

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Inhibición del eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 mediante el miR-3135b y su
impacto en la proliferación y apoptosis en cáncer colorrectal**

TRABAJO RECEPCIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

STEPHANIE IRAIZ NUÑEZ OLVERA

DIRECTOR

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARRILLO

CODIRECTORA

DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA

Ciudad de México, enero 2019.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra, María Elizabeth Álvarez Sánchez UACM.

Secretario: Dr, Mario César López Camarillo UACM.

Vocal: Dra, Alma Delia Campos Parra INCAN.

1^{er}. Suplente: Dra, Lilia López Cánovas UACM

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario Cesar López Camarillo
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alma Delia Campos Parra
Instituto Nacional de Cancerología.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA

Dra. Alma Delia Campos Parra

Investigador en Ciencias Médicas

Instituto Nacional de Cancerología

ASESORES

Dra. Lilia López Cánovas

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la elaboración de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su ayuda económica brindada mediante la beca otorgada durante el periodo de julio de 2016 a julio de 2018 con No. de becario: 789774 y a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM)

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Mario Cesar López Camarillo por aceptarme en su laboratorio para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Alma Campos, mi co-directora por su guía y aporte en el desarrollo de esta tesis y por su disponibilidad.

Quiero extender un sincero agradecimiento a la Dra. Martha Yocupicio, a la Dra. Elizabeth Álvarez y a la Dra. Lilia Lopez, por su paciencia y disponibilidad en la revisión de esta tesis. También a la Dra. Olga Nohemí Hernández por guíame durante la parte experimental y sobre todo la paciencia.

DEDICATORIAS

A Chayo, Toño y mis hermanas por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años. Espero pueda seguir abusando de sus confianza otros 4 años más.

Jon, tú eres esa única persona que le permitiría ser reducido a tamaño microscópico y nadar dentro de mí en una pequeña máquina sumergible. Gracias por animarme y enseñarme

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1	Cáncer Colorrectal.....	6
1.2	Clasificación y tratamiento del cáncer colorrectal.....	8
1.3	Respuesta patológica completa en cáncer de colorrectal.....	10
1.4	MicroRNAs: nuevos reguladores de la expresión génica.....	10
1.5	Biogénesis de los miRNAs.....	11
1.6	MicroRNAs asociados a respuesta patológica completa en cáncer colorrectal.....	14
2.	ANTECEDENTES DEL PROYECTO.....	16
2.1	Perfil de expresión de microRNAs asociados a la RPC en pacientes mexicanos.....	16
2.2	El miR-3135b se encuentra reprimido en los pacientes con cáncer colorrectal que no presentaron RPC.....	18
2.3	Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.....	21
2.4	El miR-3135b podría regular la integridad del aparato de Golgi en respuesta al daño del ADN con agentes quimio-radioterapéuticos.....	23
2.5	Consecuencias de la dispersión del aparato de Golgi.....	25
2.6	El miR-3135b podría regular a SOX9 y el fenotipo troncal asociado a la respuesta a la terapia.....	27
2.7	Consecuencias de la desregulación del eje GOLPH3/ST6GAL1/AKT/mTOR/SOX9.....	27
3.	JUSTIFICACIÓN.....	32
4.	HIPOTESIS.....	33
5.	OBJETIVO GENERAL.....	34
6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
6.	METODOLOGÍA.....	36
6.1	MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON.....	36
6.1.2	Condiciones de cultivo de las líneas celulares.....	36

6.1.3 Subcultivo de líneas celulares.....	36
6.1.4 Congelamiento de las líneas celulares.....	37
6.1.5 Descongelamiento de las líneas celulares.....	37
6.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MIR-3135B EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL.....	37
6.2.1 Lisis y extracción de ARN total a partir de las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y SW480 y células de colon normal CRL-1790.....	37
6.2.2 Análisis de expresión del miR-3135b en las líneas celulares HCT-15, SW480 y CRL-1790.....	38
6.2.3 Cálculo de la IC-50 de DOXO y 5-FU.....	39
6.3 RESTAURACIÓN DEL MIR-3135B Y SU RESPUESTA EN LA ORGANIZACIÓN DEL APARATO DE GOLGI, PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA CON QUIMIOTERAPÉUTICOS.....	40
6.3.1 Transfección del precursor del miR-3135b.....	40
6.3.2 Ensayo de la proliferación de células HCT-15 transfectadas con el miR-3135b.....	41
6.3.3 Cuantificación de células apoptóticas mediante Anexina-V.....	42
6.3.4 Efectos del miR-3135b sobre la morfología del aparato de Golgi mediante microscopia confocal.....	42
6.5 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL EJE GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9.....	43
6.5.1 Obtención de los extractos proteicos.....	43
6.5.2 Cuantificación de las proteínas.....	44
6.5.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	44
6.5.4 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	44
6.5.5 Ensayos de inmunodetección.....	45
7. RESULTADOS.....	46
7.1 Expresión relativa del miR-3135b en líneas celulares de cáncer colorrectal.....	46

7.2 Expresión del miR-3135b en respuesta al daño al DNA en líneas celulares de cáncer colorrectal.....	48
7.3 Restauración del miR-3135b en la línea celular HCT-15.....	52
7.4 Expresión del eje GOLPH3/AKT-mTOR/ SOX9 en células HCT-15.....	53
7.5 Ensayo de la proliferación celular en la línea celular HCT-15.....	57
7.6 Ensayo de apoptosis en la línea celular HCT-15 transfectada con el miR-3135b.....	59
7.7 Ensayo de WB para determinar la presencia de daño al DNA.....	61
7.8 Visualización de la morfología de aparato de Golgi por Inmunofluorescencia.....	63
8. DISCUSIÓN.....	65
9. CONCLUSIONES.....	69
10. BIBLIOGRAFÍA.....	70
11. APENDICE.....	77

Abreviaturas

5-FU	5-Flurouracil
AJCC	American joint committee on cancer
AKT	Proteína quinasa B
ARNm	ARN mensajero
CCR	Cáncer colorectal
CEA	Antígeno Carcino embrionario
CO ₂	Dióxido de carbono
CPT	Camptotesina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DOXO	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilendaminotetracético
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GOLPH3	fosfoproteína 3 del aparato de Golgi
GRT	Grado de regresión tumoral
Gy	Grays
HGM	Grupo de alta movilidad

IC50	Concentración media letal 50
kDa	Kilodaltones
KEGG	Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes
miRNAs	microRNAs
mTOR	Proteína blanca de la rapamicina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MYO18A	miosina 18ªA
Nt	Nucleótidos
°C	Grados centígrados
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pre-miRNA	MicroRNA precursor
Pri-miRNA	MicroRNA primario
QRTn	Quimio-radioterapia neoadyuvante
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN

RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	ARN mensajero
RPC	Respuesta patológica completa
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
RTK	Receptores tirosina cinasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
ST6GAL1	Beta-Galactoside Alpha-2,6-Sialyltransferase 1
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tampón de Tris, Borato y EDTA
TRBP	Proteína TAR de unión a RNA
Wb	Western blot
XPO5	Exportina 5
uL	Microlitros

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Anatomía del intestino grueso.....	5
Figura 2. Biogénesis de microRNAs.....	12
Figura 3. Mapa de calor de microRNAs desregulados en pacientes RYAN 3 vs RYAN 0.....	16
Figura 4. Vías de señalización potencialmente afectadas por la desregulación del miR-3135b.....	18
Figura 5. Predicción de genes blancos y rutas de señalización moduladas por el miR-3135b.....	19
Figura 6. Esquemas de la vía PI3K / AKT / mTOR.....	21
Figura 7. La sialilación aberrante.....	25
Figura 8. Genes blanco predichos del miR-3135b que participan en el fenotipo troncal.....	28
Figura 9. Modelo de trabajo hipotético de la participación del miR-3135b en el eje GOLPH3/ST6GAL1/AKT/mTOR/SOX9 en respuesta al daño del ADN por los agentes quimio-radioterapéuticos.....	30
Figura 10. Expresión relativa del miR-3135b en células de cáncer de colon.....	44
Figura 11. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC50) de doxorubicina y 5-FU en células SW480 y HCT-15.....	47
Figura 12. Análisis de la expresión relativa del miR-3135b en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y HCT-15 tratadas con Doxorubicina y 5-Fluorouralcilo.....	48
Figura 13. Validación de la expresión del miR-3135b en células HCT-15.....	49

Figura 14. Expresión del eje GOLPH3/AKT-mTOR/ SOX9 en células HCT-15...	52
Figura 15. Ensayo de proliferación celular.....	54
Figura 16. Ensayo de apoptosis por medio de Anexina V en la línea celular HCT-15.....	55
Figura 17. Detección de daño al DNA.....	57
Figura 18. Visualización de la morfología del aparato de Golgi.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema TNM para la estadificación del cáncer colorrectal.....	7
Tabla 2. miRNAs como predictores de respuesta en cáncer colorrectal	14

RESUMEN

En este trabajo se caracterizaron por primera vez una parte importante de los aspectos moleculares relacionados a la respuesta patológica completa en pacientes con cáncer colorrectal en los que podría estar involucrado el microRNA miR-3135b. Este miRNA fue encontrado reprimido mediante análisis de perfil de expresión de miRNAs asociados a esta respuesta patológica completa. De acuerdo a los resultados bioinformáticos y experimentales de este trabajo, el miR-3135b podría estar modulando de forma negativa un novedoso mecanismo de sobrevivencia de las células tumorales frente a los agentes de quimioterapia llamado el eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9.

La activación de este eje surge como un mecanismo de defensa frente a agentes anti-cancerosos como doxorrubicina (DOXO), camptotecina (CPT), 5-fluorouracilo (5-FU) y radiación Ionizante (RI), teniendo como consecuencia la dispersión del aparato de Golgi vía la proteína GOLPH3, de tal manera que en respuesta a la dispersión del Golgi los patrones de glicosilación cambian de manera dramática para favorecer la hipersialilación de proteínas de membrana y receptores. Esta situación favorece la adquisición del fenotipo cáncer stem cell al incrementar la expresión de SOX9 y la transducción de la señal mediada por PI3K/AKT-mTOR.

Los resultados de RT-PCR demostraron que la expresión relativa del miR-3135b se encontró reprimida en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15, además, al restaurar la expresión del miR-3135b se observaron favorecidos los eventos de apoptosis/necrosis, así como una inhibición en la proliferación celular y en relación a la dispersión del aparato de Golgi se observó que este microRNA puede abatir la dispersión del aparato de Golgi generada por la exposición al 5-FU.

En relación a la modulación del eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9, ensayos de western blot mostraron una reducción significativa en la expresión de estas proteínas en las células que fueron transfectadas con este el precursor del miR-3135b lo que sugiere que es blanco molecular de estas proteínas del eje. Nuestros

datos aportaron nuevos conocimientos sobre potenciales mecanismos de la respuesta patológica completa que pueden estar siendo regulados por los microRNAs por vías no estudiadas completamente todavía.

ABSTRACT

In this work, an important part of the molecular aspects related to the complete pathological response was characterized for the first time in patients with colorectal cancer in which microRNA miR-3135b could be involved. This miRNA was found repressed by expression profile analysis of miRNAs associated with this complete pathological response. According to the bioinformatic and experimental results of this work, miR-3135b could be negatively modulating a novel survival mechanism of tumor cells against chemotherapy agents named the GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 axis.

According to several reports, the activation of this axis arises as a defense mechanism against anti-cancer agents such as doxorubicin (DOXO), camptothecin (CPT), 5-fluorouracil (5-FU) and ionizing radiation (IR), resulting in dispersion of the Golgi apparatus by GOLPH3 protein pathway, in this pathway, in response to the Golgi dispersion, the glycosylation patterns change dramatically to favor the hypersialylation of membrane proteins and receptors. This situation favors the acquisition of the an stem cell cancer phenotype by increasing the SOX9 expression and signal transduction activation mediated by PI3K/AKT-mTOR.

The results of RT-PCR showed that the relative expression of miR-3135b was found repressed in colon cancer cell lines HCT-15, in addition, by restoring the expression of miR-3135b apoptotic/necrotic events in the cells were enhanced, an inhibition in cell proliferation was also observed and in relation to the dispersion of the Golgi apparatus it was observed that this microRNA can knock-down the dispersion of the Golgi apparatus generated by exposure to 5-FU. In relation to the modulation of the GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 axis, western blot assays showed a significant reduction in the expression of these proteins in the cells that were transfected with the mir3135b precursor, which suggests that this is indeed a molecular target of axis proteins. Our data provided new insights into potential mechanisms of the complete pathological response that may be being regulated by microRNAs through pathways not fully studied yet.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer colorrectal

El intestino grueso es un órgano con forma de tubo, de aproximadamente 1.5 metros de largo, que forma parte del tubo digestivo (1). Desde el punto de vista anatómico, se distinguen: el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente, el colon sigmoideo y el recto (**figura 1**), sin embargo, desde el punto de vista funcional, es más sencillo clasificarlo en dos partes: el colon derecho y el colon izquierdo. El colon derecho está compuesto por el ciego y el colon ascendente, funcionalmente es donde se desarrollan los procesos de fermentación y digestión por la flora bacteriana, así como la mayor parte de los procesos de absorción y secreción. El colon izquierdo, constituido por el colon descendente, el sigmoides y recto, tiene como tareas fundamentales el almacenamiento de las heces, la absorción agua y por último, su evacuación al exterior (2). Por su naturaleza biológica, el colon posee un alto recambio celular debido a su continua exposición a múltiples agentes de orden físico, químico y biológico, lo que incrementa la posibilidad de desarrollar diversas patologías, destacando el cáncer (2).

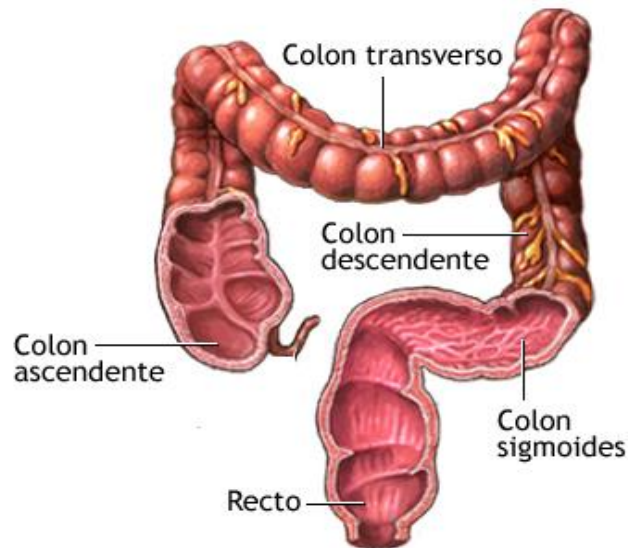


Figura 1. Anatomía del intestino grueso. Desde el punto de vista anatómico, se distinguen: el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente, el colon sigmoideo y el recto. Tomado de Enrique Rey Díaz-Rubio et al, 2010 (2)

El cáncer colorrectal (CCR) generalmente se refiere al estudio en conjunto de los tumores de colon y recto sin especificar su origen (3). Actualmente es uno de los cánceres más prevalentes en todo el mundo. Según cifras del GLOBOCAN (4) el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad con un estimado de 1.4 millones de casos y 693,900 muertes en 2012

En el 2015 la infografía publicada por el Instituto Nacional de Cancerología (InCAN) y el Instituto Nacional de Salud Pública lo situaron como el cuarto cáncer más frecuente en la población mexicana (5). Cada año, se presentan alrededor de 8,700 casos nuevos en el país, mientras que en todo el mundo la cifra llega a un millón 400 mil casos. Por otro lado, se estima que más del 60% de los pacientes con cáncer colorrectal son diagnosticados y tratados en estadios III y IV considerados como avanzados, lo cual disminuye considerablemente la sobrevivencia de los pacientes (5).

La carcinogénesis en colon y recto se debe a las interacciones entre el sujeto y factores ambientales, reguladas por el estilo de vida y por el fondo genético y epigenético de los individuos (6). El origen del CCR puede ser clasificado entre hereditario y el adquirido o esporádico. El cáncer hereditario constituye entre un 5% y 15% de los casos de CCR, donde existe una correlación directa con una serie de alteraciones genéticas específicas y hereditarias, que se agrupan en diferentes síndromes de CCR hereditario, entre los que cabe destacar el Síndrome de Lynch y la Poliposis Adenomatosa Familiar. Finalmente, el CCR adquirido o esporádico representa la mayoría de los casos de CCR (aproximadamente entre el 70-85%), y es atribuido al estilo de vida del paciente al no tener relación a causas genéticas, hereditarias o familiares (7). Más allá del estilo de vida, la inflamación crónica en el colon se ha descrito como un factor de riesgo del CCR que aumenta con el tiempo de padecimiento de la enfermedad (8). Muchos de los factores que influyen en la carcinogénesis colorrectal provocan una gran heterogeneidad de la enfermedad, condicionando las características moleculares del tumor y el pronóstico (9). Entre los factores de riesgo que promueven la aparición de CCR esporádico, se ha encontrado una asociación directa entre la edad avanzada de

los individuos y el sexo masculino (10). También en los últimos años las evidencias epidemiológicas muestran una asociación directa entre la presencia de CCR y la dieta rica en carnes rojas y pobre en fibra (11, 12), o el consumo de carne ahumada y procesada (13, 14).

1.2 Clasificación y tratamiento del cáncer colorrectal

En pacientes con CCR la estadificación es fundamental para definir el pronóstico y las distintas alternativas terapéuticas que incluyen la quimio-radioterapia neoadyuvante y resección quirúrgica (15). El sistema más usado para la estadificación de los cánceres de colorrectal es el sistema TNM de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) que analiza tres parámetros: tamaño del tumor (T), invasión a nódulos (N) y presencia de metástasis a distancia (M). (Tabla 1). Esta información es agrupada para poder asignar un estadio TNM específico que van desde el estadio 0 al IV (16).

Tabla 1. Sistema TNM para la estadificación del cáncer colorrectal. Tumor primario (T), Nódulo linfáticos (N) y Metástasis (M)

Clasificación TNM			
Estadio	T	N	M
Estadio 0	Tumor in situ	N0	M0
Estadio 1	T1-T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4	N0	M0
Estadio IIIA	T1-T2	N1	M0
Estadio IIIB	T3-T4	N1	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N2	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

El tratamiento del cáncer colorrectal consiste en la combinación de quimioterapia y radioterapia. La quimio-radioterapia neoadyuvante (QRTn) es el tratamiento que se utiliza antes del procedimiento quirúrgico y ha sido recomendada para los pacientes en estadios T2-T4 o pacientes con enfermedad ganglionar positiva (17,18). En la radioterapia se utilizan dosis de 1.8-2 Gy (Gray) durante 5-6 semanas (dosis total de 45-50 Gy), además de la administración simultánea de quimioterapia basada en 5-fluorouracilo (18,19). Se han utilizado varios regímenes quimioterapéuticos para la terapia neoadyuvante de cánceres colorrectales incluyendo infusión única de fluorouracilo, o en combinación con leucovorina (20). También se administran otros agentes como la capecitabina y el oxaliplatino (21). La quimioterapia adyuvante, posterior al tratamiento quirúrgico, en general ha sido altamente recomendada para pacientes con cáncer colorrectal en estadios T3 y T4 (9). Ha demostrado ser eficaz para reducir la recurrencia local y la mortalidad por cáncer colorrectal utilizando infusiones de 5-fluorouracilo (22); el régimen de Roswell Park (administración semanal fluorouracilo más leucovorina), el régimen FOLFOX (infusión de fluorouracilo y leucovorina más oxaliplatino) o CAPOX (capecitabina más oxaliplatino).

El 5-fluorouracilo es el agente de quimioterapia más utilizado de manera estándar, su mecanismo de acción consiste en inhibir competitivamente la enzima timidilato sintetasa provocando la deficiencia de timidina y por consiguiente la disminución de la síntesis ADN (23). Por otro lado, la radioterapia daña directamente a las moléculas de ADN, produciendo rupturas de doble cadena, lo conduce al daño o incluso a la muerte celular (24). A pesar de la combinación de ambos regímenes se obtienen efectos terapéuticos diferentes para diversas modalidades de quimio-radioterapia. En algunos ocurre la resistencia al tratamiento, lo cual es consecuencia de la desregulación de proteínas apoptóticas y de reparación del daño al DNA, lo cual produce inhibición de la apoptosis y aumento en la proliferación celular. Por otro lado, se han reportado pacientes que presentan sensibilidad al tratamiento lo cual ocasiona el arresto del ciclo celular, activación

de la apoptosis, disminución de la proliferación celular y del crecimiento tumoral (25).

