

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE
MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**Análisis de la expresión y función del miR-145-5p en
la respuesta patológica completa al tratamiento
neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

FREDERIK EULICES GARCIA GARCIA

DIRECTOR

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARRILLO

CODIRECTORA

DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA

Ciudad de México, enero de 2018.

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.

INTEGRACION DEL JURADO

Presidente: Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez

Secretario: Dr. Mario Cesar López Camarillo

Vocal: Dra. Alma Delia Campos Parra

1 Suplente: Dra Martha Yocupicio Monroy

2 Suplente: Dra Eliza Azuara Liceaga

Lugar donde se realizo el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario César 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. Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesora Investigador. Posgrado de Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

M en C. Raúl García Vásquez

Instituto Politécnico Nacional (ENMH)

Posgrado en Biomedicina Molecular y Biotecnología

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación presentado forma parte del proyecto “Búsqueda e identificación de microRNAs asociados a la respuesta patológica completa en tumores y sueros de pacientes mexicanas con cáncer de mama” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. de proyecto: 233370.

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 hacen posible que este tipo de proyectos se puedan llevar a cabo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por la ayuda económica brindada mediante la beca otorgada durante el periodo de Julio del 2016 a Julio del 2017 con el No de becario 712889 y a la Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por el apoyo académico proporcionado.

Deseo agradecer en especial al Dr. Mario César López Camarillo por aceptarme en su laboratorio para llevar a cabo mi proyecto de investigación. Le agradezco que me haya facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Alma Delia Campos, mi co-directora por su guía y aporte en el desarrollo de esta tesis y por su disponibilidad. Así como a la Dra Elizabeth Alvares por su paciencia y la disponibilidad que tuvo para ayudarme con el desarrollo de este proyecto. También quisiera agradecer a las doctoras: Elizabeth Alvarez, Eliza Azuara y a la Dra Martha Yocupicio por su disponibilidad y paciencia en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Raul Garcia, Ivonne Arriaga, Iraiz Nuñez, Martha Resendiz, Fany Contreras, Olga Hernandez y Yarely Vera, los cuales fueron muy importantes para mi y fueron de gran apoyo para el desarrollo de este proyecto, muchas gracias por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio y por hacer mas agradable mi estancia en la Maestria. A mis compañeros de maestria Monica Zurdo, Jorge, Victor Alvares, Diana Ortiz David de la Rosa, Yarely Vera, con los cuales inicie esta etapa de mi vida la cual me ayudo a crecer tanto personal como profesionalmente. Por su compañía y por todos esos momentos agradables que compartimos durante la estancia en la Maestria. Mi agradecimiento mas profundo para mi familia, mi hermana Nallely Garcia, mi cuñado Esteban Hernandez, mi primo Hugo Lopez y en especial a mi tia Gabriela Garcia la cual si su apoyo no me hubiera sido posible llegar al lugar en el cual me encuentro ahora.

INDICE

	PAG
Abreviaturas	1
Índice de figuras	2
Índice de tablas	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Origen y desarrollo del cáncer.....	6
2. Las características distintivas del cáncer	7
2.1 Mantenimiento de una señalización de proliferación.....	7
2.2 Evasión de supresores tumorales.....	7
2.3 Activación de la angiogénesis.....	8
2.4 Invasión y metástasis.....	8
2.5 Evasión de la apoptosis	9
2.6 Evasión a señales de anticrecimiento	9
3. Fisiología de la mama.....	9
4. El cáncer de mama en México.....	11
5. Clasificación clínica y molecular del cáncer de mama.....	14
6. Tratamiento contra el cáncer de mama.....	18
6.1 Tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama	21
7. Los microRNAs y su desregulación en cáncer.....	26
7.1 Procesamiento de los miRNA.....	27
7.2 MicroRNAs asociados a la RPC en cáncer	28
7.3 El miR-145-5p y su función en cáncer.....	31
7.4 El miR-145 y su asociación con el cáncer de mama	33

8. El receptor TGFBRII y su asociación con el desarrollo de cáncer.....	36
9. Justificación.....	40
10. Hipótesis.....	41
11. Objetivos.....	42
11.1 Objetivo general.....	42
11.2 Objetivos particulares.....	42
12. Estrategia experimental	43
13. Metodología	44
13.1 Selección de muestras	44
13.2 Criterios de inclusión	44
13.3 Criterios de exclusión.....	44
13.4 Criterios de eliminación de las muestras.....	44
13.5 Extracción de ARN total a partir de muestras embebidas en parafina.....	45
13.6 Ensayo de RT-PCR para las muestras de pacientes con RPC y no- RPC.....	47
13.7 Manejo de la línea celular MDA-MB-231.....	47
13.8 Mantenimiento de la línea celular MDA-MB-231, SKB3, MCF7 y BT- 20.....	48
13.9 Extracción de RNA de las líneas celulares MCF-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF-7 y Skb3 de cáncer de mama	49
13.10 Análisis de expresión del miR-145 en las líneas celulares MCF-10A BT20, MDA-MB-231, MCF-7 y Skb3 de cáncer de mama.....	49
13.11 Ensayo de transfección del miR-145.....	50
13.12 Ensayos de proliferación celular	51
13.13 Obtención de extractos de proteínas totales y cuantificación a partir de la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con el precursor para el miR- 145.....	52
13.14 Determinación de la concentración de las proteínas totales.....	52
13.15 Electroforesis SDS-PAGE de extractos proteicos	52

13.16 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	53
13.17 Ensayos de Western blot	53
13.18 Ensayo de apoptosis mediante citometria de flujo.....	53
13.19 Análisis estadísticos ,.....	53
14. Resultados	55
14.1 Expresión del miR-145 en pacientes que responden a la terapia neoadyuvante.....	55
14.2 Análisis de Kaplan-Meier asociada a la expresión del miR-145 en pacientes con RPC y no-RPC.....	57
14.3 Análisis bioinformático sobre un blanco del miR-145 que explique la RPC en pacientes que presentan CMTN.....	59
14.4 Análisis de expresión de miR-145 en líneas celulares de cáncer de mama.....	62
14.5 Sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231.....	66
14.6 Ensayo de la proliferación celular.....	69
14.7 Ensayo de apoptosis en la línea celular MDA-MB-231 tranfectadas con el miR-145.....	70
15.Discusión de resultados.....	71
16. Conclusiones.....	77

Abreviaturas

DNA	Acido desoxirribonucleico
cDNA	
Acido desoxirribonucleico complementario	
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	ARN mensajero
CDDP	Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II)
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DL50	Dosis letal 50
EDTA	Ácido etilendaminotetracético
ET	Extracto total
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
kDa	Kilodaltones
L	Litros
Min	Minutos
μL	Microlitros
nt	Nucleótidos
°C	Grados centígrados
PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de amonio
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tampón de Tris, Borato y EDTA
Wb	Western blot
AVPD	Años de vida perdidos por discapacidad
XPO5	Exportina 5
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
TRBP	Proteína TAR de unión a RNA
FUCAM	Fundación contra el cáncer de mama
RPC	Respuesta patológica completa
No-RPC	No respuesta patológica compl

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades biológicas o hallmarks del cáncer.....	10
Figura 2. Incidencia de tumores malignos de mama en la población femenina y masculina mayor a 20 años por cada 100 mil habitantes.....	13
Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria y los diferentes tejidos que la componen.....	15
Figura 4. Proceso de biogénesis de los miRNAs.....	32
Figura 5. Cascada de señalización de TGF β	38
Figura 6. . Análisis de expresión relativa del miR-145 en pacientes con PCR y no-PCR.....	57
Figura 7. Análisis de Kaplan Meier en el cual se evaluó si la expresión del miR-145 está relacionada con la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama.....	58
Figura 8. Resultado de la búsqueda de las vías en las cuales participa el miR-145.	62
Figura 9. Análisis de expresión del miR145 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF7 y SKb3.	64
Figura 10. Resultado de la sobre expresión del miR-145 teniendo las condiciones mock, Scramble, miR-145 (30 y 60 nM).....	66
Figura 11. Ensayo de proliferación celular realizado en la línea celular MDA-MB-231 trasfectadas con el miR-145 (60 nM) a periodos de 0, 12, 24, 36 y 48 horas.....	68
Figura 12. Ensayo de apoptosis por medio de Anexina V en la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con el miR-145.....	68
Figura 13. Ensayo de Western Blot para evaluar la expresión relativa de la proteína TGF β R2 en células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-145.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM para el cáncer de mama.....	17
Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama asociadas a receptores hormonales.....	19
Tabla 3. Diferentes tipos de tratamiento contra el cáncer de mama, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.....	23
Tabla 4. Principales beneficios de la quimioterapia neoadyuvante.....	29
Tabla 5. MicroRNAs asociados a respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en diversos tipos de cáncer.....	34

Resumen

El cáncer de mama triple negativo es uno de los subtipos de cáncer de mama que tienen un peor pronóstico debido a que es altamente proliferativo y agresivo. La quimioterapia neoadyuvante se ha utilizado para tratar a las pacientes con cáncer de mama triple negativo localmente avanzado y se ha demostrado un porcentaje de estas presenta una respuesta patológica completa. Los microRNAs (miRNAs) son secuencias de RNA no codificantes los cuales se encargan de regular negativamente la expresión de los genes a nivel postranscripcional. Se ha propuesto que los miRNAs podrían funcionar como potenciales indicadores de la respuesta patológica completa. En la presente investigación se demostró que la baja expresión del miR-145-5p se asocia con la respuesta patológica completa, mientras que los ensayos *in vitro* demostraron que la sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231 es capaz de reducir la expresión de la proteína TGF β R2. Estos resultados son una manera de demostrar como la expresión del miR-145-5p se asocia con la respuesta patológica completa en las pacientes con cancer de mama triple negativo.

Abstract

Triple negative breast cancer is one of the subtypes of breast cancer that have a worse prognosis because it is highly proliferative and aggressive. Neoadjuvant chemotherapy has been used to treat patients with locally advanced triple negative breast cancer and a percentage of these has been shown to present a complete pathological response. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNA sequences which are responsible for negatively regulating the expression of genes at the post-transcriptional level. It has been proposed that miRNAs could function as potential indicators of the complete pathological response.

In the present investigation we found that the low expression of miR-145-5p was associated with the complete pathological response. At the same time, a Kaplan Meier analysis was developed in which we were able to associate the expression of the miR-145-5p with a longer survival period. A search of predicted targets for the miR-145 was carried out using the miRbase bioinformatics platform; which was focused on the search for those that were associated with the complete pathological response. Through in vitro tests we demonstrated that the overexpression of miR-145 in the MDA-MB-231 cell line is capable of inducing apoptosis as well as reducing the expression of TGF β R2 protein at a concentration of 60nM. These results demonstrate that the expression of miR-145-5p is associated with the complete pathological response in patients with triple negative breast cancer.

1. Introducción

1.1 Origen y desarrollo del cáncer

En tejidos normales en adultos el tamaño de la población de las células está determinado por las tasas de proliferación celular, diferenciación y muerte celular. Como una regla general, el incremento en el número de células puede resultar en ya sea en el incremento en la proliferación o una disminución en la muerte celular (Engström W, y *col*, 2015). El cáncer se define etiológicamente por el crecimiento descontrolado y la diseminación de un grupo de células anormales las cuales, si no son controladas pueden provocar la muerte. El cáncer es considerado como una enfermedad multifactorial en la cual intervienen factores externos tales como el tabaco, agentes infecciosos, agentes químicos, exposición a luz UV, etc., así como como factores internos entre los cuales encontramos la herencia genética, mutaciones somáticas, factores hormonales, condiciones inmunológicas, entre otros; los cuales pueden actuar juntos o en secuencia para que pueda aparecer la enfermedad (Hejmadi M, 2010).

El cáncer presenta capacidades distintivas o hallmarks, las cuales se adquieren durante el proceso de desarrollo del tumor. La base de este concepto indica que las células normales experimentan una transformación paso a paso hacia la neoplasia, adquiriendo de este modo, una sucesión de capacidades distintivas. Hannan y *col*. argumentan que los tumores son más que masas insulares de células malignas en proliferación; en cambio son tejidos complejos, compuestos de múltiples tipos de células que participan en interacciones heterópicas una con otra. (Engström W, y *col*, 2015). Las características distintivas del cáncer nos proporcionan una base sólida para la comprensión de la biología del cáncer. Entre estas capacidades distintivas encontramos el mantenimiento de una señalización de proliferación, evasión de supresores tumorales, evasión de la destrucción por el sistema inmune, capacidad de una inmortalidad replicativa, promoción de la inflamación tumoral, activación de invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, inestabilidad genómica y mutación, resistencia a la muerte celular y

una desregulación de la energética celular (Figura 1) (Hanahan D. and Weinberg, R. 2011). Todas estas características son adquiridas debido a la inestabilidad genética que presentan las células cancerígenas, ya que en ellas es más común que ocurran mutaciones las cuales pueden incluir rearrreglos cromosómicos, sustituciones, deleciones, entre otras.

2. Las características distintivas del cáncer

2.1 Mantenimiento de una señalización de proliferación

Las células normales dependen de las vías de señalización de crecimiento y proliferación, el ciclo celular estrictamente regulado para proliferar y mantener la homeostasis del tejido de manera controlada; sin embargo, esto se altera en el caso del cáncer. Actualmente se ha descrito que en las células cancerosas, las vías de crecimiento y señalización proliferativa presentan una o más alteraciones de conducción dentro de sus compartimentos que les da un borde de supervivencia. Entre estos se incluyen la sobre expresión de algunos ligandos de crecimiento, sus receptores o moléculas de señalización citosólica.

2.2 Evasión de supresores tumorales

Durante el proceso que conlleva a la malignidad del cáncer, las células cancerosas se enfrentan a una amplia gama de situaciones de estrés las cuales incluyen una excesiva señalización, daño en el ADN, hipoxia, escasez de nutrientes e incluso el uso de una terapia contra el cáncer. Fisiológicamente, las células adoptan una variedad de respuestas para adaptarse al estrés si es posible o, cuando el estrés es abrumador, se eliminan altruistamente por el bien de los tejidos completos y sanos. La resistencia a la apoptosis, el desarrollo de mecanismos de reparación de ADN, evasión de la autofagia y la senescencia, son algunos de los mecanismos por los cuales las células cancerígenas son capaces de evadir señalizaciones que inhibirían el crecimiento y proliferación celular.

2.3 Activación de la angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de formación, división celular, migración y ensamblaje de células endoteliales (EC) de vasos preexistentes. Este se presenta durante la embriogénesis para la expansión y remodelación de redes vasculares primitivas y es parte de los eventos posnatales que incluyen la cicatrización de heridas, el ciclo reproductivo femenino y la inflamación crónica. En estos eventos, sin embargo, la angiogénesis se desactiva o puede ser prolongada pero autolimitada, a diferencia de las malignidades en las que el proceso se activa continuamente. La regulación de la angiogénesis implica factores pro y anti-angiogénicos; su equilibrio determina el estado del "interruptor angiogénico". Solo cuando un disparador inclina la balanza hacia factores proangiogénicos como en el caso de malignidad se enciende el interruptor y los tejidos quiescentes muestran signos de angiogénesis.

2.4 Invasión y metástasis

La característica definitoria de la malignidad implica la capacidad de invadir el tejido circundante y alojarse en sitios distantes para formar crecimientos secundarios a los cuales se les denomina "metástasis". La enfermedad metastásica es responsable de más del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer e involucra una serie de eventos, la "cascada de invasión-metástasis". Para que las células cancerosas se produzcan en sitios distantes deben: 1) invadir a través de la matriz extracelular (MEC), incluida la membrana basal y las células estromales, 2) intravasarse en la vasculatura tumoral, 3) sobrevivir el transporte en circulación, 4) extravasarse en el parénquima de órganos distantes, y 5) sobreviven y manipulan microambientes foráneos que forman micrometástasis, que más tarde 6) pueden convertirse en macrometástasis clínicamente relevantes, un paso limitante de velocidad llamado "colonización"

2.5 Evasión de la apoptosis

La evasión de la apoptosis se lleva a cabo por la existencia de mutaciones con la pérdida de función en el gen supresor de tumores p53, que altera la vía principal por la que si el ADN resulta dañado se desencadenaría la apoptosis. En este tipo de eventos se ha descrito la participación de genes como BCL2, los cuales promueven la supervivencia de las células cancerosas produciendo proteínas que intervienen en la apoptosis.

2.6 Insensibilidad a señales de anticrecimiento

Los tejidos normales se encuentran protegidos de la proliferación celular descontrolada mediante una gran variedad de mecanismos inhibidores del crecimiento. Las células cancerosas deben evadir señales de anticrecimiento para continuar con su proliferación. La mayoría de las señales de anticrecimiento actúan durante la parte final de la fase G1 y ejercen sus efectos a través de múltiples proteínas.

3. Fisiología de la mama

La glándula mamaria tiene como principal función la producción y secreción de leche para la lactancia. La leche es producida en unas pequeñas glándulas llamadas bulbos que se agrupan para formar lobulillos y estos, a su vez constituyen los lóbulos las cuales son las verdaderas unidades funcionales. Estas estructuras glandulares están conectadas por unos tubos denominados ductos los cuales se encargan del transporte de la leche desde los lóbulos hasta el pezón (figura 2) (Bayo L, y col, 2007). La clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se divide en no invasores (*in situ*), invasores y otros (Brandan ME y Villaseñor Y, 2009). Aproximadamente 75-80% de los cánceres son invasivos o infiltrantes, esta característica le da a las células la capacidad de penetrar alrededor de los canales linfáticos y vasculares dando metástasis.

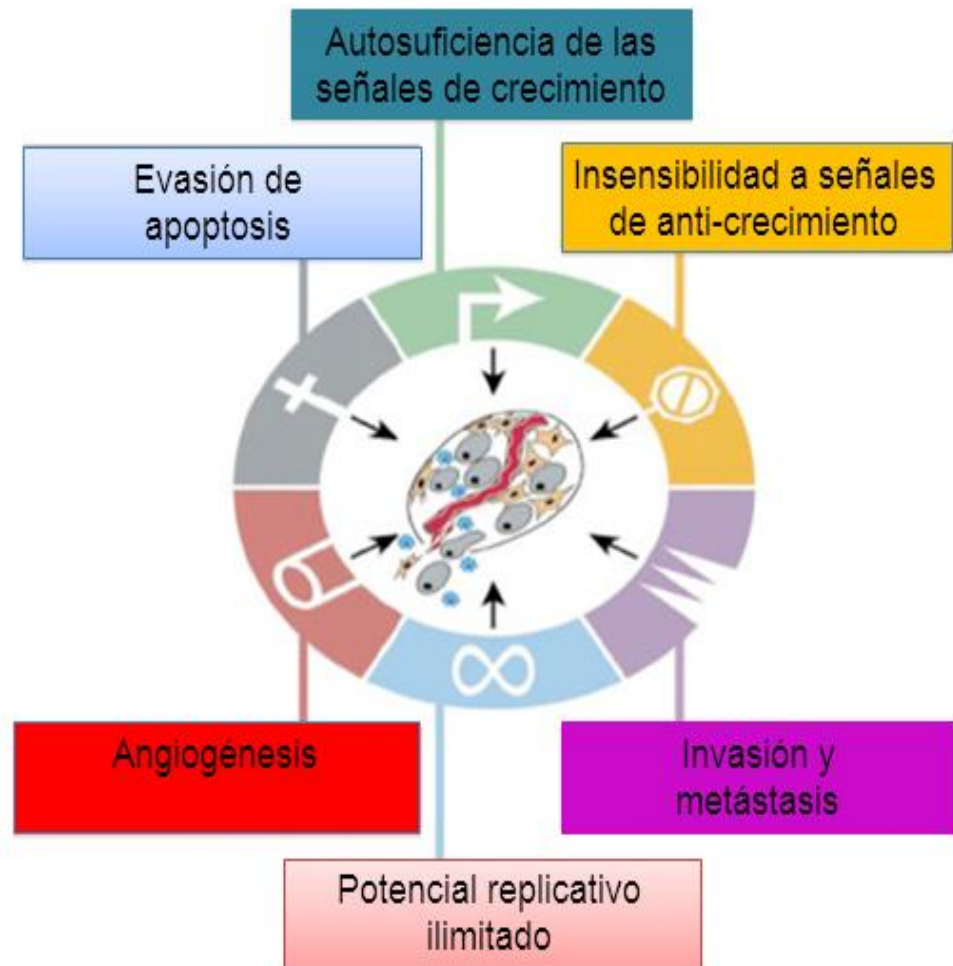


Figura 1. Capacidades biológicas o hallmarks del cáncer. Propiedades biológicas que adquiere o caracterizan a un tumor maligno y nos ayudan a entender el mecanismo molecular por el cual ocurre la transformación de una célula normal hacia una célula maligna (Tomado de Hanahan, *D. and* Weinberg, R. 2011).

