

**Análisis de las rutas de señalización VEGF/PI3K/AKT
en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada
por el miR-204 en cáncer de mama**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

BIOL. YARELY MARLENE SALINAS VERA

DIRECTOR

DR. MARIO CESAR LÓPEZ CAMARILLO, UACM

CODIRECTORA

DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA, INCAN

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente:	Dra, Elisa Irene Azuara Liceaga UACM.
Secretario:	Dr, Mario Cesar López Camarillo UACM.
Vocal:	Dra, Alma Delia Campos Parra INCAN.
1 ^{er} . Suplente:	Dra, Lilia López Cánovas UACM.
2 ^{do} . Suplente:	Dra, María Elizbeth Álvarez Sánchez UACM.

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

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

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alma Delia Campos Parra
Instituto Nacional de Cancerología.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario Cesar López Camarillo

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA

Dra. Alma Delia Campos Parra

Instituto Nacional de Cancerología

ASESORES

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación presentado forma parte del proyecto “Análisis funcional del miR-204 en cáncer de mama” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. de proyecto: 222335 y por el proyecto de SALUD-2015-1 No. de proyecto: 262044.

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

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su ayuda económica brindada mediante la beca otorgada durante el periodo de julio de 2016 a julio de 2017 con No. de becario: 588430 y a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por el apoyo académico y económico para la impresión de esta tesis, con el número de convenio UACM-CSE-ITR/111/2017.

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

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

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Dra. Elisa Azuara por su importante aporte en desarrollo de esta tesis, por su disponibilidad y paciencia en la revisión de esta tesis.

Quiero extender un sincero agradecimiento a la Dra. Lilia López y a la Dra. Elizbeth Álvarez, por su paciencia y disponibilidad en la revisión de esta tesis.

Especial reconocimiento merece por las sugerencias recibidas de la Dra. Olga Nohemí Hernández, y por el ánimo infundido.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de Laboratorio, especialmente al Mto y amigo Raúl García quien compartió conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor. Por su gran apoyo en momentos difíciles y ser un confidente.

Para mis compañeros de generación, tengo sólo palabras de agradecimiento, ha sido un camino largo y duro. Especialmente a Mónica por sus ánimos y contagiarnos siempre con su alegría, a Jorge por ser un gran amigo y compañero, a Frederik por brindarnos momentos de alegría y a Victor por su constancia, perseverancia, por ser mi vecino en el laboratorio y llenarme de tantos momentos de alegría.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura investigación.

A mis padres, Eufemio y Amelia mi mayor inspiración, por su ejemplo de lucha y honestidad, por ser mi guía durante tantos años; a mis hermanas Nancy, Vanessa y Jessica por sus ánimos y apoyo, a mi tía Guadalupe Vera por darme la fuerza para continuar con este largo y duro camino, a mi tío Antonio Vera por darme siempre alicientes para seguir superándome y a mi esposo Yussel por su paciencia, inteligencia, generosidad y todo su apoyo en este largo camino...por ellos y para ellos!

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a todos aquellos que creyeron en mí.

A mis padres...

Este es un logro que quiero compartir con ustedes

A mi mamá Amelia, gracias por todo el esfuerzo y por la confianza que depositaste en mí, gracias porque siempre has estado a mi lado, apoyándome en todo momento. Te amo mamá eres especial en mi vida.

A mi padre Eufemio, gracias por creer en mí, por todo tu apoyo y porque sé que hiciste un gran esfuerzo para darme una educación. Quiero que sepas que ocupas un lugar especial en mi vida.

A mis hermanas...

Nancy, Vanessa y Jessica, por estar conmigo y apoyarme siempre, las quiero mucho.

A mis sobrinos...

Wendy, Dany, Sao, Dylan, Jade, Bruno y Ángel, para que vean en mí un ejemplo a seguir. Y sepan que todo es posible. Los quiero mucho.

A mi esposo...

Yusnel, por compartir tu vida conmigo, por darme tu amor, confianza y nunca dejarme caer. Por tu apoyo incondicional y por darme el mejor regalo, nuestra pequeña bebé que viene en camino. Te amo mucho.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína cinasa B
ANGPT1	Angiopoyetina 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARN pol II	ARN polimerasa II
ARNm	ARN mensajero
BDNF	Factor neurotrópico derivado del cerebro
cADN	ADN codificante
CE's	Células endoteliales
CM	Cáncer de mama
COX-2	Ciclo-oxigenasa 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
ELK1	Factor de transcripción
Eph2A	Receptor de ephrin tipo A 2
ERK ½	Cinasa de regulación extracelular
FAK	Cinasa de adhesión focal
H	Horas
HER2	Factor de crecimiento epidermal 2
HIF-1α	Factor inducible de hipoxia 1 alfa
HRE's	Elemento de respuesta a hipoxia
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
Min	Minutos
miRNA	microRNA
mL	Mililitros
MMP's	Metaloproteasas
MV	Mimetismo vasculogénico
Ng	Nanogramos
Nt	Nucleótidos
°C	Centígrados
p/mol	Picomol
P38αMAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos 14
PAS	Ácido peryodico de schiff
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción de la cadena de polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PLCγ2	Fosfolipasa C gamma 2
PRKCA	Proteína cinasa C alfa
PTK's	Receptor de tirosina cinasa
PVDF	Polyvinylidene difluoride
r.p.m	Revoluciones por minuto
RAF1	Proto-oncogén cinasa serina/treonina RAF
RB	Retinoblastoma
RE	Receptor de estrógeno

RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RP	Receptor de progesterona
RT	Retrotranscripción
SHC1	Proteína adaptadora Shc 1
Src	Proteína cinasa tirosina proto-oncogén Src
T.A	Temperatura ambiente
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TrKB	Receptor de tirosina cinasa
UTR	Región no traducida
VE-cadherina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Factor de crecimiento epidermal vascular
VEGFR2	Receptor del factor de crecimiento epidermal vascular 2