1.3 Respuesta patológica completa en cáncer de colorrectal.

La respuesta patológica completa (RPC) se define como la ausencia de células tumorales residuales después del tratamiento quimio-radioterapéutico (26). Aproximadamente el 40% de los pacientes muestran una respuesta pobre o nula al tratamiento, mientras que se ha reportado una respuesta patológica completa en hasta el 20% de los casos (27,28). El grado de regresión tumoral (GRT) es una escala de RPC en pacientes que recibieron quimio-radioterapia seguida de resección quirúrgica. Uno de los sistemas GRT de mayor uso es el sistema Ryan (27). Se basa en el volumen de las células tumores residuales del tumor primario clasificando a los pacientes en 3 categorías: GRT0, sin células cancerosas viables, ni células individuales, ni grupos pequeños de células cancerosas, GRT2, cáncer residual excesivo, GRT3, cáncer residual extenso.

La identificación de biomarcadores con utilidad pronóstica y diagnóstica podría ayudar a la toma de decisiones clínicas con respecto a la necesidad de quimioterapia adyuvante. Muchos estudios han identificado biomarcadores moleculares de respuesta al tratamiento en cáncer colorrectal tales como la disminución del antígeno carcino-embriionario (CEA), ausencia de mutación en KRAS, APC, TP53, PIK3CA, disminución de Ku-70/80, SOX9 y los microRNAs los cuales han sido ampliamente aceptados como herramientas de pronóstico y predicción de las terapias en las últimas décadas (29).

1.4 MicroRNAs: nuevos reguladores de la expresión génica

Los miRNAs pertenecen a una familia de pequeños ARN (ácido ribonucleico) monocatenarios no codificantes de alrededor de 19-25 nucleótidos (nt) de largo, se pueden encontrar tanto en animales como en plantas y están involucrados en la regulación post-transcripcional (30). En 1993 fueron descritos por primera vez por

Victor Ambros y colaboradores, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. El grupo de investigadores estaba trabajando con el gen *lin-4* el cual es esencial para el desarrollo post-embriónico del nematodo. Lo único que sabían en ese tiempo era que en la etapa larvaria, *lin-4* regula negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Ellos encontraron que, *lin-4* no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos ARN's: uno de 22 nt y otro de aproximadamente 60 nt, el cual podría formar una estructura de tallo y burbuja y ser el precursor del ARN más corto (31). Posteriormente, se descubrió que la manera en la que el *lin-4* regula la producción de la proteína LIN-14 es mediante la unión de la región 3'UTR del ARN mensajero (ARNm) de *lin-14* por complementariedad de bases, evitando así su traducción (32). Estos datos sugirieron que los miRNAs reprimen la expresión génica al unirse directamente a la región 3' no traducida (UTR, del inglés untranslated region) de un ARNm blanco e inducen degradación o inhiben la traducción del transcrito de manera específica (33).

1.5 Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs se puede englobar en cinco pasos: 1: Los miRNA son sintetizados por la ARN polimerasa II (ARN pol II), que inicialmente produce un transcrito largo precursor. Durante la transcripción se forman regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla mediante apareamiento de secuencias complementarias, generando así un miRNA primario (pri-miRNA) de alrededor de 100 nt, que poseen una estructura de CAP en su extremo 5' UTR y son poliadenilados en su extremo 3' UTR, tal como ocurre con los ARNm celulares. (31). 2: El pri-miRNA es procesado por el complejo microprocesador conformado por la enzima Drosha y la proteína DGCR8. La estructura secundaria de tallo-burbuja del pri-miRNA es reconocida y procesada por la enzima Drosha, la cual posee actividad de RNAsa tipo III, generando precursores de 70-100 nt llamados miRNA precursores (pre-miRNA). El pre-miRNA es una secuencia que posee una estructura tallo-burbuja con una prolongación de dos uracilos en su extremo 3',

esta estructura funciona como un motivo de reconocimiento por la exportina 5. 3: La exportina 5, la cual interviene directamente en el transporte del pre-miRNA del núcleo al citoplasma en un proceso dependiente de Ran-GTP (33). 4: Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por DICER otra enzima del tipo RNasa III, que en conjunto con la proteína TRBP, recorta por fuera de la horquilla y genera un RNA de doble cadena imperfecto denominado miRNA/miRNA*. Posteriormente, TRBP recluta a la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2) al complejo miRNA/miRNA*-DICER y forma el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). La cadena complementaria del dúplex miRNA/miRNA* es liberada y degradada por AGO2. La proteína AGO2 guía al miRNA a la región 3' UTR del ARNm blanco donde se une de manera específica mediante complementariedad de la secuencia (34). 5: Si la complementariedad del miRNA con la secuencia del transcrito es perfecta se reclutarán las proteínas de desadenilación para iniciar la degradación del ARNm (**figura 2**). De manera alternativa, si la complementariedad del miRNA con su ARNm blanco es casi perfecta se inhibirá la traducción del transcrito (34).

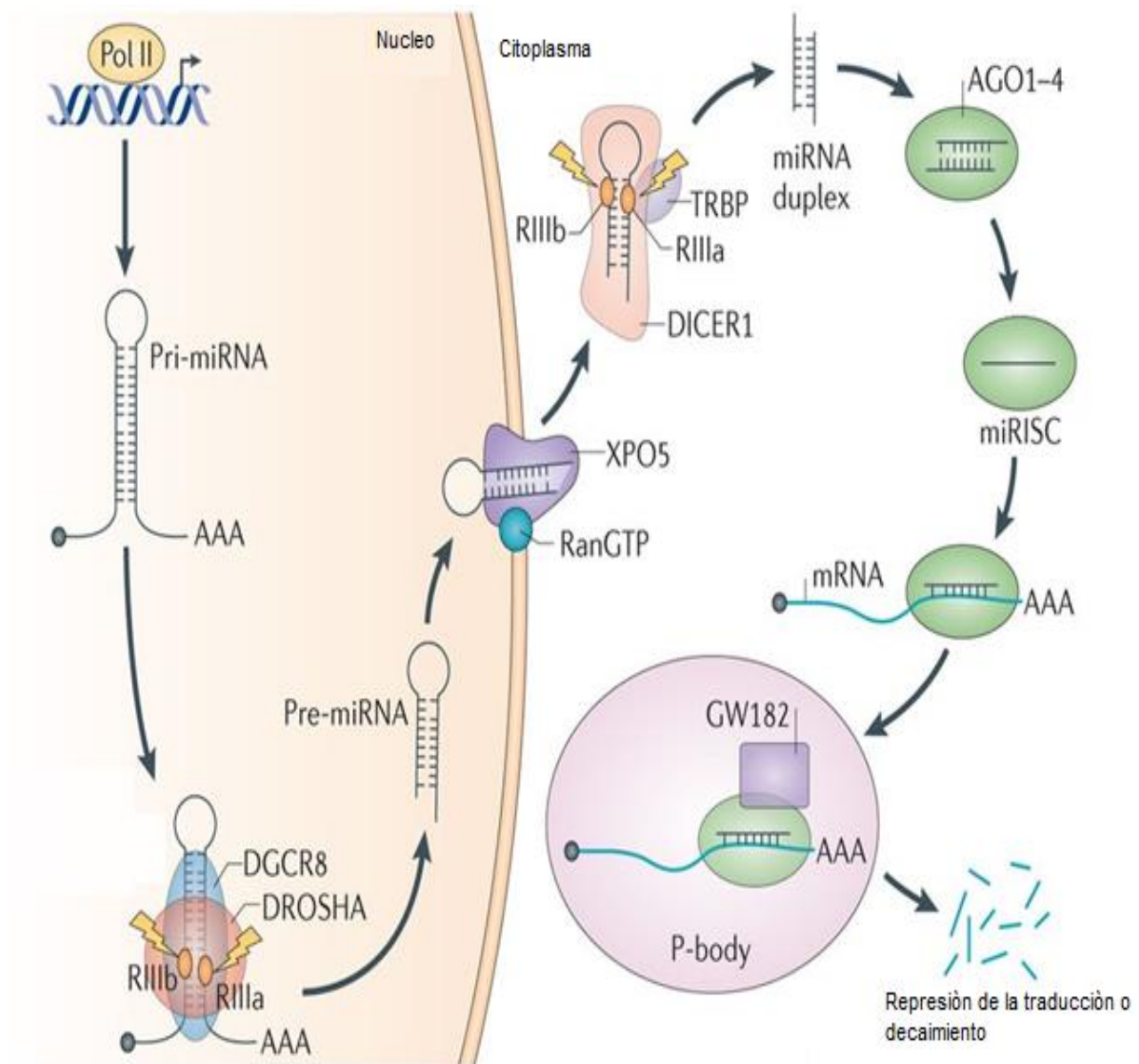


Figura 2. Biogénesis de los miRNAs. Los pri-miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II y pueden contener CAP y ser poliadenilados. Los pri-miRNA son procesados por Drosha, una enzima RNasa III y convertidos a pre-. Se caracterizan por tener una estructura dúplex imperfecta. Los pre-miRNA son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 y RanGTP. En el citoplasma, los pre-miRNA son transformados por Dicer, otra enzima del tipo RNasa III, generando la estructura híbrida miRNA/miRNA*. La unión de estos dúplex de RNA a proteínas como la Argonata 2, libera el miRNA*. El miRNA dirige la asociación de RISC a sitios específicos en la región 3' no traducida del RNAm blanco. Tomado de Croce et al 2009 (34)

1.6 MicroRNAs asociados a respuesta patológica completa en cáncer colorrectal.

Los miRNAs han sido usados ampliamente en cáncer por tener la capacidad de regular la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores. Se han publicado diferentes estudios en los cuales se analiza su valor predictivo como posibles indicadores de una RPC. Por ejemplo, en el estudio de Svoboda y colaboradores (35) se reportaron por primera vez alteraciones en la expresión de miRNAs posterior al tratamiento de QRTn en CCR. En este estudio se analizaron 31 pacientes con cáncer colorrectal localmente avanzado y se encontró un aumento significativo de los niveles de expresión del miR-125b y miR-137 después de 2 semanas de QRTn. Además, también encontraron que altos niveles de miR-125b y miR-137 se asociaron con una pobre respuesta clínica al tratamiento (35). Otra de las publicaciones, es la del grupo de Vittoria Scarpato, los cuales analizaron 38 biopsias de tumores primarios de pacientes con cáncer colorrectal localmente avanzado sometidos a QRTn. Los autores encontraron que el miR-622 y miR-630 se encontraron reprimidos en pacientes sin RPC (36). Sin embargo, aún no se define una firma única de miRNAs que sea capaz de predecir la RPC (Cuadro 2), por lo que se considera importante realizar más estudios que estén orientados a definir biomarcadores confiables que puedan predecir el éxito o fracaso de las terapias.

Cuadro 2. miRNAs como predictores de respuesta en cáncer de colorrectal.

Investigaciones de miRNAs asociados a la RPC en el cáncer colorrectal expresados diferencialmente en pacientes respondedores y no respondedores a las terapias.

Estudio	Espécimen	Radioterapia dosis	Identificación de miRNAs en pacientes sin respuesta
Svoboda et al. 2009 (35)	Biopsias de tejido tumoral	50.4 Gy/28 + 5-FU	↑ miR125b y miR137
Della Vittoria Scarpati et al. 2012 (36)	Biopsias de tejido tumoral	45 Gy Capecitabina + oxaliplatino	↑ miR-622 y miR-630
Miller et al. 2013 (37)	Biopsias de tejido tumoral	50.4 Gy+ capecitabina	↓ miR-143-5p y miR-145-5p
Svoboda et al. 2012 (38)	Biopsias de tejido tumoral	45 Gy + Capecitabina/5-FU	↑ miR190b y miR-29b-2 ↓ let7e, miR-196b, miR-450a, miR-450b-5p y miR-99 ^a

2. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

2.1 Perfil de expresión de microRNAs asociados a la RPC en pacientes mexicanos

El grupo de la Dra. Erika Ruiz Garcia del InCAN, determinó una huella de expresión de miRNAs asociados a la RPC en 10 pacientes mexicanos con cáncer de colorrectal avanzado (estadio T3-4 o N+), tratados con QRTn 45Gy + capecitabina (Datos no publicados). La respuesta al tratamiento se evaluó de acuerdo al sistema de clasificación Ryan, identificando 5 pacientes respondedores (Ryan 0, sin células cancerosas viables) y 5 pacientes no respondedores (Ryan 3, con residuos extensos de células cancerosas). Con la finalidad de obtener el perfil de expresión de miRNAs asociados a RPC utilizaron el GenChip Array 4.0 (Affimetrix) el cual contiene un total de 30,231 sondas de miRNAs de los cuales 2,578 pertenecen a miRNAs maduros y 2,025 a pre-miRNAs. En la Figura 3 se muestra el mapa de calor que agrupa los 120 miRNAs que tuvieron una expresión diferencial en los tumores de pacientes Ryan 3 comparado con Ryan 0 (fold change ≥ 1.5 ; $P < 0.05$).

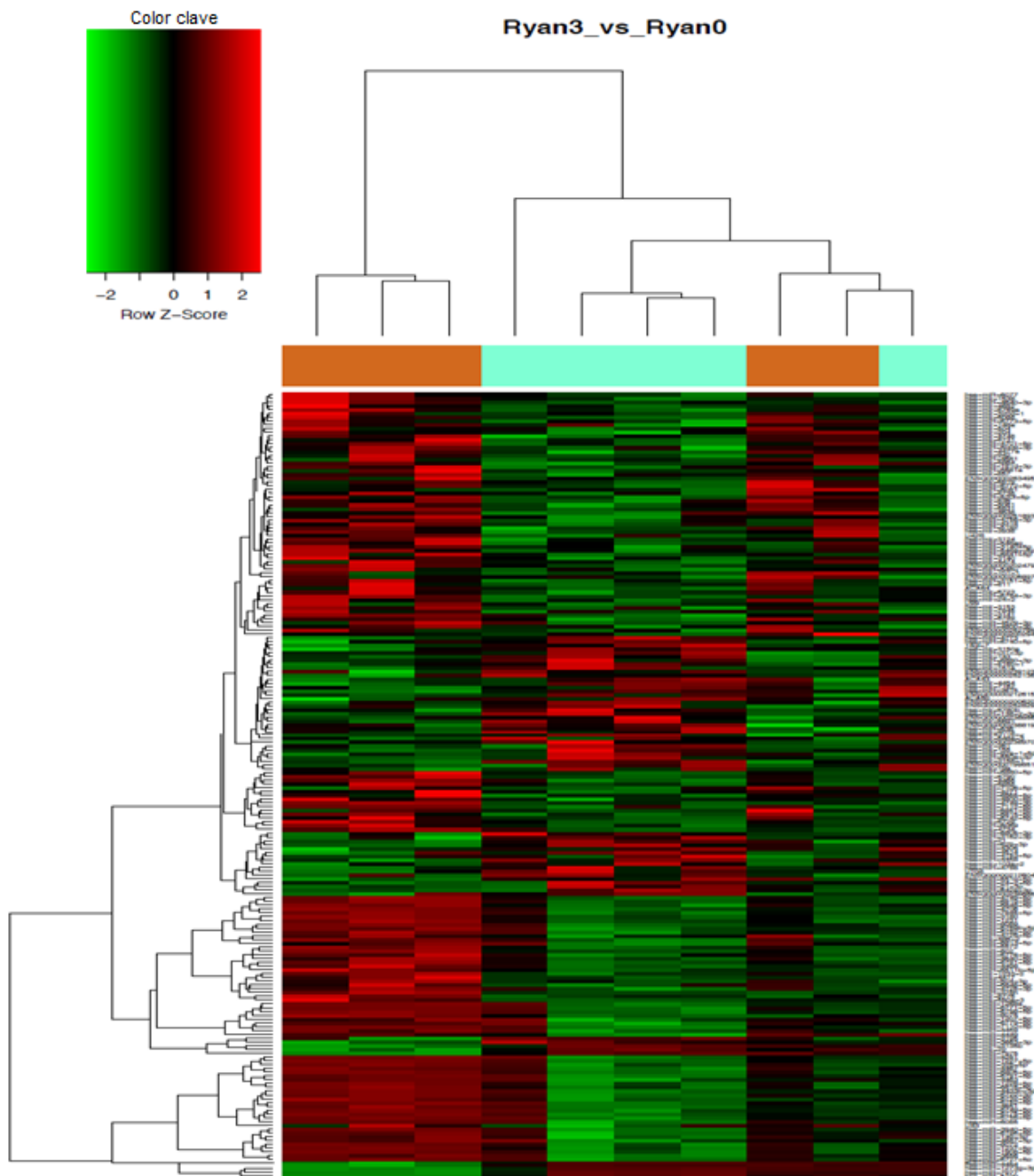


Figura 3 Mapa de calor de los niveles de expresión de miRNAs diferencialmente expresados entre pacientes Ryan 0 y Ryan 3. Agrupación de 10 muestras de cáncer de colorrectal (columnas) utilizando los datos de los 120 miRNAs expresados diferencialmente (filas). El resultado clínico de los pacientes se indica mediante cuadrados de color: café para no-pCR y azul para pCR. Tomado de Erika Ruiz Garcia et al, datos no mostrados.

2.2 El miR-3135b se encuentra reprimido en los pacientes con cáncer colorrectal que no presentaron RPC.

De los 120 miRNAs que mostraron una expresión diferencial (fold change ≥ 1.5 ; $P < 0.05$), en particular nos interesó estudiar el miR-3135b debido a que presentó una disminución importante en los pacientes sin RPC (fold Change -4.263). El miR-3135b ha sido reportado en tres investigaciones que van desde síndromes coronarios agudos, hasta calcificación de arterias coronarias, sin embargo su función en cáncer aún no ha sido revelada. Para determinar una posible relación entre la desregulación del miR-3135b y las vías de señalización asociadas con la resistencia al tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal utilizamos la herramienta Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) que incluye la herramienta de predicción de blancos mirPath v.3. Los resultados indican que el miR-3135b podría modular un grupo de genes que participan en diversas vías de señalización implicadas en el mantenimiento del fenotipo tumoral incluyendo ErbB, adhesión focal, Wnt, mTOR, MAPK y VEGF entre otras. En conjunto, estas vías son responsables de regular procesos celulares oncogénicos como la inhibición de la apoptosis, el ciclo celular, la angiogénesis, el metabolismo y la resistencia a la quimioterapia (37). En particular, se encontró que mTOR podría ser una de las vías más afectadas significativamente por el miR-3135b (**Figura 4**), teniendo como blancos específicos a los genes PI3K, AKT, PRAS40 y raptor del complejo 1 de mTOR y efectores río abajo como ATG1, S6K, S6 y eIF4B, entre otros (**Figura 5**). De manera particular la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR ha sido considerada fundamental para que las células cancerosas adquieran capacidades que les permitan sobrevivir a la quimio-radioterapia (37).