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasor que representa el 70 al 80%, el segundo más común es el lobulillar invasor (5-10%), difícil de diagnosticar por su diseminación difusa en vez de formar una masa, su tasa de multifocalidad y bilateralidad es alta.

4. El cáncer de mama en México

A nivel mundial, el cáncer de mama es el más frecuente y la causa de muerte más común en mujeres que fallecen por esta neoplasia maligna. Se estima que cada año se diagnostican cerca de 1.67 millones de mujeres con cáncer de mama y 522, 000 pacientes fallecen por esta enfermedad. En países pobres y en vías de desarrollo, la supervivencia a cinco años es del 30-45%, en contraste con países plenamente desarrollados, en los cuales tienen un 80%. Estos resultados dependen del acceso a una detección oportuna de cáncer y a un tratamiento óptimo (Golditz G, y *col*, 2007). Análisis recientes de las tendencias de mortalidad y morbilidad ilustran la carga de la enfermedad en los países en desarrollo. Como proporción de todos los años de vida perdidos por discapacidad (AVPD), perdidos por cáncer, el cáncer de mama supera al cáncer cérvicouterino y prostático en las regiones en vías de desarrollo del mundo. En la región de Latinoamérica y el Caribe, el cáncer de mama es la principal causa de AVPD perdidos por cáncer, y corresponde a 9%, seguido por el cáncer cérvicouterino con 7% (Knaul M, y *col*, 2009).

El cáncer de mama representa una de las principales causas de muertes prematuras debido a que 60% de las mujeres que mueren por esta enfermedad tiene entre 30 y 59 años de edad. Para el año 2006, el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de muerte más común en México entre las mujeres de 30 a 54 años y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años (después de la diabetes y las cardiopatías). Si bien el cáncer de mama es todavía más común en los grupos de población de nivel socioeconómico más elevado, en la actualidad afecta a todos los grupos poblacionales (Rodríguez S, y *col*, 2000).

El análisis de mortalidad por área geográfica muestra diferencias notorias por entidad federativa, con las tasas de defunción más altas en los estados del centro y norte del país. Seis estados concentraron la mitad de las muertes por cáncer de mama durante el 2010, Ciudad de México (13.4%), Estado de México (12.4%), Jalisco (8.2%), Veracruz (6.4%), Nuevo León (6%) y Guanajuato (3.8%). En el año 2010 la tasa de mortalidad fue de 18.7 por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años, lo cual representa un incremento del 49.5 % en las últimas dos décadas. En el periodo de 2007 al 2014, la tasa de mortalidad por cáncer de mama aumento en todos los estados (Grafica 1), principalmente en Chihuahua, Coahuila y Guerrero, con aumentos de más del 20%; en contraste, aquellos con menor elevación fueron Aguas Calientes, Durango y Baja California. Esta afección se ha convertido para México en un problema creciente de salud pública. Tanto la mortalidad como el número de casos nuevos que se presentan cada año se han incrementado paulatinamente, siendo impostergable el control de los factores de riesgo conocidos y la implementación de un programa de detección organizado que incluya la garantía de calidad en todos los procesos, desde la detección hasta el tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer (Cárdenas S, y col, 2015).

El carcinoma ductal in situ (CDIS) permanece confinado al sistema ductal de la mama sin penetrar la membrana basal, aproximadamente el 30 al 50% de las pacientes con carcinoma ductal *in situ* desarrollara carcinoma ductal en un periodo de 10 años. El carcinoma lobulillar in situ (CLIS) se origina del lobulillo terminal ductal, pudiéndose distribuir de forma difusa por la mama (Huicochea S, y col, 2009). Cada mama contiene vasos sanguíneos y vasos linfáticos. Estos son estructuras pequeñas con forma de frijol, las cuales filtran sustancias en la linfa y ayudan a combatir infecciones y enfermedades. Cerca de la mama se encuentran racimos de ganglios linfáticos en la región de las axilas (debajo de los brazos), por encima de la clavícula y en el pecho. Si la mama se divide imaginariamente en cuatro, la mayoría de los tumores se localizan en el cuadrante superior externo, es decir, arriba del pezón y en el extremo que da hacia la axila, por lo cual, cuando se disemina, las células cancerosas migran principalmente hacia los ganglios de esa zona (Imigio F. y Hernández, M., y col, 2011).

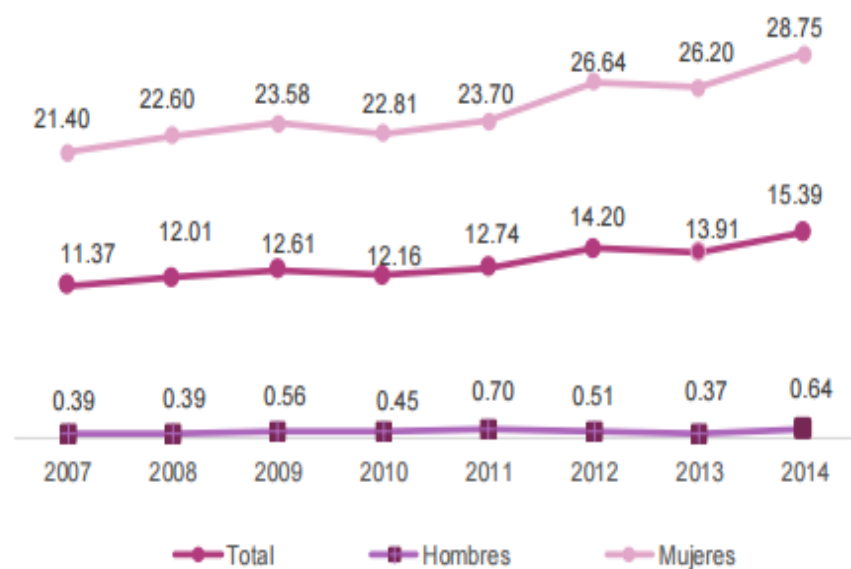


Figura 2. Incidencia de tumor maligno de mama en la población femenina y masculina mayor a 20 años por cada 100 mil habitantes. A partir del año 2007 se han incrementado el número de casos de cáncer de mama en nuestro país esto puede ser atribuido a múltiples factores siendo el más preocupante una tardía detección de la enfermedad. Fuente: SSA, CENAVECE (2014), Anuario de morbilidad 1984-2013; y CONAPO (2014) Proyecciones de la población 2010-2050.

El sistema TNM es un sistema de estadificación seguro y fácilmente reproducible, que permite obtener una nomenclatura estandarizada la cual facilita el intercambio de información entre diferentes centros y ayuda a clasificar a las pacientes de acuerdo al comportamiento biológico del tumor, también permite evaluar y determinar la selección de estrategias terapéuticas y el pronóstico de estas. Los médicos utilizan la clasificación clínica para evaluar los riesgos y el pronóstico asociado a las características específicas de la paciente y el tipo de cáncer implicado. El sistema de estadificación TNM se utiliza de forma generalizada. La combinación del tamaño del tumor (T) y la invasión del tejido circundante, la implicación de los ganglios linfáticos (N), y de la metástasis (M) o la extensión del cáncer a otro órgano del cuerpo.

5. Clasificación clínica y molecular del cáncer de mama

El estadio es fundamental para decidir el tratamiento, puesto que cuanto menos avanzado es el estadio, mejor es el pronóstico para las pacientes. Existen 5 estadios (Tabla 1): estadio 0 (cero), que es carcinoma ductal *in situ* no invasivo (DCIS), y los estadios I a IV (1 a 4), que representan cáncer de mama invasivo. El estadio es una forma de describir el cáncer, de manera que los médicos puedan planificar de forma conjunta los mejores tratamientos. Los médicos usan diferentes pruebas de diagnóstico para averiguar el estadio del cáncer, por lo que tal vez no pueda determinarse el estadio hasta que se hayan realizado todas las pruebas correspondientes. Conocer el estadio ayuda al médico a decidir cuál es el mejor tratamiento y puede ayudar a predecir el pronóstico de un paciente, es decir, la probabilidad de su recuperación (González C, y col, 2012). Dentro de la denominación de carcinoma de mama se incluye un grupo heterogéneo de enfermedades con comportamientos biológicos diferentes. En los últimos años con los estudios de expresión génica se han podido determinar subgrupos con perfiles de expresión diferencial y los cuales presentan un comportamiento biológico diferente (Tabla 2).

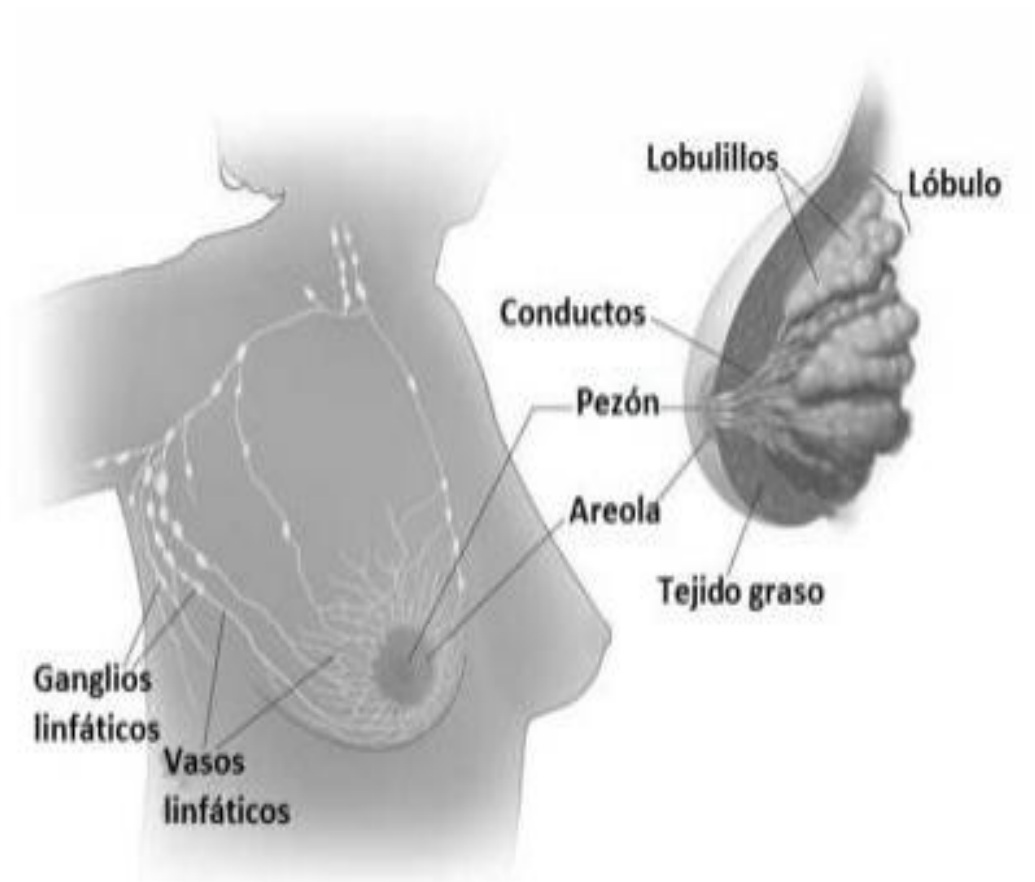


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria y los diferentes tejidos que la componen. La mama está compuesta por dos tipos de tejidos principalmente, por un lado encontramos a los lóbulos, los cuales son los encargados de la producción de la leche durante el periodo de lactancia y los ductos los cuales son los encargados de transportar la leche desde los lóbulos hacia el pezón. (Imagen tomada de la Guía de práctica clínica de la ESMO).

En el estudio realizado por Perou y colaboradores se diferenciaron 4 grupos; Luminal (caracterizado por la expresión de genes relacionados con el receptor estrogénico), el factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2) (caracterizado por la sobreexpresión de HER2), el Basal (caracterizado por la expresión de genes como EGFR y citoqueratinas basales) y el Normal (éste posteriormente se cree que es un artefacto de contaminación de tejido normal). Posteriormente, se ha añadido una subdivisión en el grupo luminal (A y B) y se ha añadido un nuevo grupo el denominado Claudin-Low. Las características histológicas del cáncer de mama, han sido utilizadas como elementos importantes para la definición de los diferentes factores pronóstico y de tratamiento de esta enfermedad.

Sin embargo, las características inmunohistoquímicas el tumor nos permiten diferenciar alteraciones genéticas que nos proporcionan la posibilidad de clasificar al cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad del tratamiento (Uribe R. y col, 2010). El cáncer de mama Triple Negativo (CMTN) constituye del 10-30% de todos los tipos de cáncer de mama, tiende a ser más agresivo, ya que son tumores que tienen un crecimiento más rápido, existe un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad y las pacientes generalmente tienen un pobre pronóstico (Hon JD, y col, 2016). Debido a que este tipo de tumores no presentan receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP) o HER2, las terapias hormonales no son eficaces en él; sin embargo, para su tratamiento se suele utilizar una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia.

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM para el cáncer de mama (tomada de la Guía de práctica clínica de la ESMO)

Estadio	Definición
Estadio 0	Las células anómalas continúan contenidas en el conducto en el que aparecieron en un principio.
Estadio 1	El tumor mide menos de 2cm y pueden encontrarse pequeños grupos de células cancerosas en los ganglios linfáticos. El cáncer de mama estadio I se divide en los estadios IIA y IIB.
Estadio 2	El tumor mide menos de 2 cm y se ha extendido a los ganglios linfáticos en la axila o el tumor mide entre 2 cm y 5 cm de diámetro, pero no se ha extendido a los ganglios linfáticos en la axila. El cáncer de mama de estadio II se divide en los estadios IIA y IIB.
Estadio 3	El tumor puede tener cualquier tamaño, pero: - se ha extendido a la pared torácica y/o la piel de la mama - se ha extendido a por lo menos 10 ganglios linfáticos en la axila o los ganglios linfáticos en la axila están unidos entre sí o a otras estructuras - se ha extendido a los ganglios linfáticos cerca del esternón (tórax óseo). - se ha extendido a los ganglios linfáticos debajo o encima de la clavícula El cáncer de mama de estadio III se divide en los estadios IIIA, IIIB, y IIIC
Estadio 4	El cáncer se ha extendido a otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia a los huesos, pulmones, hígado o cerebro. Dichos depósitos tumorales distantes se denominan metástasis

El diagnóstico, manejo y tratamiento del CMTN es actualmente un reto para los oncólogos clínicos, a pesar de tener una tasa de respuesta alta a la quimioterapia en comparación con los otros tipos de cáncer de mama, los resultados favorables son cortos debido a mecanismos de resistencia que se desarrollan en forma precoz, siendo esta la paradoja del cáncer de mama triple negativo. Es por ello que la mayoría de los estudios sobre esta neoplasia están enfocados a la identificación de biomarcadores terapéuticos con resultados limitados hasta el momento. A diferencia de otros subtipos, los pacientes con cáncer de mama triple negativo se benefician de la quimioterapia, solo el 19% logra una respuesta clínicamente completa. Para el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama triple negativo se utiliza un tipo de quimioterapia aplicada antes de una cirugía (en lugar de después de la cirugía), a este tipo de tratamientos se les denomina Quimioterapia Neoayuvante, los resultados han demostrado que este tratamiento puede tener múltiples beneficios, uno de ellos es que ayuda a reducir el tamaño del tumor lo suficiente para que una mujer pueda tener una cirugía de conservación de las mamas en lugar de una mastectomía (Zaharia M y Gómez H, 2013).

6. Tratamiento contra el cáncer de mama

Las opciones de tratamiento para el cáncer de mama varían según la etapa, su tamaño, posición, si se ha extendido a otras partes del cuerpo y la salud física del paciente. El tratamiento del cáncer de mama es complejo y requiere la participación de un equipo multidisciplinario para poder ofrecerles a las pacientes un tratamiento óptimo. Tanto los cirujanos como los oncólogos médicos, los radioterapeutas y los restantes especialistas trabajan en conjunto para desarrollar un tratamiento adecuado para cada paciente. Los principales tratamientos contra el cáncer de mama son la cirugía, la radiación, quimioterapia, terapia endocrina y terapia dirigida, de las cuales sus características se resumen en la tabla 3. Estas terapias se pueden usar solas o en combinación dependiendo de la etapa de la enfermedad. (Nounou MI, y col, 2015).

Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama asociadas a receptores hormonales (tomada de la Guía de práctica clínica de la ESMO)

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento	Frecuencia
Luminal A	RE (+) y/o PR (+); HER2/neu(-)	Subtipo más común y menos agresivo. Buen pronóstico. Bajo grado histológico. Respuesta hormonal. Asociado a incremento de edad.	50%
Luminal B	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (+)	Similar al subtipo Luminal A. Peor resultado que el luminal A. Más frecuentemente RE(+)/RP(-).	
Basal	RE(-), RP(-); HER2/neu (-) CK 5/6 (+) y/o EGFR(+)	Subtipo agresivo. Alto grado histológico e índice mitótico. Riesgo en edades menores a 40 años. Más frecuente en mujeres premenopáusicas.	
Her2/neu (+); RE (-)	RE (-), RP (-) y HER2/neu (+)	Menos común. Subtipo altamente agresivo. Alto grado histológico. Riesgo en mujeres menores a 40 años.	30%
Triple negativo	RE(-), RP (-) y HER2/neu (-)	Altamente agresivo.	

Se presenta en mujeres jóvenes.

Tumores de mayor tamaño.

15-20%

Altamente metástasicos.

Estimación de supervivencia de 5 años.

RE: Receptores de estrógenos, RP: Receptores de progesterona, Her2/New: receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano, EGFR receptor del factor de crecimiento epidérmico, CK5/6: Citoqueratina 5/6

En los estadios tempranos del Cáncer de Mama, la cirugía es el tratamiento fundamental el cual al ser utilizado junto con la radioterapia, pueden controlar la enfermedad en la gran mayoría de los casos. A pesar de esto, alrededor de un 30% de las pacientes finalmente fallecerá debido a la diseminación del cáncer. Como se mencionó anteriormente, diferentes características biológicas son consideradas para el diagnóstico y pronóstico de las pacientes con cáncer de mama, entre ellas podemos mencionar el grado histológico, estado de los nódulos linfáticos, estatus de los receptores hormonales y el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2). Algunos de estos factores han sido asociados con la tasa de supervivencia de las pacientes y sus resultados clínicos después del tratamiento (Imigio G, y col, 2011). La terapia neoadyuvante o quimioterapia pre operativa es ahora considerada como una estrategia legítima para el tratamiento contra el cáncer de mama localmente avanzado. Esto se basa en evidencia preclínica y clínica, que sugiere colectivamente que en mujeres con alto riesgo de presentar enfermedad micrometastásica, puede ser necesario un tratamiento temprano y efectivo mediante quimioterapia sistémica para mejorar el resultado clínico de la terapia loco regional. El objetivo de esta terapia tiene como objetivo disminuir el tamaño del tumor para facilitar una cirugía menos invasiva y, con suerte, mejorar el resultado al tratamiento (Chatterjee A and Erban JK, 2017).