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Las características distintivas del cáncer	3
1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento	5
1.2.2 Insensibilidad a las señales anti-crecimiento	5
1.2.3 Evasión a los procesos de muerte celular programada (apoptosis).....	6
1.2.4 Ilimitado potencial replicativo	6
1.2.5 Angiogénesis.....	8
1.2.6 Invasión a tejidos y metástasis.....	8
1.3 Cáncer de mama.....	9
1.3.1 Factores de riesgo	12
1.3.2 Clasificación del cáncer de mama.....	12
1.4 MicroRNAs	14
1.4.1 Biogénesis de los miRNAs	14
1.4.2 miRNAs y cáncer: oncomiRs.....	15
1.4.3 Funciones de los miRNAs en cáncer de mama.	17
1.5 Antecedentes particulares	19
1.5 El miR-204 y cáncer de mama.	19
1.6 Mimetismo vasculogénico.	21
1.7.1 Hipoxia y mimetismo vasculogénico	23
1.7.2 Papel de VEGF en el mimetismo vasculogénico.....	24
1.7.3 Vía de señalización PI3K/AKT y MV	25
1.7.4 Papel de VE-cadherina, EphA2, FAK en el mimetismo vasculogénico	27
1.8 Importancia del mimetismo vasculogénico en cáncer de mama	28

1.9 El mimetismo vasculogénico y su regulación por miRNAs en distintos tipos de cáncer	28
II. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo general	31
2.1.1 Objetivos específicos	31
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
4.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama.	33
4.1.1 Condiciones de cultivo de la línea celular	33
4.1.2 Sub-cultivo de la línea celular MDA-MB-231.....	33
4.1.3 Congelamiento de las líneas celulares.....	33
4.1.4 Descongelamiento de las líneas celulares	34
4.2 Análisis de la expresión del miR-204 en la línea celular MDA-MB-231.....	34
4.2.1 Transfección del precursor del miR-204.....	34
4.2.2 Lisis y extracción de ARN total de la línea celular MDA-MB-231.....	35
4.2.3 Análisis de la expresión del mir-204 mediante sondas Taqman.	35
4.3 Análisis de la expresión de las proteínas y su estado de fosforilación en células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-204 mediante Phospho-antibody arrays.....	36
4.3.1 Extracción de proteínas.....	36
4.3.2 Purificación de proteínas.....	37
4.3.3 Cuantificación de proteínas.....	37
4.3.4 Marcaje de proteínas.....	37
4.3.5 Bloqueo del fosfo-arreglo	37
4.3.6 Acoplamiento de proteínas con el fosfo-arreglo	38
4.3.7 Detección antígeno/anticuerpo.....	38
4.3.8 Análisis de datos	38

4.4 Validación del fosfo-arreglo mediante ensayos de western blot.....	39
4.4.1 Obtención de extractos proteicos totales.	39
4.4.2 Determinación de la concentración de proteínas	39
4.4.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	40
4.4.4 Transferencia de proteínas a membrana PVDF.	40
4.4.5 Ensayos de western blot	40
4.5 Análisis bioinformáticos.....	42
4.6 Ensayos de mimetismo vasculogénico.....	42
4.6.1 Condiciones de hipoxia.	42
4.6.2 Ensayo de formación de estructuras tipo capilar <i>in vitro</i>	42
4.6.3 Inhibición de PI3K, FAK y Src, utilizando inhibidores específicos.	43
4.7 Construcciones pmiR-LUC-3'UTR.	43
4.7.1 Hibridación y clonación de las secuencias 3'UTR de los genes PI3K y Src silvestres y mutadas.....	43
4.7.2 Ligación de los insertos 3'UTR dentro del plasmido pmiR-report-Luc.	44
4.8 Validación de blancos mediante construcciones LUC-3'UTR.....	46
4.8.1 Transfección de las construcciones pmiR-LUC-PI3K, pmiR-LUC-Src, pmiR-PI3K.MUT y pmiR-Src-MUT en células MDA-MB-231.	46
4.8.2 Co-transfección del pre-miR-204 y scramble en células transfectadas con las construcciones pmiR-LUC-3'UTR.....	46
4.8.3 Detección de la actividad luciferasa.	47
V. RESULTADOS	48
5.1 Formación del mimetismo vasculogénico en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.	48
5.2 Análisis de la restauración del miR-204 en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.	48
5.3 El miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.	50

5.4 Vías de señalización que participan en el mimetismo vasculogénico mediado por el miR-204.....	50
5.5 Predicción de los mRNA blancos del miR-204.....	57
5.6 Validación del fosfo-arreglo por Western blot.....	57
5.7 Análisis de la expresión HIF-1 α y su participación en la formación del mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.....	59
5.8 Participación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK en la inhibición del mimetismo vasculogénico.	59
5.9 Clonación de la región 3'UTR de los genes PI3K y Src en el vector pmiR-report	63
5.10 El miRNA-204 tiene dos genes blancos PI3K y Src relacionados con el mimetismo vasculogénico.	63
V. DISCUSIÓN.....	69
VII. CONCLUSIONES.....	76
VIII. FUENTES DE CONSULTA	77
IX. ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial y en México.	11
Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.	13
Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados para hacer el ensayo de inmunodetección. .	41
Tabla 4. Oligonucleótidos correspondientes a la región 3'UTR de los genes PI3K, Src y FAK.	45
Tabla 5. Predicción de genes blancos del miR-204 desregulados en el fosfo-arreglo , que participan en la formación del MV.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases para el desarrollo del cáncer..	4
Figura 2. Las características distintivas del cáncer.	7
Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria.....	10
Figura 4. Biogénesis de los miRNAs.....	16
Figura 5. Papel de los microRNAs en cáncer.....	18
Figura 6. Estructuras implicadas en el suministro de nutrientes a los tumores.....	22
Figura 7. Modelo esquemático de mecanismos moleculares y vías de señalización involucradas en la formación de MV.	26
Figura 8. miRNAs que regulan la formación de mimetismo vasculogénico en distintos tipos de cáncer.....	30
Figura 9. Estrategia experimental.	32
Figura 10. Formación del mimetismo vasculogénico en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.	49
Figura 11. Análisis de la restauración del miR-204 en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.....	51
Figura 12. El miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.	52
Figura 13. Vías de señalización inhibidas por el miR-204 en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.	53
Figura 14. Análisis de las rutas de señalización PI3K/AKT en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204.	54
Figura 15. Análisis de las rutas de señalización FAK en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204.	55
Figura 16. Análisis de las rutas de señalización MAPK en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204.	56
Figura 17. Validación de los cambios en la expresión y fosforilación de proteínas moduladas en el fosfo-arreglo.....	
Figura 18. Análisis de la expresión de HIF-1 α en células transfectadas con el miR-204 bajo con condiciones de hipoxia.	60
Figura 19. Participación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK en la inhibición del mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.....	62