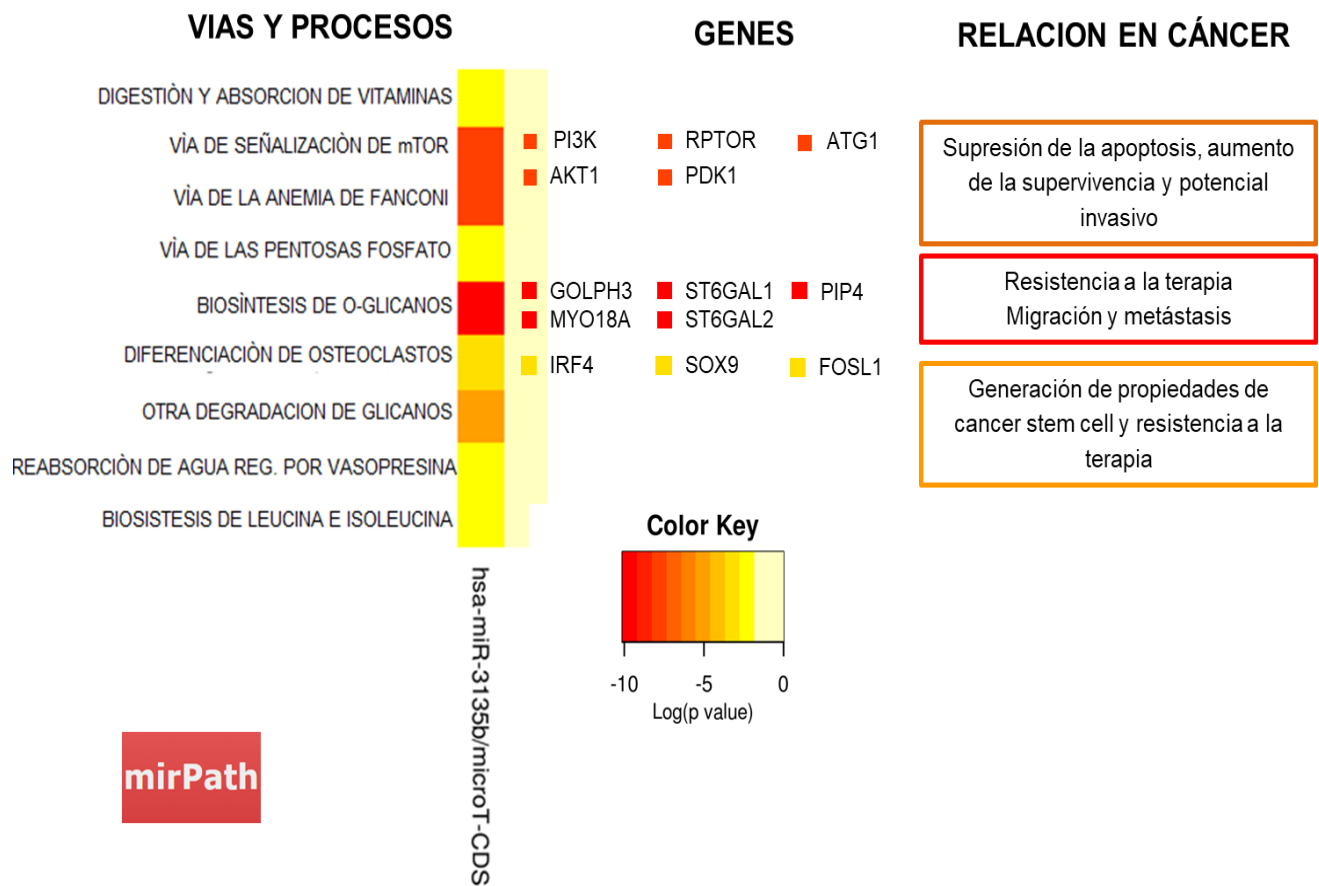


Figura 4. Vías de señalización potencialmente afectadas por la desregulación del miR-3135b. Las columnas muestran las vías y procesos celulares más significativos de acuerdo al software microT-CDS. El color indica la significancia estadística Log (p value) de la predicción tomando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Realizado en DIANA-miRPath v3, 2018.

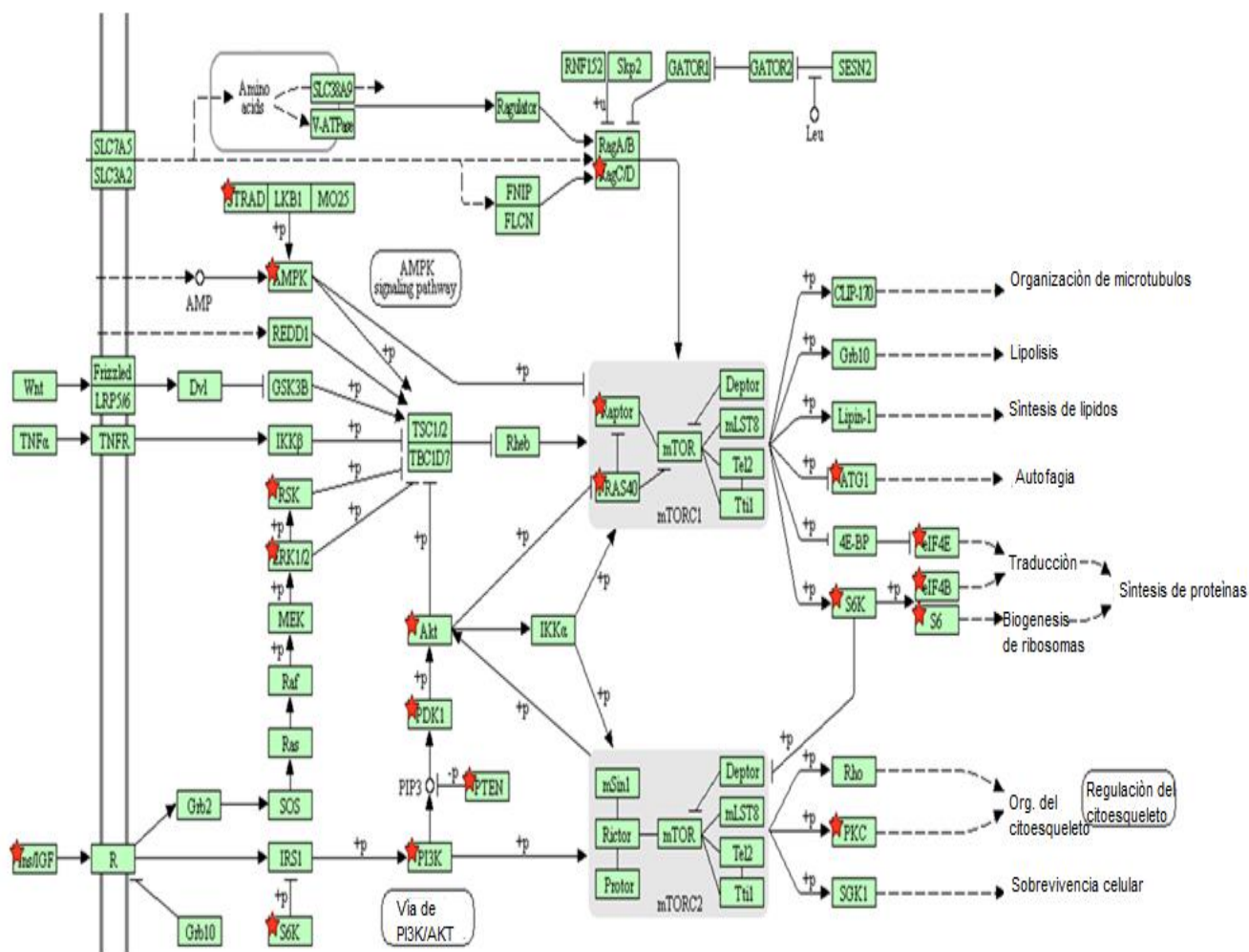


Figura 5. Predicción de genes blancos y rutas de señalización moduladas por el miR-3135b. El recuadro rojo indica el eje PI3K/AKT/mTOR. Las flechas continuas indican activación de proteínas en las rutas. Las flechas punteadas indican los procesos celulares afectados por las rutas de señalización. Realizado en Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2018.

2.3 Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR

La ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR juega un papel esencial en el cáncer, contribuyendo a la progresión del ciclo celular, disminuyendo la apoptosis e incrementando las capacidades metastásicas de las células cancerígenas (38).

La ruta PI3K/Akt/mTOR activa comienza con el reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática cuando los residuos de tirosina fosforilados de los receptores tirosina quinasa interaccionan con la subunidad reguladora de PI3K, p85. PI3K es un heterodímero que se compone en una subunidad reguladora, p85, y una subunidad catalítica, p110, que transfiere un grupo fosfato al fosfatidil inositol, 4,5-bisfosfato (PIP2), generando el fosfatidil inositol, 3,4,5-trifosfato. Existen evidencias de que PTEN desfosforila PIP3, actuando como regulador negativo de la ruta de señalización de PI3K (39).

PIP3 actúa como ligando para reclutar a la serina/treonina quinasa Akt (también llamada proteína-quinasa B, PKB) a la membrana plasmática a través de la interacción con el dominio con homología plestrina (PH) de Akt. Una vez en la membrana, Akt es fosforilado por una serina/treonina quinasa, la quinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1), resultando en la activación de Akt.

La activación de Akt controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las blancos relacionados a la apoptosis, con el resultado neto del incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo (38).

Específicamente, la fosforilación de mTOR por Akt ocurre a través de la represión del complejo de esclerosis tuberosa (TSC). El complejo TSC es un heterodímero que consiste en tuberina (TSC2) y hamartina (TSC1), que actúa inhibiendo a la proteína Rheb, la cual actúa como un activador de mTOR (**figura 6**). Debido a la fosforilación del complejo TSC2, Akt disocia el complejo, permitiendo a Rheb activar a mTOR, teniendo como consecuencia la inhibición de la autofagia, y apoptosis, aumento de la proliferación y de la síntesis de proteínas (40).

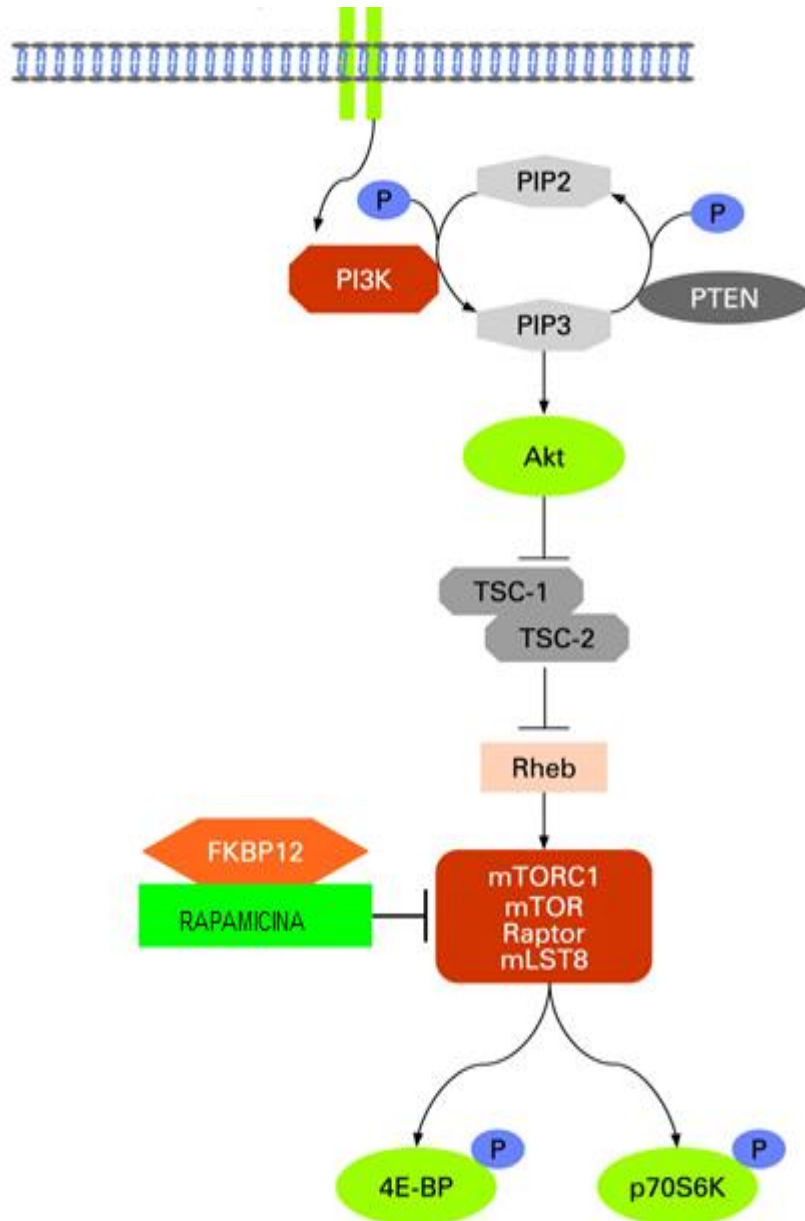


Figura 6. Esquemas que muestran la vía PI3K / AKT / mTOR. La activación de AKT permite la fosforilación del TSC2, inhibiendo la el complejo hamartina / tuberina y en consecuencia se activa el complejo 1 de mTOR. Tomado de Zhang Y. et al 2003 (40)

2.4 El miR-3135b podría regular la integridad del aparato de Golgi en respuesta al daño del ADN con agentes quimio-radioterapéuticos.

De manera interesante, el miR-3135b podría también regular procesos relacionados con el funcionamiento del aparato de Golgi como la biosíntesis y degradación de O-glicanos (**Figura 5**). Por ejemplo, se identificaron genes relacionados al aparato de Golgi como la miosina 18A (MYO18A) y la fosfoproteína 3 del aparato de Golgi (GOLPH3), implicados en procesos de glicosilación, mantenimiento de la estructura de Golgi y de vincular las membranas al citoesqueleto (41). *Kunli Zhun y cols.* describen por primera vez que GOLPH3 y mTOR se encuentran sobreexpresados en pacientes con cáncer colorrectal localmente avanzado y esta sobreexpresión se relaciona con un mal pronóstico (42). Por otro lado, los análisis en el número de copias identifican una amplificación frecuente de la región 5p13 en varios tipos de tumores sólidos incluyendo pulmón, colorrectal, mama, próstata y melanoma (43). Scott y cols. identificaron a la proteína de Golgi, GOLPH3, como el gen candidato de la amplificación (43). Celularmente, GOLPH3 se localiza en la red trans-Golgi e interactúa con componentes del retrómero, que en levadura ha sido ligado a la proteína blanco de la rapamicina (TOR). Debido a lo observado en levadura, se analizó el efecto de mTOR en la regulación del tamaño celular donde el silenciamiento de GOLPH3 llevó a una reducción significativa del tamaño celular y de la modulación de los niveles de fosforilación de AKT y S6K (43). Estos datos genómicos y biológicos en levaduras y humanos establecen a GOLPH3 como un nuevo oncogén, capaz de modular la respuesta a la rapamicina.

El gen *GOLPH3* codifica para la fosfoproteína 3 del aparato de Golgi, una proteína de 34 kDa de unión al fosfatidilinositol-4 fosfato (PI4P) la cual se encuentra enriquecida en la cara *trans* del aparato de Golgi y está implicada en diversas funciones celulares como reciclaje de receptores a través de endosomas en conjunto con la proteína retromérica VPS35 (44). Otras de sus funciones son la regulación de la masa mitocondrial a partir de la biogénesis de lípidos y el

mantenimiento de la estructura del Golgi, función por la cual se ha visto involucrado en una nueva vía de respuesta al daño del DNA (44). *Farber-Katz y cols.*, describen esta nueva vía, como una “*dispersión Catastrófica del aparato de Golgi*”. Induciendo daño al DNA con diferentes agentes como camptotecina (CPT), doxorubicina (DOXO) y radiación ionizante (IR) en células HeLa, se observó una dispersión del aparato de Golgi, que era independiente de la apoptosis (45). Los autores comprueban que GOLPH3 y MYO18a son responsables de este evento, ya que al silenciar la expresión de ambos genes mediante un siRNA se evita la dispersión en respuesta al daño del DNA con CPT (45). Este fenómeno está acompañado por la fosforilación de GOLPH3 (Thr143 y Thr148), la cual es mediada por la cinasa DNA-PK en respuesta al daño (45). Para determinar si DNA-PK, GOLPH3 y MYO18A podrían contribuir a la sobrevivencia de las células después de la inducción del daño al DNA, las células HeLa silenciadas para DNA-PK, GOLPH3 y MYO18A fueron tratadas con DOXO a diferentes concentraciones, y así se observó un incremento significativo en los niveles de caspasa-3 y una disminución en el número de colonias en comparación al control. Este resultado junto con datos obtenidos por otro autores indicaron que GOLPH3 podría participar en una vía de protección de las células a la apoptosis seguida de la inducción del daño al DNA con agentes quimioradioterapéuticos (45, 46,47).

2.5 Consecuencias de la dispersión del aparato de Golgi.

La glicosilación anormal de las células de cáncer es uno de los cambios fenotípicamente comunes que se caracteriza por el aumento de la sialilación (**figura 7**) y este aumento se asocia con el fenotipo troncal, la inhibición de la apoptosis y por consiguiente la resistencia a la terapia (48). Se especula que la perturbación en la morfología de Golgi puede conducir al reordenamiento de estas enzimas de sialilación (49). La elevada expresión de la β -galactosidasa α 2,6-sialiltransferasa-1 (ST6Gal-1) ha sido observada en el cáncer colorrectal y su sobreexpresión favorece la migración celular así como la activación de AKT. Además se ha reportado que ambos efectos pueden ser bloqueados en células de cáncer de mama con expresión disminuida de GOLPH3 (50). Otro reporte indica que la sobreexpresión de ST6Gal-I en las células de cáncer colorrectal modula positivamente el crecimiento esferoide de las CSC, la resistencia a la quimioterapia y el potencial de iniciación tumoral. Sorprendentemente, ST6Gal-I también se ha visto implicada en la regulación de la expresión de factores de transcripción como SOX9 (51), el cual tiene un papel crucial en el cáncer, así como el mantenimiento de la CSC. En dicha investigación se reporta que la expresión de SOX9 fue reprimida en células de cáncer de ovario (SKOV3-ST6Gal-I knockdown) y en células de cáncer de colon (HD3- ST6Gal-I knockdown). Por el contrario, la sobreexpresión de ST6Gal-I en las células de cáncer ovárico induce nuevamente la expresión de SOX9 (51).