6.1 Tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama

El tratamiento neoadyuvante, se refiere al tratamiento de pacientes con agentes sistémicos antes de la extirpación quirúrgica definitiva de un carcinoma. Originalmente, se usó como tratamiento estándar para los cánceres de mama localmente avanzados inflamatorios e inoperables (Sahoo S, y col, 2009). En general la quimioterapia neoadyuvante puede provocar sobre los tumores una reducción en el tamaño tumoral, cambios en las características y en la densidad de la células cancerígenas, en la apariencia histológica, en el grado de diferenciación tumoral, la presencia y las características de la invasión vascular

linfática, así como variaciones en la expresión de factores pronósticos para la respuesta a la terapia (Tabla 4). La respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante, tanto en el tumor primario como de las metástasis ganglionares, se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y la recidiva, actualmente esta terapia se propone como un referente válido para la aprobación de fármacos en cáncer de mama, dada la excelente correlación con la evolución a largo plazo (Tresserra, F., y col 2012).

La Respuesta Patológica Completa (RPC) se define como: “la ausencia de tumor total o residual en la mama” y esta se asigna a las pacientes que responden favorablemente al tratamiento neoadyuvante. Este término incluye múltiples criterios para evaluar la posible respuesta al tratamiento. En general, son consideradas características como el tamaño del tumor, la presencia de carcinoma *in situ*, la cantidad de células residuales, la apariencia histológica y la respuesta ganglionar, entre otras variables todas ellas permiten evaluar el efecto que tiene la quimioterapia sobre los tumores (Tufia C, y col, 2015). Hasta el momento existe una incapacidad de los métodos clínicos para predecir con precisión la respuesta a la quimioterapia en las pacientes con cáncer de mama. El cáncer de mama triple negativo presenta una proporción significativa de tumores los cuales son altamente resistentes a la quimio radioterapia estándar y en algunos casos estos pueden progresar durante el tratamiento. Sin embargo Liedtke C, y col, realizaron un estudio para determinar si existía alguna relación entre las pacientes con cáncer de mama triple negativo y el resultado clínico, así como la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante o RPC, ellos encontraron que las pacientes con cáncer de mama triple negativo tienen mayores tasas de RPC así como mayores periodos de supervivencia, en comparación con aquellas pacientes que no presentan Cáncer de Mama Triple Negativo, indicando de este modo la eficiencia del tratamiento neoadyuvante en las pacientes con cáncer de mama triple negativo.

Tabla 3. Diferentes tipos de tratamiento contra el cáncer de mama, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos (Modificada de Nounou MI, y col, 2015).

Tipo de tratamiento	Características	Ventajas	Desventajas
Cirugía	Extirpación completa del tumor cuando este es pequeño. En tumores más grandes se aplica quimioterapia o terapia hormonal adicional a la cirugía.	Se puede extirpar el tumor. Fácil de realizar. Se pueden realizar estudios clínicos en el tejido extirpado.	Tratamiento invasivo. Se requiere extirpar tejido que rodea al tumor. Pueden quedar células cancerígenas, en estos casos se requiere otra cirugía.
Radioterapia	Uso de rayos X u otras partículas con alto potencial para matar células cancerígenas.	Puede ayudar a disminuir el tamaño de un tumor previo a una cirugía o posterior a esta para evitar la recurrencia del cáncer.	Puede causar efectos secundarios como fatiga, hinchazón de la mama, enrojecimiento o decoloración/hiperpigmentación de la piel y dolor/ardor en la piel donde se aplicó la radiación, y en ocasiones ampollas o descamación.
Terapia sistémica	Terapia que puede ser aplicado de manera oral o intravenosa. Puede ser de tres tipos: Quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida.		
Quimioterapia	Fármacos para destruir a las células cancerígenas, los cuales actúan al	Puede aplicarse previo a la cirugía para ayudar a disminuir el tamaño	Los efectos dependen de la persona, de los fármacos administrados, del programa y las dosis utilizadas.

	inhibir su capacidad del tumor o para proliferar y posterior a esta para dividirse evitar recurrencia del cáncer	Entre los efectos secundarios podemos encontrar fatiga, riesgo de infección, náuseas y vómitos, caída del cabello, pérdida de apetito y diarrea.
Terapia hormonal (terapia endocrina)	Tamoxifeno: Medicamento que bloquea al estrógeno e impide su fijación a las células de cáncer de mama. Inhibidores de la aromatasa (IA): Disminuyen la cantidad de estrógenos producidos por los tejidos que no son de los ovarios en las mujeres postmenopáusicas al bloquear la enzima aromatasa.	Tratamiento eficaz para la mayoría de los tumores que presentan un resultado positivo para los receptores de estrógenos o progesterona Sofocos, sequedad, secreción o sangrados vaginales; riesgos muy raros de padecer cáncer de la pared inferior del útero, cataratas y coágulos sanguíneos. Dolor articular y muscular, sequedad vaginal, un mayor riesgo de osteoporosis, fracturas de huesos y aumento en los niveles de colesterol.
Terapia dirigida	Tratamiento que está dirigido contra los genes o las proteínas específicas del cáncer, o las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y la supervivencia del cáncer.	
	Terapia dirigida contra	Tratamientos Los efectos secundarios

HER2: Inhibición de la proteína que participa en el crecimiento descontrolado de las células cancerosas.	focalizados distintos a la quimioterapia. Ayudan a bloquear el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas y, a la vez, limitan el daño a las células sanas.	dependen de cada persona y de los medicamentos administrados y sus concentraciones.
--	--	---

El enfoque más prometedor para predecir la respuesta a la terapia probablemente involucra una combinación de biomarcadores que sean fácilmente cuantificables, traducibles en múltiples plataformas de evaluación y, lo más importante, que sean reproducibles. Los miRNAs se han propuesto como posibles biomarcadores en pacientes de cáncer de mama debido a que son moléculas que son fácilmente detectables. Recientemente, perfiles de miRNAs han sido evaluados para mejorar la clasificación de los pacientes con cáncer de mama como respondedores y no respondedores a las terapias con prometedores resultados (Bartel DP, 2009).

7. Los microRNAs y su desregulación en cáncer

Los miRNAs son secuencias cortas de RNA no codificantes que presentan una longitud de 20 a 24 nucleótidos (Wang S, y col, 2009). Los miRNAs pueden ser expresados de manera tejido específica (Zou C, y col, 2012) y se encargan de la regulación postranscripcional de la expresión genética en un gran número de procesos celulares clave como proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo y en la respuesta inmune (Jansson M. and Lund A, 2012.). La forma en la que actúan los miRNA en la regulación de la expresión de una proteína, es mediante la unión de estos en la región 3' UTR del RNAm del gen blanco. Los miRNA contienen una secuencia que se denomina "región semilla" la cual consiste de 6-8 nucleótidos que se unen a una secuencia complementaria del RNAm a la cual se unen, dependiendo del grado de homología con la región 3'UTR de la secuencia blanco, los miRNA pueden inducir la represión transcripcional o degradación del RNAm. En general el potencial de los miRNAs sobre la regulación genómica es enorme, se ha estimado que más del 60% de los RNAm se encuentran bajo el control de los miRNAs (Jansson MD, y col, 2012). Sin embargo la desregulación de su expresión tiene efectos negativos en el crecimiento normal de las células, lo cual puede contribuir con el desarrollo de enfermedades como diabetes, desordenes inmuno o neurodegenerativos y cáncer. En particular, en cáncer, una aberración en los niveles de expresión de los miRNAs se ha asociado

con el comienzo y progresión de diferentes tipos de cáncer (Bertoli, G, *et al*, 2015).

Existen múltiples reportes que indican que algunos miRNAs se encuentran aberrantemente expresados en pacientes con cáncer de pulmón, próstata, ovario, mama, colorrectal, entre otros (Ng EK, *y col*, 2013). Existen factores los cuales pueden provocar una desregulación de los miRNAs en cáncer, generalmente esto puede ser debido a que sus genes se encuentran localizados en regiones genómicas las cuales son inestables en cáncer, en estas regiones es común encontrar deleciones, mutaciones, silenciamientos epigenéticos (una aberrante metilación del ADN y modificaciones en las histonas) y/o alteraciones en el procesamiento de los miRNAs son algunos de los factores que causan una desregulación de los miRNAs en cáncer debido a que pueden afectar la síntesis de los miRNAs primarios, su procesamiento o maduración o su interacción directa con sus RNAs mensajeros blanco (Letelier P, *y col*, 2014). Muchos miRNAs son únicos y diferencialmente expresados en ciertos tipos de cáncer comparados con el tejido normal, actualmente se han considerado estos perfiles de expresión como marcadores pronósticos para esta enfermedad (Donzelli S, *y col*, 2015). Algunos de los miRNAs más estudiados debido a que se ha descrito que presentan una expresión aberrante en cáncer y los cuales contribuyen a su desarrollo son let-7, miR-21, y la familia del miR-34 (Wang S, *y col* 2009). Muchos miRNAs se encuentran bajo investigación como indicadores de un posible pronóstico y diagnóstico, así como objetivos terapéuticos y biomarcadores en subtipos de cáncer (Letelier P, *y col*, 2014).

7.1 Procesamiento de los miRNAs

Los miRNAs son transcritos de genes individuales que contienen su propio promotor o intragénicos de porciones de genes codificantes de proteínas. Los miRNAs son transcritos por la RNA Polimerasa II como pri-miRNA, los cuales son reconocidos por un mini complejo de procesamiento que contiene a una enzima RNasa de tipo III llamada Drosha, la cual corta el transcrito primario y lo libera en una estructura de tallo y burbuja llamado pre-miRNA el cual

subsecuentemente es transportado hacia el citoplasma por la exportina 5 (XPO5). Una vez en el citoplasma, un complejo de proteínas las cuales incluyen a la RNasa Dicer y a la proteína TAR de unión a RNA (TRBP) las cuales se encargan de cortar el pre-miRNA para producir una cadena sencilla de miRNA madura; que posteriormente se incorpora dentro del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual incluye otras proteínas como AGO2 y GW182. El miRNA maduro induce el silenciamiento de los genes a nivel postranscripcional por la unión del complejo RISC a una secuencia particular y la cual es complementaria al miRNA la cual se encuentra en la región 3' UTR del RNAm. Un solo miRNA puede tener como blanco a cientos de RNAm, por tanto, una expresión aberrante de un miRNA puede afectar a una multitud de transcritos y puede influir profundamente en vías de señalización relacionadas al cáncer (Bertoli, G, y *col*, 2015).

7.2 MicroRNAs asociados a la RPC en cáncer

Los miRNAs se han propuesto como posible biomarcadores en pacientes con cáncer de mama; debido a que pueden ser fácilmente detectados en diferentes tipos de muestras, desde tumores (miRNAs no circulantes), así como en sangre, plasma, suero y saliva. Los miRNAs son muy confiables y se encuentran protegidos de la actividad de RNAsas, gracias a que se encuentran unidos a lipoproteínas como lípidos de alta densidad (LAD), la proteína argonauta 2 (AGO2), o embazados en micropartículas como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Estas características les permiten ser analizados para el diagnóstico, pronóstico y predicción de resultados terapéuticos en pacientes con Cáncer de Mama (Bertoli, G., y *col*, 2015).

En las pasadas décadas la mayoría de los estudios se han enfocado en encontrar posibles indicadores para el diagnóstico y pronóstico ante una posible respuesta o resistencia ante un tratamiento quimioterapéutico en cáncer de mama (Ng EK, y *col*, 2013).

Tabla 4. Principales beneficios de la quimioterapia neoadyuvante (modificada de Sahoo S, y col, 2009).

Permite una evaluación in vivo de los pacientes:	La respuesta o no respuesta del cáncer puede ser determinada en pacientes individuales. En estos estudios se pueden comparar a los pacientes que no responden de aquellos que tienen una buena respuesta clínica, estos tratamientos han permitido identificar factores que permiten asociar una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo y la supervivencia global. Aquellos pacientes que logran una respuesta patológica completa (RPC), es decir, aquellas que no presentan carcinoma invasivo residual en el seno ni en los ganglios linfáticos, tienen un pronóstico excelente. La información sobre la respuesta puede ser utilizada para modificar o cambiar el tratamiento para los pacientes cuyos carcinomas muestran poco o ningún cambio después del tratamiento inicial.
Permite hacer una evaluación de la respuesta tumoral valoración a corto plazo para los ensayos clínicos:	Después de que un carcinoma de mama es extirpado quirúrgicamente, el siguiente ensayo final para un ensayo clínico es la recidiva o la muerte. Sin embargo estos eventos pueden no ocurrir por muchos años e incluso décadas. Además si un paciente responde favorablemente, no se puede determinar si sus resultados son debido a la efectividad del tratamiento sistémico o debido a que el carcinoma fue totalmente removido por la cirugía. La respuesta tumoral proporciona información clínica importante en cuestión de meses, lo cual puede permitir hacer una evaluación más rápida de nuevos tratamientos con menos pacientes.
Permite mantener una mayor conservación del seno después de	En la mayoría de los estudios de QNA, la mayoría de los tumores se reducen en tamaño y algunas mujeres son capaces de conservar su mama en lugar de requerir la mastectomía.

la extirpación
quirúrgica:

Permite analizar muestras de tejido durante y después del tratamiento. Las cuales son poderosas para evaluar la respuesta tumoral: herramientas de investigación para identificar técnicas que ayuden a predecir la respuesta tumoral, así como para el entendimiento de cómo y porque los tumores responden a la terapia. Estos estudios pueden ayudar a identificar perfiles de expresión de genes asociados con la respuesta tumoral.

Permite identificar cambios patológicos en los tumores después del tratamiento: Aunque existen múltiples combinaciones de agentes terapéuticos usados en la QNA, generalmente se observan cambios similares en la mayoría de los carcinomas después de un tratamiento.

Actualmente, se han desarrollado diferentes estudios en los cuales se analiza el valor predictivo de los miRNA como posibles indicadores de una Respuesta Patológica Completa, así como aquellos que indican la no respuesta en las pacientes (Tabla 2). En algunos casos se evalúa el posible mecanismo molecular que ayuda a entender el por qué los pacientes están respondiendo a la terapia; la hipótesis de estos estudios es que una expresión diferencial de los miRNAs podría ayudar a detectar aquellos que de algún modo regulan la expresión de genes implicados en la muerte o supervivencia de las células tumorales después de daños causados por la quimioterapia o la radiación (McGuire A, y col, 2015).

Un reto importante en la oncología médica es identificar las características relacionadas con los pacientes o el tumor responsable de la respuesta a fármacos convencionales o específicos. Experimentos in vitro sugieren que varios miRNAs pueden afectar la sensibilidad de diferentes líneas tumorales humanas a agentes quimioterapéuticos (Hummel R, y col, 2010). Al realizar una búsqueda bibliográfica encontramos dos miRNAs los cuales están fuertemente asociados con cáncer ambos funcionando como supresores de tumores. Skinner D, y col, reportaron que una sobre expresión del miR-145-5p está asociada a un buen pronóstico ante la quimioterapia neoadyuvante en cáncer nasofaríngeo. Estudios emergentes indican que el miR-145-5p puede actuar como un supresor de tumores, ya que este se encuentra reprimido en diferentes tipos de cáncer, entre ellos podemos mencionar pulmón, próstata, mama, colon, hígado, entre otros, actualmente algunos estudios evalúan la posibilidad de utilizar este miRNA como un posible indicador de la respuesta patológica completa así como un posible blanco terapéutico (Eades, G, y col, 2015).

6.3 El miR-145-5p y su función en cáncer

El miR-145-5p deriva de una secuencia genómica de 4.09 kb del cromosoma 5 en la región 5q32-3, la cual se encuentra adyacente a la región 5q31.1 la cual es conocida por ser un sitio frágil en el genoma humano (Cui SY, y col, 2014).

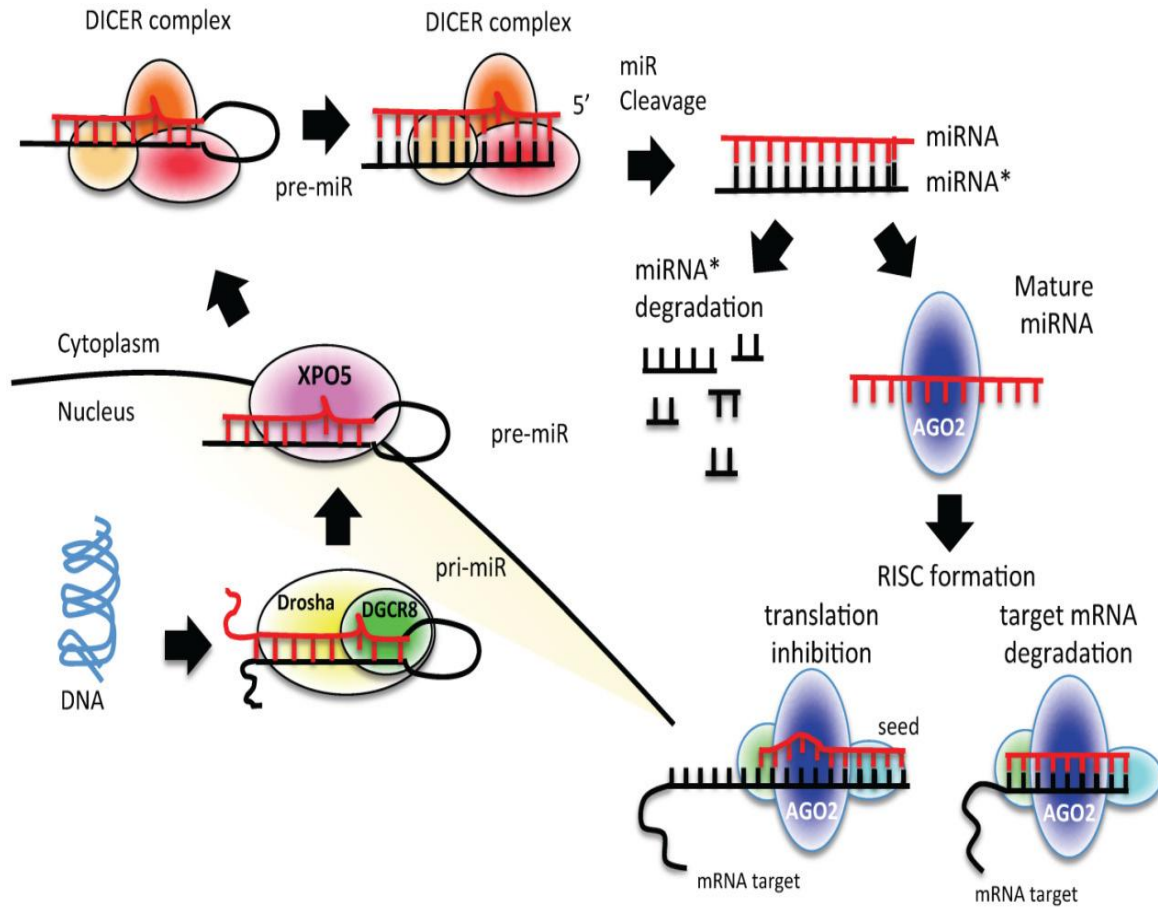


Figura 4. Proceso de biogénesis de los miRNA El procesamiento de los miRNAs comienza en el núcleo donde son transcritos por la DNA polimerasa II la cual genera un miRNA-primario el cual es reconocido por la RNasa Drosha, este pri-miRNA es reconocido por la Exportina 5 y enviado hacia el citoplasma, donde otra RNasa denominada DICER el cual lleva a cabo el procesamiento del pir-miRNA, finalmente este es reconocido por el complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC para llevar a cabo la represión de sus RNA mensajeros blanco (Tomado de Bertoli y col,2015).