Figura 20. Doble digestión del plásmido pmiR-report con las enzimas <i>Hind</i> III y <i>Spe</i> I visualizada en electroforesis analítica en gel de agarosa al 1.0 %.	64
Figura 21. Hibridación de los oligonucleótidos de la región 3'UTR de los genes Src y PI3k visualizada en una electroforesis analítica en gel de agarosa al 2.0 %.	65
Figura 22. Productos de PCR colony de las distintas clonas visualizadas en electroforesis en gel de agarosa al 2 %.	66
Figura 23. Verificación de las clonas obtenidas	67
Figura 23. PI3K y Src son blancos predichos del miR-204.	68
Figura 24. Modelo hipotético de como el miR-204 inhibe el MV a través de la inhibición de múltiples vías de señalización	75

RESUMEN

El mimetismo vasculogénico (MV) es un novedoso mecanismo independiente de la angiogénesis, en el que las células tumorales altamente agresivas y metastásicas forman estructuras tipo capilar para la obtención de nutrientes, sin el requerimiento de la angiogénesis clásica. El MV se ha asociado con un mal pronóstico y baja supervivencia en diversos tipos de tumores. Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que el miR-204 es un supresor de tumor, y un novedoso angiomiR con un papel primordial en la angiogénesis tumoral. Sin embargo, su participación en la regulación del MV aún no está explorada. En la presente investigación demostramos que las células de cáncer de mama triple negativo altamente metastásicas bajo condiciones de hipoxia desarrollan MV. Además, la restauración de la expresión del miR-204 inhibe drásticamente el MV. Con el fin de descifrar las vías de señalización implicadas en la inhibición del MV por miR-204, determinamos los niveles de expresión y el estado de fosforilación de múltiples proteínas de señalización utilizando un fosfo-arreglo de anticuerpos. Los datos mostraron que proteínas claves de múltiples vías de señalización tales como PI3K-AKT, MAPK, FAK fueron reprimidas significativamente después de la restauración de miR-204. Además, el estado de fosforilación de AKT (Ser 473), MEK1 (Ser 218/222), p38 α MAPK (Thr 180/Tyr 182), PI3K (Tyr 458) y Src (Tyr 418) disminuyó, esto fue confirmado por medio de ensayos de Western blot. Interesantemente, la proteína HIF-1 α , que regula a la baja la vía de señalización PI3K/AKT, también disminuyó su expresión al restaurar la expresión del miR-204. De forma congruente, la inhibición de PI3K, FAK y SRC con inhibidores específicos inhibió eficazmente el MV. Y el ensayo de luciferasa mostro que PI3K y Src son blancos del miR-204. Estos datos resaltaron la importancia de las terapias multi-focalizadas utilizando miRNAs como un enfoque atractivo en el cáncer. También nuestros hallazgos proporcionan nuevos blancos potenciales para la intervención del MV con aplicaciones terapéuticas en el cáncer de mama.

ABSTRACT

Vascular mimicry (VM) is a novel angiogenesis-independent mechanism in which highly aggressive and metastatic epithelial tumor cells form vascular 3D channel-like structures to obtain nutrients without the use of classical blood vessels. VM is associated with poor prognosis and low survival in diverse types of human cancers. Previously, we showed that tumor suppressor miR-204 is a novel angiomiR with a pivotal role in tumor angiogenesis. However its function in VM remains unexplored. Here, we showed that metastatic triple negative breast cancer cells effectively undergo VM in hypoxia conditions. Moreover, *in vitro* restoration of miR-204 using RNA mimics dramatically inhibits VM. In order to decipher the signaling circuitry involved in VM inhibition by miR-204, we screened the expression levels and phosphorylation status of multiple signaling proteins using Phospho Antibody Arrays. Data showed that a signaling network of key proteins involved in the activation of PI3K-AKT, RAF1, MAPK, and FAK pathways were significantly downregulated after restoration of miR-204. In addition, a decrease in the phosphorylation of AKT (Ser 473), MEK1 (Ser 218/222), p38 α MAPK (Thr 180/Tyr 182), PI3K (Tyr 458) and Src (Tyr 418), were confirmed by Western blot. Congruently, targeted inhibition of PI3K, FAK and SRC tyrosine kinases before miR-204 restoration effectively inhibits VM. Luciferase reporter assay confirms that PI3K and SRC genes are targets of miR-204. These data highlighted the importance of RNA-based multi-targeted therapies as an attractive approach in cancer. Also our findings provide novel potential targets for VM intervention with therapeutic applications in breast cancer.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El nombre del cáncer proviene del término griego *karkinoma* dado por Hipócrates cuatro siglos antes de Cristo y del equivalente latino *cancer*, al crecimiento radial infiltrante de algunos tumores de mama a modo del cuerpo de un cangrejo (Spencer, 1950). El cáncer es un grupo de enfermedades etiológicamente distintas entre sí y es el resultado de dos procesos sucesivos: la proliferación exacerbada de un grupo de células denominadas tumor o neoplasia y la posterior adquisición por parte de estas células de la capacidad invasiva que les permite escapar de su sitio de origen e invadir tejidos adyacentes y otros órganos, este proceso se conoce como metástasis (Figura 1). (Muñoz, 1997). Existen alrededor de 200 tipos de células en nuestro organismo y si bien el cáncer se puede desarrollar a partir de cualquier tipo de células existen más de 200 tipos de cáncer distintos los cuales se pueden clasificar con base en su origen en:

Carcinoma (*Carcin* = cangrejo, úlcera cancerosa. *Oma* = tumor). Se llaman carcinomas cuando los tumores se originan de células epiteliales. Las células epiteliales son las células que forman el epitelio, que es el tejido que recubre todas las superficies del organismo y constituye el revestimiento interno de las cavidades, de los órganos huecos, de los conductos del cuerpo, la piel, las mucosas y las glándulas. Cuando el origen de las células tumorales proviene de células epiteliales que recubren glándulas, este recibe el nombre de adenocarcinoma. Cuando se origina de epitelio de superficie que no es glandular este puede ser carcinoma epidermoide, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células transicionales. Debido a la gran extensión que tienen los epitelios en el cuerpo humano y a que este tejido está en extremo contacto con agente mutagénicos y/o carcinogénicos, los carcinomas son el tipo de cáncer más común de la población mundial, constituyendo aproximadamente un 85% de todos los tipos de cáncer. Dentro de los carcinomas de mayor incidencia se encuentran el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, y el cáncer de pulmón (Sonneborn, 1947).