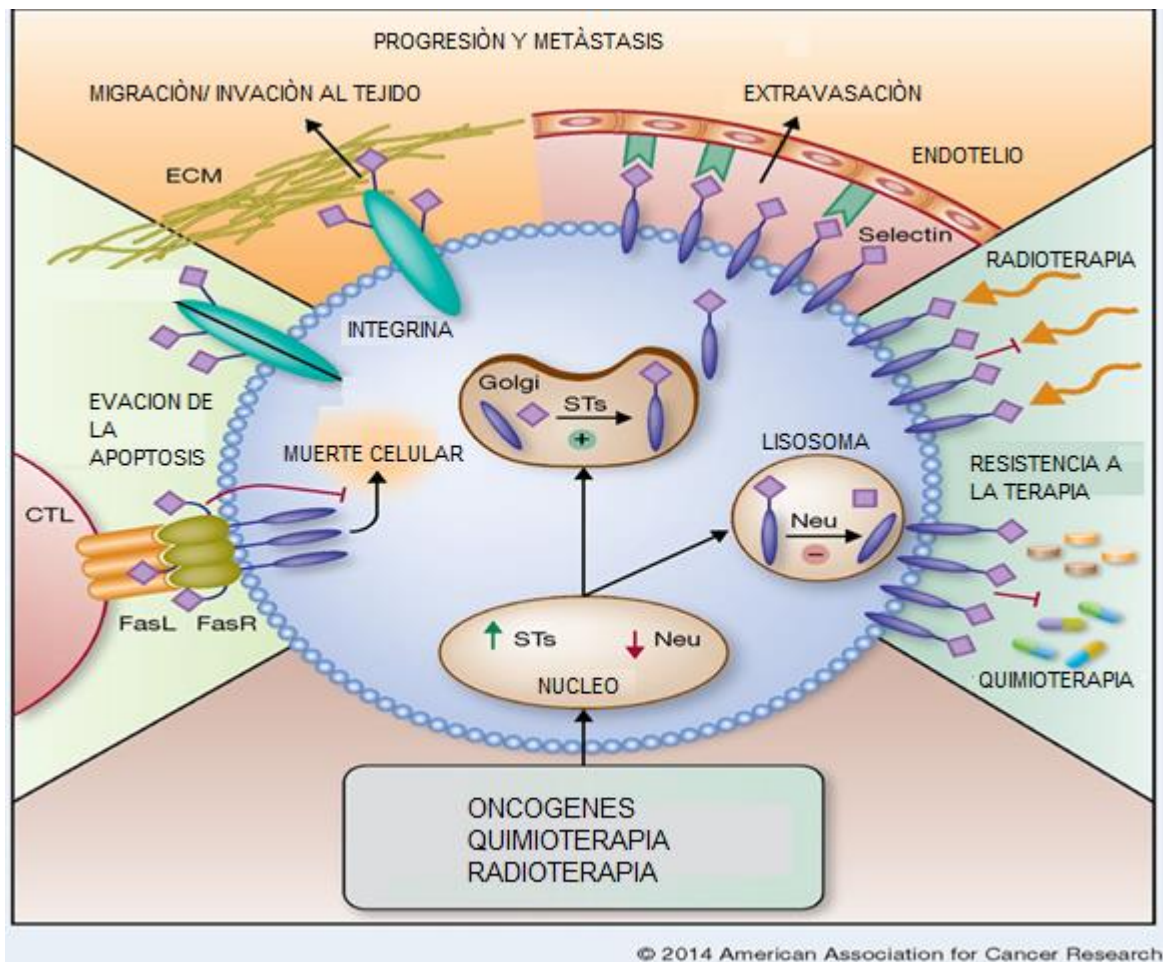


Figura 7. La sialilación aberrante en cáncer. El incremento de ácido siàlico favorece el crecimiento y la progresión del tumor. Varios factores (por ejemplo, oncogenes, hormonas o quimioterapia) aumentan la expresión de sialiltransferasas (ST) y regulan a la baja la expresión de sialidasas (Neu). Como resultado, la síntesis de estructuras sialiladas incrementa en el Golgi lo que lleva a la acumulación de estructuras hipersialiladas en la membrana celular. La expresión aberrante de los sialoglicanos deteriora la señalización apoptótica por el receptor Fas, facilita la unión a la ECM o selectinas, permitiendo la migración / invasión tisular y metástasis, respectivamente y media resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Tomada y modificada de Schultz MJ et al, 2016 (51)

2.6 El miR-3135b podría regular a SOX9 y el fenotipo troncal asociado a la respuesta a la terapia.

El fenotipo troncal característico de las células madre o progenitoras está regulado por proteínas que poseen la capacidad de modular la pluripotencia y auto renovación tales como OCT, KLF4, c-MYC, SOX2 y SOX9 (52). En particular, el gen de la región Y determinante del sexo-box 9 (SOX9) codifica para un factor de transcripción de la familia SOX que se caracteriza por la presencia de una secuencia homóloga similar al de las proteínas del grupo de alta movilidad (HMG). El dominio SOX-HMG reconoce la secuencia CCTTGAG en diversos promotores y activa la transcripción de genes que poseen un papel crítico en el desarrollo embrionario, compromiso del linaje y el mantenimiento de células madre (52-55). En diversos tipos de cáncer se han aislado subpoblaciones de células tumorales que expresan de manera aberrante genes embrionarios por lo que estas células han sido denominadas “cancer stem cell-like” o células tumorales similares a las células madre. En particular, la expresión aberrante de SOX9 se ha asociado al mantenimiento de un fenotipo similar al troncal observado en las células progenitoras embrionarias ya que promueve la autorenovación, la formación de esferas y el desarrollo y progresión tumoral. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la adquisición del fenotipo troncal de las células tumorales no han sido completamente dilucidados (56). Por otro lado, algunas investigaciones han reportado que la inhibición de SOX9 resulta en la sobreexpresión de p21, la inducción de caspasas 3/7 y la inhibición de Bcl-2 que resulta en disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis (56). La sobreexpresión de SOX9 se ha reportado en diversos tipos de cáncer incluyendo de mama, próstata, pulmón y colorrectal (57). La sobreexpresión de SOX9 se asocia con una pobre respuesta a la terapia de 5-FU y un mal pronóstico en cáncer colorrectal (58).

De manera importante, la regulación de la expresión de SOX9 está sujeta a mecanismos regulatorios a nivel transcripcional, epigenético, post-transcripcional y traduccional. A nivel postranscripcional los microRNAs (miRNAs) representan un

mecanismo importante de regulación de SOX9. Por ejemplo, el miR-592 y miR-138 se han reportado como reguladores negativos de la expresión de SOX9 en cáncer de pulmón. De manera similar, el miR-32 regula a SOX9 en cáncer hepático. Como consecuencia de la inhibición de SOX9 se promueve la apoptosis, disminuye el fenotipo troncal, la proliferación celular y la migración (59-61).

Las vías de señalización molecular de Wnt, PI3K/AKT, Hedgehog y TGF- β regulan la homeostasis normal de las células madre y están altamente reguladas. La sobreexpresión aberrante de estas vías de señalización en cánceres humanos contribuyen a la sobreexpresión de genes que participan en el fenotipo troncal y en consecuencia se promueven propiedades de auto-renovación, disminución de apoptosis, incremento de la proliferación, resistencia a quimio-radioterapia y mantenimiento del fenotipo troncal (62). Las predicciones bioinformáticas indican que el miR-3135b podría estar regulando genes que participan en estas vías de señalización a nivel citoplasmático y los genes blancos relacionados a la regulación del fenotipo troncal, como LGR5, SOX2 y SOX9 (**Figura 8**).

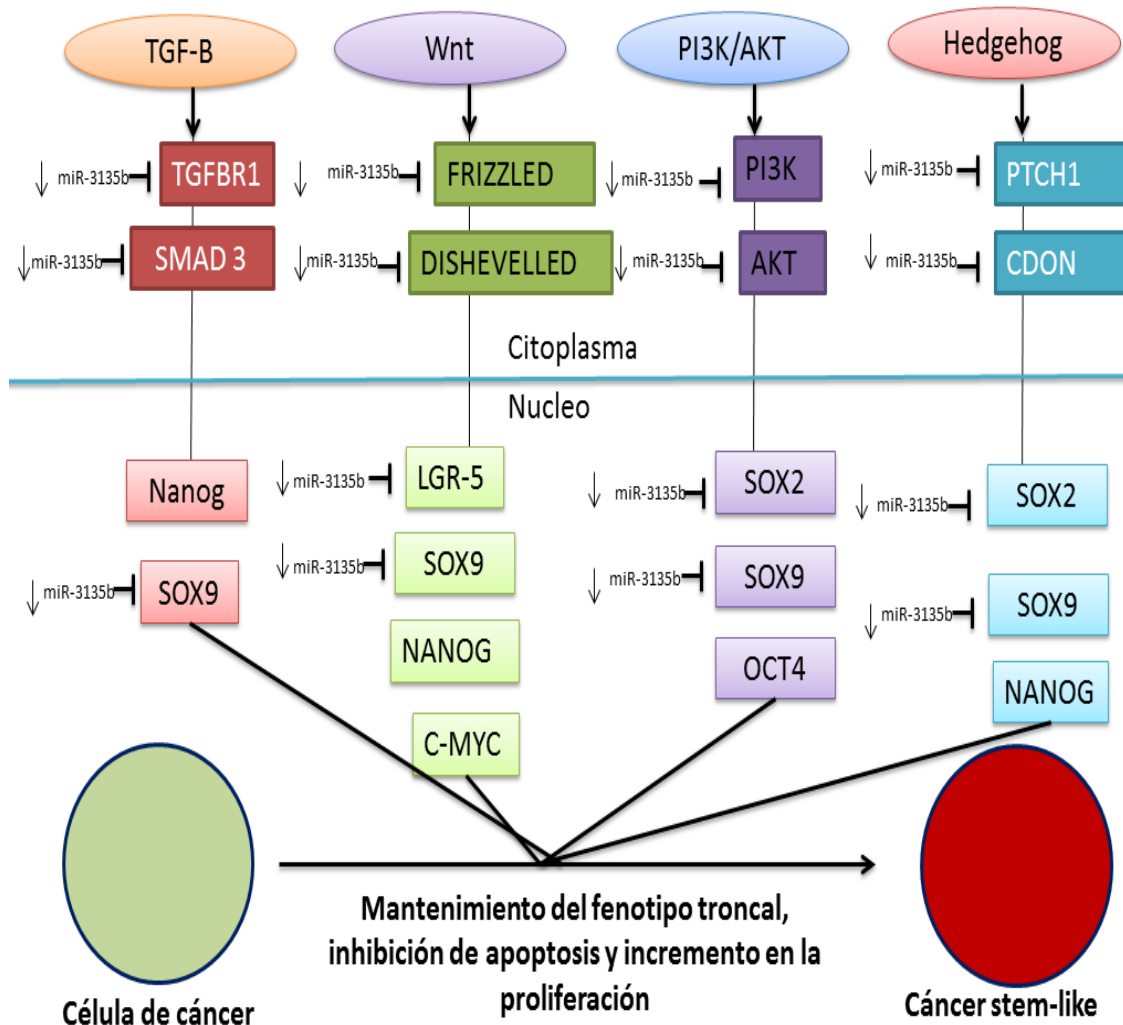


Figura 8. Genes blanco predichos del miR-3135b que participan en el fenotipo troncal. Se muestra las vías de señalización de TGF-β, Wnt, PI3K/AKT y Hedgehog que están asociadas a la regulación de “cáncer stem cell-like”. La línea azul divide los genes blanco del miR-3135b de la cascada de señalización (citoplasma) y los genes blancos relacionados al fenotipo troncal de cada vía (núcleo). Imagen construida a partir de los datos de Alan C. Mullen et al, 2017 (63), Philippe Blache et al, 2009. (64), Park J. et al 2010 (65) y bases de datos de predicción de blancos de microRNAs: *TARGETSCAN* y *MIRWALK*

2.7 Consecuencias de la desregulación del eje GOLPH3/ST6GAL1/AKT/mTOR/ SOX9 y el miR-3135b en pacientes con cáncer colorrectal.

En respuesta al daño del DNA ocasionado por la quimio-radioterapia, la DNA-PK fosforila a GOLPH3 (Thr143/Thr148) y en consecuencia GOLPH3 se une al PI4P y MYO18A para promover la dispersión del Golgi (46). Esta dispersión promueve la actividad de la sialil-transferasa ST6Gal-I y en consecuencia incrementa la sialilación de receptores tirosina cinasa (RTK), los cuales podrían activar sus correspondientes vías de señalización celular tales como PI3K-AKT-mTOR y favorecer la sobrevivencia de la célula tumoral, mediante la alteración del balance de la señalización celular que culmine en la inhibición de la apoptosis y autofagia, progresión del ciclo celular y el incremento en la proliferación celular (**Figura 9**). Este modelo de trabajo podría explicar, en parte, porque los pacientes con cáncer de colorrectal no presentaron RPC (Ryan 3) posterior al tratamiento quimio-radioterapéutico.

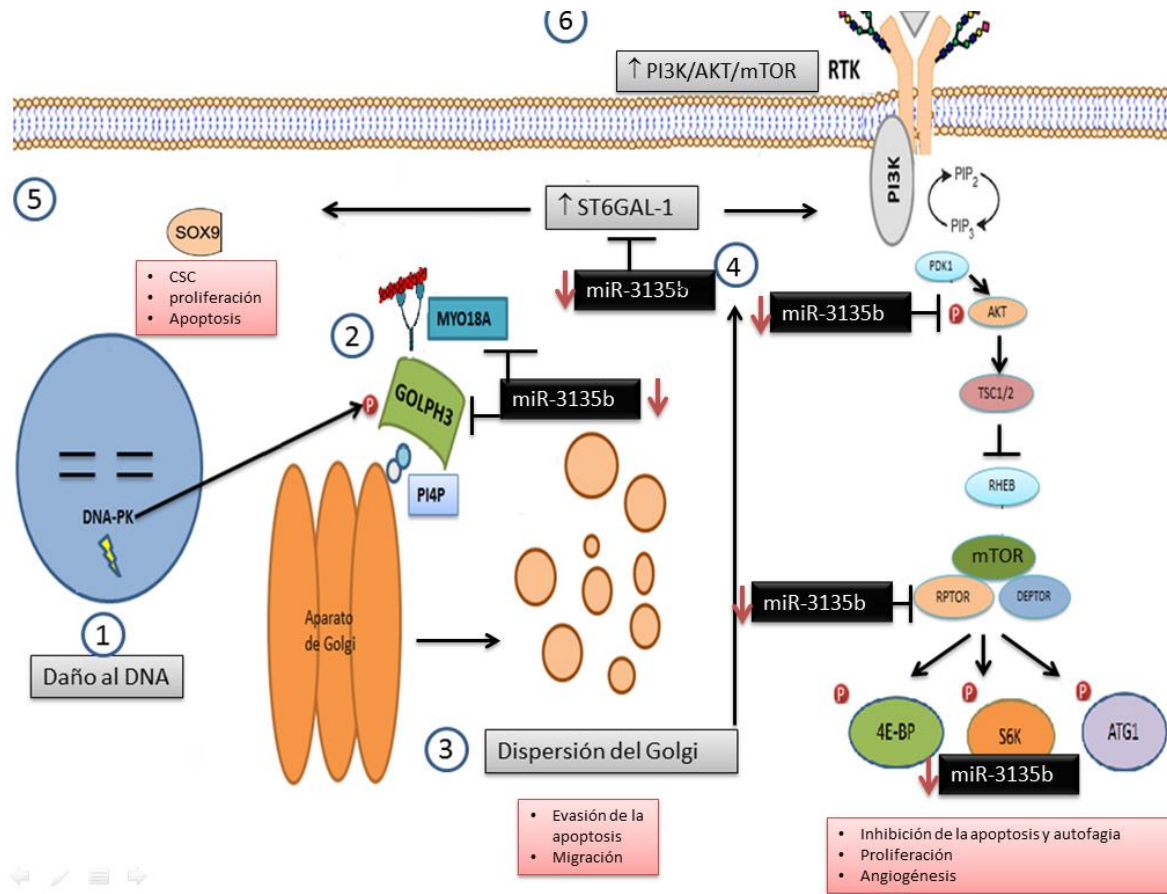


Figura 9. Modelo de trabajo hipotético de la participación del miR-3135b en el eje GOLPH3/ST6GAL1/AKT/mTOR/SOX9 en respuesta al daño del ADN por los agentes quimio-radioterapéuticos. En respuesta al daño del ADN se activa DNA-PK y fosforila a GOLPH3 lo cual resulta en un aumento de la interacción GOLPH3 con MYO18A y una mayor fuerza de tracción y dispersión del Golgi que incrementa los niveles de sialilación catalizados por ST6GAL-1. Esta enzima promueve la sialilación de diversos receptores tirosina cinasa y la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR. La sobreexpresión de ST6Gal-1 también promueve la expresión de SOX9 dando como resultado la sobrevivencia de la célula tumoral frente a la quimio-radioterapia a través de la evasión de la apoptosis, proliferación y aumento de las características del fenotipo troncal que incluyen un aumento en la resistencia a la quimioterapia. Imagen construida a partir de los datos de Farber-Katz et al. 2016 (45)

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer colorrectal es el cuarto cáncer más frecuente en todo el mundo y en México. A pesar de que la terapia con agentes quimio-radioterapéuticos es el tratamiento de elección se han encontrado diferentes respuestas clínicas entre los pacientes con cáncer colorrectal. La mayoría de los perfiles de miRNAs asociados a la RPC en cáncer de colorrectal describen la sobreexpresión o represión de estos, sin estudios funcionales que podrían brindar información sobre los mecanismos reguladores de la RPC. El análisis funcional de la vía de GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 nos permitirá conocer mejor los mecanismos moleculares que ayuden a comprender la resiliencia del daño al DNA frente a los agentes quimio-radioterapéuticos en cáncer.

4. HIPOTESIS

Si el miR-3135b inhibe el eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9, entonces se reprimirá la proliferación celular y activará la apoptosis

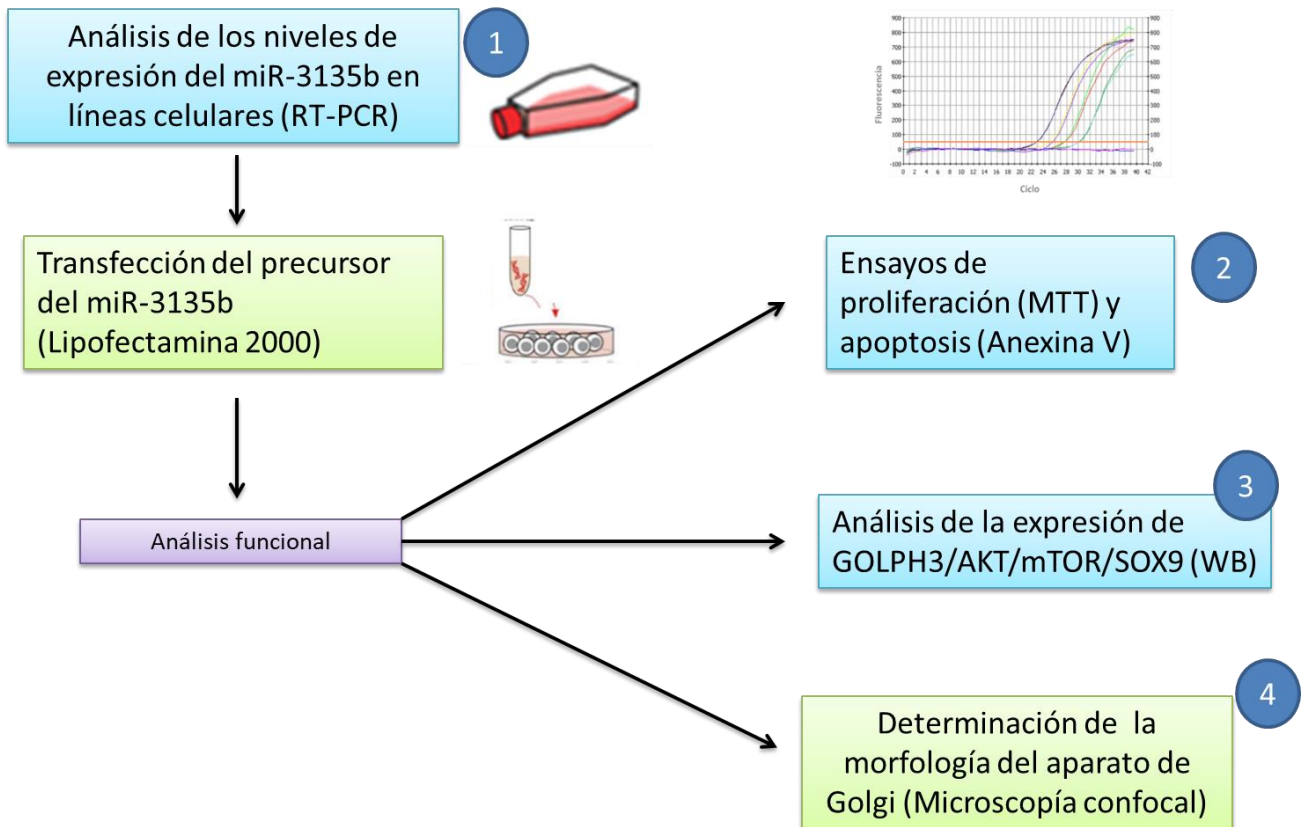
5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inhibición del eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 mediante el miR-3135b y su impacto en la proliferación y la apoptosis en respuesta al daño al DNA.

Objetivos específicos

1. Analizar la expresión del miR-3135b en líneas celulares de cáncer colorrectal
2. Restaurar la expresión del miR-3135b y analizar su efecto en la expresión de GOLPH3, SOX9 y en la activación de AKT/mTOR en células de cáncer colorrectal.
3. Analizar los efectos de la restauración del miR-3135b en la organización del aparato de Golgi, proliferación y apoptosis en respuesta al daño del DNA con quimioterapéuticos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. METODOLOGÍA

6.1 MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON

6.1.2 Condiciones de cultivo de las líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15, SW-480 así como la línea celular de colon normal CRL-1790 se cultivaron en medio DMEM-F12 Y RPMI-1640, (Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Invitrogen), penicilina y estreptomycin. Se incubaron con aireación a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂.

6.1.3 Subcultivo de líneas celulares

Para el mantenimiento de las líneas celulares, primero se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1x a pH 7.0.

Posteriormente se retiró el PBS y se agregó PBS-EDTA 6.8 mM. Luego se añadió tripsina 0.25 % (Gibco), se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios e incubaron durante 5 min a 37°C. A la par se agregó medio de cultivo fresco a un frasco nuevo y se rotuló apuntando el nombre de línea celular, número de pasaje, día y responsable. Una vez transcurridos el tiempo de incubación con tripsina se visualizaron las células en microscopio, las cuales deben estar redondeadas y despegadas, se dio un pequeño golpe a la caja para separar por completo. Posteriormente se agregó PBS-BSA 1% y se mezcló por pipeteo sobre toda la superficie, se transfirieron las células despegadas a un tubo falcon de 15 ml y centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco, distribuyendose en frascos nuevos y estériles.

