalgo-Miranda, A., Ocampo E.A., Sierra M.A., Palma-flores C., Fonseca-Sanchez M., Astudillo-de la Vega H., ruíz-García E., González-Barrios J.A.,

- Pérez-Plasencia C., Streber M.L., López-Camarillo C. (2016). Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci. Rep.* 6 , 1-18.
98. Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., y otros. (1999). Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *American Journal of Pathology*, Vol. 155, No. 3, 739-752.
 99. Basu, G. D., Liang, W. S., Stephan, D. A., Wegener, L. T., Conley, C. R., Pockaj, B. A., y otros. (2006). A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Research 2006*. Vol 8 No 6, 1-2.
 100. Folberg, R., & Maniotis, M. J. (2000). Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *American Journal of Pathology*, Vol. 156, No. 2 , 361-379.
 101. Cao, Z., Bao, M., Miele, L., Sarkar, F. H., Wang, Z., & Zhou, Q. (2013). Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer* 49 , 3914-3923.
 102. Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., et al. (2009). Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors. *Cancer Cell* , 220-231.
 103. Zhang C., Chen W., Zhang X., Huang B., Chen A., He Y., Wang J., Li X.(2016). Galunisertib inhibits glioma vasculogenic mimicry formation induced by astrocytes. *Nature Scientific Reports*. 1-11.

FORMATO 4 VOTO APROBATORIO DE LECTOR

México, D.F. a 25 de noviembre de 2016

Mtro. José Luis Fernández Silva
Coordinador de Certificación y Registro
Presente

Por este medio me permito informarle que después de haber revisado la tesis, titulada:

"Análisis del miR-204 en la regulación de la angiogénesis a través de la modulación del

factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama."

Presentada por: Gilberto Mandujano Lázaro Matrícula: 14-104-0077

Maestría/Doctorado en: Maestría en Ciencias Genómicas

Considero que cumple con los requisitos académicos, por lo que otorgo mi **VOTO APROBATORIO** para presentar el Examen de grado.

Atentamente


Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Nombre y firma del Lector/a

C.c.p. Interesado

FORMATO 4 VOTO APROBATORIO DE LECTOR

México, D.F. a 25 de noviembre de 2016

Mtro. José Luis Fernández Silva
Coordinador de Certificación y Registro
P r e s e n t e

Por este medio me permito informarle que después de haber revisado la tesis, titulada:

"Análisis del miR-204 en la regulación de la angiogénesis a través de la modulación del

factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama."

Presentada por: Gilberto Mandujano Lázaro Matrícula: 14-104-0077

Maestría/Doctorado en: Maestría en Ciencias Genómicas

Considero que cumple con los requisitos académicos, por lo que otorgo mi **VOTO APROBATORIO** para presentar el Examen de grado.

A t e n t a m e n t e



Nombre y firma del Lector/a

Martha Gocupero Manroy

C.c.p. Interesado

FORMATO 4 VOTO APROBATORIO DE LECTOR

México, D.F. a 25 de noviembre de 2016

Mtro. José Luis Fernández Silva
Coordinador de Certificación y Registro
P r e s e n t e

Por este medio me permito informarle que después de haber revisado la tesis, titulada:

"Análisis del miR-204 en la regulación de la angiogénesis a través de la modulación del

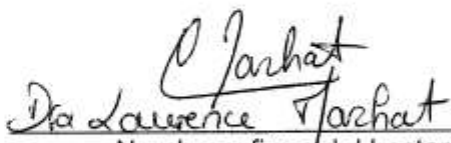
factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama."

Presentada por: Gilberto Mandujano Lázaro Matrícula: 14-104-0077

Maestría/Doctorado en: Maestría en Ciencias Genómicas

Considero que cumple con los requisitos académicos, por lo que otorgo mi **VOTO APROBATORIO** para presentar el Examen de grado.

A t e n t a m e n t e


Nombre y firma del Lector/a

C.c.p. Interesado

FORMATO 4 VOTO APROBATORIO DE LECTOR

México, D.F. a 25 de noviembre de 2016

Mtro. José Luis Fernández Silva
Coordinador de Certificación y Registro
P r e s e n t e

Por este medio me permito informarle que después de haber revisado la tesis, titulada:

"Análisis del miR-204 en la regulación de la angiogénesis a través de la modulación del

factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama."

Presentada por: Gilberto Mandujano Lázaro Matrícula: 14-104-0077

Maestría/Doctorado en: Maestría en Ciencias Genómicas

Considero que cumple con los requisitos académicos, por lo que otorgo mi **VOTO APROBATORIO** para presentar el Examen de grado.

A t e n t a m e n t e



Rubiceli Medina Aguilera
Nombre y firma del Lector/a

C.c.p. Interesado

FORMATO 5 FECHA DE EXAMEN DE GRADO

México, D.F. a 29 de noviembre de 2016

El que suscribe, Dr. Mario César López Camarillo, profesor de la academia del Posgrado en Ciencias Genómicas del Plantel del Valle, considero que la tesis cumple con los requisitos académicos para programar el EXAMEN DE GRADO del egresado:

Nombre: **Gilberto Mandujano Lázaro**

Matrícula: **14-104-0077**

Maestría/Doctorado: **Maestría en Ciencias Genómicas**

Nombre de la tesis: "Análisis del miR-204 en la regulación de la angiogénesis a través de la modulación del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) en cáncer de mama."

Para el día 7 del mes de diciembre del presente año, en el plantel del Valle a las 12:00 en el aula A108.

Asimismo, se propone que el jurado este integrado por los siguientes profesores: (Especificar nombre completo, grado académico, academia o institución a la que pertenecen)

1. Dr. Mario César López Camarillo. PCG-UACM Presidente
2. Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez. PCG-UACM Secretario
3. Dra. Rosa Martha Yocupicio Monroy. PCG-UACM Vocal

Atentamente


Firma del Director(a)

C.c.p. Interesado(a)