Leucemia (*Leuco* = Blanco, *emia* = Sangre). Se llaman leucemias a los cánceres originados en células de la médula ósea (tejido que se encuentra dentro de los huesos y que se encarga de generar las células que componen la sangre). En este tipo de cáncer se observa un aumento descontrolado del número de leucocitos inmaduros (glóbulos blancos) en la médula ósea, que a su vez pueden pasar a la sangre aunque en ciertas ocasiones no lo hacen y generan lo que se llama leucemias aleucémicas. Dentro de las leucemias también se incluye aquella que afecta la proliferación de glóbulos rojos y es llamada eritroleucemia. Los cuatro tipos principales de leucemias son: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC). El número de casos de leucemia en adultos es aproximadamente diez veces el número de casos en niños. La leucemia es el cáncer infantil más común y la leucemia linfocítica aguda representa aproximadamente 72% de casos de leucemia infantil. La leucemia más común en adultos es la LMA seguida por la LLC, LMC y la LLA (Sonneborn, 1947).

Linfoma (*Linfa* = agua. *Oma* = tumor). Este cáncer que inicia en las células del sistema inmune, particularmente en el sistema linfático. A los linfomas también se les llama los tumores sólidos hematológicos para diferenciarlos de las leucemias. Hay dos categorías básicas de linfomas. Una categoría es el linfoma de Hodgkin, que se caracteriza por la presencia de un tipo de célula llamada célula de Reed-Sternberg (célula gigante derivada de linfocitos B). La otra categoría es la de los linfomas no Hodgkin que incluye un grupo grande y diverso de cánceres de las células del sistema inmunitario. Los linfomas no Hodgkin pueden dividirse aún más en cánceres que tienen una evolución o curso indolente (de crecimiento lento) y aquellos que tienen una evolución dinámica (de crecimiento rápido). Tanto los linfomas de Hodgkin como los no Hodgkin se pueden presentar en niños y adultos (Sonneborn, 1947).

Mielomas (*Miel* = médula. *Oma* = tumor). Tipo de cáncer que comienza en las células plasmáticas (glóbulos blancos que producen anticuerpos). También se llama enfermedad de Kahler, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas y mielomatosis. En el mieloma se produce de forma continua y en cantidad mayor al

habitual. Este es el segundo cáncer sanguíneo más común en los Estados Unidos y representa el 1% de casos de cáncer en el mismo país. En otros tejidos del cuerpo también pueden originarse tumores, pero este tipo de cáncer son muy extraños y poco comunes. Dentro de éste grupo de cánceres, los tumores más comunes son los cerebrales, los cuales derivan de células del tejido conectivo formado por células gliales, que sostienen a las células nerviosas en el cerebro. Estos cánceres son conocidos como gliomas (Sonneborn, 1947).

Adenocarcinoma. Tumor originado en epitelios glandulares, son el tipo más frecuente de cáncer en seres humanos. Incluyen todos los tumores de las vías respiratorias y digestivas, así como cáncer de mama y próstata (Sonneborn, 1947).

1.2 Las características distintivas del cáncer

A pesar que el cáncer es una enfermedad heterogénea existen características biológicas que comparten todos los tipos de cáncer. En el año 2000 Weinberg y Hanahan las denominaron características distintivas del cáncer o en inglés, “hallmarks” del cáncer, los cuales son: autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, evasión a los procesos de muerte celular programada (Apoptosis), ilimitado potencial replicativo, angiogénesis, invasión a tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011. Figura 2).

1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento

En condiciones normales existe una fuerte regulación mediada por las señales de crecimiento; la mayoría de los factores de crecimiento son producidos por un tipo de célula en particular, estimulando la proliferación celular del mismo tipo celular. Una de las principales características de las células cancerosas es la capacidad de crecer ilimitadamente. Existen distintos mecanismos mediante los cuales las células tumorales son capaces de adquirir autosuficiencia a señales de crecimiento (Hanahan y Weinberg, 2011). Principalmente, las células tumorales adquieren la capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento, estimulando así su proliferación, mediante un mecanismo autocrino. Un mecanismo alternativo, de las