6.1.4 Congelamiento de las líneas celulares

En general, se emplearon aproximadamente 2×10^6 células se procesaron de manera similar a cuando se realiza un subcultivo pero en vez de resuspenderlas en 1 ml de medio fresco, se agregó 1 ml de medio de congelamiento a un criotubo (20% SFB, 10% de DMSO y 700 μ l de medio de cultivo). A continuación se cerró herméticamente el criotubo y se colocó en hielo durante aproximadamente 10 min, los tubos se guardaron a -80°C , hasta su uso.

6.1.5 Descongelamiento de las líneas celulares

Las células congeladas en el Revco se procesaron de la siguiente manera: se limpió el criotubo con benzal y rápidamente se colocó en baño a 37°C hasta que se descongelara completamente el medio. El contenido del criotubo se pasó a un tubo falcon y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a 4°C , posteriormente se descartó el medio de congelamiento y se resuspendieron las células en medio DMEM suplementado fresco a 37°C .

6.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MIR-3135B EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL

6.2.1 Lisis y extracción de ARN total a partir de las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y SW480 y células de colon normal CRL-1790

La extracción del ARN total de las líneas celulares HCT-15, SW480 Y CRL-1790 se realizó a partir del cultivo de estas en placas de 6 pozos. El primer paso consistió en despegar las células, se agregó 0.75 mL de PBS-EDTA pH 7.0 y 32 μ L de tripsina 0.25 % (Gibco) por pozo y se incubaron durante 5 min a 37°C , pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1,200 r.p.m a 4°C durante 5 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 mL de PBS pH 7.0, se centrifugó nuevamente a 1,200 r.p.m a 4°C durante 5 min y

se descartó el sobrenadante. La pastilla de células se trató con 1 mL de trizol y se mezcló por pipeteo, se recuperó el lisado celular en un tubo eppendorf de 1.5 mL. y se incubó durante 5 min a T.A, se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de trizol utilizado y se mezcló por agitación vigorosa durante 15 seg, se incubó el tubo eppendorf durante 3 min a T.A y se centrifugó a 12,500 r.p.m por 25 min a 4°C. Posterior a la centrifugación, se recuperó la fase acuosa cuidando de no mezclar las otras fases, y se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL. Se le adicionaron 500 µL de isopropanol para precipitar el ARN y se incubó en hielo durante 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 12,500 r.p.m durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1mL de etanol al 75 % y se dejó secar durante 5 min. Posteriormente, fue re-suspendido en 20 µL de agua libre de RNAsas. Finalmente el ARN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1%.

6.2.2 Análisis de expresión del miR-3135b en las líneas celulares HCT-15, SW480 y CRL-1790

Para llevar a cabo el análisis de la expresión del miR-3135-b en las líneas celulares HCT-15, SW480 de cáncer de colon y en la línea celular de colon normal CRL-1790, se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído de cada una de las líneas. Para ello se utilizaron sondas stem-loop RT (Applied Biosystem) específicas para el miR-3135b y el RNU44 como control endógeno. Se mezclaron en un tubo eppendorf 10 ng de ARN total, 3 µL de primers RT, 0.15 µL de dNTPs con dTTP (100mM); 1.0 µL de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ µL); 1.5 µL de buffer RT 10X, 0.19 µL de inhibidor de RNasa (20 U/µL) y 4.16 µL de H₂O libre de RNasa, para una reacción total de 15 µL. La mezcla se agitó suavemente. La reacción de RT se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems), programando tres temperaturas, a 16 °C por 30 min; 42 °C por 30 min; y 85 °C por 5 min, más un paso final a 4 °C ∞.

Al finalizar la reacción de RT-PCR, se realizó la reacción de PCR en tiempo real en la que se usaron sondas TaqMan, para lo cual en una placa óptica de 96 pozos se mezclaron 1.33 μ L del producto de la reacción de RT, 10 μ L del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No 4 AmpErase UNG, 2X), 7.67 μ L de agua libre de RNAsas, y 1.0 μ L de la sonda PCR (específica para el miR-3135b y para RNU44) por pozo para una reacción de 20 μ L total. Cada una de estas reacciones se realizó por triplicado. La reacción se corrió en un equipo 7300 de Applied Biosystems. Programando un paso a 95 °C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60 °C por 1 min. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de ct ($2^{-\Delta\Delta ct}$), usando como normalizador la expresión del control endógeno RNU44. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos, considerando la normalidad de distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

6.2.3 Calculo de la IC-50 de DOXO y 5-FU

Un total de 15,000 células HCT-15 y SW480 fueron sembradas en placas de 96 pozos y tras 12 horas en la incubadora a 37°C y en las condiciones adecuadas de humedad, se realizó el tratamiento con DOXO y 5-FU, añadiendo a los distintos pocillos diferentes concentraciones de los mismos en el rango 0-2-5-10-15-20-25-30-35-40-45-50-55 μ M disueltos en medio de cultivo. Posteriormente las placas se incubaron durante 12 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se procedió a su cuantificación. Para evaluar la viabilidad se empleó un ensayo colorimétrico estándar de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol), el cual es basado en la reducción metabólica del MTT. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento, se preparó una alícuota de 5mg de MTT (Sigma)/1mL (DMEM sin suplementar) se mezcló mediante vortex y se trabajó a una temperatura menor a 37°C. La mezcla se filtró mediante una membrana de 0.22 μ . Se retiró el medio de cada pozo (placa con 6 pozos). Se hizo un lavado a cada

pozo con 1mL de PBS. De la solución filtrada se agregó una décima parte de (40 μ L) y 360 μ L de medio DMEM sin suplementar. De tal manera que el MTT se encontró a 0.5mg por cada pozo con células. La placa se colocó a incubar a 37°C durante 3 a 4h. Terminado el tiempo a las células se les retiró el medio con el MTT y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente se agregaron 150 μ L de isopropanol al 100% a cada pozo, se colocó en el Shaker durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa no se expuso a la luz durante el tiempo de incubación. Por último se retiró el isopropanol y se realizó la lectura de la intensidad del color púrpura del formazan en una placa de lectura Elisa a 570nm. La IC-50 fue determinada con un intervalo de confianza del 95% mediante una regresión no lineal, usando para ello el software *Graphpad Prism*.

6.3 RESTAURACIÓN DEL MIR-3135B Y SU RESPUESTA EN LA ORGANIZACIÓN DEL APARATO DE GOLGI, PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA CON QUIMIOTERAPÉUTICOS.

6.3.1 Transfección del precursor del miR-3135b

La línea celular de cáncer de colon HCT-15 fue transfectada con la molécula precursora del miR-3135b, así como con la secuencia scramble. Un día previo a la transfección, 25 x10⁵ células HCT-15 fueron sembradas en placas de 6 pozos. Al día siguiente, en dos tubos eppendorf de 1.5 mL se mezclaron con 100 μ L de medio reducido OptiMem con 7.5 μ L del agente Lipofectamina 2000 en cada tubo. Al mismo tiempo, en dos tubo eppendorf de 1.5 mL se mezcló 100 μ L de medio reducido OptiMem con 7.5 μ L y 15 μ L del precursor pre-miR-3135b o del premiR-Neg-Ctrl (scramble) a una concentración de 30 (nM) y 60 (nM) respetivamente y se incubaron ambos tubos a T.A (temperatura ambiente) durante 10 min. Transcurrido el tiempo ambas mezclas con lipofectamina y del precursor del miR-3135b se mezclaron por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 min a T.A. Consecutivamente, esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM

debidamente complementado (con un volumen final 2.5 mL/pzo). Se agitó suavemente, se incubó a 37°C y 5% de CO₂ hasta su análisis. Para corroborar que la transfección fue exitosa, la expresión relativa del miR-3135b fue evaluada a las 48 h, mediante qRT-PCR con sondas TaqMan. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de ct ($2^{-\Delta\Delta ct}$), usando como normalizador la expresión del control endógeno RNU44.

6.3.2 Ensayo de la proliferación de células HCT-15 transfectadas con el miR-3135b.

En una placa de 96 pozos 1×10^4 células fueron sembradas por triplicado, la placa se colocó en la incubadora por un periodo de 24 h, pasado el tiempo se realizó la transfección de las células HCT-15 con el precursor del miR-3135b por medio del agente Lipofectamina 2000. El experimento constó de seis condiciones: control (medio), vehículo (Lipofectamina), Scramble y las células transfectadas con el precursor del miR-3135b, las células transfectadas con el precursor del miR-3135b + 5-FU y células solamente tratadas con 5-FU. La cantidad de células viables por pozo se analizó con un ensayo de MTT a 0, 12, 24, 36 h después de la transfección. El ensayo de MTT se utilizó para determinar los posibles efectos que podrían tener la sobreexpresión del miR-3135b en la línea celular HCT-15 sobre la proliferación. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento, se preparó una alícuota de 5mg de MTT (Sigma)/1mL (DMEM sin suplementar) se mezcló mediante vortex y se trabajó a una temperatura menor a 37°C. La mezcla se filtró mediante una membrana de 0.22 μ m. Se retiró el medio de cada pozo (placa con 6 pozos). Se hizo un lavado a cada pozo con 1mL de PBS. De la solución filtrada se agregó una décima parte de (40 μ L) y 360 μ L de medio DMEM sin suplementar. Así la concentración del MTT adicionada a cada pozo fue de 0.5 mg. La placa incubó a 37°C durante 3 a 4h. Terminado el tiempo a las células se les retiró el medio con el MTT y se lavó con PBS. Posteriormente se agregaron 150 μ L de isopropanol al 100% a cada pozo, se colocó en el Shaker durante 15 minutos a

temperatura ambiente. La placa no se expuso a la luz durante el tiempo de incubación. Por último se realizó la lectura de la intensidad del color purpura del formazan en una placa de lectura Elisa a 570nm.

6.3.3 Cuantificación de células apoptóticas mediante Anexina-V.

Para la detección de apoptosis se utilizó el kit de detección de apoptosis (Fluos-annexine V. ROCHE), en el cual la anexina-V está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para el experimento se utilizó las células HCT-15 bajo las siguientes condiciones: control (medio), vehículo (Lipofectamine), Scramble, células transfectadas con el precursor (miR-3135b), las células transfectadas con el precursor del miR-3135b + 5-FU y 5-FU como control positivo de daño. Posteriormente, las células se tiñeron con 2µl de Annexin V-FITC y 2µl de Yoduro de Propidio (tinción nuclear) mezclado con 100µl de buffer de incubación durante 15 minutos. A continuación, se lavaron las células con 500µl de buffer de unión y se resuspendieron en 300µl de PBS. Los eventos de apoptosis fueron analizados en el citometro de flujo FACS Calibur (BDIS, Becton Dickinson). Las emisiones de la anexina V y el yoduro de propidio fueron detectados en los canales FL-1 y FL-2 respectivamente. Los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2 para obtener los histogramas y el porcentaje de células en apoptosis. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.3.4 Efectos del miR-3135b sobre la morfología del aparato de Golgi mediante microscopia confocal.

En placas de 6 pozos fueron sembradas un total de 2.5×10^5 células HCT-15 en conjunto con cubreobjetos en cada pozo. Se colocaran en la incubadora por un

periodo de 24 horas, pasado el tiempo se realizó la transfección de las células HCT-15 con el precursor del miR-3135b por medio del agente Lipofectamine 2000. El experimento presentó siete condiciones: control (medio), vehículo (Lipofectamine), Scramble, células transfectadas con el miR-3135b y células expuestas a daño con 5-FU con 12 horas de recuperación, células expuestas a DOXO con 12 horas de recuperación y células transfectadas con el miR-3135 expuestas a 5-FU con 12 horas de recuperación, con dos repeticiones por cada uno. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído al 4% a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con Tritón-100x al 1% y se bloquearon con PBS-BSA al 1%. Las células fueron incubadas durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-TGN38, y al siguiente día se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Se utilizaron 5 uL de DAPI con vectashield para teñir los núcleos. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos y se sellaron con esmalte de uñas. La visualización de las células se realizó se hizo mediante el microscopio ZEN de ZEISS

6.5 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL EJE GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9

6.5.1 Obtención de los extractos proteicos

Para preparar los extractos proteicos totales se lavaron tres veces los cultivos celulares con PBS frío, luego se incubaron a 4°C con buffer de lisis TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA) suplementado con cóctel de inhibidores (serínproteasas, cisteínproteasas y metaloproteasas) (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) durante 15 min en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se alicuotó y almacenó a -80°C.

6.5.2 Cuantificación de las proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos se utilizó el método de Bradford. La curva patrón se construyó utilizando una disolución de BSA (1 mg/ml). Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se obtuvieron sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras en la ecuación de la recta elaborada a partir de los valores de la curva estándar. La ecuación es: $y = m x + b$, donde y es la absorbancia 595 nm, m es la pendiente, x es la concentración de proteínas y b es la ordenada en el origen.

6.5.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó a una concentración de acrilamida del 6% para la detección de mTOR y a una concentración al 12% para las demás proteínas del eje

Para correr el gel se empleó una disolución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

6.5.4 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD). Los geles, las membranas, papel whatman y esponjas se incubaron 15 min en solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y 20 % de metanol). Posteriormente, se armó el cassette, se sumergió en la solución de transferencia y se transfirió 400 a mA durante 1 h en hielo. Para

confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó tinción con rojo Ponceu, posteriormente se lavó la membrana con PBS pH 7.4.

6.5.5 Ensayos de inmunodetección

Las membranas conteniendo las proteínas transferidas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS pH 7.4) durante 1 h a TA ó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween20 (0.05%) durante 5 min, tres veces, y posteriormente se agregó el anticuerpo primario a las siguientes concentraciones; 1:500 GOLPH3 (Santa Cruz), 1:2000 p-AKT (Santa Cruz), 1:1000 mTOR (Cell Signaling) y 1:500 SOX9 (Abcam) y fueron incubados toda la noche a 4°C, con agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS-Tween20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido (1:2000) en PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubó durante 1 h a TA en agitación. Posterior a la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con PBS y se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 5 min con el reactivo ECL (Amhersham Pharmacia Biotech, USA). Los resultados fueron analizados por densitometría y normalizados con la expresión basal de las proteínas constitutivas α -tubulina y GAPDH. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Expresión relativa del miR-3135b en líneas celulares de cáncer colorrectal.

El análisis de la expresión relativa del miR-3135b se realizó en células de cáncer colorrectal HCT-15 y SW480 utilizando como calibrador a la línea celular de colon normal CRL-1790 y considerando el gen RNU44 como control de expresión endógena (Figura 10). Los datos obtenidos indican que los niveles de expresión del miR-3135b se encontraron reprimidos en la línea celular HCT-15 en comparación con la línea celular normal de colon CRL-1790 ($p=0.00028$).

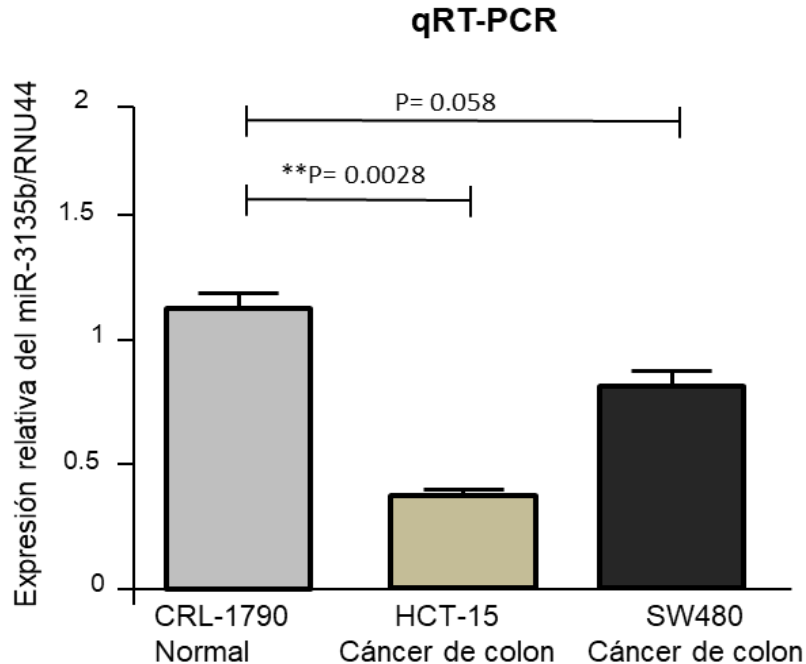


Figura 10. Expresión relativa del miR-3135b en células de cáncer de colon. Las barras indican la expresión relativa del miR-3135b en las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT-15, SW480 y en la línea celular de colon normal CRL-1790 obtenidos mediante el método comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado; CRL-1790 1.25 ± 0.83 , HCT-15 0.29 ± 0.06 y SW480 0.82 ± 0.28 . La significancia se evaluó mediante la prueba t de Student tomando valor de $p < 0,05$ como significativo.

A pesar de que los niveles de expresión del miR-3135b en células SW480 fueron menores a los de la línea celular normal de colon, estos no son estadísticamente significativos ($p=0.058$). Este resultado sugiere que las diferencias en la expresión del miR-3135b en ambas líneas celulares de cáncer puede ser debido a la diferencia del fenotipo, por un lado la línea celular HCT-15 pertenece a un estadio de cáncer de colon Dukes C (esto indica que el cáncer se diseminó a por lo menos un ganglio linfático en el área cercana al intestino), mientras que la línea células SW480 pertenece a un estadio Dukes tipo B (en el cual el cáncer ha crecido a través de la capa muscular del intestino) (16).

Considerando estas características, el potencial metastásico de la línea celular HCT-15 le brinda fenotipos como motilidad, pérdida de uniones celulares, migración y la adquisición de resistencia a la apoptosis (17) y al menos dos de estas características podrían estar siendo reguladas por el miR-3135b al tener como blancos predichos a factores antiapoptóticos como BCL-2, integrinas de membrana y genes que codifican para ST6GAL1 y ST6GAL2 (18), Dichas proteínas facilitan la unión de las integrinas a la matriz extracelular y a ciertas selectinas presentes en células endoteliales permitiendo así la extravasación y la diseminación de las células cancerosas.

Esto sugiere que la línea celular HCT-15 puede estar reprimiendo la expresión del miR-3135b como un mecanismo para mantener su potencial metastásico a diferencia de la línea celular SW480.

7.2 Expresión del miR-3135b en respuesta al daño al DNA en líneas celulares de cáncer colorrectal.

Como se describió anteriormente, una de nuestras hipótesis es que el miR-3135b podría estar participando en el eje de GOLPH3/AKT/mTOR/SOX9 el cual se activa en respuesta al daño del DNA como mecanismo de sobrevivencia.

Por lo anterior, se decidió analizar si la expresión del miR-3135b podría ser regulada por el daño al DNA con agentes de quimioterapia como 5-FU y Doxorrubicina. Para ello se determinó la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC-50) a través de un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular en respuesta a las diferentes concentraciones de DOXO y 5-FU. Una vez obtenidos los datos del ensayo de MTT la IC-50 fue calculada mediante un análisis de regresión no lineal y calculamos que para la línea celular HT-15, con 5-FU y Doxorrubicina fue de 45 μM y 5.14 μM respectivamente, mientras que para la línea celular SW480 fue de 4.3 μM y 7.3 μM respectivamente (Figura 11).