Diferentes estudios indican que el miR-145 es un potente supresor de tumores, ya que regula negativamente procesos celulares como la proliferación, ciclo celular, metástasis, apoptosis, invasión y diferenciación, en diferentes líneas celulares de cáncer, también se ha encontrado que su sobre expresión en algunas de estas líneas es capaz de inhibir su proliferación (Zhang J, y col, 2013). Múltiples estudios han mostrado que una baja expresión del miRNA-145-5p es característica en diferentes tipos de cáncer; esta baja expresión se mantiene durante el desarrollo del tumor y se considera que esto puede contribuir para que las células cancerígenas mantengan su transformación oncogénica y una proliferación descontrolada (Noh JH, y col, 2013). Estudios en los cuales se analizó la expresión del miR-145 han descrito que su represión se relaciona con un peor pronóstico en muchos tipos de cáncer, resistencia a la quimio y radio terapia indicando así que puede funcionar como un potencial biomarcador y un atractivo objetivo para la terapia contra el cáncer (Donzelli S, y col, 2015).

El miR-145 es capaz de inducir apoptosis mediante la regulación negativa de blancos como RTKN en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Wang S, y col, 2009). El miR-145 tiene como posibles blancos a factores de transcripción asociados a la pluripotencia como OCT4, SOX2, y KLF4 los cuales son clave en la regulación de las células madre humanas los cuales están asociados a la resistencia a la quimioterapia (Ng EK, y col, 2013). La sobre expresión del miR-145 es capaz de inhibir el crecimiento de las líneas celulares HeLa y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Wang S, y col, 2009).

6.4 El miR-145 y su asociación con el cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente el miR-145 se encuentra en un sitio frágil del genoma y se ha descrito deletado en 11% de los casos de cáncer de mama esporádico, esto puede ser una de las razones de su baja expresión en este tipo de cáncer (Wang S, y col, 2009). El miR-145 tiene un papel muy importante en cáncer de mama debido a que existen múltiples líneas de evidencia las cuales han mostrado que existe una correlación inversa entre su expresión y el grado tumoral, tamaño de tumor y el índice de proliferación Ki-67 (Spizzo R, y col, 2010).

Tabla 5. MicroRNAs asociados a respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en diversos tipos de cáncer

MiRNAs	N	Estudio	Régimen Neoadyuvante	Bibliografía
RPC: miR-21-5p, miR-1246, miR-1290 -3p No-RPC: miR-205-5p.	16	miRNAs como marcador predictivo a quimioterapia neoadyuvante en cáncer rectal	5-Fluorouracilo y radiación	Miranda, C., y col, 2014.
RPC: miR-16, miR-153 y 590-5p No-RPC: miR-519c-3p y miR-561	12	miRNAs como predictores de respuesta a la quimio-radioterapia en cáncer rectal.	Quimio radiación	Elraisheid, A., y col, 2013.
RPC: Let-7e, miR-196b, miR-450a, miR-450b-5p, miR-99 No-RPC: miR-215, miR-190b, miR-29b-2	8	miRNAs asociados a la respuesta neoadyuvante en cáncer rectal	5-Fluorouracilo y radiación	Sovoboda, M, y col, 2012.
RPC: miR-1183, miR-483-5p, miR-622, miR-125a-3p, miR-224-5p, miR-188-5p, miR-1471, miR-6715p, miR1909, miR130 y miR-765. No-RPC: miR1274b y miR720	38	miRNAs específicos correlacionados con respuesta patológica completa en cáncer rectal avanzado	capecitabina y oxaliplatino	Scarpati, G., y col, 2011.
RPC: miR-505, miR-99b, miR-451 y miR-145	65	miRNAs asociados a RPC en adenocarcinoma faríngeo	5-fluorouracilo, cisplatino y radiación	Skkiner D, y col, 2014.
miR-7 y miR-340	64	El miR-7 y el miR-340 predicen la respuesta a la terapia neoadyuvante en cáncer de mama.	Epirubicina, paclitacel, ciclofosfamida y docetaxel.	Raychaudhuri, M., y col, 2017.

Spizzo R, y *col*, describió que el miR-145 inhibe la proliferación e induce apoptosis de células de cáncer de mama a través de la activación de la vía de TP53 reduciendo la expresión de los receptores de estrógeno- α RE). Se proporciona evidencia de una correlación inversa entre la expresión del miR-145 con el grado del tumor y tamaño así como con el índice de proliferación KI76. Hong, Z., y *col*, 2016 por otro lado describe el rol inhibidor del miR-145 en la migración en células de cáncer de mama, en este estudio se describió que una sobre expresión del miR-145 inhibe la transición epitelio mesénquimal mediante la interacción de miR-145 y FSCN-1.

En otro estudio, Enders K, y *col*, 2015 demostraron que los niveles del miR-145 y el miR-451 en plasma sanguíneo se encuentran reprimidos en pacientes de cáncer de mama, por lo que ellos proponen que el miR-145 podría funcionar como un biomarcador temprano de la enfermedad. Por otro lado el miR-145 ayuda en la sensibilización de los tumores ante la quimio y radio terapia y una combinación del miR-145 junto a quimio o radioterapia pueden representar una nueva estrategia antitumoral. Se ha descrito que el tratamiento con el miR-145 inhibe el crecimiento de cáncer gástrico e incrementa su susceptibilidad a fluoracilo (5-FU). También se ha descrito que el miR-145 es capaz de sensibilizar hacia otros medicamentos moleculares dirigidos como el Gefitinib y el Vemurafenib.

Otra investigación de Eades G, y *col*, 2015 reportó que el miR-145 se encuentra reprimido en diferentes líneas celulares de cáncer de mama tanto Luminal como triple negativo (MCF7, HSA578 Y MDA-MB-231), al hacer comparaciones con otros estudios, se encontró que el miR-145 se encuentra fuertemente reprimido en pacientes con CMTN. Se demostró que el miR-145 inhibe la migración de las células de cáncer de mama triple negativo. Zou, C, y *col*, también describió que el miR-145 se encuentra reprimido en CMTN y puede funcionar como un posible predictor de diagnóstico asociado a la angiogénesis y los estados de malignidad; proponen su uso como un posible uso terapéutico en cáncer de mama.

Estos estudios han demostrado que el miR-145 puede ser analizado como posible biomarcadores para conocer si un paciente responde o no a la quimioterapia neoadyuvante así como evaluar un posible blanco que pueda responder el por qué estas pacientes responden ante la terapia y de este modo proponer si estos miRNAs pueden funcionar como agentes terapéuticos teniendo como objetivo el posible blanco que encontremos. La vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), ha sido asociada con la resistencia a la quimioterapia de manera interesante el miR-154 tiene como blanco a proteínas importantes que participan en esta vía de señalización.

8. El receptor TGF β R2 y su asociación con el desarrollo de cáncer

La vía de factor de crecimiento transformante TGFB está involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos, los cuales incluyen el arresto en el ciclo celular, arresto en las células epiteliales y hematopoyéticas, control de la Transición Epitelio Mesenquimal (TEM), proliferación y diferenciación celular, cicatrización, producción de matriz extracelular e inmuno supresión. Los receptores de TGF- β son expresados en todos los tejidos y se ha encontrado que la activación de estas vías ha sido asociada con el desarrollo y progresión de múltiples enfermedades como cáncer, asma, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares. En cáncer se ha descrito que participa en procesos asociados a la carcinogénesis como la migración y la resistencia a la apoptosis. Los receptores de TGFB son expresados en todos los tejidos, como se mencionó la activación de estas vías de señalización juegan un papel importante en las enfermedades humanas, mientras que la pérdida de la función ha sido implicada en desordenes hiperproliferativos, formación de tumores, inflamación, y enfermedades autoinmunes, la ganancia de la función lleva a la inmunosupresión y metástasis tumoral (Jean-Jacques L, 2008). La cascada de señalización de TGF- β (Figura 4) se inicia cuando el ligando de TGF- β se une al receptor de TGF β R de tipo dos TGF β R2, el cual a su vez recluta y fosforila al receptor TGFBR1. La fosforilación de TGF β R1 entonces fosforila a SMAD2 y SMAD3, las cuales forman un complejo

junto con SMAD4. El complejo de SMAD es transportado hacia el núcleo, donde junto con otros factores de transcripción y co-factores regularan la transcripción de sus genes blanco (Boström AK y *col*, 2013).

La vía de TGF- β tiene roles contradictorios en el proceso de tumorigenesis, en estadios tempranos actúa como un supresor de tumores mediante la activación de inhibidores del ciclo celular y activadores de la apoptosis. Sin embargo a medida que el tumor progresa estos efectos son evadidos y TGF- β participa en promoviendo el desarrollo del tumor a través de la estimulación de la transición epitelio mesenquimal (TEM), adhesión celular, migración e invasión, quimioatracción y metástasis tumoral, una sobre expresión de TGF- β se observa en tumores más agresivos y altamente metastásicos. A medida que crecen y progresan los tumores, generalmente producen y secretan una gran cantidad de TGF- β autocrino el cual es liberado en los alrededores del tumor, haciendo al tumor más agresivo y más propenso para la diseminación. El incremento de los niveles de TGF- β no solo afecta a las células tumorales, también ejerce un efecto en las células vecinas, como las células estromales en las cuales se produce la inhibición de la adhesión celular, induciendo la inmunosupresión y estimulando la angiogénesis, así como la degradación de la matriz extracelular lo cual promueve el proceso de metástasis (Chapnick DA y *col*, 2011). TGFB es capaz de inducir la invasión por la Transición Epitelio Mesenquimal a través de vías de señalización de las proteínas SMAD (Kim S y *col*, 2016).

Se ha descrito que los ligandos de TGF- β a menudo se enriquecen en el microambiente tumoral del cáncer de mama triple negativo y pueden ser producidos por células tumorales o por células estromales o inmunitarias asociadas a tumores. Estos datos sugieren la posibilidad de que la vía de TGF-B esté involucrada en el mantenimiento de las células madre de cáncer de mama. En carcinomas de células renales, una sobre expresión de TGF- β se ha asociado con un peor pronóstico, y su inhibición se ha asociado con un decremento de su capacidad invasiva (Boström AK y *col*, 2013).

TGF- β Signaling

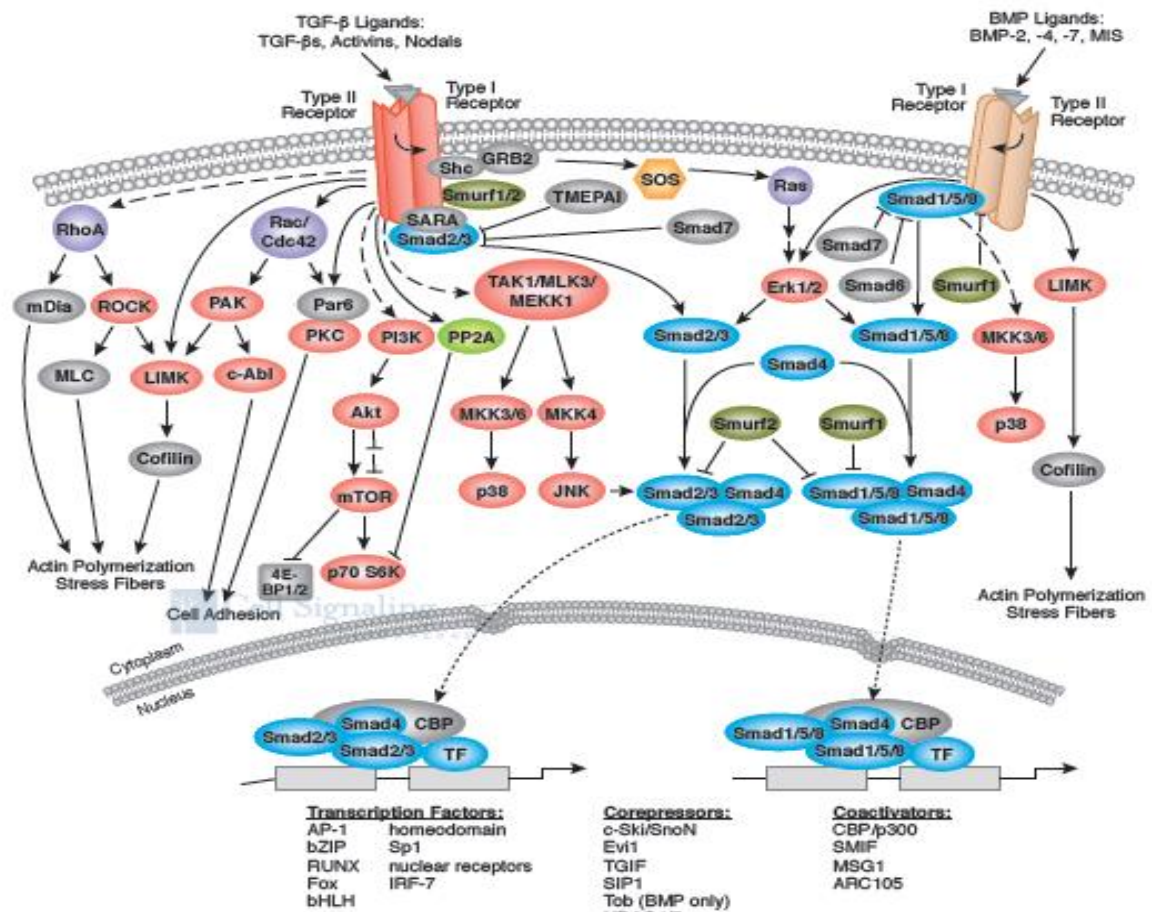


Figura 5. Cascada de señalización de TGF- β . La cascada inicia cuando el ligando de TGF- β se une al receptor de TGF β R de tipo dos TGF β R2, el cual a su vez recluta y fosforila al receptor TGF β R1. La fosforilación de TGF β R1 entonces fosforila a SMAD2 y SMAD3, las cuales forman un complejo junto con SMAD4. El complejo de SMAD es transportado hacia el núcleo, donde junto con otros factores de transcripción y co-factores regularan la transcripción de sus genes blanco

Ma X y col, 2012 describen la existencia de una variación genética del gen de TGF- β el cual confiere susceptibilidad para desarrollar cáncer de mama en mujeres asiáticas. Bola NE y col, 2013 , sugieren que los tratamientos de quimioterapia anticancerosa en combinación con antagonistas sistémicos de señalización de TGF- β , inhibidores de cinasas de molécula pequeña o anticuerpos terapéuticos, deberían limitar las recurrencias de tumores de mama basales después de la quimioterapia y, como resultado, mejorar el resultado de los pacientes con este subtipo de cáncer de mama Kim S, y col, 2016 describen la importancia de TGF- β como un posible blanco terapéutico al utilizar silbinina para inhibir la invasión de células cancerígenas de cáncer de Mama Triple Negativo por la baja expresión de TGF-B) Además, encontramos que los niveles de expresión de TGF- β 2 aumentaron significativamente en las células TNBC en comparación con las células que no son triple negativo. Por lo tanto, demostramos que la expresión aberrante de TGF- β 2 puede afectar directa o indirectamente la motilidad de las células triple negativo, lo que da como resultado un mal pronóstico (Kim S y col, 2016).

Se ha descrito que el bloqueo de la vía de señalización de TGF- β por medio de anticuerpos monoclonales o inhibidores del receptor de TGF- β suprime la metástasis hacia pulmón o hueso del cáncer de mama (Padua D, y col, 2008). La supresión de TGF- β en la línea celular de MCF-7 de cáncer de mama disminuye su capacidad proliferativa (Sun L y col, 1994). La señalización de TGF- β es necesaria para la invasión de células de cancerígenas y metástasis durante la tumorigénesis en etapas tardías. Además, TGF- β promueve la progresión tumoral mediante la supresión de respuestas inmunes antitumorales. Finalmente, TGF- β es un inmunosupresor altamente potente y aumenta significativamente en el plasma de pacientes con cáncer de mama metastásico que responden al tratamiento con tamoxifeno en comparación con muestras de pacientes que no lo hicieron (Kopp A y col, 1995).

9. Justificación

El cáncer de mama es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, siendo en México la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. El cáncer de mama triple negativo es el más agresivo y se ha asociado con baja sobrevivencia, sin embargo presenta una mayor respuesta patológica completa ante nuevos regímenes de quimioterapia neoadyuvante. Cambios en la expresión del miR-145 pueden servir como un predictor de la respuesta patológica completa, así mismo el análisis de su función permitirá conocer mejor los mecanismos moleculares que ayuden a entender la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

10. Hipótesis

Los niveles de expresión del miR-145 podrían ser útiles para clasificar clínicamente a las pacientes que responden y no responden a la quimioterapia en cáncer de mama triple negativo localmente avanzado. El miR-145 participaría en los mecanismos involucrados en la respuesta celular a la quimioterapia.

11. Objetivos

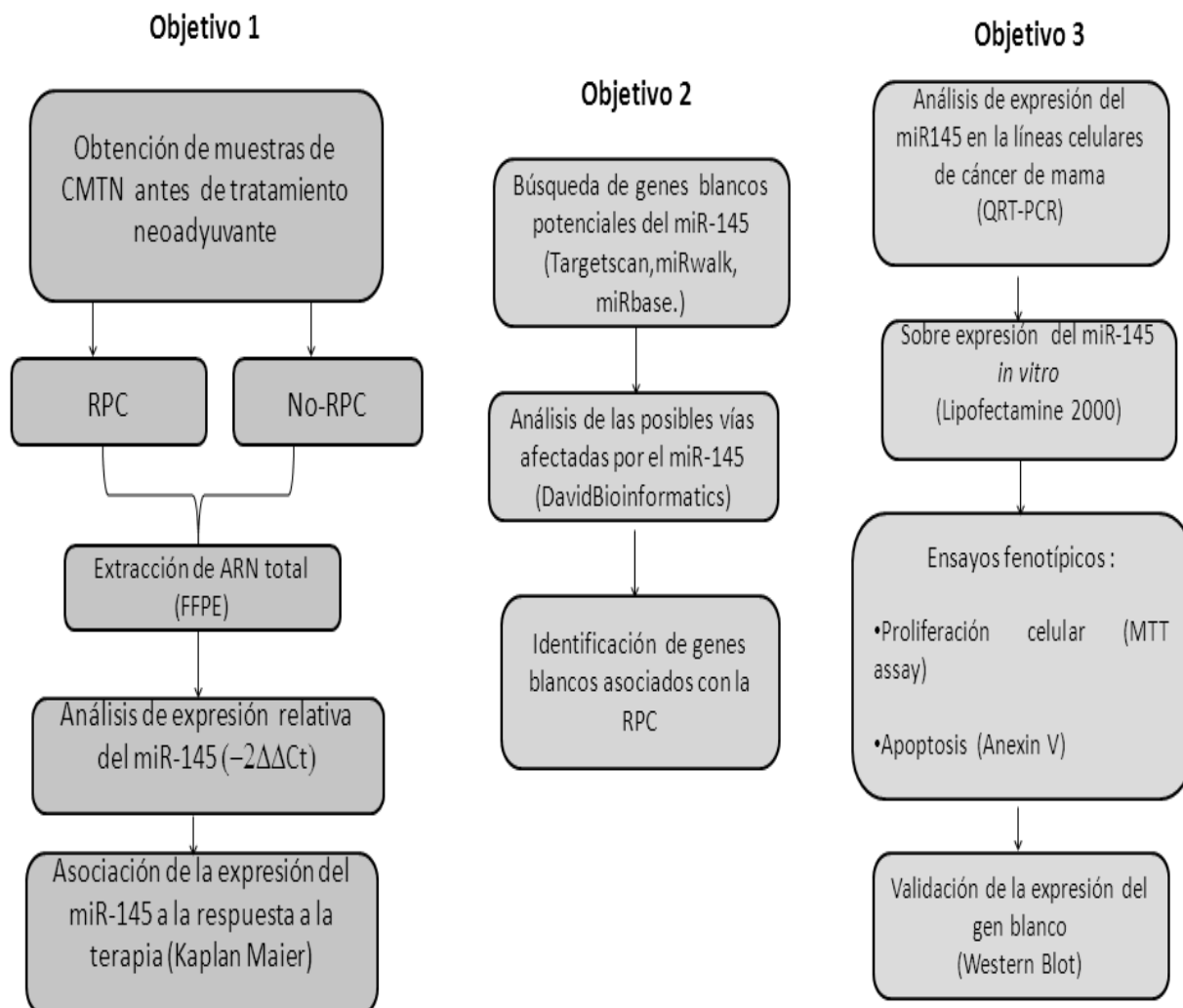
11.1 Objetivo general

Evaluar la expresión del miR-145 y su función en algún proceso asociado a la respuesta patológica completa en cáncer de mama triple negativo localmente avanzado.