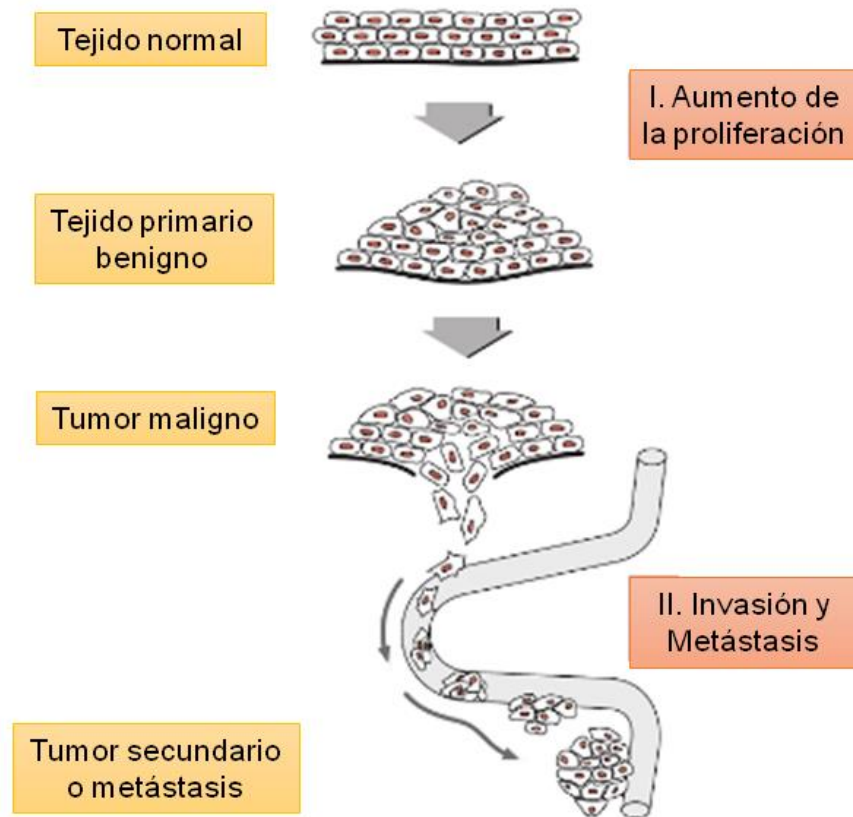


Figura 1. Fases para el desarrollo del cáncer. 1.1) formación del tumor benigno, debido a un aumento en la proliferación celular, y 1.2) posterior malignización de este con formación de tumores secundarios en sitios distantes como consecuencia de la adquisición de invasividad y la capacidad metastásica. Tomada y modificada de (Muñoz, 1997).

células tumorales es mandar señales a las células normales, para la producción de factores de crecimiento y así utilizarlos (Lemmon y Schlessinger, 2010). Uno de los principales factores de crecimiento involucrados en cáncer es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que se encuentra desregulado en distintos tipos de cáncer tales como mama, pulmón, colón, entre otros (Chen *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2017). Pero también se requiere de la participación de las rutas de señalización para que se lleve a cabo este proceso. Una de las principales rutas de señalización involucradas es de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que se encuentra alterada en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, la sobre-activación de esta vía promueve la proliferación celular en cáncer cervical (Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

1.2.2 Insensibilidad a las señales anti-crecimiento

Además de estimular su crecimiento, las células tumorales también tienen la capacidad de evadir señales anti-crecimiento, este mecanismo depende de los supresores de tumor, los cuales van a actuar dentro de la célula mediante diferentes rutas. Los genes supresores de tumor más conocidos son; los que codifican para la proteína asociada a retinoblastoma (RB) y TP53 estos funcionan como controladores del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2011). La proteína RB se encuentra alterada en diversos tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, próstata, gástrico y mama; entre otros. La proteína RB es capaz de integrar señales antiproliferativas de distintos orígenes, tanto extracelular como intracelular, una de las principales funciones de RB es inhibir la progresión del ciclo celular (Burkhart *et al.*, 2008; Deshpande *et al.*, 2005). Por otro lado, TP53 es una proteína que censa tanto el estrés celular como el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo tanto, si una célula estuviera bajo estrés intenso o recibiera mucho daño al ADN, TP53 es capaz de detener el ciclo celular hasta que nuevamente haya condiciones normales en la célula o hasta que el daño generado al ADN haya sido reparado, pero si el daño es irreparable, TP53 puede activar el proceso de muerte programada y llevar a la célula comprometida a apoptosis (Fischer *et al.*, 2017).

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

Otra característica importante que adquiere el tumor es evadir la muerte celular programa o apoptosis. Para que las células puedan llevar acabo la apoptosis se requiere de la maquinaria apoptótica que está compuesta por arriba de reguladores y por debajo de efectores (Hanahan y Weinberg, 2011). Los reguladores monitorean las condiciones ambientales tanto extracelular como intracelular, mandando señales de supervivencia o muerte celular. La vía de señalización de la apoptosis converge en la mitocondria donde las proteínas pro-apoptóticas despolarizan la membrana liberando al citocromo C, generando así la muerte de las células. Otro grupo de proteínas que participa en la apoptosis es la familia de las Bcl2 (Cory *et al.*, 2002). Bcl2 es una proteínas pro-apoptótica que se encuentra desregulada en diferentes tipos de cáncer, tales como la leucemia linfocítica crónica y cáncer de mama. La función alterada de Bcl-2 en la leucemia linfocítica crónica y otros tipos de cáncer se ha atribuido a la hipometilación del promotor de Bcl-2. También, se ha reportado que la represión de Bcl-2 se debe a miRNAs tales como el miR-15 y miR-16 (Yip *et al.*, 2008).