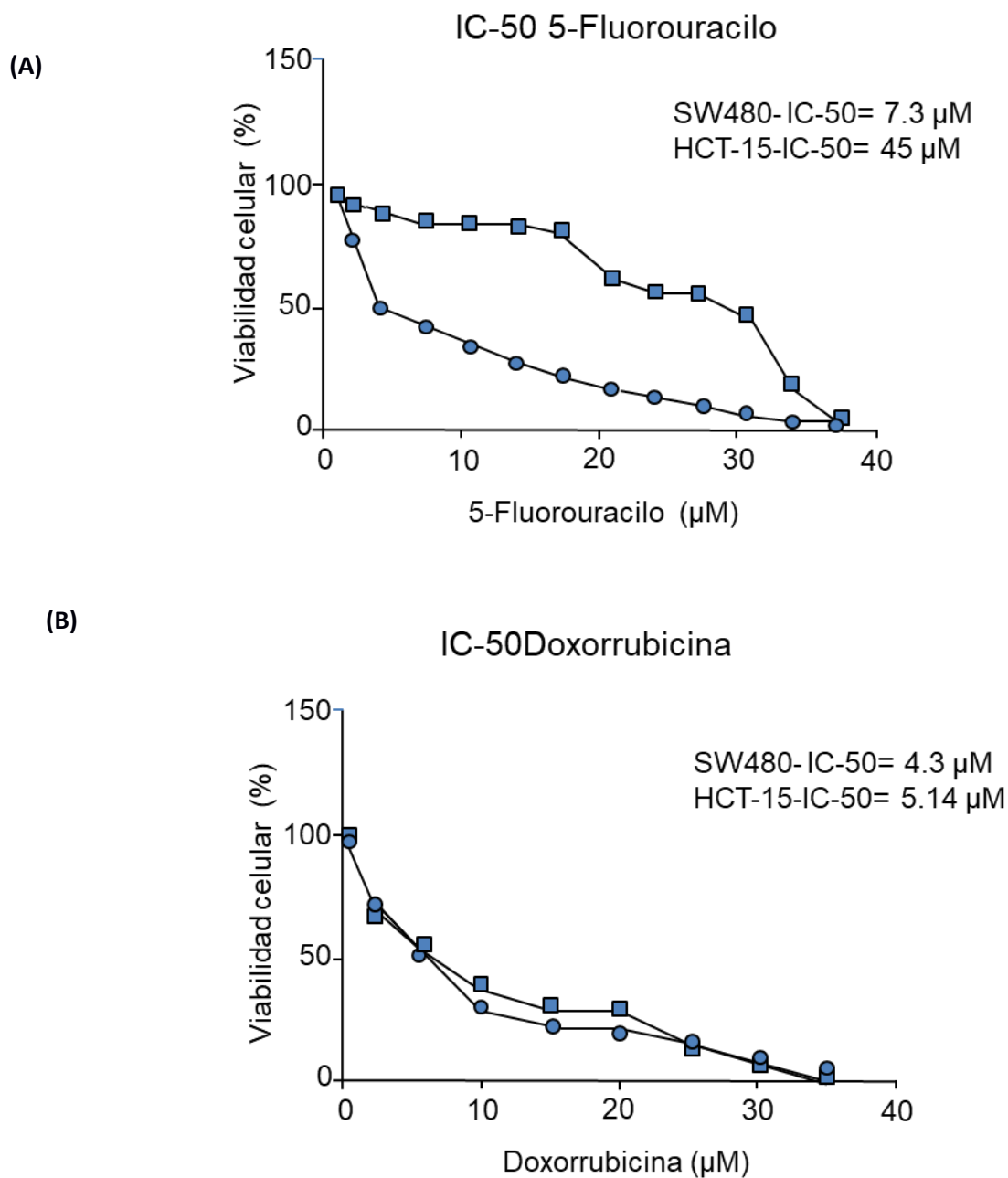


Figura 11. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC50) de doxorubicina y 5-FU en células SW480 y HCT-15. Figura (A) muestra la IC50 para 5-Fluorouracilo en células SW480 y HCT-15 las cuales fueron de 7.3 μ M y 45 μ M respectivamente, la figura (B) muestra la IC-50 para Doxorubicina en células SW480 y HCT-15 las cuales fueron de 4.3 μ M y 5.14 μ M respectivamente. Los valores de IC-50 se calcularon mediante análisis de regresión no lineal.

Después de establecer las concentraciones de DOXO y 5-FU, se analizó de nuevo la expresión del miR-3135b mediante RT-PCR en células SW480 y HCT-15 las cuales fueron expuestas por 12 horas a las concentraciones determinadas de los fármacos 5-FU y DOXO y bajo estas condiciones se encontró una disminución significativa en la expresión del miR-3135b en las líneas celulares HCT-15 ($p=0.0127$ y $p=0.0065$) y SW480 ($p=0.0021$ y $p=0.0001$) tratadas con Doxorrubicina y 5-FU respecto a sus niveles basales sin ningún tipo de tratamiento (**Figura 12**). Este resultado indica que la regulación de miR-3135b podría ser un mecanismo de respuesta al daño al DNA y que las células sobrevivientes a la quimioterapia estarían reprimiendo los niveles de expresión de este microRNA como un posible mecanismo de defensa.

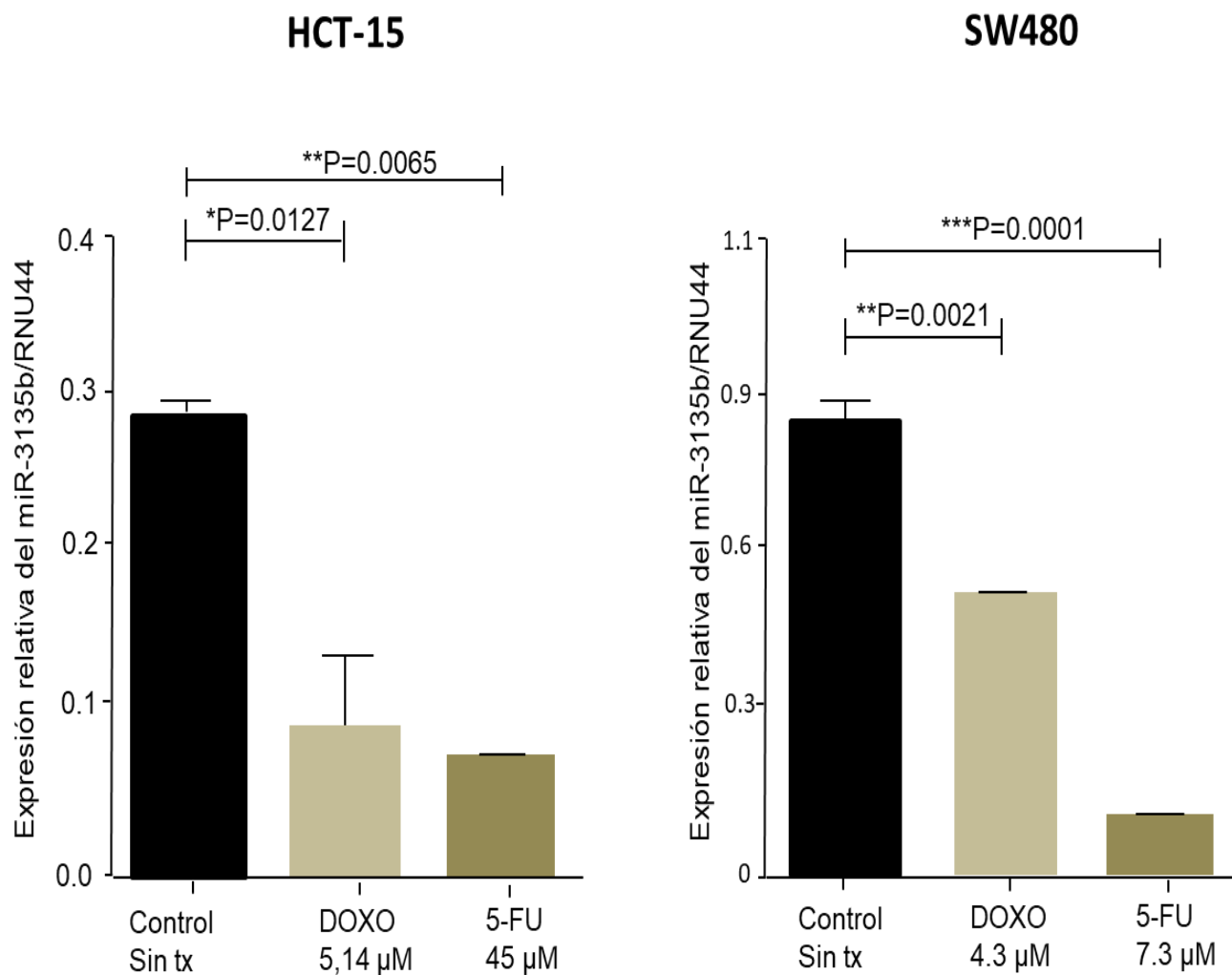


Figura 12. Expresión relativa del miR-3135b en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y HCT-15 tratadas con Doxorrubicina y 5-Fluorouracilo en comparación con sus niveles basales. Las barras indican la expresión relativa del miR-3135b de las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT-15 y SW480, obtenido mediante el método comparativo de Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado. La significancia se evaluó mediante la prueba t de Student tomando valor de $p < 0,05$ como significativo.

7.3 Restauración del miR-3135b en la línea celular HCT-15.

Posteriormente realizamos un análisis para corroborar la restauración del miR-3135b en la línea celular HCT-15 en la cual la expresión relativa de este miRNA se encontró reprimida de manera significativa. Se realizó la sobre-expresión del miR-3135b por medio de la transfección de 30 y 60 nM del precursor del miR-3135b en células HCT-15. Donde después de 48h se observó el incremento en la expresión del este miRNA. Ambas concentraciones del mimetizador del miRNA fueron utilizadas para los ensayos posteriores.

Validación de la expresión del miR-3135b en células HCT-15

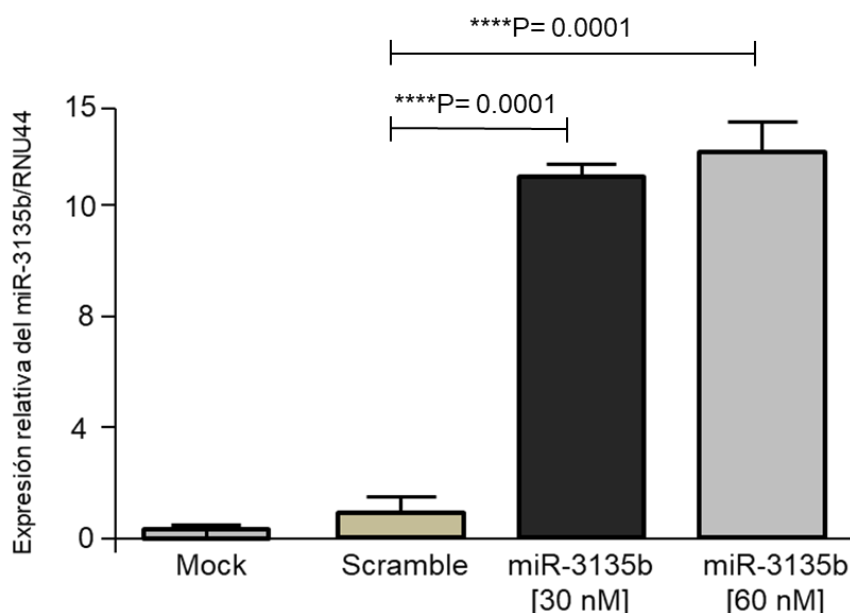


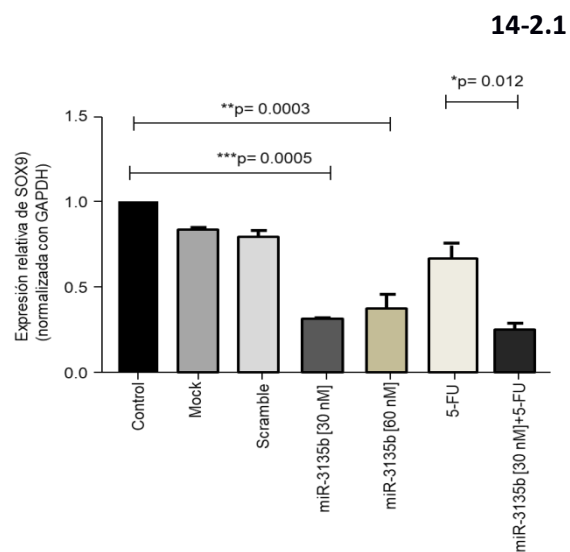
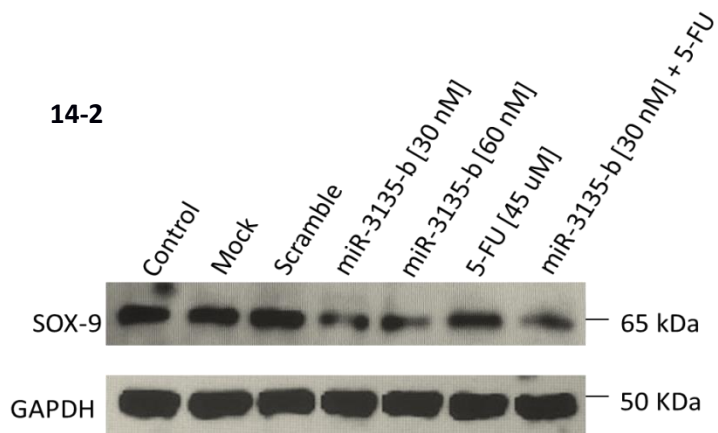
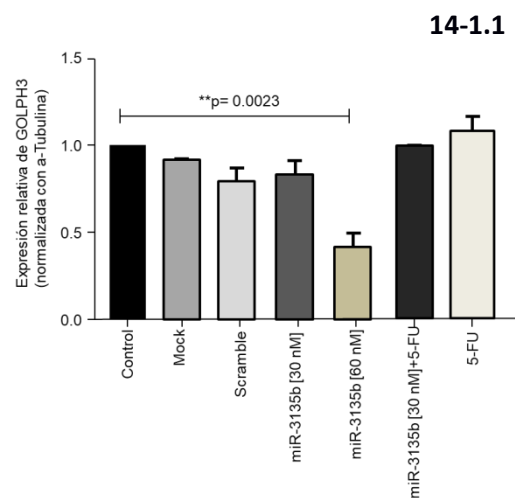
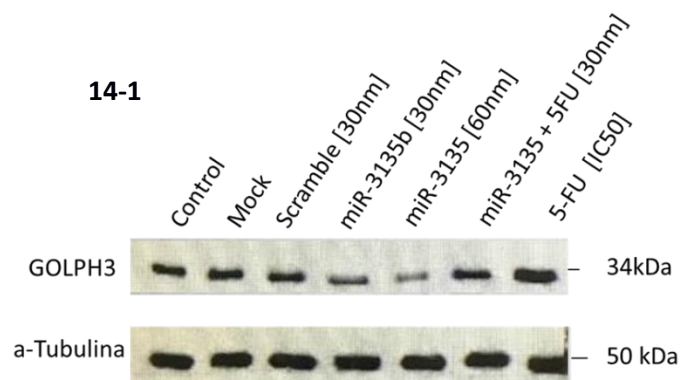
Figura 13. Validación de la expresión del miR-3135b en células HCT-15. Las barras muestran la expresión del miR-3135b después de la transfección con su precursor a una concentración de 30 y 60nM en comparación con la condiciones Mock y Scramble. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado; Mock 0.19 ± 0.07 , Scramble 0.8 ± 0.18 , miR-3135b [30 nM] 13.11 ± 0.69 , miR-3135b [60nM] 14.48 ± 0.97 . La significancia se evaluó mediante la prueba t de Student tomando valor de $p < 0,05$ como significativo.

7.4 Expresión del eje GOLPH3/AKT-mTOR/ SOX9 en células HCT-15.

Para evaluar los niveles de expresión del eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 en la línea celular HCT-15 se realizaron ensayos de Western Blot en extractos celulares totales bajo las siguientes condiciones; Control, Mock, Scramble, miR-3135b [30 nM], miR-3135b [60 nM], 5-FU [45 μ M], miR-3135b [30 nM]+ 5-FU.

La expresión de las proteínas GOLPH3, AKT-mTOR y SOX9 no presentó cambios en los ensayos realizados con las proteínas de células control, mock y scramble. Por otro lado la expresión de estas proteínas se encontró reprimida a la concentración tanto de 30 y 60 nM del miR-3135b.

De manera interesante también observamos por análisis densitométrico que la expresión de las proteínas del eje como GOLPH3/AKT-mTOR incrementó su expresión en presencia de daño con 5-FU (**figura 14: 14-1, 14-3, 14-4**).



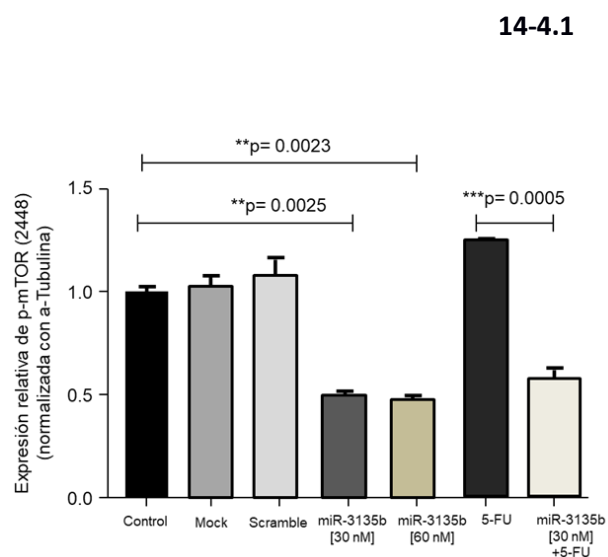
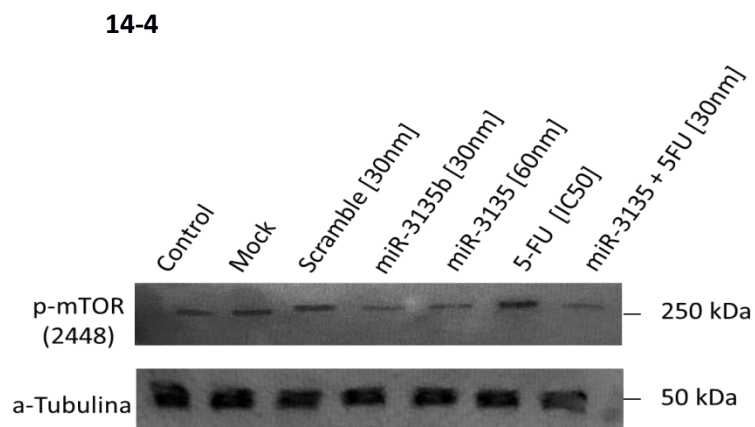
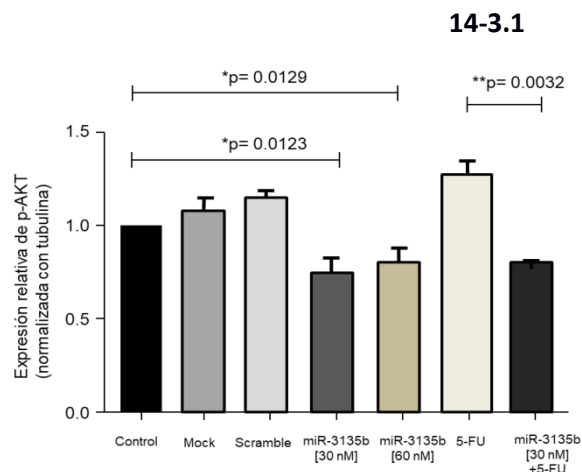
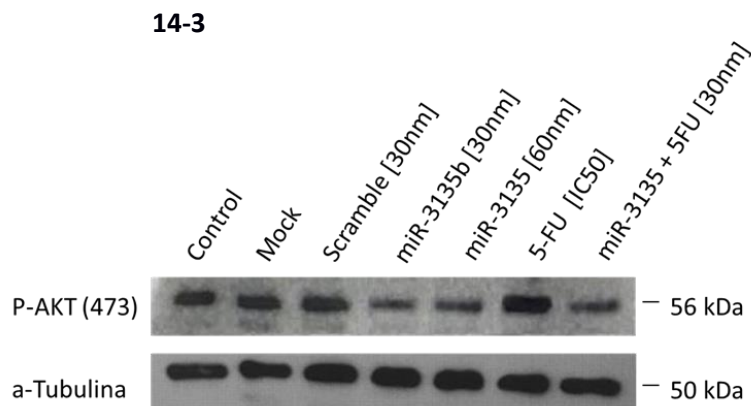


Figura 14. Expresión del eje GOLPH3/AKT-mTOR/ SOX9 en células HCT-15. Análisis de Western para determinar la expresión de las proteínas de GOLPH3 (14-1), Sox9 (14-2), p-AKT (14-3) y p-mTOR (14-4) en células Control, Mock, transfectadas con miR-SC-, miR-3135b [30nM y 60nM] y control de daño positivo con el fármaco 5-FU. Los resultados fueron analizados por densitometría y normalizados con la expresión basal de las proteínas constitutivas a-tubulina y GAPDH. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Debido a estos resultados se realizó *un microRNA challenger* el cual implicaba retar al miR-3135b a reducir la expresión de las proteínas del eje causada por la exposición al 5-FU y observamos de manera remarcada que los extractos proteicos de las células que fueron expuestas a 5-FU y transfectadas con el precursor del miR-3135b, abatieron de manera considerable la sobreexpresión generada por el 5-FU (**figura 14:** 14-1.1, 14-3.1, 14-4.1).