11.2 Objetivos particulares

1. Analizar la expresión del miR-145 en pacientes con respuesta patológica completa (RPC) y sin RPC a la quimioterapia neoadyuvante.
2. Predecir los blancos potenciales del miR-145 e identificar aquellos involucrados en los mecanismos celulares asociados a la RPC a la terapia neoadyuvante.
3. Validar un potencial gen blanco del miR-145 implicado en los procesos celulares asociados con la RPC a la terapia neoadyuvante.

12. Estrategia experimental



13. Metodología

13.1 Selección de muestras

Se colectaron muestras de tumores de mama fijados en formalina y embebidos en parafina de mujeres que fueron diagnosticadas con cáncer de mama triple negativo antes de recibir un tratamiento neoadyuvante, en el cual consistió de paclitaxel y doxorubicina, los cuales nos fueron proporcionados por la Fundación de Cáncer de Mama (FUCAM). De acuerdo a las características clínicas observadas después del tratamiento, las pacientes fueron divididas en dos grupos: aquellas que presenten una respuesta patológica completa (PCR) y las que no presenten una respuesta patológica completa (no-PCR), teniendo en consideración que RPC se define como la ausencia de cáncer invasivo en la mama.

13.2 Criterios de inclusión

En el estudio fueron incluidas: Mujeres mexicanas que aceptaron y firmaron un consentimiento informado, las cuales presentaron un diagnóstico de cáncer de mama triple negativo localmente avanzado. Las biopsias tumorales contaron con más del 80% de células cancerígenas (celularidad). Se recopiló una historia clínica completa de las pacientes en la cual se recolectaron datos como: edad, estadio clínico, histología y recurrencia, entre otros.

13.3 Criterios de exclusión

Las pacientes que fueron excluidas del estudio, fueron aquellas que presentaban antecedentes de cáncer hereditario y pacientes con carcinoma ductal invasivo bilateral (hereditario).

13.4 Criterios de eliminación de las muestras

De las muestras analizadas se eliminaron aquellas biopsias de las cuales que no se obtuvo la cantidad suficiente de RNA para realizar los análisis.

13.5 Extracción de ARN total a partir de muestras embebidas en parafina

La extracción de ARN total de las biopsias en parafina se realizó utilizando el kit RNeasy FEEP Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello se utilizaron los cortes de las muestras de tejido (cinco cortes de 20 μ m), los cuales fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5mL a los cuales les fue agregado 1mL de Xileno, posteriormente se les dio un vortex durante 30 segundos. Los tubos se metieron a incubar a 63°C durante 1h en el Termoblock. Terminado el tiempo de incubación, el xileno fue extraído de cada tubo por medio de pipeteo. Se repitieron los dos pasos anteriores pero esta vez sin aplicar un vortex a los tubos. Nuevamente se extrajo el xileno por medio de pipeteo y se realizaron dos lavados con 1mL de etanol absoluto mezclando la muestra por medio de inversión en cada uno. Se retiró el etanol por medio de pipeteo y los tubos se metieron a incubar a 63°C durante 10 minutos para lograr la evaporación del etanol completamente. Una vez que se observó la evaporación del etanol, se adicionaron 150 μ L de Buffer de lisis PKD a cada tubo, posteriormente se les dio un vortex durante 30 segundos. Inmediatamente se agregaron 10 μ L de proteínasa K a cada tubo y se mezcló mediante pipeteo. Los tubos se metieron a incubar a 56°C durante 15 minutos y se les dio un vortex cada 5 minutos durante el tiempo de incubación. Una vez terminado el tiempo de incubación los tubos se pasaron al Termoblock donde se dejaron incubando 15 minutos a una temperatura de 80°C. Terminado este tiempo de incubación se colocaron los tubos en hielo durante 3 minutos, pasado los 3 minutos los tubos se centrifugaron a 13,500rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante fue recuperado de cada tubo y se pasó a un tubo eppendorf nuevo de 1.5ml para cada muestra. A cada tubo nuevo que contenía el sobrenadante recuperado se le adicionaron 20 μ L de DNase Booster Buffer, la solución se mezcló por pipeteo e inmediatamente se les adiciono DNase Stock y todo fue mezclado por pipeteo, posteriormente se dejaron incubando los tubos durante 15min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se adicionaron

320 μ L de Buffer RBC y se mezcló por pipeteo. Posteriormente se adicionaron 720 μ L de etanol (grado biología molecular) y se mezcló por pipeteo. La solución fue transferida a una columna RNeasy Mini Elute Spin, la cual fue colocada dentro de un tubo Eppendorf de 1.5mL para cada muestra, los tubos fueron centrifugados a 10,000rpm durante 1minuto a temperatura ambiente. Se repitieron los dos pasos anteriores hasta pasar completamente toda la muestra por la columna. Una vez pasada toda la muestra fueron adicionados 500 μ L de Buffer RPE por cada columna y estas se centrifugaron a 10,000rpm durante 15 segundos. Se repitió el paso anterior colocando 500 μ l de Buffer RPE a cada columna pero en esta ocasión se centrifugo a 10,000rpm durante 2 minutos. Se colocaron las columnas en un tubo nuevo y estos fueron centrifugados a 10,000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las columnas fueron colocadas en tubos Eppendorf nuevos de 1.5ml y se le adicionaran 20 μ L de agua libre de RNAsas a cada una de ellas. Los tubos se centrifugaron a 10,000rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Las muestras se cuantificaron en el nanoDrop y finalmente fueron almacenadas a -80°C.

13.6 Ensayo de qRT-PCR para las muestras de pacientes con RPC y no-RPC

Para llevar a cabo el análisis de la expresión del miR-145 en las pacientes con respuesta y no respuesta, se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído de las biopsias embebidas en parafina y fijadas con formalina. Para ello se utilizaron sondas stem-loop RT(Applied Biosystem) específicas para el miR-145 y para el RNU-44 utilizado como nuestro control, se realizó una mezcla la cual contenia 50ng de RNA total, 3 μ l de primers RT, 0.2 μ l de dNTPs (100mM) a una concentración final de 20mM, 1 μ l de transcriptasa reversa MultiScribe (50U/ μ l) (ThermoFisher), Buffer RT 10X a una concentración final de 1X, 0.2 μ l de inhibidor de RNasa (20U/ μ l), MgCl₂ (25mM) a una concenrtracion final de 22.5mM y agua libre de RNAsas, el volumen final de la reacción fue de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp system 9700 (Applied Biosystem)

con el siguiente ciclado: 16°C por 2 minutos, 42 °C por 1 minuto, 50°C por 1 segundo por 40 ciclos un ciclo de 85 °C por 5 minutos y un final de 4 °C. Terminado el tiempo de ciclado se realizó una PCR tiempo real por medio de sondas TaqMan, por lo cual en una placa de 96 pozos se mezclaron 1.33µl del producto de la Retro transcripción, 10µl de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied biosystem) a una concentracion final de 1X, 1µl de la sonda especifica TaqMan small RNA Assay 20X a una concentración final de 1X y agua libre de nucleasas, el volumen final de la reacción fue de 20µl. La reacción se llevo a cabo en el equipo 7500 de Applied Biosystem con el siguiente programa de ciclado: 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 60 segundos. Para el análisis de los resultados se utilizó el método de ct ($-2\Delta\Delta ct$) utilizando como normalizador la expresión del RNU44.

13.7 Manejo de la línea celular MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 la cual corresponde a una línea celular de cáncer de mama triple negativo fue cultivada en cajas de cultivo y se utilizó medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gluta-Max 1, bajo en glucosa y glutamina (Gibco, Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% V/V (Gibco, Life Technologies) y antibióticos (penicilina/estreptomicina). Las células se mantuvieron durante su mantenimiento en la incubadora a una temperatura de 37° C y con una atmosfera de 5% de CO₂.

13.8 Mantenimiento de las líneas celulares MDA-MB-231, SKB3, MCF7 y BT20

Para el mantenimiento de las líneas celulares se realizaron subcultivos, para esto fue necesario hacer el retiro del medio de cultivo, se realizaron de dos a tres lavados con Buffer Sulfato Salino (PBS) 1x a un pH de 7.0. Posteriormente, se agregó PBS 1X-EDTA 1X 6.8 mM a un pH 7 a la cual se le adicionaron 64µl de Tripsina por cada 1.5ml de PBS-EDTA, la solución se distribuyó en las células mediante movimientos suaves oscilatorios, la caja fue colocada dentro de la

incubadora donde permaneció durante 5 minutos a 37°C. Después de los 5 minutos de incubación con tripsina la caja se observó bajo el microscopio para corroborar que las células se hayan despegado completamente. Posteriormente a la caja se le agregaron 2ml de suero DMEM para inactivar el efecto de la tripsina. La solución de la caja se recuperó y se pasó a un tubo falcon de 15ml el cual se metió a centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y a las células contenidas en el tubo se les adiciono 1ml de medio de cultivo, posteriormente la solución se resuspendió por pipeteo, una vez hecho esto, la solución de células con medio de cultivo se distribuyeron en una caja de cultivo nueva.

13.9 Extracción de RNA de las líneas celulares MCF-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF-7 y Skb3 de cáncer de mama

Para conocer el nivel de expresión del miR-145 en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, se llevó a cabo la extracción de RNA total de un cultivo de células en placas de 6 pozos. Las células fueron sembradas como se indica en el apartado anterior y se colocaron en la incubadora durante 12 horas. Pasado el tiempo de incubación a cada pozo se le adicionaron 500µl de Trizol Reagent (Ambion), se incubó la placa durante un minuto y posteriormente, se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5mL, al tubo se le adicionaron 300µl de cloroformo, la solución fue mezclada por medio de inversión de 2 a 3 veces, el tubo fue incubado durante tres minutos a temperatura ambiente pasado el tiempo, el tubo se metió a centrifugar a 12000rpm a 4°C durante 15 minutos, pasado el tiempo de centrifugación se tomó la fase acuosa y esta se pasó a un tubo eppendorf nuevo de 1.5mL, a este tubo se le adicionaron 800µl de isopropanol para precipitar el RNA y se mezcló por inversión de 2 a 3 veces, el tubo se dejó incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación el tubo se metió a centrifugar a 12000rpm a 4°C durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante del tubo y se realizaron dos lavados agregando 80µl con etanol al 75% en los cuales la muestra se centrifugo a 12500rpm. Posteriormente se dejó

secar la muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos, pasado el tiempo se agregaron 20 μ l de agua libre de RNAsas caliente al tubo. Las muestras se almacenaron a -80°C.

13.10 Análisis de expresión del miR-145 en las líneas celulares MCF-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF-7 y Skb3 de cáncer de mama

Para llevar a cabo el análisis de la expresión del miR-145 en las líneas celulares MCF-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF-7 y Skb3 de cáncer de mama, 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-145 y para el RNU-44 utilizado como nuestro control, se realizó una mezcla la cual contenía 50ng de RNA total, 3 μ l de primers RT, 0.2 μ l de dNTPs (100mM) a una concentración final de 20mM, 1 μ l de transcriptasa reversa MultiScribe (50U/ μ l) (ThermoFisher), Buffer RT 10X a una concentración final de 1X, 0.2 μ l de inhibidor de RNasa (20U/ μ l), MgCl₂ (25mM) a una concentración final de 22.5mM y agua libre de RNAsas, el volumen final de la reacción fue de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp system 9700 (Applied Biosystem) con el siguiente ciclado: 16°C por 2 minutos, 42 °C por 1 minuto, 50°C por 1 segundo por 40 ciclos un ciclo de 85 °C por 5 minutos y un final de 4 °C. Terminado el tiempo de ciclado se realizó una PCR tiempo real por medio de sondas TaqMan, por lo cual en una placa de 96 pozos se mezclaron 1.33 μ l del producto de la Retro transcripción, 10 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied biosystem) a una concentración final de 1X, 1 μ l de la sonda específica TaqMan small RNA Assay 20X a una concentración final de 1X y agua libre de nucleasas, el volumen final de la reacción fue de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo en el equipo 7500 de Applied Biosystem con el siguiente programa de ciclado: 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 60 segundos. Para el análisis de los resultados se utilizó el método de ct ($-2\Delta\Delta$ ct) utilizando como normalizador la expresión del RNU44.

13.11 Ensayo de transfección del miR-145

Para llevar a cabo la sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231 se utilizó el agente de transfección Lipofectamina 2000. Primero se realizó la siembra de las células en placas de seis pozos, en total fueron sembrados 8 pozos, dos por cada condición; teniendo así dos pozos con la condición mock, dos Scramble, dos para la sobre expresión del miR-145 a 30nM y dos para la sobre expresión del 145 a 60nM. En cada pozo fueron sembradas 250,000 células por cada uno. 12 horas después se procedió a realizar la transfección, para ello se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml: 7.7 μ l del precursor del miR-145 con 150 μ l de Opti-MEM I (1X) Reduced Serum Medium, la solución se mezcló por pipeteo y se dejó incubando durante 20 minutos. En otro tubo eppendorf de 1.5mL se colocaron 12.5 μ l de Lipofectamina 2000 con 150 μ l de Opti-MEM I (1X) Reduced Serum Medium, la solución se mezcló por medio de pipeteo y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasados los 20 minutos de incubación para los dos tubos se realizó la mezcla de ambos re suspendiendo la solución por medio de pipeteo y dejando incubar la solución durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la solución fue agregada en cada pozo el cual contenía 2180ml de Medio DMEM suplementado con SFB 5%, se procedió a realizar movimientos ondulatorios en la placa para realizar la mezcla de la solución junto con el medio de cultivo. La placa fue colocada en la incubadora durante 48 horas.

13.12 Ensayos de proliferación celular

Para realizar el ensayo de proliferación por medio de MTT se llevó a cabo la siembra de las células en 5 placas de 96 pozos en los cuales se colocaron 15,000 células por cada uno. Cada placa contenía las condiciones mock, scramble, y transfectada con el precursor del miR145 a 60nM, cada condición se colocó por triplicado en cada una de las placas. 12 horas después de que fueron sembradas las células se llevó a cabo la sobre expresión del miR-145, para ello se utilizó el

agente de transfección Lipofectamina 2000. Se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml: 3.5 μ l del precursor del miR-145 con 150 μ l de Opti-MEM I (1X) Reduced Serum Medium, la solución se mezcló por pipeteo y se dejó incubando durante 20 minutos. En otro tubo eppendorf de 1.5mL se colocaron 12.5 μ l de Lipofectamina 2000 con 150 μ l de Opti-MEM I (1X) Reduced Serum Medium, la solución se mezcló por medio de pipeteo y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasados los 20 minutos de incubación para los dos tubos se realizó la mezcla de ambos re suspendiendo la solución por medio de pipeteo y dejando incubar la solución durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la solución fue agregada en cada pozo el cual contenia 2180ml de Medio DMEM suplementado con SFB 5%, se procedió a realizar movimientos ondulatorios en la placa para realizar la mezcla de la solución junto con el medio de cultivo.

El ensayo de MTT se utilizó para determinar los posibles efectos que podrían tener la sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231 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 . 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 en cada pozo con células. La placa se colocó a incubar a 37°C durante 3 a 4h. Terminado el tiempo se retiró el medio con el MTT a las células, se dio un lavado a las células con PBS 1X. Terminado el tiempo se retiró el MTT con DMEM cuidadosamente. 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. Una vez terminado el tiempo se retiró el isopropanol y se realizó la lectura del formazan formado en la placa de lectura Elisa a 570nm.

13.13 Obtención de extractos de proteínas totales y cuantificación a partir de la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con pre-miR-145

Se llevó a cabo la extracción de proteínas a partir de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama. Previo a este procedimiento se realizó la siembra de las células en placas de 6 pozos, en los cuales se colocaron 250, 000 células en cada uno de ellos, 12 horas después se comprobó que la confluencia de las células en cada pozo fuera la correcta para desarrollar el experimento. Una vez comprobado que las células estuvieran en óptimas condiciones para el experimento se procedió a realizar la transfección de las células con el precursor del miR-145 a 30 y 60 nM, incluyendo las condiciones; control y scramble, según lo establecido por el protocolo del agente de transfección Siport Aminne. 48 horas después de la transfección se procedió a extraer las proteínas de cada una de las condiciones de la siguiente manera:

Para preparar los extractos proteicos totales se lavaron tres veces los cultivos celulares con PBS 1X frío, luego se agregaron 200 μ l de TNTE (Tris-HCL 50mM a pH de 7.4, NaCl 150mM, Triton X-100) al 0.1%, EDTA 1mM) suplementado con 50 μ l de Complete Protease Inhibitor Cockatill 10X (ROCHE), se dejó incubando durante 15 minutos a 4°C en agitación. La mezcla se pasó a un tubo eppendorf de 1.5mL el cual se metió a centrifugar a 12, 500rpm a 4°C por 10 minutos, el sobrenadante de cada tubo se pasó a un tubo nuevo el cual fue almacenado a -80°C hasta su cuantificación.

13.14 Determinación de la concentración de las proteínas totales

La cuantificación se llevó a cabo por el método de Bradford, para ello se realizó una solución estándar con BSA a una concentración de 1mg/ml, la curva se leyó en un espectrofotómetro a una λ de 595nm, los resultados se graficaron y se determinó el coeficiente de correlación lineal. Los resultados de absorción de las muestras fueron obtenidos por interpolación mediante la sustitución en la ecuación de la recta $y=mx+b$ la cual fue obtenida de los datos de la curva estándar sustituyendo los

valores de y por los datos de absorbancia de cada una de las muestras y como x a la concentración de proteínas.

13.15 Electroforesis SDS-PAGE de extractos proteicos

Se llevó a cabo una separación de proteínas mediante la técnica de electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia del detergente duodecil sulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE) a una concentración de acrilamida de 12% en el gel separador y para el gel concentrador a una concentración de 5%. Se utilizó una solución amortiguadora preparada con Tris 0.25M, Glicina 1.92, 0.1% de SDS, la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 100V.

13.16 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD). Las membranas y el papel Whatman se sumergieron en buffer de transferencia que contenía Tris 0.0025M, Glicina 0.192M y Metanol al 20%, se armó el cassette y se colocó en un equipo TransBlot (BIO-RAD) a 30V y a un Ampere por un periodo de 30 minutos. Una vez pasado el tiempo de la transferencia se realizó una tinción de la membrana con rojo de Ponceau y posteriormente se dieron lavados con PBS 1X, para destañir la membrana.

13.17 Ensayos de Western blot

Las membranas que contenían las proteínas transferidas se incubaron en solución bloqueadora que contenía PBS 1X y leche en polvo al 5% dejándola incubando durante toda la noche y en agitación a una temperatura de 4°C. Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se realizaron 5 lavados de 3 minutos con PBS 1X-Tween (0.005%). Se procedió a agregar el Anticuerpo primario diluido a una concentración de 1:500 en PBS 1X-Tween (0.005%) y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C en agitación. Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 5 veces por un periodo de 5 minutos cada uno con PBS 1X-Tween (0.005%), después de los lavados se agregó el Anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa a una concentración de 1:2000 diluido en PBS-Tween

(0.005%). Terminado el tiempo de incubación las membranas fueron lavadas tres veces durante cinco minutos con PBS 1X- Tween (0.005%). Después de realizados los lavados se procedió a revelar la membrana por medio de quimioluminiscencia aplicando a las membranas con el reactivo ECL (Amhersham Pharmacia Biotech, USA).