1.2.4 Ilimitado potencial replicativo

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

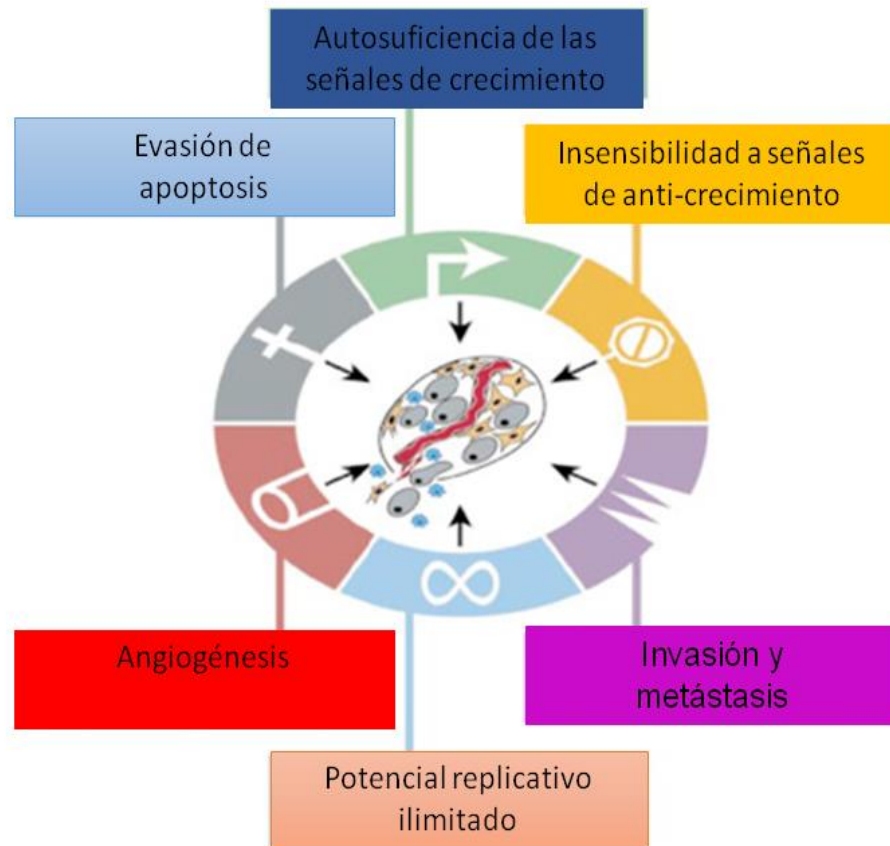


Figura 2. Las características distintivas del cáncer. La figura muestra las seis capacidades distintas del cáncer, que permiten la progresión tumoral. Tomada y modificada de (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2.5 Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de una red pre-existente (Carmeliet *et al.*, 2005). La angiogénesis es esencial en el desarrollo y crecimiento del tumor, cuando el tamaño del tumor es mayor a 2 mm, se genera un ambiente de hipoxia, por lo tanto, el tumor necesita de la formación de vasos sanguíneos para el suministro de nutrientes y oxígeno (Carmeliet *et al.*, 2005). Por lo que, cuando se genera un ambiente de hipoxia la célula tumoral empieza a secretar factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento epidermal vascular (VEGF), el factor inducible de hipoxia (HIF), generando una quimio-taxis de las células endoteliales hacia las células tumorales estimulando su proliferación y migración. Por otra parte, las metaloproteasas (MMP's) favorecen a la degradación de la matriz extracelular (MEC) para la formación de los vasos sanguíneos. De manera importante la angiogénesis se acompaña de otros eventos celulares tales como la proliferación, motilidad celular e invasión mediados por la activación de rutas de señalización comunes tales como fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), VEGF, proteína cinasa B (AKT) y TGF β (Carmeliet *et al.*, 2005).

1.2.6 Invasión a tejidos y metástasis

Lo que diferencia de un tumor benigno, de uno maligno, es que las células tumorales malignas adquieren la capacidad de invadir tejidos adyacentes y generar metástasis. Para esto, las células tumorales deben ser capaces de liberarse de las interacciones célula-célula así como de su interacción con proteínas propias de la matriz extracelular; la capacidad de transformarse de un estado celular definido y especializado (célula epitelial) a un estado más dinámico, migrante, que presenta algunas características similares de las células madre (mesenquimal) esto último se le conoce como transición epitelial-mesenquimal (TEM). Una de las principales proteínas que participa en este proceso es e-cadherina. La e-cadherina es una proteína transmembranal perteneciente a la familia de las caderinas, que tiene como función mantener la interacción célula-célula (Gheldof *et al.*, 2013; Berx *et al.*, 2009).

1.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) se origina cuando las células del tejido mamario comienzan a crecer en forma descontrolada (OMS, 2014; Giordano, 2004). El CM puede originarse en diferentes partes del seno, como son en los ductos que llevan leche al pezón, denominado cáncer ductal, siendo este el más común alrededor del 80 % de los casos y en los lobulillos que representan las glándulas donde se produce la leche, denominado cáncer lobulillar. Entre el 15 al 30% corresponden a carcinomas *in situ* y el resto son infiltrantes (Cotran *et al.*, 1999) (Figura 3). No sólo las mujeres desarrollan CM, también lo llegan a desarrollar hombres pero la incidencia es mucho menor, alrededor del 1% de incidencia (Lozano *et al.*, 2008). El CM es la neoplasia con mayor prevalencia a nivel mundial. De acuerdo al informe de la International Agency for Research on Cancer (IARC) de Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide (GLOBOCAN), en el año 2012 1, 671,149 nuevos casos fueron diagnosticados, representando el 43 % de los cánceres en las mujeres. En México el número de nuevos casos fue de 20,444 prediciendo para este año 23,764 nuevos casos de CM. Así mismo, se reporta que murieron 8, 201,575 personas por cáncer de las cuales 521,907 fueron por CM y 5,680 en México (tabla 1). Desafortunadamente, cada 2 h muere una mujer a causa del CM en nuestro país. El comportamiento del CM se ha modificado y la edad de aparición de nuevos casos es más temprana, se aprecia aumento significativo: 45.5% del total de casos nuevos de cáncer ocurrió en mujeres menores de 50 años (Secretaría de Salud, 2001). En México, la magnitud del problema se puede explicar cuando se estima, que para el año 2020 el número de mujeres de 25 años o más alcanzará los 29.7 millones (López-Ríos *et al.*, 1997).

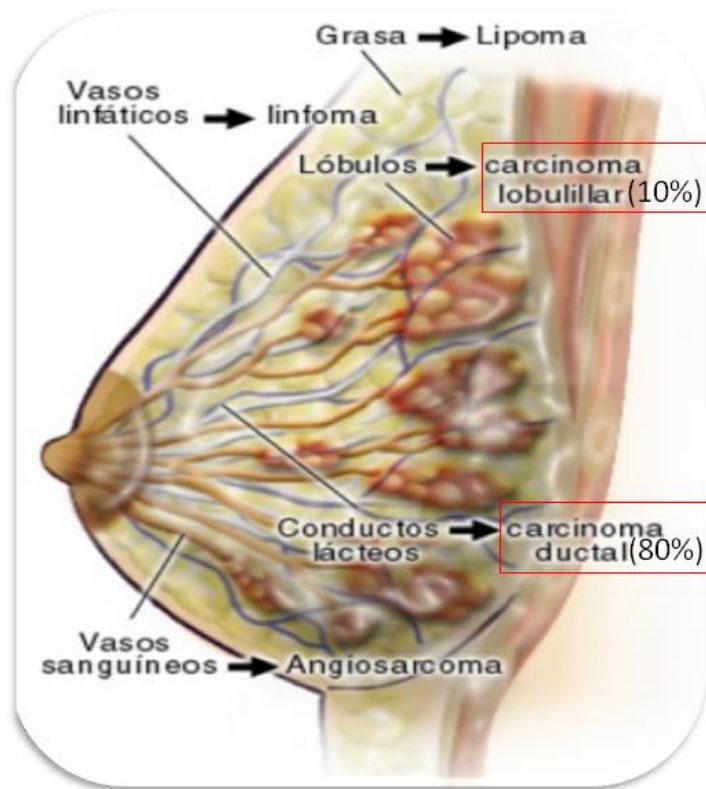


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria. La mama está formada por 10 o 20 secciones llamados lóbulos. Cada lóbulo está dividido en secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Los lobulillos contienen las glándulas encargadas de producir la leche durante la lactancia. La leche fluye del lobulillo al pezón por unos tubos llamados ductos. El espacio entre las lobulillos y los ductos está lleno de grasa y tejido fibroso. Tomada y modificada de (Cotran *et al.*, 1999).