Estos resultados sugirieron que la región semilla del miR-3135b podría estar uniéndose por complementariedad a la región 3'UTR de GOLPH-3, AKT Y SOX9 e inhibiendo en parte la expresión de las proteínas las cuales participan en la dispersión del aparato de Golgi y el mantenimiento del fenotipo de células madre en las células HCT-15.

7.5 Ensayo de la proliferación celular en la línea celular HCT-15.

Después de comprobar que el procedimiento utilizado permite la sobreexpresión del miR-3135b, se realizó el ensayo de proliferación celular mediante el uso de MTT. El ensayo de MTT es utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, de esta manera se evalúa la cantidad de células vivas de acuerdo a la cantidad de cristales de formazán producido.

Para llevar a cabo el ensayo de proliferación se incubaron células HCT-15 en una placa de 96 pozos en la cual se colocaron 10,000 células por pozo bajo las siguientes condiciones por triplicado; control, mock, scramble, miR-3135b, miR-3135b + 5-FU y 5-FU. A las 12 horas de post-incubación se realizó la transfección del miR-3135b y 48 horas después las placas se leyeron a 0, 12, 24 y 36 horas. Observamos que las condiciones control, mock y scramble presentaron un crecimiento exponencial a las 12, 24 y 36 horas en comparación con las condiciones miR-3135b, 5-FU y miR-3135b + 5-FU, donde observamos que en estas condiciones existió una disminución en la capacidad proliferativa a las 12 horas y una ligera recuperación a las 24 y 36 horas posteriores, manteniéndose quiescentes pero sin llegar a tener comportamiento de crecimiento exponencial similar al de las células control, mock y scramble. Además, estos resultados nos demuestran que la transfección del miR-3135b tiene un efecto discreto sobre la capacidad proliferativa de la línea celular HCT-15 teniendo un mayor impacto en las primeras 12 horas (**Figura 15**).

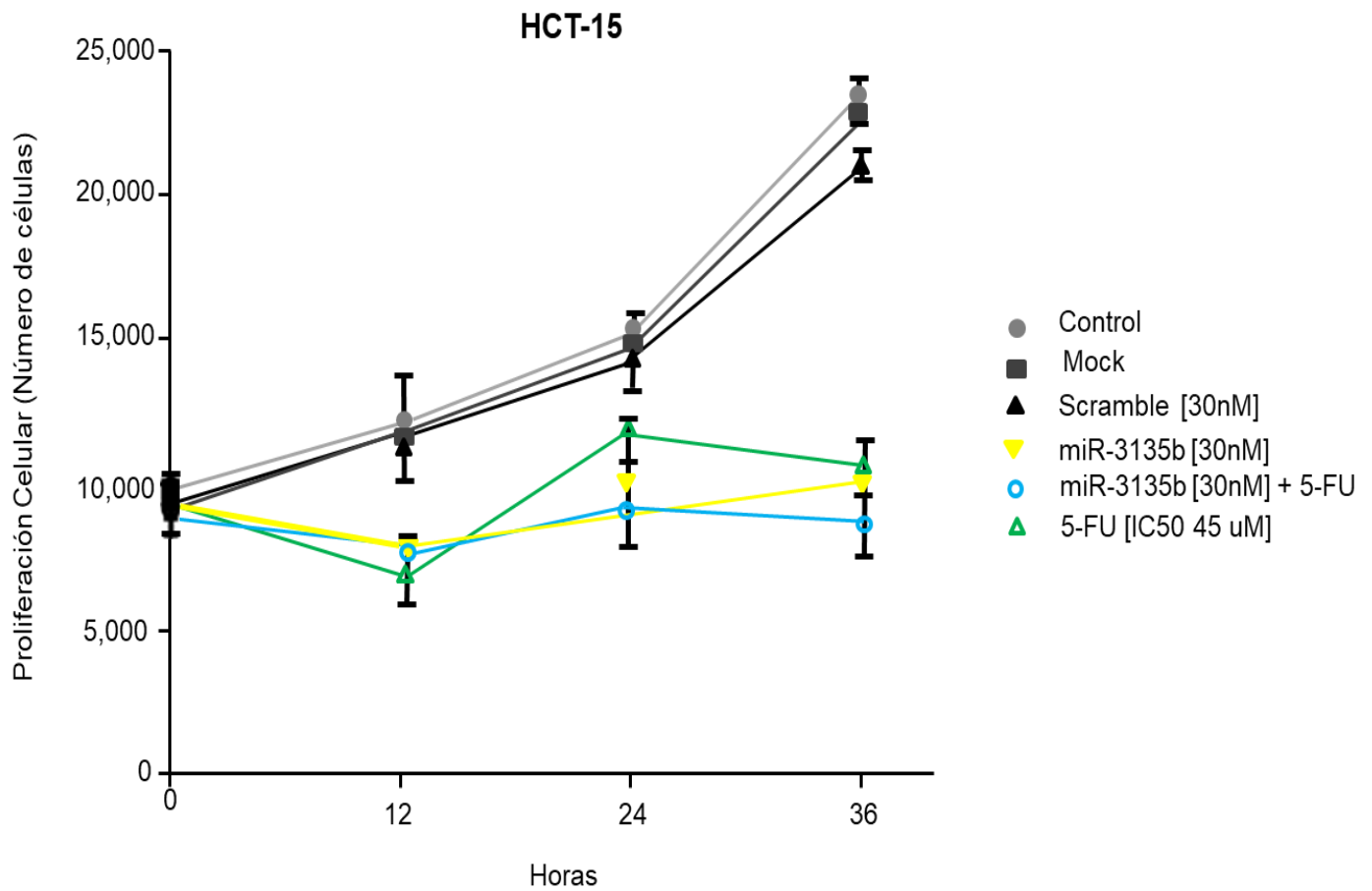


Figura 15. Ensayo de proliferación celular. Se efectuó el ensayo en la línea celular HCT-15 transfectada con el miR-3135b (30 nM) a periodos de 0, 12, 24 y 36 horas. Las diferencias de proliferación celular a las 12 h. en las condiciones de células control y miR-3135b (**p=0.00239) fueron estadísticamente significativas así como en las condiciones 5-FU y el miR-3135b+5FU (*p=0.0409) a las 24 h. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.6 Ensayo de apoptosis en la línea celular HCT-15 transfectada con el miR-3135b

Los resultados obtenidos en el ensayo de MTT nos indicaron que la sobreexpresión del miR-3135b es capaz de disminuir la proliferación de la línea celular HCT-15; por tanto decidimos comprobar si esta disminución en la proliferación de las células era debida a que el miR-3135b podría inducir apoptosis en las células HCT-15.

Para ello se llevó a cabo un análisis de apoptosis a través de la detección de células en apoptosis mediante Anexina V-FITC el cual fue analizado por citometría de flujo. Los resultados obtenidos indicaron que el miR-3135b es capaz de inducir apoptosis hasta en un 10% más en relación con las condiciones mock y scramble. De manera interesante también se observó que el miR-3135b en combinación con el 5-FU promueve un incremento en el porcentaje de células en apoptosis y necrosis en comparación con las células tratadas únicamente con 5-FU (**Figura 16**).

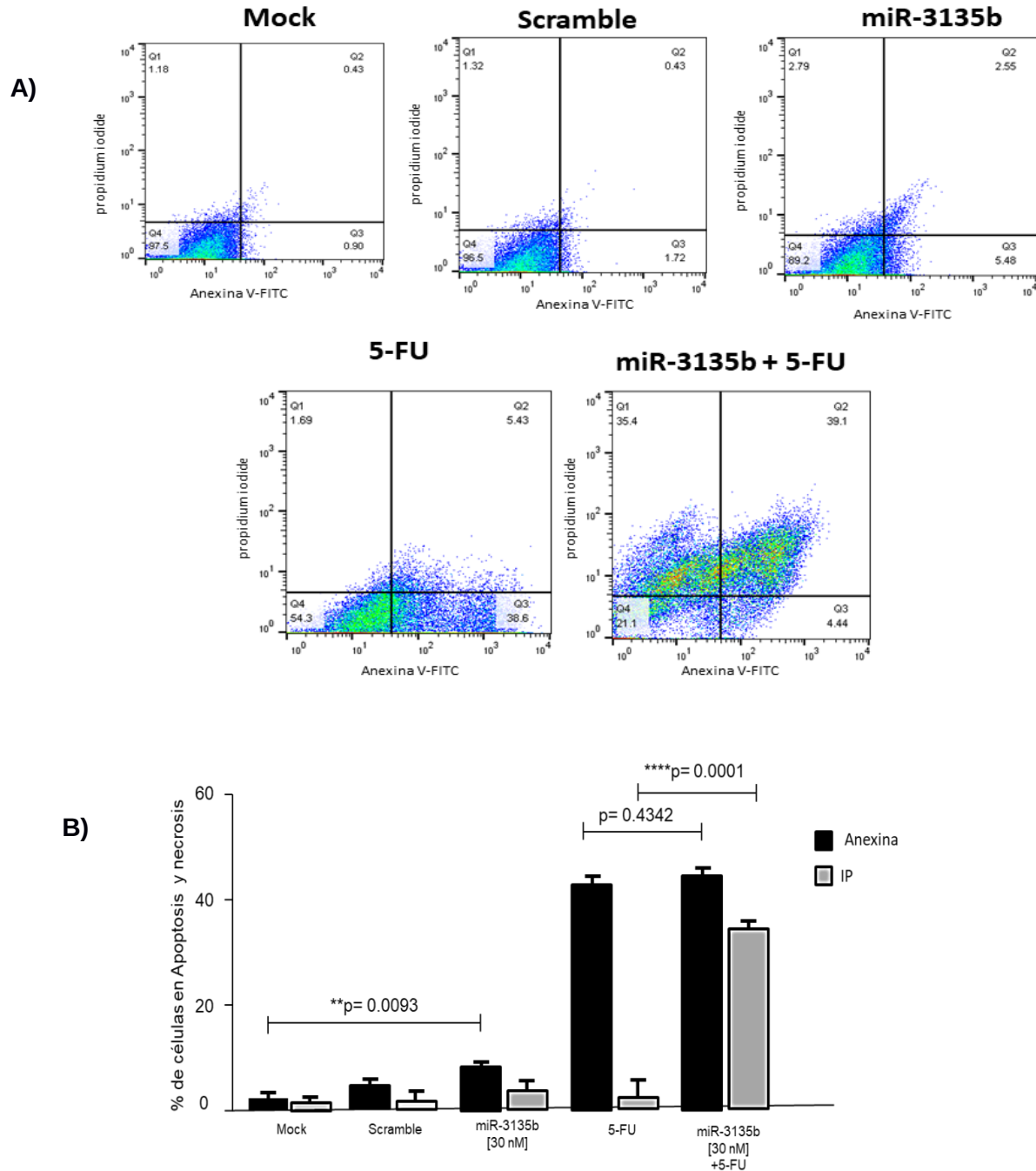


Figura 16. Ensayo de apoptosis por medio de Anexina V en la línea celular HCT-15. En el panel A) se muestran los plots representativos de anexina V (horizontal) y IP (vertical) de cada condición celular; mock, scramble, mir-3135b, 5-FU y miR-3135b+5-FU. En panel B) Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.7 Ensayo de WB para determinar la presencia de daño al DNA

Una de las partes claves para la activación del eje de GOLPH3 es el daño al DNA ocasionado por agentes de quimioterapia para activar a la DNA-PK.

De acuerdo lo anterior era necesario demostrar como parte de nuestra estrategia experimental que la exposición a 5-FU en las células HCT-15 promueve daño al DNA. Este daño fue sentido mediante la detección por WB de la histona H2AX, la cual es un marcador temprano de daño al DNA al ser fosforilada en la serina 139 por proteínas como ATM y DNA-PK.

Como se observa en este primer análisis de WB (**Figura 17**) existe una menor inducción de la fosforilación de H2AX en células control en comparación con las células expuestas a 5-FU, donde se observó un incremento en el estatus de fosforilación de esta. Los datos obtenidos sugieren que el daño al DNA podría estar asociado con la exposición al 5-FU.

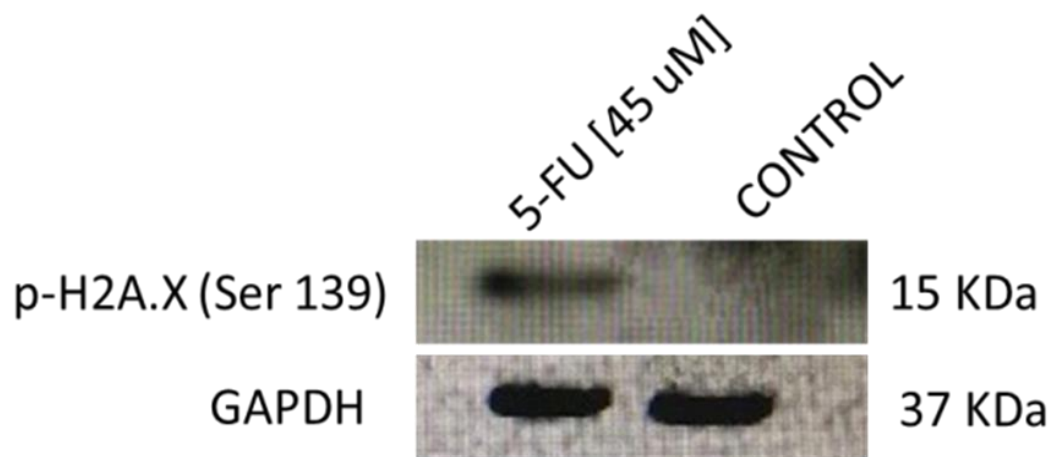


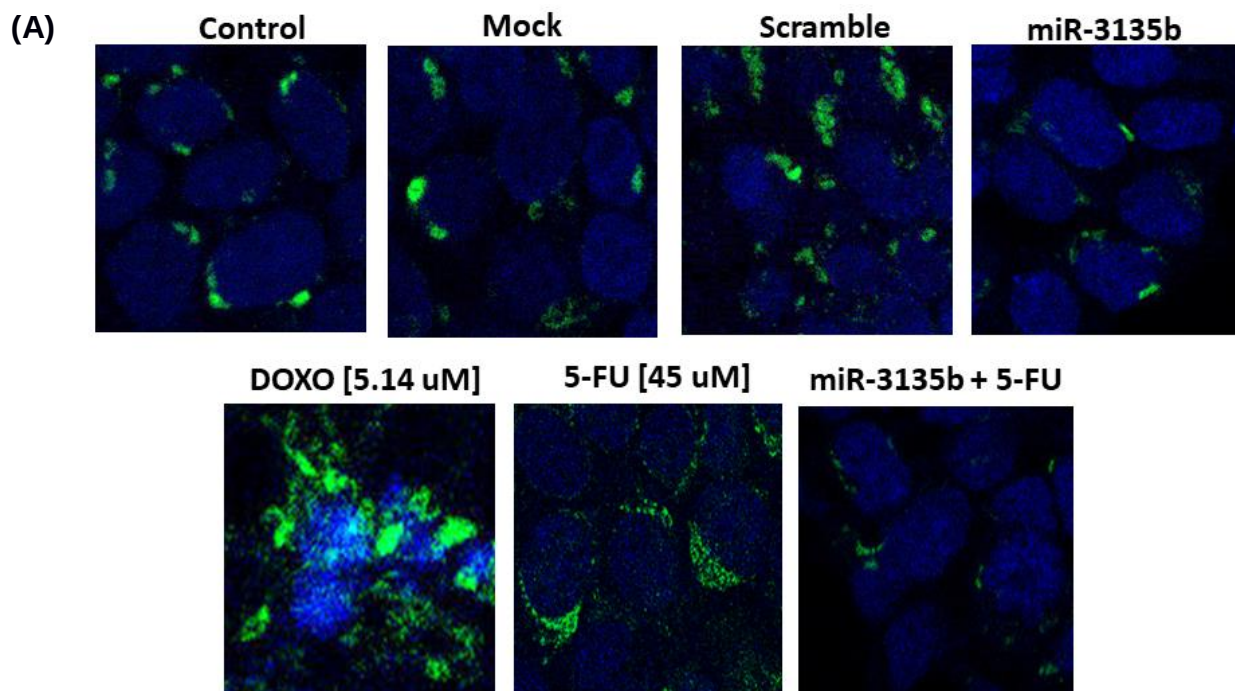
Figura 17. Detección de daño al DNA- Primer análisis de WB del estatus de fosforilacion de la histona H2AX en respuesta al 5-FU durante 12 horas.

7.8 Visualización de la morfología de aparato de Golgi por Inmunofluorescencia.

Una vez determinado que GOLPH3 podría ser un blanco directo del miR-3135b, que GOLPH3 se sobreexpresa en respuesta al tratamiento con 5-FU y que este agente de quimioterapia promueve el daño al DNA en la línea celular HCT-15, el siguiente paso fue determinar si miR-3135b era capaz de abatir la dispersión del aparato de Golgi, el cual es un evento relacionado directamente con la sobreexpresión de GOLPH3 en respuesta al tratamiento con 5-FU.

En la condición control las células HCT-15 mostraron el área relativa del aparato de Golgi (señal verde) como una cinta perinuclear alrededor del núcleo (señal azul) y una morfología similar se observó en las condiciones, mock y scramble.

Sin embargo, la señal de Golgi se dispersa en respuesta al tratamiento 5-FU y también con DOXO (**Figura 18 A**), lo cual es un efecto esperado debido al tratamiento con estos fármacos, pero al compararlas con las células transfectadas con el miR-3135b y expuestas a 5-FU se aprecia un efecto de compactación del aparato de Golgi abatiendo la dispersión ocasionado por los fármacos de quimioterapia en las células tratadas (**Figura 18 A y B**).



(B)

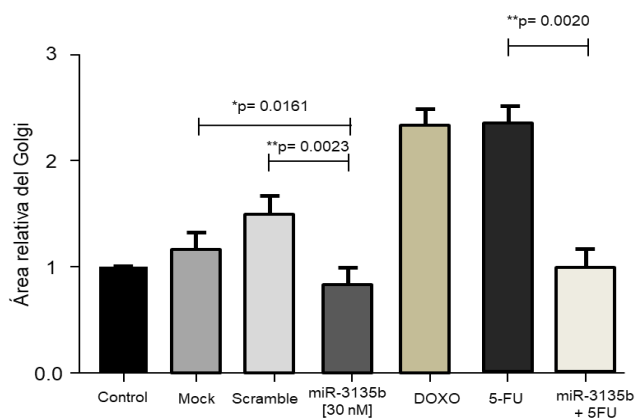


Figura 18. Visualización de la morfología del aparato de Golgi. En el panel (A) se muestran las imágenes de inmunofluorescencia de las condiciones control, mock, scramble, miR-3135b, células tratadas con 5-FU o DOXO, miR-3135b + 5FU. En el panel (B) las barras muestran la cuantificación relativa del área del Golgi. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos por triplicado. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8. DISCUSIÓN.

Durante los últimos años la búsqueda exhaustiva de genes y vías de señalización relacionadas el fenómeno de resistencia a la terapia han llevado a descubrir diferentes mecanismos por los cuales las células de cáncer adquieren la capacidad de evadir el daño ocasionado por las terapias.

Recientemente, un número creciente de informes han reportado que la dispersión del aparato de Golgi es una novedosa vía de respuesta al daño al DNA que involucra al eje de GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 para promover la sobrevivencia de las células tumorales (41-44), de tal manera que las proteínas de este eje podrían representar importantes blancos terapéuticos para favorecer el éxito de las terapias.