13.18 Ensayo de apoptosis mediante citometria de flujo

Para llevar a cabo el ensayo de apoptosis se realizó la siembra de 200,000 células por triplicado en una placa de seis pozos y se crecieron para que tuvieran una confluencia del 80%. Las condiciones que se colocaron para realizar el ensayo fueron mock (SiPORT), Scramble, precursor del miR-145 a 60nM para 48 horas, subsecuentemente se adiciono el cisplatino (50 μ M) de acuerdo a la curva de citotoxicidad (IC50) del cisplatino para 24 horas. Después de dar los tratamientos, las células fueron cosechadas de las placas, lavadas dos veces con PBS 1X pre-enfriado, re suspendidas en 100 μ l de buffer de unión (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2), y procesadas según las indicaciones del fabricante (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche). Brevemente las células se tiñeron con 2 μ l de Annexin V-FITC y 2 μ l de Yoduro de Propidio mezclado con 100 μ l de buffer de incubación durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron las células con 500 μ l de buffer de unión y se re suspendieron en 300 μ l de PBS1X. Los eventos de Apoptosis fueron analizados en el citometro de flujo FACS Calibur (BDIS, Becton Dickinson). La emisión Annexina V y el Yoduro de propidio fueron detectadas en los canales FL-1 y FL-2 respectivamente. Para cada muestra los datos de 20,000 células se adquirieron en modo lista en escalas logarítmicas. El análisis se realizó con el software Summit V4.3 y los resultados se presentaron como el porcentaje total de células apoptóticas como la suma de las fases temprana y tardía de la apoptosis (Annexina V FITC positivo). Los ensayos se realizaron por triplicado.

13.19 Análisis estadísticos

Los análisis de expresión se analizaron por medio de t-test y pruebas no paramétricas (Mann Whitney) y fueron graficados por medio del programa GraPhap para hacer el análisis de expresión entre pacientes con RPC y no RPC. Los resultados se analizaron para asociar a la pCR con el porcentaje de supervivencia de las pacientes a partir de análisis de Kaplan Meires (curvas de supervivencia).

14. Resultados

14.1 Expresión del miR-145 en pacientes que responden a la terapia neoadyuvante

Para llevar a cabo el análisis de expresión relativa del miR-145 entre las pacientes con respuesta patológica completa y no respuesta, se llevó a cabo la extracción de RNA total a partir de biopsias de tumor embebidas en parafina y fijadas con formalina utilizando el kit comercial RNeasy FEEP Kit (Qiagen) las cuales fueron proporcionadas por la Fundación Contra el Cáncer de Mama (FUCAM). En total se nos proporcionaron 37 biopsias que pertenecían a paciente que presentaron cáncer de mama triple negativo localmente avanzado antes de recibir un tratamiento quimioterapéutico.

De las 37 muestras, 12 correspondían a pacientes que presentaron RPC y 25 de pacientes que no presentaron RPC. Mediante una RT-PCR y posteriormente una PCR tiempo real, se llevó a cabo el análisis de la expresión del miR-145 en las biopsias de las pacientes. Al graficar los datos de expresión relativa (Figura 6) encontramos una mayor represión del miR-145 en las pacientes con pCR en comparación con las pacientes de no respuesta, cuando los resultados fueron evaluados mediante el análisis estadístico de chi-cuadrada, se encontró un valor significativo ($p=0.005$) lo que nos indica que una baja expresión del miR-145 es una firma característica de las pacientes que responden al tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama triple negativo localmente avanzado antes de recibir un tratamiento quimioterapéutico.

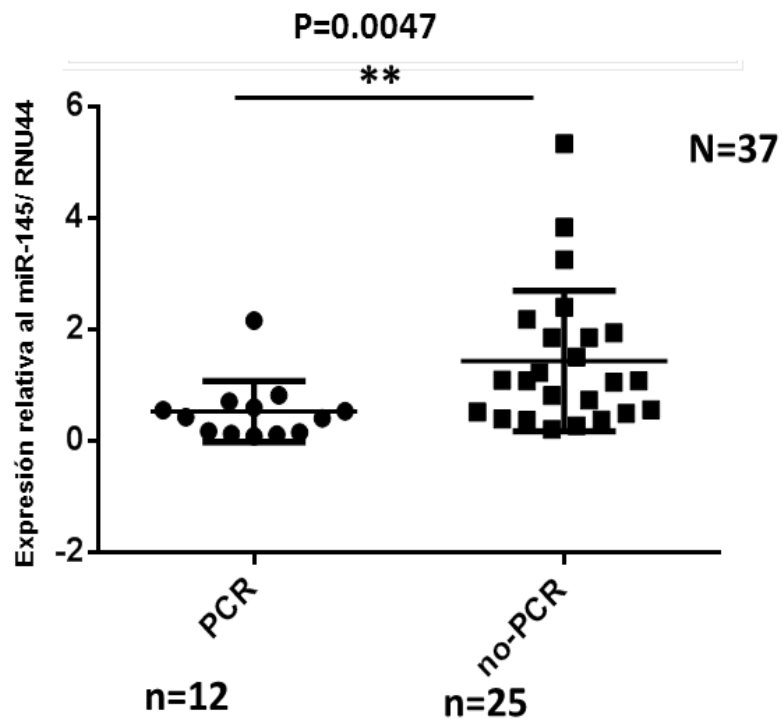


Figura 6. Análisis de expresión relativa del miR-145 en pacientes con PCR y no-PCR. Se llevó a cabo la extracción de RNA de un total de 37 biopsias pertenecientes a pacientes con cáncer de mama triple negativo antes de ser sometidas a un tratamiento quimioterapéutico de las cuales 12 presentaron respuesta y 25 no presentaron respuesta patológica completa.

14.2 Análisis de Kaplan-Meier asociada a la expresión del miR-145 en pacientes con RPC y no-RPC

En epidemiología clínica, especialmente con enfermedades neoplásicas, pronosticar la supervivencia a largo plazo es de fundamentalmente importante para la toma de decisiones acerca de la efectividad de la terapia y definir cuál es la más adecuada. Al realizar los análisis de expresión relativa del miR-145 encontramos una diferencia significativa entre las paciente con respuesta y las de no respuesta; por tanto decidimos evaluar si la expresión del miR-145 podría tener alguna relación con la supervivencia de las pacientes después de ser sometidas al tratamiento neoadyuvante. Para ello se realizó un análisis de Kaplan Meier este tipo de estudios nos permite evaluar el tiempo transcurrido desde el cual se inicia el tratamiento hasta un tiempo final en el cual termina la recolección de datos para las pacientes., donde se puede demostrar o no la aparición de un suceso. Estos estudios son utilizados en el campo de la oncología para proponer la posible efectividad de un tratamiento en los pacientes.

Al llevar a cabo el análisis encontramos que las pacientes con una baja expresión del miR-145 tienen una mayor probabilidad de supervivencia en comparación con aquellas pacientes que tienen una mayor expresión del miR-145, obteniendo un valor significativo de $p=0.0007$. La función de riesgo a una función que mide la probabilidad de que a un individuo le ocurra cierto suceso a lo largo del tiempo. En nuestro estudio identificamos la función de riesgo de que un determinado número de pacientes no respondan favorablemente al tratamiento, los resultados obtenidos nos indican que de un número de 37 pacientes que son sometidas al tratamiento neoadyuvante existe una probabilidad de que un 10% (4 pacientes) de ellas no respondan favorablemente al tratamiento. Estos resultados no demuestran que una baja expresión del miR-145 es característica en las pacientes con Respuesta Patológica Completa y que también su expresión está relacionada con una mayor supervivencia de las pacientes con Cáncer de Mama Triple Negativo Localmente avanzado

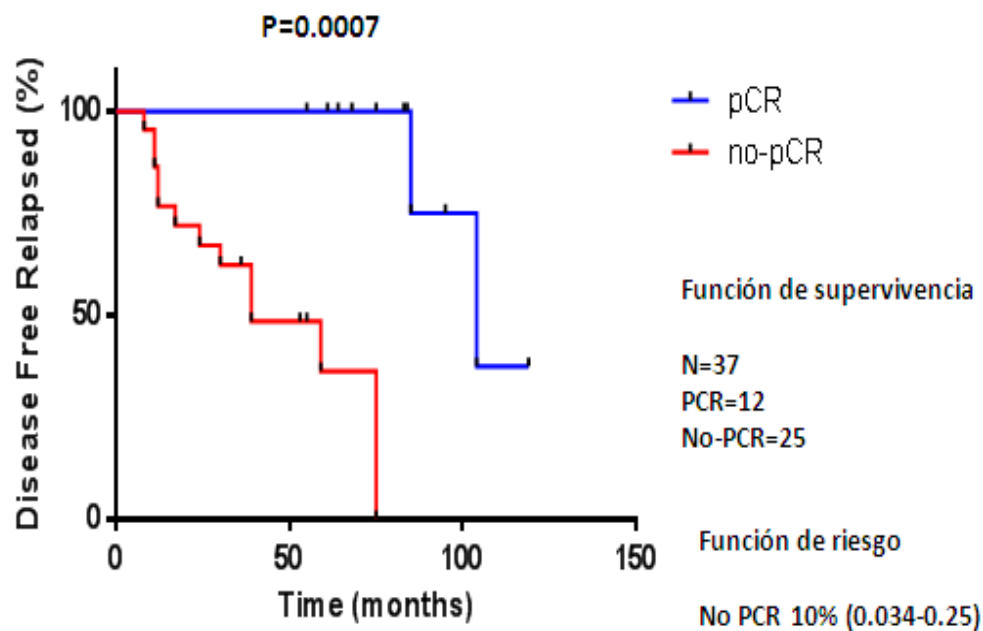


Figura 7. Análisis de Kaplan Meier. Se evaluó si la expresión del miR-145 está relacionada con la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama. Se llevó a cabo el análisis de Kaplan Meier en el cual se encontró que las pacientes con una menor expresión del miR.145 tenían una probabilidad mayor de supervivencia en comparación con aquellas pacientes que no respondieron al tratamiento obteniendo un valor significativo ($p=0.0007$). Al realizar el análisis para detectar la función de riesgo encontramos que de 37 pacientes que son sometidas al tratamiento neoadyuvante un 10% de ellas pueden no responder al tratamiento.

14.3 Análisis bioinformático de blancos del miR-145 que explique la RPC en pacientes que presentan CMTN

Múltiples estudios indican que el miR-145 funciona como un potente supresor de tumores el cual generalmente se encuentra reprimido en pacientes con cáncer de mama. Estudios *in vitro* realizados en líneas celulares han demostrado que su sobre expresión es capaz de suprimir fenotipos asociados al desarrollo y progresión del cáncer. Por lo tanto se llevó a cabo un análisis bioinformático utilizando las plataformas TarjetScan, miRbase y miRwalk, en las cuales se realizó una búsqueda de blancos predichos para el miR-145. La búsqueda se delimito a aquellos blancos asociados con algunos de los sellos distintivos del cáncer como proliferación y apoptosis, también fueron considerados aquellos genes blancos asociados a la quimio resistencia. Posteriormente las bases de datos obtenidos de la búsqueda blancos predichos del miR145 se introdujeron en la plataforma bioinformática David Functional Annotation Bioinformatics enfocando nuestro análisis en la base de datos KEGG en la cual se llevó a cabo la búsqueda de las vías en las cuales participa directamente el miR-145 y las cuales nos ayudarían a explicar un Respuesta Patológica Completa en las pacientes.

El análisis bioinformático nos permitió identificar múltiples blancos así como las vías en las cuales participa directamente el miR-145, pero solo algunas de ellas nos permitirían dar una explicación que relacionara la expresión del miR-145 con la respuesta Patológica Completa en las pacientes después de ser sometidas a un tratamiento neoadyuvante. De las vías analizadas, una de las que más llamo nuestra atención fue la de TGF- β . Ya que el miR-145 tiene como blanco a cuatro proteínas importantes las cuales participan en esta vía de señalización como el ligando de TGF- β 2, el receptor TGF β R2, SMAD2 y SMAD3.

Esta vía está compuesta por citosinas multifuncionales, las cuales regulan una amplia gama de procesos celulares como proliferación y diferenciación celular, cicatrización, producción de matriz extracelular e inmuno supresión, entre otros.

Múltiples estudios indican que una sobre expresión de TGF- β se asocia a un pobre pronóstico en diferentes tipos de cáncer si como una resistencia a la quimio y radioterapia; por tal motivo se ha propuesto el uso de inhibidores de esta vía como un posible co tratamiento para el tratamiento del cáncer de mama, en especial el cáncer de mama triple negativo (Bhola NE, y col. 2013).

El receptor de TGF- β tiene una región 3' UTR de una longitud de 9492 pb y presenta tres sitios de unión para el miR-145, dos conservados y uno pobremente conservado en las regiones 3991-3990, 2194-2201, y 4235- 4242 respectivamente. Por este motivo fue considerado el blanco TGF β R2 como posible blanco del miR145 el cual nos podría ayudar la Respuesta Patológica En las pacientes con cáncer de mama triple negativo localmente avanzado.

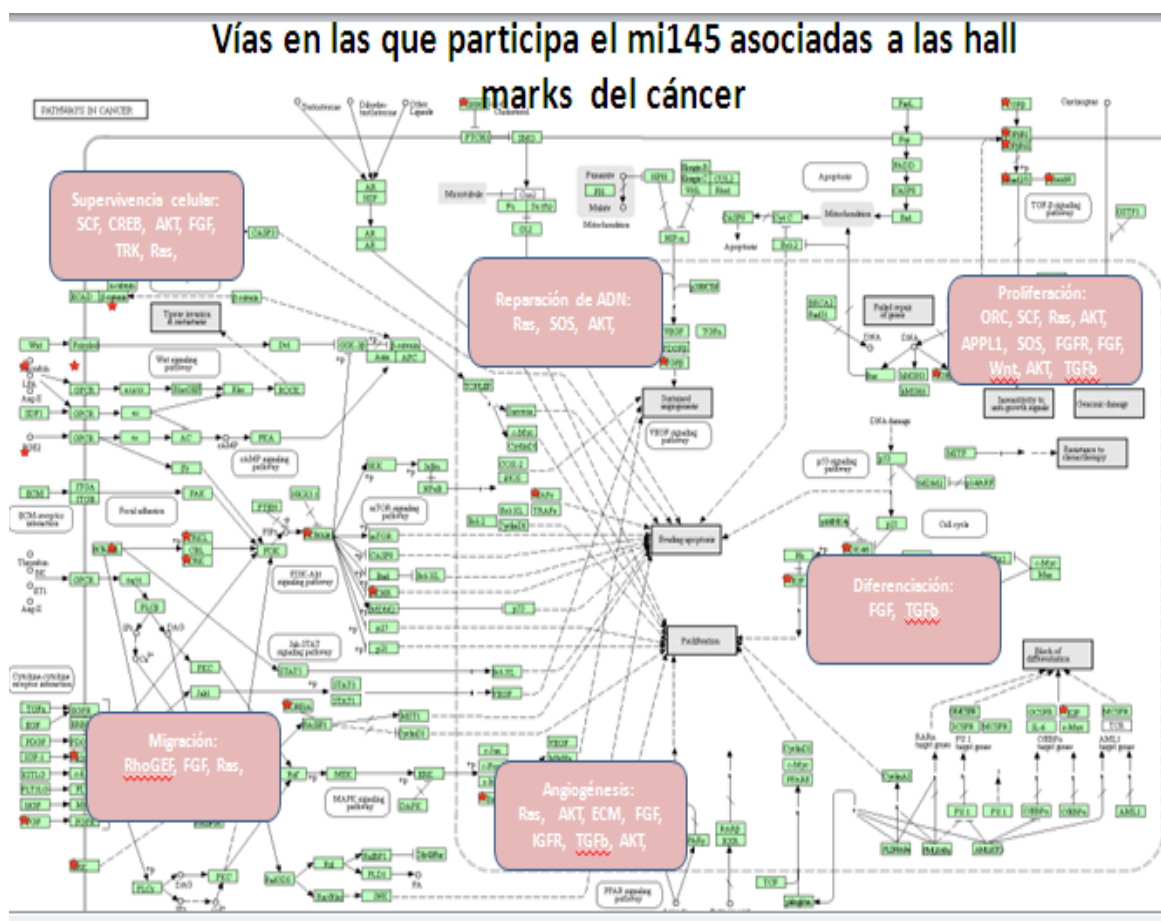


Figura 8. Resultado de la búsqueda de las vías en las cuales participa el miR-145. El análisis bioinformático nos permitió identificar múltiples blancos predichos para el miR-145, enfocando nuestra atención en aquellos relacionados a procesos celulares como supervivencia, reparación de ADN, diferenciación, proliferación, migración y angiogénesis, al realizar una correlación con la plataforma bioinformática David Functional Annotation Bioinformatics encontramos algunas vías en las cuales participa directamente el miR-145, una de las que más llamo nuestra atención es la vía de TGF β ya que el miR145 tiene como blanco a cuatro proteínas importantes para esta vía de señalización.

14.4 Análisis de expresión de miR-145 en líneas celulares de cáncer de mama

Algunos estudios han demostrado que hay una represión del miR-145 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, por tal motivo se llevó a cabo una extracción de RNA total de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF-7 y Skb3, que corresponden a tejido mamario no tumoral, triple negativo, luminal A y HER2+, respectivamente. Posteriormente se realizó una RT-PCR seguida una PCR tiempo real para evaluar los niveles de expresión del miR-145 en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama.

Los resultados obtenidos nos indican que la expresión del miR145 se encuentra reprimida en las líneas celulares de cáncer de mama analizadas en comparación con la línea de tejido mamario no tumoral MCF-10A (figura 9). Estos resultados nos permitieron determinar que para poder realizar los análisis funcionales de nuestro miRNA tendríamos que llevar a cabo la sobre expresión del miR.145. Para ello se eligió a la línea celular MDA-MB-231, debido a que es una línea celular de cáncer de mama triple negativo lo que es similar a las características clínicas de las biopsias de las pacientes analizadas en el estudio de expresión del miR-145, también cuentan con la característica que es una línea celular altamente proliferativa.

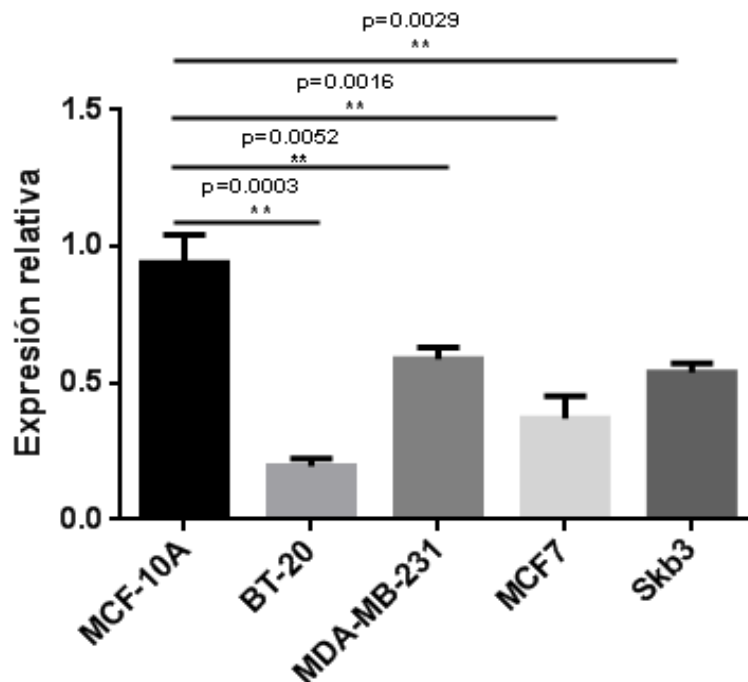


Figura 9. Análisis de expresión del miR145 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-10A, BT20, MDA-MB-231, MCF7 y SKb3. Se muestra la expresion relativa del miR-154 respecto a RNU44. Las células MCF10A corresponden a tejido mamario no tumoral. Las restantes corresponden acelulas de cáncer de mama triple negativo, Luminal A y HER2+ respectivamente.