Tabla 1. Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial y en México del 2012.

Cáncer de mama	Incidencia	Mortalidad
En el mundo	1,671,149 casos	521,907 muertes
México	20,444 casos	5,680 muertes

Tasa AJS: Tasa por 100.000 mujeres estandarizada por edad (todas las edades).

1.3.1 Factores de riesgo

Hasta el momento no existe una causa específica para desarrollar CM; sin embargo, se conocen varios factores de riesgos involucrados y relacionados directa o indirectamente con las hormonas reproductivas, en particular con la exposición prolongada a los estrógenos y progesterona. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado también asociación entre el CM y la menarca temprana (antes de los 12 años), nuliparidad o paridad a edades tardías (después de los 35 años), menopausia tardía, alta densidad del seno en la mastografía, terapias hormonales de reemplazo, y el uso reciente de anticonceptivos orales (Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2007). El antecedente de abultamientos benignos en mama aumenta cinco veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres sin cambios benignos en la mama (McPherson *et al.*, 2000). Ha sido encontrado también que la obesidad en la mujer, posmenopáusia, estatura alta, exposición a las radiaciones, consumo excesivo de alcohol, tabaco y falta de ejercicio físico son factores de riesgo para el desarrollo del CM (Dumitrescu *et al.*, 2005; Gómez-Dantés *et al.*, 2003).

1.3.2 Clasificación del cáncer de mama.

El CM se clasifica con base al estadio clínico, la morfología celular y el análisis inmunohistoquímico. Son necesarios factores pronósticos más precisos que ayuden en las decisiones terapéuticas. Utilizando microfosfo-arreglos de cADN se determinó que existen varios subtipos de CM con diferentes patrones de expresión genética y pronóstico. Estos hallazgos confirmaron las diferencias en el fenotipo y agregaron nuevos conocimientos sobre la biología del CM. El CM se divide en dos grupos principales basados en la presencia o ausencia de expresión del receptor de estrógeno (RE) (Eroles *et al.*, 2010). El perfil de expresión genética reveló que dentro de los tumores RE+ existen dos subtipos: luminal A y luminal B (Eroles *et al.*, 2010). Los tumores RE- comprenden también dos subtipos: HER2 y tipo basal. Estos subtipos muestran periodos cortos libres de enfermedad luego de su tratamiento y un pronóstico más sombrío. Pero también se puede dividir basados en la presencia o ausencia del receptor progesterona (RP), factor de crecimiento epidermal 2 (HER2), o bien la ausencia de los tres receptores (RE-, RP- y HER2-) denominados triple negativo (Eroles *et al.*, 2010).

Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.

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

EGFR, receptor de factor de crecimiento epidermal; RE, receptor de estrógeno; HER2, receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2; RP, receptor de progesterona, Ki-67 marcador de proliferación.

Tomada de (Wallden *et al.*, 2015).

Perou y colaboradores, fueron los primeros en clasificar el CM de acuerdo a su perfil de expresión génica, determinando 5 subtipos: luminal (A y B), HER2, tipo basal y normal (tabla 2) (Wallden *et al.*, 2015; Perou *et al.*, 2000).

1.4 MicroRNAs: nuevos reguladores de la expresión génica

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

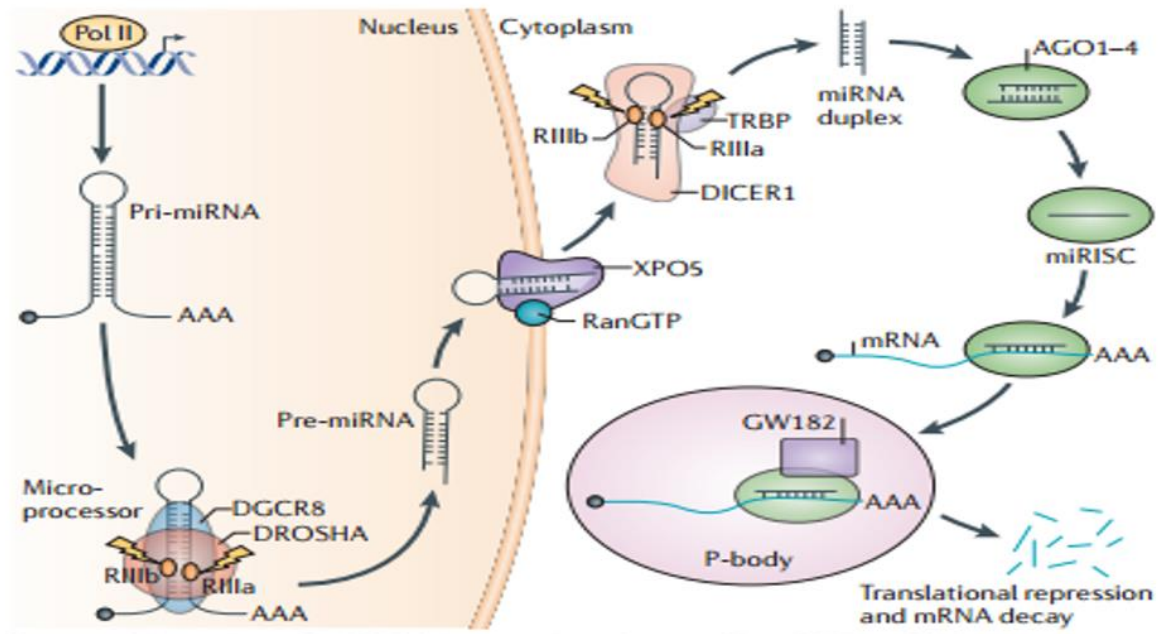
1.4.1 Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs se puede englobar en cinco pasos: (1) Los miRNA son sintetizados por la ARN polimerasa II (ARN pol II), que inicialmente produce un transcrito largo precursor. Durante la transcripción se forman regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla mediante apareamiento de secuencias complementarias, generando así un miRNA primario (pri-miRNA) de alrededor de