En este trabajo se han determinado por primera vez los aspectos moleculares en los que está involucrada la expresión del miR-3135b. Este microRNA fue hallado en un perfil de microRNAs asociados a la respuesta patológica completa en pacientes de cáncer colorrectal. Se demostró mediante ensayos de WB que el miR-3135b regula de forma negativa el eje de GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 y así al restaurar su expresión en células cancerosas (**Figura 14**) se observó que activa la apoptosis e inhibe en cierta parte la proliferación en células de cáncer colorrectal HCT-15 (**figura 15 y 16**).

Nuestros datos en células de cáncer colorrectal concuerdan con estudios previos que han demostrado que la inhibición de GOLPH3 a través del miR-126, promueve la apoptosis y la inhibición de la proliferación en el carcinoma de células escamosas esofágicas (66).

Por otro lado, en las células cancerosas gástricas, el miR-134 suprime la proliferación celular mediante la unión a la región 3'UTR de GOLPH3 (67). Otras proteínas de este eje, como la cascada de señalización AKT-mTOR es una vía activa en casi todos los cánceres empero también representa uno de las principales vías de desarrollo para la resistencia a los fármacos de quimioterapia.

Los investigadores Kongliang y Tingting Lou demostraron que la transfección del miR-10a inhibió significativamente la proliferación y la migración, y promovió la apoptosis de las células de cáncer de mama, lo cual se atribuyó a una marcada supresión de los niveles de p-AKT y p-mTOR (68).

Lo que nosotros encontramos al restaurar la expresión del miR-3135b en células de cáncer de colon fue un efecto similar de reducción del status de fosforilación de AKT en la serina 473 y mTOR en la serina 2448 **(Figura 14)**. Sin embargo debemos recordar hasta este punto que nuestros análisis bioinformáticos no mostraron a mTOR como un blanco directo del miR-3135b, pero si a proteínas necesarias para su activación como AKT ya que estudios previos han demostrado que la Ser-2448 de mTOR es un objetivo directo de fosforilación por AKT (69), lo que podría explicar en parte la reducción en el status de fosforilación de mTOR en respuesta a la restauración del miR-3135b.

De manera interesante y consecuente a la activación AKT-mTOR la dispersión del aparato de Golgi vía GOLPH3 tiene la capacidad de potenciar la hipersialilación de receptores RTK promoviendo la transducción de la señal de PI3K/AKT-mTOR (48,50). De manera tal que podríamos especular que la reducción en la activación de AKT/mTOR podría tener dos vertientes; la primera estaría ligada de manera indirecta a la inhibición de GOLPH3 por el miR-3135b, lo que hipotéticamente evitaría la dispersión del Golgi y por consiguiente la hipersialilación de receptores RTK, la segunda vertiente que planteamos es la unión directa de la región semilla del miR-3135b a la región 3'UTR de AKT.

Es importante destacar que la fragmentación del Golgi puede resultar en una redistribución y sobreexpresión de sialiltransferasas (49), como ST6Gal-I, la cual regula la expresión de un factor crucial para el inicio de la tumorigenesis, Sox9, en células de cáncer de páncreas, ovario y colon. Sox9 es un factor de transcripción asociado a células madre y fuertemente vinculado a la resistencia a la terapia, la formación y el crecimiento de muchos tipos de cáncer (70).

De acuerdo con nuestro ensayo de WB la restauración del miR-3135b reduce la expresión de SOX9 (**figura 14**), lo que podría apuntar hacia un efecto negativo sobre el fenotipo troncal de las células madre de cáncer. Sin embargo creemos que hace falta evaluar la inhibición de fenotipos asociados con troncalidad de estas células como la formación de esferas y la disminución de marcadores de troncalidad para brindar más evidencia con respecto al papel de SOX9 en este proceso.

Farber katz y colaboradores (45) fueron los pioneros en demostrar que el daño al ADN con agentes como DOXO y CPT desencadena la dispersión del Golgi a través del citoplasma. También mostraron que la dispersión del Golgi requiere a proteínas como GOLPH3 / MYO18A y la proteína quinasa del daño del ADN, la DNA-PK (45). Considerando que el daño al DNA ocasiona la dispersión del aparato de Golgi, recapitularemos algunos datos obtenidos en este estudio, la exposición a 5-FU incrementa la expresión de GOLPH3 (**figura 14**), el miR-3135b disminuye la expresión de GOLPH3 (**figura 14**). De modo tal que al simular un ambiente celular de daño al DNA utilizando 5-FU y se obtuvieron datos similares de la dispersión del Golgi al utilizar 5-FU (**figura 18**) con respecto a los obtenidos por Farber Katz y cols, además se demostró que el miR-3135b es capaz de abatir la dispersión del aparato de Golgi en células HCT-15 que fueron tratadas con 5-FU y transfectadas con el precursor de este miRNA.

Este efecto de compactación del Golgi podría ser explicado debido a que el miR-3135b tiene como blanco predicho a GOLPH3, además en previos estudios se demostró que la inhibición de GOLPH3 mediante un RNA de interferencia evita la dispersión del Golgi en respuesta al agente DOXO (45,46).

En resumen, nuestros resultados demostraron que la vía de señalización GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9 es regulada negativamente por el miR-3135b teniendo como consecuencia la apoptosis y una disminución en la capacidad proliferativa de las células HCT-15. Nuestros datos proporcionaron nuevos conocimientos sobre mecanismos potenciales de la respuesta patológica completa

que pueden estar siendo regulados por los microRNAs y también sugieren que el miR-3135b podría ser un posible biomarcador del éxito de las terapia a futuro.

9. CONCLUSIONES

1. El miR-3135b se encontró reprimido en las líneas celulares de cáncer colorrectal, teniendo una represión estadísticamente significativa en la línea celular HCT-15 en comparación con la línea celular de colon normal CRL-1790.
2. La expresión del miR-3135b reduce hasta en un 50% en respuesta al tratamiento con DOXO y 5-FU en las células de cáncer de colon HCT-15 Y SW480 en comparación con los niveles basales de estas mismas células de cáncer sin ningún tipo de tratamiento.
3. La restauración del miR-3135b promueve en las células HCT-15 la inducción de la apoptosis/necrosis y una disminución en la capacidad proliferativa.
4. La transfección del miR-3135b promueve una forma compacta en el aparato de Golgi y evita la dispersión del Golgi aun en presencia del 5-FU
5. De acuerdo a nuestros ensayos de WB el miR-3135b podría estar regulando de manera negativa a las proteínas del eje GOLPH3/AKT-mTOR/SOX9.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Moore. Anatomía. Editorial Médica Panamericana. Ed. 4ª. 2007
2. Enrique Rey Díaz-Rubio; Ángel Álvarez Sánchez; Manuel Díaz-Rubio. "fisiología humana" Capítulo 65: Intestino grueso
3. Lino-Silva et al. "Mesorectal Invasion Depth in Rectal Carcinoma Is Associated With Low Survival". Clinical Colorectal Cancer, Vol. 16, No. 1, 73. Publicado en línea: doi.org/10.1016/j.clcc.2016.05.001
4. GLOBOCAN. Colorectal cáncer, 2012. Publicado en línea: <http://globocan.iarc.fr>
5. InCAN, INSP." Infografía Cáncer Colon y Recto". 2015, Publicado en línea: <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>
6. Olga Marina Hano García et al. "Factores de riesgo para el cáncer colorrectal" Rev cubana med v.50 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2011
7. Clara Ibet Juárez-Vázquez, Mónica Alejandra Rosales-Reynoso. "Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares" Gaceta Médica de México. 2014;150
8. Foersch, S. and M.F. Neurath, Colitis-associated neoplasia: molecular basis and clinical translation. Cell Mol Life Sci, 2014. 71(18): p. 3523-35.
9. Ogino, S., et al., Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. Gut, 2011. 60(3): p. 397-411.
10. Cunningham, D., et al., Colorectal cancer. Lancet, 2010. 375(9719): p. 1030-47
11. Bingham, S.A., et al., Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. Lancet, 2003. 361(9368): p. 1496-501.

12. Chan, A.T. and E.L. Giovannucci, Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2010. 138(6): p. 2029-2043 e10.
13. Bouvard, V., et al., Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*, 2015. 16(16): p. 1599-600.
14. Song, M., W.S. Garrett, and A.T. Chan, Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, 2015. 148(6): p. 1244-60 e16.
15. Milinis k, Thornton M, Montazeri A. "Adjuvant chemotherapy for rectal cancer: Is it needed?" *World J Clin Oncol*. 2015 Dec 10; 6(6): 225–236. Publicado en línea doi: 10.5306/wjco.v6.i6.225
16. Decanini-Terán, González-Acosta, Obregón-Méndez. "Cáncer de recto. Diagnóstico, estadificación y tratamiento". *Cir Cir* 2011;79:481-487
17. Aparna Kalyan' Shaina Rozelle, Al Benson." Neoadjuvant treatment of rectal cancer: where are we now? " *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2016 Aug; 4(3): 206–209. Publicado online doi: 10.1093/gastro/gow017
18. P. Hong, P. Ryan. "Adjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Is It a Given?" *Journal of Clinical Oncology*, Vol 33, No 17 (June 10), 2015: pp 1878-1880.
19. M. Sadegh Fazeli et al. "Rectal cancer: a review". *Med J Islam Repub Iran*. 2015; 29: 171
20. Leduc B et al." Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203". *Bedenne LJ Clin Oncol*. 2006 Oct 1; 24(28):4620.
21. Aschele C. "Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial". *J Clin Oncol*. 2011 Jul 10; 29(20):2773-80.
22. Monson J. et al." Practice parameters for the management of rectal cancer (revised)."Task Force of the American Society of Colon and Rectal Surgeons *Dis Colon Rectum*". 2013 May; 56(5):535-50.

23. Raida M. "Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls". Clin Cancer Res. 2001 Sep; 7(9):2832-9.
24. Millan TJ. "The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy". Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 Feb 1;49(2):373-7.
25. Park K. "Molecular characterization of patients with pathologic complete response or early failure after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer using next generation sequencing". Oncotarget. 2015 Sep 15;6(27):24499-510.
26. Hur H. "Can a Biomarker-Based Scoring System Predict Pathologic Complete Response After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer?." Dis Colon Rectum. 2014 May;57(5):592-601. doi: 10.1097/DCR.0000000000000109
27. Kim S. "What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy?" Cancer Res Treat. 2016 Jul;48(3):998-1009. doi: 10.4143/crt.2015.254. Epub 2015 Oct 22.
28. Minsky BD et al. "Combined modality therapy of rectal cancer: decreased acute toxicity with the preoperative approach." Clin Oncol. 1992 Aug; 10(8):1218-24
29. Biomarker-Based Prediction of Response to Therapy for Colorectal Cancer: Current Perspective American Journal of Clinical Pathology, Volume 134, Issue 3, 1 September 2010, Pages 478–490, <https://doi.org/10.1309/AJCP2Y8KTDPOAORH>
30. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. (2017) Role of microRNAs in translation regulation and cancer. World J Biol Chem. **8**, 45-56
31. Kim SJ, Oh JS, Shin JY, Lee KD, Sung KW, Nam SJ, Chun KH. (2011) Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. J Control Release.155, 427-434.

32. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. **294**, 853-858
33. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294, 853-858
34. Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews genetics*, **10**, 704-714.
35. Svoboda M, Izakovicova Holla L, Seif R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, Dvorak J. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol*. 2008 Sep; 33(3):541-7.
36. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, Singh VK, D'Incalci M, De Placido S, Pepe S. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Jul 15; 83(4):1113-9.
37. S. Steelman. "Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging" *Aging (Albany NY)*. 2011 Mar; 3(3): 192–222. doi: 10.18632/aging.100296
38. Vivanco I. y Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer* 2002; 2: 489-501.
39. Song, G. Ouyang, S. Bao. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med*. 2005; 9: 59-61.
40. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 578-581.
41. A. Pereira et al. "Golgi Phosphoprotein 3 Mediates the Golgi Localization and Function of Protein O-Linked Mannose β -1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase 1". *J Biol Chem*. 2014 May 23; 289(21): 14762–14770. doi: 10.1074/jbc.M114.548305

42. Kunli Zhu. "GOLPH3 overexpression correlates with poor response to neoadjuvant therapy and prognosis in locally advanced rectal cancer." *Oncotarget*. 2016 Oct 18; 7(42): 68328–68338. doi: 10.18632/oncotarget.12008
43. K. L. Scott et al. "GOLPH3 modulates mTOR signaling and rapamycin sensitivity in cancer" *Nature*. 2009 Jun 25; 459(7250): 1085–1090. doi: 10.1038/nature08109
44. Sechi S et al. "The multiple cellular functions of the oncoprotein Golgi phosphoprotein 3". *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):3493-506.
45. S.E. Farber-Katz et al. "DNA Damage Triggers Golgi Dispersal via DNA-PK and GOLPH3". *Cell*. 2014 Jan 30; 156(3): 413–427. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.023
46. Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, et al. GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* 2009;139:337–51
47. M. D. Buschman, J. Rahajeng, J. Field. "GOLPH3 Links the Golgi, DNA Damage, and Cancer", *Cancer Res*; 75(4) February 15, 2015. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3081
48. Lee Met al "Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance". *Mol Cancer Res*. 2008 Aug; 6(8):1316-25
49. Armen Petrosyan "Onco-Golgi: Is Fragmentation a Gate to Cancer Progression?" *Biochem Mol Biol J*. 2015; 1(1): 16.
50. Tomoya Isaji et al. "An Oncogenic Protein Golgi Phosphoprotein 3 Up-regulates Cell Migration via Sialylation". doi: 10.1074/jbc.M113.542688
51. Schultz MJ et al. "The Tumor-Associated Glycosyltransferase ST6Gal-I Regulates Stem Cell Transcription Factors and Confers a Cancer Stem Cell Phenotype" *Cancer Res*. 2016 Jul 1;76(13):3978-88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2834.
52. Kreso A, Dick JE." Evolution of the cancer stem cell model". *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6; 14(3):275-91.

53. Charafe-Jauffret E et al .“Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer”. Clin Cancer Res. 2010 Jan 1; 16(1):45-55.
54. Beck B, Blanpain C. ” Unravelling cancer stem cell potential”. Nat Rev Cancer. 2013 Oct; 13(10):727-38.
55. Jo A. et al. “The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases”. Genes Dis. 2014 Dec; 1(2):149-161.
56. Chungang Liu. “Sox9 regulates self-renewal and tumorigenicity by promoting symmetrical cell division of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma” HEPATOLOGY, VOL. 64, NO. 1, 2016
57. A. Matheu, M. Collado, C. Wise, et al. “Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9” Cancer Res, 72 (2012), pp. 1301-1315
58. P.A. Candy, M.R. Phillips, A.D. Redfern, et al. “Notch-induced transcription factors are predictive of survival and 5-fluorouracil response in colorectal cancer patients”. Br J Cancer, 109 (2013), pp. 1023-1030
59. Li Z. at al. “miR-592 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting SOX9.” Oncol Rep. 2017 Jan;37 (1):297-304. doi: 10.3892/or.2016.5275
60. Yahui Liu et al. “miR-138 suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting SOX9 in hepatocellular carcinoma” Am J Transl Res. 2016; 8(5): 2159–2168.
61. Dan Zhu et al. “miR-32 functions as a tumor suppressor and directly targets SOX9 in human non-small cell lung cancer”. Onco Targets Ther. 2015; 8: 1773–1783.
62. William H. Matsui. “Cancer stem cell signaling pathways”. Medicine (Baltimore). 2016 Sep; 95(Suppl 1): S8-S19.
63. Alan C. Mullen, Jeffrey L. Wrana. TGF- β Family Signaling in Embryonic and Somatic Stem Cell Renewal and Differentiation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017 Jul 5; 9(7): a022186. doi: 10.1101/cshperspect.a022186

64. Philippe Blache et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol.* 2004 Jul 5; 166(1): 37–47. doi: 10.1083/jcb.200311021
65. Park J. et al. Regulation of Sox9 by Sonic Hedgehog (Shh) is essential for patterning and formation of tracheal cartilage. *Dev Dyn.* 2010 Feb;239(2):514-26. doi: 10.1002/dvdy.22192.
66. Li H et al. Insulin receptor substrate-1 and Golgi phosphoprotein 3 are downstream targets of miR-126 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2014 Sep;32(3):1225-33
67. Liu Y, Sun Y, Zhao A. MicroRNA-134 suppresses cell proliferation in gastric cancer cells via targeting of GOLPH3. *Oncol Rep.* 2017 Apr;37(4):2441-2448
68. Kongliang Ke y Tingting Lou. MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncol Lett.* 2017 Nov; 14(5): 5994–6000
69. Chiang GG1, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25485-90
70. Alice Jo et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.* 2014 Dec; 1(2): 149–161.

APÉNDICE

Medios de cultivo:

DMEM, SFB 10%, PISf (100 ml):

90 ml de Gluta-MAX-I (DMEM, alto glucosa y glutamina, Invitrogen), 10 ml de Suero fetal bovino (Invitrogen), previamente inactivado durante 30 min a 56 °C e incubado durante 2 días a 37 °C y 1 ml de solución de Penicilina (10.000 U/ml)-Estreptomicina (10.000 ug/ml).

Soluciones para ensayos de inmunodetección

TNTE

Reactivos	Cf
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Tritón x100	0.1 %
EDTA	1 mM

Geles de acrilamida

- Separador

Reactivos	10 %	12 %	15 %
Tris-HCl pH 8.8 [1.5 M]	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Acrilamida 30 %	3.3 mL	4.0 mL	5.0 mL
SDS 10 %	100 µL	100 µL	100 µL
PSA 10 %	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	4 µL	4 µL	4 µL
H ₂ O	4.0 mL	3.3 mL	2.3 mL

- Concentrador

Reactivos	5 mL
Tris-HCl pH 6.8 [1.5 M]	1.26 mL
Acrilamida 30 %	0.83 mL
SDS 10 %	50 µL
PSA 10 %	50 µL
TEMED	5 µL
H ₂ O	2.7 mL

Tris Glicina 10 X

Tris-base...30 g

Glicina.....144 g

H₂O.....cbp 1 L

Buffer de transferencia

Tris-glicina 10 x...100 mL

Metanol.....200 mL

H₂O.....cbp 1 L

Buffer de corrida

Tris-glicina 10 x...100 mL

SDS 10 %.....200 mL

H₂O.....cbp 1 L

TAE 50 X

Tris [2 M].....242.28 g

Ac. acético [1M]...57.1 mL

EDTA [0.05 M]....18.612 g

H₂O cbp.....1000 mL

Solución de Azul de Coomasie (1 L):

Coomasie R-250 al 0.25%, 500 ml de metanol y 70 ml de ácido acético. Agua c.b.p. 1L.

Solución desteñidora:

Etanol 30 %, ácido acético 10 % y Agua bidestilada 60%.

Reactivo de Bradford:

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

Amortiguador de carga para proteínas (2X):

2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M, 0.4 mg de SDS, 2ml de glicerol, 200 ug de β -mercaptoetanol y 0.1 mg de azul de bromofenol en un volumen final de 10 ml. pH 6.8.

TBE (10X):

108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico, 40 ml 0.5 M de EDTA pH 8. Agua c.b.p. 1L.

❖ Parámetros de RT-PCR

- Retrotranscripción (RT)

Reactivos	Cf	Vol
dNTP's	100 mM	0.15 µL
Multi scribe reverse	50 µL	1.0 µL
Buffer de reversa	10 x	1.5 µL
Inhibidor de RNAsa	200 µL	0.16 µL
H ₂ O libre de nucleasas	---	4.16 µL
Primer RT	---	3 µL
ARN	10 ng	5 µL

Parámetros de ciclaje en el termociclador para RT

Temperatura

16 °C...30 min

42 °C...30 min

85 °C...5 min

4 °C.....∞

- PCR- tiempo real con sondas TaqMan

Reactivos	Cf	Vol
TaqMan miRNA	20 x	1 µL
RT producto	---	1.33 µL
TaqMan universal PCR mix	2 x	10 µL
H ₂ O libre de nucleasas	---	7.67 µL

}

Parámetros de ciclaje en el termociclador para PCR

95 °C...10 min

95 °C...15 seg } 40 ciclos

60 °C...1 min }

4 °C.....∞