14.5 Sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231

Los resultados del análisis de expresión del miR-145 en las líneas celulares de cáncer de mama nos indicaron que se encuentra reprimido en todas ellas menos en la línea celular MCF-10A, la cual corresponde a tejido de mama no tumoral. De acuerdo a estos resultados, procedimos a elegir la línea celular MDA-MB-231 que corresponde a una línea de cáncer de mama Triple Negativo, la cual presenta las mismas características clínicas que tenían las pacientes de las cuales se llevó a cabo el análisis de expresión del miR-145. Para llevar a cabo la sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231 se utilizó el agente de transfección Lipofectamina 2000. El reactivo lipofectamina contiene subunidades lipídicas que pueden formar liposomas en un entorno acuoso, que atrapa la carga de transfección, en nuestro caso, correspondió al precursor del miR145. Se llevó a cabo la transfección de las células con las siguientes condiciones: control, Scramble, Mock miR-145 a 30 y a 60mM. 48 horas después de que se llevó a cabo la transfección, se procedió a realizar la extracción de RNA total de cada una de las condiciones, para después realizar una qRT-PCR y posteriormente una PCR entiendo real para comprobar la sobre expresión del miR145. Los resultados obtenidos y mostrados en la figura 10 nos indican la eficiencia de la transfección mostrándo que efectivamente el miR-145 se sobreexpreso en las células posterior a la transfección del precursor. En consecuencia, decidimos llevar a cabo los ensayos fenotípicos posteriores.

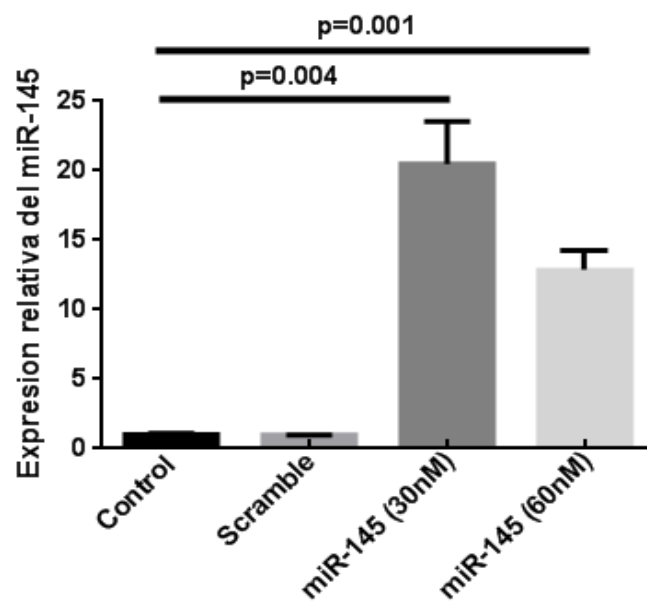


Figura 10. Resultado de la sobre expresión del miR-145. Se muestran las condiciones mock, Scramble, miR-145 (30 y 60 nM). Se llevó a cabo la sobre expresión del miR-145 mediante el agente de transfección Lipofectamina 2000.

14.6 Ensayo de la proliferación celular

Después de comprobar que el agente de transfección Lipofectamina 2000 nos permite llevar a cabo la sobre expresión del miR-145, procedimos a realizar el ensayo de proliferación mediante el uso de MTT. El principio del ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este ensayo es utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de cristales de formazán producido.

Para llevar a cabo el ensayo de proliferación se realizó la siembra de las células en una placa de 96 pozos en la cual se colocaron 15, 000 células. 12 horas después de la siembra se realizó la transfección del miR-145 a una concentración de 60nM, y se colocaron las condiciones control y Scramble para estandarizar el ensayo. Las placas se leyeron a 0, 12, 24, 36 y 48 horas en los cuales encontramos que en los pozos de las células transfectadas con el miR-145 se observa una fuerte disminución en la capacidad proliferativa de las células en las primeras doce horas, en las horas posteriores esta disminución se mantuvo observando una diferencia significativa a 12, 24 y 36 horas. Estos resultados nos demuestran que la sola transfección del miR-145 es capaz de inhibir la capacidad proliferativa de la línea celular MDA-MB-231 teniendo un mayor impacto en las primeras 12 horas.

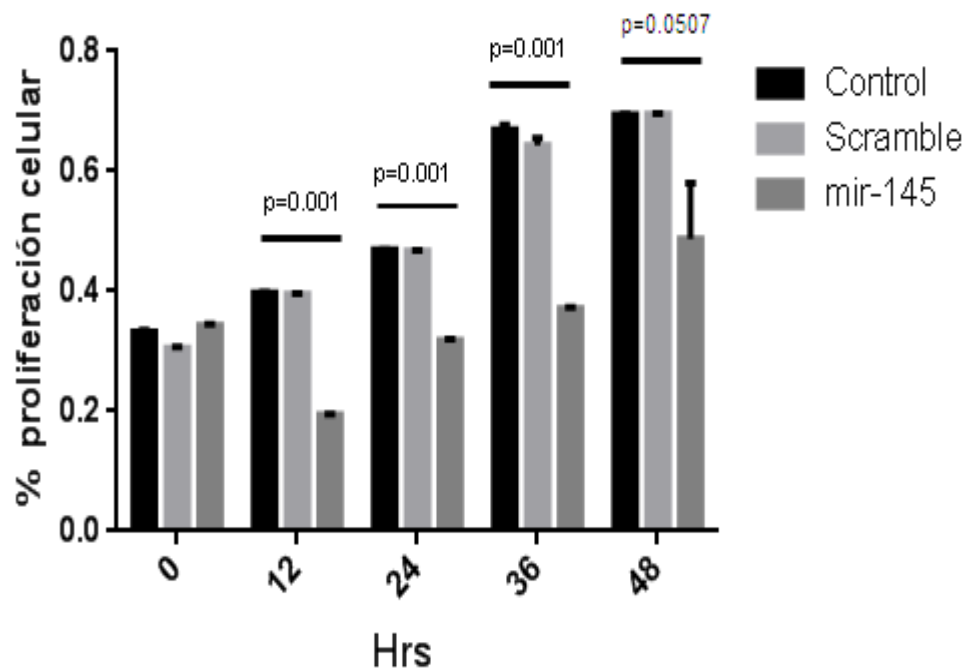
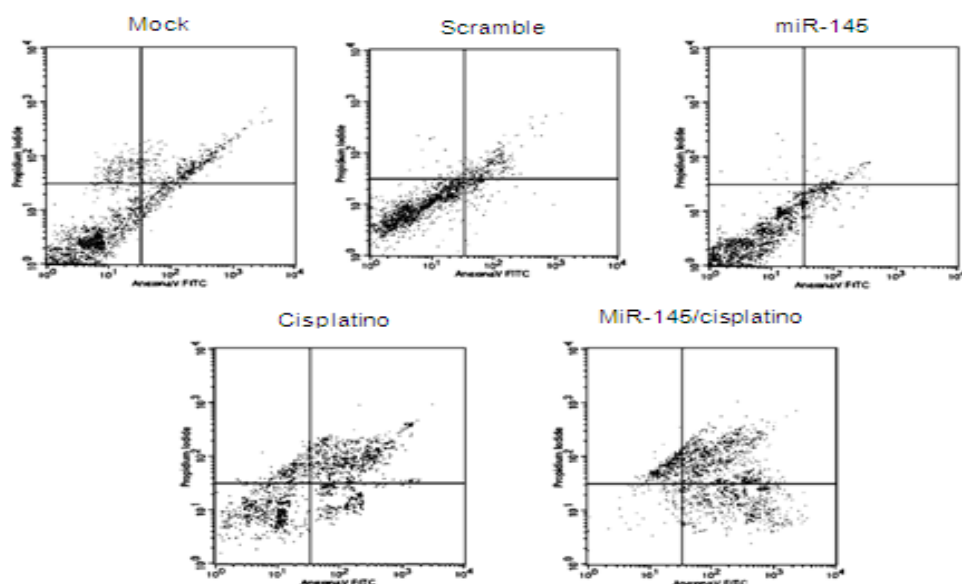


Figura 11. Ensayo de proliferación celular. Se efectuó el ensayo en la línea celular MDA-MB-231 trasfectadas con el miR-145 (60 nM) a periodos de 0, 12, 24, 36 y 48 horas. Se llevó a cabo la transfección del miR-145 por medio del agente de transfección Lipofectamina 2000.

14.7 Ensayo de apoptosis en la línea celular MDA-MB-231 tranfectadas con el miR-145

Los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación nos indicaron que la sobre expresión del miR-145 es capaz de disminuir la proliferación de la línea celular MDA-MB-231; por tanto decidimos comprobar si esta disminución era debido a que el miR-145 es capaz de inducir apoptosis en las células. La apoptosis se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte de una forma ordenada y silenciosa. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos característicos: la membrana plasmática se altera y se visualizan protuberancias irregulares, el volumen celular se reduce considerablemente y el citoplasma se condensa, el núcleo se reduce y la cromatina se hace más densa y se colapsa dividiéndose al final en varias esferas, la célula apoptótica es fagocitada por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio. Para ello se llevó a cabo un análisis de apoptosis por medio de Anexina V el cual fue analizado por medio de cartometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron que el miR-145 es capaz de inducir apoptosis

A



B

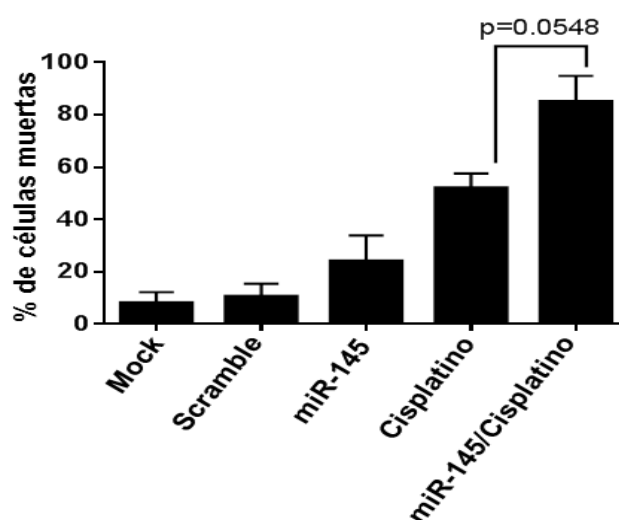
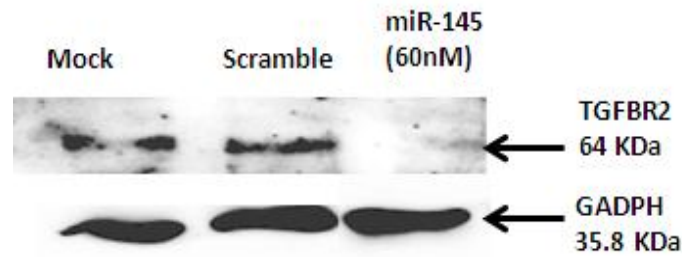


Figura 12 .Ensayo de apoptosis por medio de Anexina V en la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con el miR-145. Inciso A se muestran los cuadrantes observados durante el ensayo de apoptosis. Inciso B, muestra la gráfica de barras que indica las diferentes condiciones para llevar a cabo el ensayo de apoptosis.

14.8 Ensayo de Western blot para la proteína TGF β R2

Para evaluar si la sobre expresión del miR145-5p era capaz de inhibir la expresión de la proteína TGF β R2, se llevó a cabo la transfección del precursor del miR-145-5p en las células MDA-MB-231 a una concentración de 60nM, colocando las siguientes condiciones: Mock, Scramble y miR-145. 48 horas después de llevar a cabo la transfección se llevó a cabo la extracción de proteínas y cuantificación de las proteínas, para después correrlas en un gel SDS-Page de Acrilamida. Se comprobó la integridad de las proteínas y se evaluó mediante Western Blot la expresión de la proteína TGF β R2. Como se puede observar en la Figura 6 se observa una misma concentración de la proteína en las concentraciones Mock y Scramble, pero en aquellas células transfectadas con el miR-145 se observa una drástica disminución de la proteína TGF β R2. La conclusión de este ensayo nos indica que la sola sobre expresión del miR-145 en la línea celular MDA-MB231 es capaz de inhibir la expresión de la proteína TGF β R2 y que esta podría ser uno de los posibles mecanismos por los cuales este miRNA este participando en la respuesta patológica completa en las paciente con cáncer de mama triple negativo.

A



B

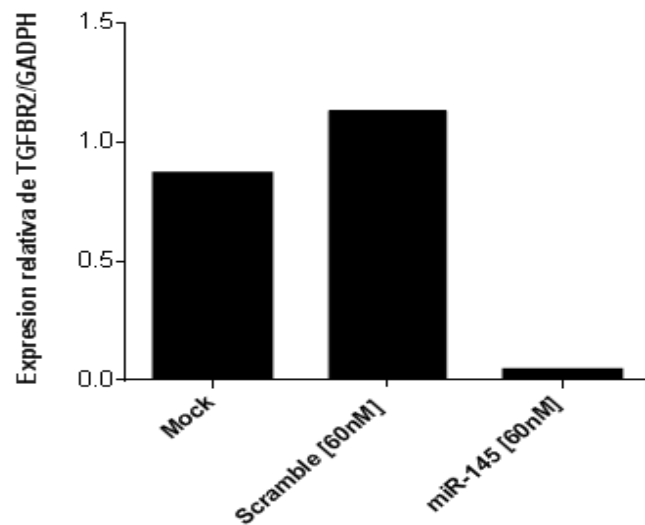


Figura 13. Ensayo de Western blot para evaluar la expresión relativa de la proteína TGF β R2 en células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-145. Se llevó a cabo la transfección de las células MDA-MB-231 con el miR-145 a una concentración de 60nM. En el inciso A se observa el resultado del Western blot mientras que en el inciso B se observa el resultado del análisis densitométrico de las bandas inmunodetectadas en A.

15. Discusión de resultados

En los últimos años el cáncer de mama se ha mantenido como un tipo de cancer altamente maligno entre las mujeres, lo que representa una grave amenaza para la salud en todo el mundo. Diferentes estudios han indicado que el cancer de mama se ha convertido en la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres, representando el 23% del total de casos de cáncer y el 14% de las muertes por cáncer. Los principales avances en nuestra comprensión de la biología del cáncer de mama han llevado a la mejora de las técnicas de diagnóstico y pronóstico así como al desarrollo de nuevas terapias dirigidas. Sin embargo, la eficacia de los nuevos tratamientos sigue siendo limitada por una combinación de resistencia a los medicamentos y nuestra limitada comprensión de las vías de señalización de las células tumorales. Actualmente muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de bioindicadores que ayuden a predecir la respuesta a la terapia contra el cáncer, este tipo de estudios son cruciales para mejorar la eficacia de tratamiento y al mismo tiempo nos puede ayudar a mejorar las tasas de supervivencia para las pacientes con cáncer de mama.

Los miRNAs participan en una gran cantidad procesos biológicos clave mediante la regulación postranscripcional de múltiples genes blanco, permitiendo de este modo establecer una homeostasis dentro del organismo. En cáncer, muchos estudios han demostrado que los miRNAs regulan procesos como inflamación, ciclo celular, respuesta al estrés, diferenciación celular, apoptosis e invasión, y se ha descrito que sus niveles de expresión pueden afectar o contribuir directamente con el desarrollo del tumor. Debido a sus características, estos han sido propuestos como grandes bioindicadores y blancos terapéuticos tanto en el diagnóstico y el pronóstico en diferentes tipos de cancer (Letelier P, y col, 4014).

Actualmente se han desarrollado estudios (Tabla 5) en los cuales se analizan los perfiles de expresión de múltiples miRNAs y su asociación con la respuesta patológica completa al tratamiento eodadyuvante. Desafortunadamente un

obstáculo muy importante que ha limitado la interpretación de estos estudios, es la dificultad para identificar blancos específicos de varios miRNAs. Otro problema asociado al desarrollo de este tipo de estudios, es que los pocos que existen no se encargan de evaluar cuales son los mecanismos moleculares por los cuales estos miRNAs pueden estar participando en el desarrollo de la respuesta patológica en las pacientes. Este estudio tuvo como principal objetivo el analizar si existe una correlación entre los niveles de expresión del miR-145-5p con una posible respuesta al tratamiento quimioterapéutico neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama triple negativo, evaluando un posible mecanismo molecular por el cual el miR-145 puede participar en el desarrollo de la respuesta patológica completa en las pacientes con cáncer de mama triple negativo mediante la evaluación del gen que codifica para la proteína TGF β R2.

En nuestro ensayo de análisis de expresión del miR-145 encontramos que las pacientes que presentaron respuesta al tratamiento, tenían niveles de expresión más bajos comparados con las pacientes que no presentaron respuesta (Figura 6). Existen múltiples factores los cuales pueden influir en que se presenten variaciones de expresión del miR-145 en pacientes con respuesta y no respuesta. Un factor muy importante es que el miR-145 deriva de la secuencia genómica de 4.09 kb dentro del cromosoma 5 (5q32-3) la cual se encuentra adyacente a la región 5q31.1 la cual es conocida por ser un sitio frágil en el genoma humano y se ha descrito que se encuentra deletado en 11% de los casos de cáncer de mama esporádico, esto podría ser una explicación por la cual podemos observar una baja expresión de este miRNA en las pacientes con la enfermedad (Wang S, y col, 2013). Se ha descrito que en pacientes que presentan cáncer de mama triple negativo el miR-145 presenta valores significativamente bajos en comparación con otros tipos de cáncer de mama. En este tipo de cáncer se ha descrito un mecanismo molecular por el cual se puede observar una baja expresión del miR-145, es debido a la presencia del RNA largo no codificante RoR, el cual actúa como una esponja competitiva en contra del miR-145. Donzelli S, y col, describen

que en los tumores de metástasis cerebral provenientes de cáncer de pulmón, que existe un incremento en la metilación de las islas CpG en la región reguladora 5' del miR-145, esto provoca su baja expresión la cual tiene como consecuencia, una sobre expresión de genes como OCT4 y EGFR, los cuales contribuyen al desarrollo de metástasis de los tumores hacia otras regiones del cuerpo.

Estos son algunos de los mecanismos por los cuales se puede observar una represión del miR-145, sin embargo, los mecanismos específicos por los cuales pueden contribuir a la disminución en su expresión y los cuales contribuyen a la aparición y progresión de l cancer de mama aún son desconocidos; de tal modo que es importante seguir analizando si algunos de estos factores puede influir en la exprecion diferencial en las pacientes con respuesta y no respuesta, de tal modo que podamos encontrar una posible asociación con el desarrollo de la respuesta al tratamiento en las pacientes.

El miR-145-5p es considerado como un potente supresor de tumores, el cual generalmente se encuentra reprimido en diferentes tipos de cáncer de pulmón, mama, de esófago, colorectal, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, entre otros. Los análisis de expresión realizados en líneas celulares de cancer de mama han reportado esto estos mismos resultados; En nuestro ensayo de análisis de expresión del miR-145 pudimos corroborar estos datos, de tal modo que para llevar a cabo los análisis funcionales de este miRNA, se llevo a cabo la sobre expresión del mismo en la línea celular MDA-MB-231. Los ensayos *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares de cancer han demostrado que la sobre expresión del miR-145-5p es capaz de inhibir procesos celulares como migración, invasión, angiogénesis, proliferación. El miR-145 juega un papel importante en la sensibilización de células cancerígenas ante quimio y radio terapia. Un estudio realizado por Gong P, y col. 2015 en lines celulares de cancer de próstata encontro que la sobre expresión del miR-145-5p es capaz de sensibilizar a las células a la radiacion, mediante la regulación negativa de genes asociados a la reparación de ADN de doble cadena. Este estudio destaca un posible papel

potencial del miR-145 mediante la regulación de sus genes objetivos Rad51, Mcl-1, Par-4 y PARP1 como bioindicadores para predecir la respuesta a la radioterapia neoadyuvante en el cáncer de próstata.

Algunos estudios han sugerido que un subconjunto de células cancerosas con alta auto renovación y propiedades stem o denominadas células madre cancerosas (CSC), son el contribuyente clave a la quimiorradioterapia y son responsables de la progresión tumoral y la recurrencia después de la terapia convencional, en cancer de mama podemos observar una gran cantidad de células que resentan estas características. Se ha propuesto que las recurrencias tumorales después del tratamiento con la quimioterapia contra el cáncer son impulsadas por una subpoblación de CSC. Estudios en los cuales se analizan los datos de expresión génica de los tumores que permanecen en la mama después de la quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama han revelado el enriquecimiento de un grupo de células madre cancerosas. Este tipo de células generalmente sobre expresan algunas proteínas las cuales se relacionan con las propiedades de células madre como son KLF4, OCT4, SOX9 y SOX2. Yang Y, *et al* 2012 encontraron que el miR-145 es capaz de sensibilizar a células pertenecientes a tumores de glioblastoma a la quimio y radioterapia mediante la regulación negativa de los genes OCT4 y SOX2 los cuales han sido asociados a la quimioresistencia en cancer, al realizar la sobre expresión del miR145 en estas células se puede observar tanto la disminución de estas proteínas así como una disminución en la pluripotencia. Estos son algunas de las maneras en las cuales los niveles altos del miR-145 pueden contribuir con el desarrollo de una respuesta en las pacientes con cancer de mama triple negativo.

En el ensayo de apoptosis que realizamos se encontró que el miR-145 es capaz de inducir apoptosis en la línea celular MDA-MB-231 esto se correlaciona con otros estudios en los cuales se ha demostrado las propiedades inductoras de apoptosis del miR-145 en una variedad de modelos de células cancerosas, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, entre otros. En

el cáncer de mama, se sabe que miR-145 activa la caspasa- 3 e induce la apoptosis en células CAMA-1, MCF7 y MCF10A (Radojicic J, y col 2011).

Se ha demostrado que la vía de señalización de TGF β facilita las funciones inmunosupresoras, facilita la invasividad y promueve la angiogénesis e inicia el proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT). Las actividades pro-oncogénicas de TGF β se ejercen tanto en el microambiente como en las células tumorales, lo que hace que el tumor sea más agresivo y propenso a la diseminación. Zhao H, y col 2016 demostraron que miR-145 suprime la migración de células de cáncer de mama a través de la regulación directa de FSCN-1 y reguladores clave relacionados con EMT como SOX9, E-caderina y OCT4. En cuanto a la angiogénesis se ha descrito que esta juega un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer. El miR-145 actúa como un factor antiangiogénico en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. En el 2012 Zou C, y col fueron los primeros vincular directamente miR-145 a las etapas de angiogénesis y malignidad del cáncer de mama e indica que miR-145 tiene un valor diagnóstico y terapéutico considerable en el cáncer de mama.

El análisis del mecanismo molecular por el cual el miR-145 puede contribuir al desarrollo de la RPC en las pacientes, nos puede ayudar a desarrollar nuevas estrategias para identificar a las pacientes que responderán favorablemente al tratamiento y de este modo hacer una clasificación que nos permita hacer una modificación a sus esquemas de tratamiento en caso de que no sea así. Uno de los principales problemas asociados al cáncer de mama triple negativo es la recurrencia de la enfermedad por este motivo es importante el desarrollo de estos estudios para desarrollar tratamientos más personalizados que nos ayuden a prevenir este tipo de problemas.

16.CONCLUSIONES

- La disminución en la expresión del miR-145 podría ayudar a identificar a los pacientes que muestren respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante en pacientes con CMTN
- La baja expresión del miR-145 se asocia a una mayor tasa de supervivencia en las pacientes tratadas con la terapia neoadyuvante
- La disminución en la proliferación celular y aumento en la apoptosis mediada por la restauración del miR-145 en la línea celular MDA-MB-231 podría explicar en parte la RPC en las pacientes.
- Estos datos sugieren que el miR-145 podría mediar la proliferación y apoptosis a partir de la regulación negativa de su blanco TGFBR2.

Bibliografía

Engström W, Darbre P, Eriksson S, Gulliver L, Hultman T, Karamouzis MV, Klaunig JE, Mehta R, Moorwood K, Sanderson T, Sone H, Vadgama P, Wagemaker G, Ward A, Singh N, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Colacci AM, Vaccari M, Mondello C, Scovassi AI, Raju J. The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signalling. *Carcinogenesis*. 2015 Jun;36 Suppl 1:S38-60.

Hejmadi M. *Introduction to Cancer Biology*. 2010, Moma Heimadi and Ventus Publishing Aps, ISBN. Ed. Book Boon.

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

Golditz G, Baer H, Tamimi R. *Cancer Epidemiology and Prevention*, 3rd ed, New York: Oxford Press, 2006.

Knaul, Felicia Marie, Nigenda, Gustavo, Lozano, Rafael, Arreola-Ornelas, Héctor, Langer, Ana, & Frenk, Julio. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, 51(Supl. 2), s335-s344.

Rodríguez-Cuevas S, Macías C, Labastida S. Cáncer de mama en México: ¿enfermedad de mujeres jóvenes? *Ginecol Obst Méx* 2000;68(5):185-190.

Cardenas-Sanchez J, Bargallo-Rocha Enrique, Aura Erazo Valle, A. Poitevin Chacon, Valero Castillo V, Perez Sanchez V. Consenso Mexicano Sobre Diagnostico y Tratamiento del Cancer Mamario. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2015;14(Supl 2):1

Calero Bayo L, Garcia Mata J, Lluch Hernandez A, Maganto V. *Cancer de mama. Cuestiones más frecuentes*. 2007 GRUPO EDITORIAL ENTHEOS Paseo de la Castellana, 210, 10º-7 28046 Madrid.

Huicochea Castellanos S, Gonzales Balboa P, Lourdes Tovar I, Olarte M, Vazquez J. Cáncer de mama. *Anales de radiología*. México 2009; 1:117-126

Felipe Imigio G, Edgardo Mansillas S, Ignacio Delama G, Maria Teresa Poblete S, Carlos Fonfach Z. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuad. Cir*. 2011; 25: 67-74

Gonzales C, Bruno G, Salariato O, Alvares C, Paganini L, Vallejos J, Dieguez A. Actualización de la estadificación del cáncer de pulmón. Capítulo de Onco-Imágenes de la Sociedad Argentina de Radiología. *RAR - Volumen 76 - Número 4* – 2012.

Howell A, y col. *Breast Cancer Res*. 2014 Sep 28;16(5):446. doi: 10.1186/s13058-014-0446-2. Review.

Avery-Kiejda KA, y col. Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Jan 31;14:51.

Summerer, I., y col. Erratum: Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol.* 2015 Apr 24;10:102.

Kuehl, U., y col., Differential Cardiac MicroRNA Expression Predicts the Clinical Course in Human Enterovirus Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2015 May;8(3):605-18.

Kheirelseid, EA., y col. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Colorectal Dis.* 2013 Feb;28(2):247-60.

Watson, JA., y col. miRNA profiles as a predictor of chemoresponsiveness in Wilms' tumor blastema. *PLoS One.* 2013;8(1):e53417.

Sun L, Wu G, Willson JK, Zborowska E, Yang J, Rajkarunanayake I, Wang J, Gentry LE, Wang XF, Brattain MG. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 1994 Oct 21;269(42):26449-55.

Wang S, Bian C, Yang Z, Bo Y, Li J, Zeng L, Zhou H, Zhao RC. miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int J Oncol.* 2009 May;34(5):1461-6.

Zhang J, Sun Q, Zhang Z, Ge S, Han ZG, Chen WT. Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the MDM2-p53 feedback loop. *Oncogene.* 2013 Jan 3;32(1):61-9.

Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CP, Ma ES, Pang R, Chua D, Chu KM, Law WL, Law SY, Poon RT, Kwong A. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One.* 2013;8(1):e53141.

Noh JH, Chang YG, Kim MG, Jung KH, Kim JK, Bae HJ, Eun JW, Shen Q, Kim SJ, Kwon SH, Park WS, Lee JY, Nam SW. MiR-145 functions as a tumor suppressor by directly targeting histone deacetylase 2 in liver cancer. *Cancer Lett.* 2013 Jul 28;335(2):455-62.

Donzelli S, Mori F, Bellissimo T, Sacconi A, Casini B, Frixia T, Roscilli G, Aurisicchio L, Facciolo F, Pompili A, Carosi MA, Pescarmona E, Segatto O, Pond G, Muti P, Telera S, Strano S, Yarden Y, Blandino G. Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. *Oncotarget.* 2015 Nov 3;6(34):35183-201.

Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, Zagatti B, Fabbri M, Veronese A, Liu X, Davuluri R, Croce CM, Mills G, Negrini M, Calin GA. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 2010 Feb;17(2):246-54.

Eades G, Wolfson B, Zhang Y, Li Q, Yao Y, Zhou Q. lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. *Mol Cancer Res.* 2015 Feb;13(2):330-8.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I,

Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7065-70.

Cui SY, Wang R, Chen LB. MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *J Cell Mol Med.* 2014 Oct;18(10):1913-26.

Letelier P, García P, Leal P, Álvarez H, Ili C, López J, Castillo J, Brebi P, Roa JC. miR-1 and miR-145 act as tumor suppressor microRNAs in gallbladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Apr 15;7(5):1849-67.

Gong P, Zhang T, He D, Hsieh JT. MicroRNA-145 Modulates Tumor Sensitivity to Radiation in Prostate Cancer. *Radiat Res.* 2015 Dec;184(6):630-8. doi:10.1667/RR14185.1. Epub 2015 Dec 3. PubMed PMID: 26632856.

Zou C, Xu Q, Mao F, Li D, Bian C, Liu LZ, Jiang Y, Chen X, Qi Y, Zhang X, Wang X, Sun Q, Kung HF, Lin MC, Dress A, Wardle F, Jiang BH, Lai L. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle.* 2012 Jun 1;11(11):2137-45. doi: 10.4161/cc.20598.

Yan X, Chen X, Liang H, Deng T, Chen W, Zhang S, Liu M, Gao X, Liu Y, Zhao C, Wang X, Wang N, Li J, Liu R, Zen K, Zhang CY, Liu B, Ba Y. miR-143 and miR-145 synergistically regulate ERBB3 to suppress cell proliferation and invasion in breast cancer. *Mol Cancer.* 2014 Sep 24;13:220.

Zhao H, Kang X, Xia X, Wo L, Gu X, Hu Y, Xie X, Chang H, Lou L, Shen X. miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Am J Transl Res.* 2016 Jul 15;8(7):3106-14. eCollection 2016.

Yang YP, Chien Y, Chiou GY, Cherng JY, Wang ML, Lo WL, Chang YL, Huang PI, Chen YW, Shih YH, Chen MT, Chiou SH. Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. *Biomaterials.*

Das AV, Pillai RM. Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* 2015 Sep 29;15:92. doi: 10.1186/s12935-015-0247-4.

Fuse M, Nohata N, Kojima S, Sakamoto S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol.* 2011 Apr;38(4):1093-101.

Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K, Mo YY. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 3;106(9):3207-12.

Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, Vallböhmer D, Bollschweiler E, Brabender J, Mönig SP, Hölscher AH, Dienes HP, Odenthal M. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the

tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol*. 2011 Aug;39(2):409-15.

Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, de Weerd V, Boersma AW, Klijn JG, Wiemer EA, Martens JW. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):13021-6. doi: 10.1073/pnas.0803304105.

Lu Y, Chopp M, Zheng X, Katakowski M, Wang D, Fraser E, Nguyen M, Jiang F. Overexpression of miR-145 in U87 cells reduces glioma cell malignant phenotype and promotes survival after in vivo implantation. *Int J Oncol*. 2015 Mar;46(3):1031-8.

Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, Vallböhmer D, Bollschweiler E, Brabender J, Mönig SP, Hölscher AH, Dienes HP, Odenthal M. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol*. 2011 Aug;39(2):409-15.

Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am J Transl Res*. 2010 Mar 25;2(2):170-80.

Avgeris M, Stravodimos K, Fragoulis EG, Scorilas A. The loss of the tumour-suppressor miR-145 results in the shorter disease-free survival of prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2013 Jun 25;108(12):2573-81. doi: 10.1038/bjc.2013.250. Epub 2013 May 23.

Ostenfeld MS, Bramsen JB, Lamy P, Villadsen SB, Fristrup N, Sørensen KD, Uhløi B, Borre M, Kjems J, Dyrskjød L, Orntoft TF. miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene*. 2010 Feb 18;29(7):1073-84.

Yu Y, Nangia-Makker P, Farhana L, G Rajendra S, Levi E, Majumdar AP. miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells. *Mol Cancer*. 2015 May 1;14:98.

Zhou K, Fan YD, Wu PF, Duysenbi S, Feng ZH, Du GJ, Zhang TR. MicroRNA-145 inhibits the activation of the mTOR signaling pathway to suppress the proliferation and invasion of invasive pituitary adenoma cells by targeting AKT3 in vivo and in vitro. *Onco Targets Ther*. 2017 Mar 16;10:1625-1635.

Martínez J.L. Cáncer de mama. Boletín de práctica médica efectiva. INSP. 2008. Secretaría de salud. México. Julio 2011.

Cárdenas S, Bargallo R, Erazo V, Maafs M, Poitevin. Consejo Mexicano Sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. 2013 Masson Doyma México S.A.

Douglas, H., and Weinberg, A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011 . 2011 Elsevier Inc.

Imigio, F., y col, 2011. Clasificación molecular del cáncer de mama. Cuad. Cir. 2011; 25: 67-74

Zaharia M, Gómez H. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2013;30(4):649-56.

Sahoo S, Lester SC. Pathology of breast carcinomas after neoadjuvant chemotherapy: an overview with recommendations on specimen processing and reporting. Arch Pathol Lab Med. 2009 Apr;133(4)

Tresserra, F., y col 2012. Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante: correlación entre 2 sistemas de gradación histológica. Rev Senol Patol Mamar. 2013;26(3):77---84.

Tufia, C., y col, 2015. Landscape of Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 May ; 22(5): 1408–1415.

Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009;136:215-233.

Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*. 2015 Jul 13;5(10):1122-43.

Skinner HD, Lee JH, Bhutani MS, Weston B, Hofstetter W, Komaki R, Shiozaki H, Wadhwa R, Sudo K, Elimova E, Song S, Ye Y, Huang M, Ajani J, Wu X. A validated miRNA profile predicts response to therapy in esophageal adenocarcinoma. *Cancer*. 2014 Dec 1;120(23):3635-41.

Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 2012 Dec;6(6):590-610.doi: 10.1016/j.molonc.2012.09.006. Epub 2012 Oct 9. Review.

Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61.

McGuire A, Brown JA, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Mar;34(1):145-55.

Eades G, Wolfson B, Zhang Y, Li Q, Yao Y, Zhou Q. lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. *Mol Cancer Res*. 2015 Feb;13(2):330-8.

Boström AK, Lindgren D, Johansson ME, Axelson H. Effects of TGF- β signaling in clear cell renal cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 24;435(1):126-33.

Jean-Jacques Lebrun. The Dual Role of TGFB in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. International Scholarly Research Network ISRN Molecular Biology Volume 2012, Article ID 381428, 28 pages doi:10.5402/2012/381428

Hummel R, Hussein DJ, Haier J. MicroRNAs: Predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumor types. *Eur J Cancer* 2010;46:298e311.

Della Vittoria Scarpato G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, Singh VK, D'Incalci M, De Placido S, Pepe S. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Jul 15;83(4):1113-9.

Skinner HD, Lee JH, Bhutani MS, Weston B, Hofstetter W, Komaki R, Shiozaki H, Wadhwa R, Sudo K, Elimova E, Song S, Ye Y, Huang M, Ajani J, Wu X. A validated miRNA profile predicts response to therapy in esophageal adenocarcinoma. *Cancer*. 2014 Dec 1;120(23):3635-41.

Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nekvindova J, Radova L, Vyzula R, Slaby O. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiat Oncol*. 2012 Nov 20;7:195.

Raychaudhuri M, Bronger H, Buchner T, Kiechle M, Weichert W, Avril S. MicroRNAs miR-7 and miR-340 predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Apr;162(3):511-521.

Kheirleiseid EA, Miller N, Chang KH, Curran C, Hennessey E, Sheehan M, Newell J, Lemetre C, Balls G, Kerin MJ. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Feb;28(2):247-60.

Lopes-Ramos CM, Habr-Gama A, Quevedo Bde S, Felício NM, Bettoni F, Koyama FC, Asprino PF, Galante PA, Gama-Rodrigues J, Camargo AA, Perez RO, Parmigiani RB. Overexpression of miR-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *BMC Med Genomics*. 2014 Dec 11;7:68.

Hon JD, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, Deng FM, Zhang DY, Monaco ME, Lee P. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res*. 2016 Sep 1;6(9):1864-1872. eCollection 2016.

Jorge R Uribe, Carlos A Hernandez, Francisco Menolascino, Joel E Rodriguez, Linda M Isturiz, Maria E Marquez, Ramon E Rodriguez. Clasificación Molecular del Cáncer de Mama. *Rev Venez Oncol* 2010;22(2):109-116

Felicia Marie Knaul, PhD, Gustavo Nigenda, PhD, Rafael Lozano, MD, M en C, Héctor Arreola-Ornelas, M en C, Ana Langer, MD, Julio Frenk, PhD. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Publica Mex* 2009;51 supl 2:S335-S344.

Brandan ME, Villaseñor Y. Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Rev Inst Nal Cancerol* 2006; 1: 147-62.

Cáncer de mama: una guía para pacientes - Basada en la Guía de Práctica Clínica de la Good Science Better Medicine Best Practice (ESMO) – v.2013.1. European Society for Medical Oncology. 2011.

Chatterjee A, Erban JK. Neoadjuvant therapy for treatment of breast cancer: the way forward, or simply a convenient option for patients? *Gland Surgery*. 2017;6(1):119-124. doi:10.21037/gs.2016.08.07.

Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2015;9(Suppl 2):17-34. doi:10.4137/BCBCR.S29420.

Kim S, Han J, Jeon M, You D, Lee J, Kim HJ, Bae S, Nam SJ, Lee JE. Silibinin inhibits triple negative breast cancer cell motility by suppressing TGF- β 2 expression. *Tumour Biol*. 2016 Aug;37(8):11397-407.

Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, y col. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008;133:66–77.

Kopp A, Jonat W, Schmahl M, Knabbe C. Transforming growth factor beta 2 (TGF-beta 2) levels in plasma of patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen. *Cancer Res*. 1995;55: 4512–5.

Ma X, Beeghly-Fadiel A, Lu W, Shi J, Xiang YB, Cai Q, Shen H, Shen CY, Ren Z, Matsuo K, Khoo US, Iwasaki M, Long J, Zhang B, Ji BT, Zheng Y, Wang W, Hu Z, Liu Y, Wu PE, Shieh YL, Wang S, Xie X, Ito H, Kasuga Y, Chan KY, Iwata H, Tsugane S, Gao YT, Shu XO, Moses HL, Zheng W. Pathway analyses identify TGFBR2 as potential breast cancer susceptibility gene: results from a consortium study among Asians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jul;21(7):1176-84.

Chapnick DA, Warner L, Bernet J, Rao T, Liu X. Partners in crime: the TGF β and MAPK pathways in cancer progression. *Cell & Bioscience*. 2011;1:42. doi:10.1186/2045-3701-1-42.