100 nt, que poseen una estructura de CAP en su extremo 5' UTR y son poliadenilados en su extremo 3' UTR, tal como ocurre con los ARNm celulares. (Lee *et al.*, 2004). (2) El pri-miRNA es procesado por el complejo microprocesador conformado por la enzima Drosha y la proteína DGCR8. La estructura secundaria de tallo-burbuja del pri-miRNA es reconocida y procesada por la enzima Drosha, la cual posee actividad de RNasa tipo III, generando precursores de 70-100 nt llamados miRNA precursores (pre-miRNA). El pre-miRNA es una secuencia que se conforma de una estructura tallo-burbuja con una prolongación de dos uracilos en su extremo 3', esta estructura funciona como un motivo de reconocimiento por la exportina 5 (3) la exportina 5, la cual interviene directamente en el transporte del pri-miRNA del núcleo al citoplasma en un proceso dependiente de Ran-GTP (Lin *et al.*, 2015). (4) Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por DICER otra enzima del tipo RNasa III, que en conjunto con la proteína TRBP, recorta por fuera de la horquilla y genera un RNA de doble cadena imperfecto denominado miRNA/miRNA*. Posteriormente, TRBP recluta a la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2) al complejo miRNA/miRNA*-DICER y forma el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). La cadena complementaria del dúplex miRNA/miRNA* es liberada y degradada por AGO2. La proteína AGO2 guía al miRNA a la región 3' UTR del ARNm blanco donde se une de manera específica mediante complementariedad de la secuencia (Ha *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2008). (5) Si la complementariedad del miRNA con la secuencia del transcrito es perfecta se reclutarán las proteínas de desadenilación para iniciar la degradación del ARNm. De manera alternativa, si la complementariedad del miRNA con su ARNm blanco es casi perfecta se inhibirá la traducción del transcrito (Ha *et al.*, 2014; Lin, *et al.*, 2015; Croce *et al.*, 2009) (Figura 4).

1.4.2 miRNAs y cáncer: oncomiRs

En cáncer la expresión genética se encuentra dramáticamente desregulada y la expresión de los miRNAs esta correlacionada con diversos tipos de cáncer. Los miRNAs afectan todos los pasos de la progresión tumoral como son el crecimiento del tumor, angiogénesis y la capacidad de invadir y generar metástasis (Oliveto *et al.*, 2017).



Ha M, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Aug;15(8):509-24

Figura 4. Biogénesis de los miRNAs. Los pri-miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II y pueden contener CAP y ser poliadenilados. Los pri-miRNA son procesados por Drosha, una enzima RNasa III y convertidos a pre-. Se caracterizan por tener una estructura dúplex imperfecta. Los pre-miRNA son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 y RanGTP. En el citoplasma, los pre-miRNA son transformados por Dicer, otra enzima del tipo RNasa III, generando la estructura híbrida miRNA/miRNA*. La unión de estos dúplex de RNA a proteínas como la Argonata 2, libera el miRNA*. El miRNA dirige la asociación de RISC a sitios específicos en la región 3' no traducida del RNAm blanco. Si el apareamiento de bases entre el miRNA y su RNAm blanco es perfecto, la función endonucleolítica de la Argonata 2 rompe el RNAm, llevándolo a su rápida destrucción. La complementariedad imperfecta puede provocar represión traduccional o causar inestabilidad del RNAm. Este último efecto es posiblemente mediado por un mecanismo de deadenilación. Estas funciones requieren del apareamiento de bases entre la secuencia 5' del miRNA y su secuencia complementaria en el 3' del RNAm blanco. (Tomado de Ha *et al.*, 2014).

Los miRNAs pueden actuar como oncomiR's o como supresores de tumor (Esquela-Kerscher A, 2006). Los oncomiR's modulan la expresión de genes supresores de tumores, se encuentran sobre-expresados en diversos tipos de cáncer, promoviendo la tumorigénesis, por otro lado, los miRNAs supresores de tumor modulan la expresión de oncogenes y se encuentran reprimidos en diversos tipos de cáncer, inhibiendo la tumorigénesis (Esquela-Kerscher *et al.*, 2006) (Figura 5). La primera evidencia de miRNAs involucrados en el cáncer fue en un estudio molecular caracterizando la delección 13q14 en leucemia linfocítica crónica (LLC), donde revelan que dos miRNAs, el miR-15a y el miR-16-1 se encuentran dentro de la pequeña región deletada, por lo tanto, se encuentra reprimidos en el 60% de los casos de LLC (Calin *et al.*, 2002). Tras este hallazgo, la expresión desregulada de miRNAs en cáncer se ha demostrado en otros tipos. Por ejemplo, el miR-143 y el miR-145 se encuentran reprimidos en cáncer de colón (Michael *et al.*, 2003). Let-7 se encuentra reprimido en cáncer de pulmón, y al restaurar su expresión en la línea celular A549 de cáncer de pulmón inhibe el crecimiento celular (Takamizawa *et al.*, 2004). Con base a los estudios, podemos determinar que la desregulación de los miRNAs en distintos tipos de cáncer se debe a que se encuentran localizados en regiones cromosómicas genéticamente alteradas como sitios frágiles y regiones de delección.

1.4.3 Funciones de los miRNAs en cáncer de mama.

Existen diferentes estudios donde identificaron miRNAs desregulados entre el tumor y el tejido mamario normal sugiriendo su uso potencial como clasificadores del cáncer de mama y para la generación de herramientas pronósticas. En un estudio donde se analizaron 76 tumores de mama y 34 tejidos normales, se identificaron 29 miRNAs, expresados diferencialmente en el tejido tumoral en comparación con el normal. Además, reportaron la expresión de miRNAs correlacionados con características patológicas tales como la expresión del receptor de estrógenos y progesterona (miR-30), el estadio tumoral (miR-213 y miR-203) y la expresión diferencial de varias isoformas de let-7 que se asociaron con la expresión del receptor de progesterona (let-7c) y metástasis en los ganglios linfáticos (let-7f-1, let-7a-3, let-7a-2) (Iorio *et al.*, 2005). En otro estudio se incluyeron 683 muestras de pacientes con cáncer de mama y 87 muestras normales.

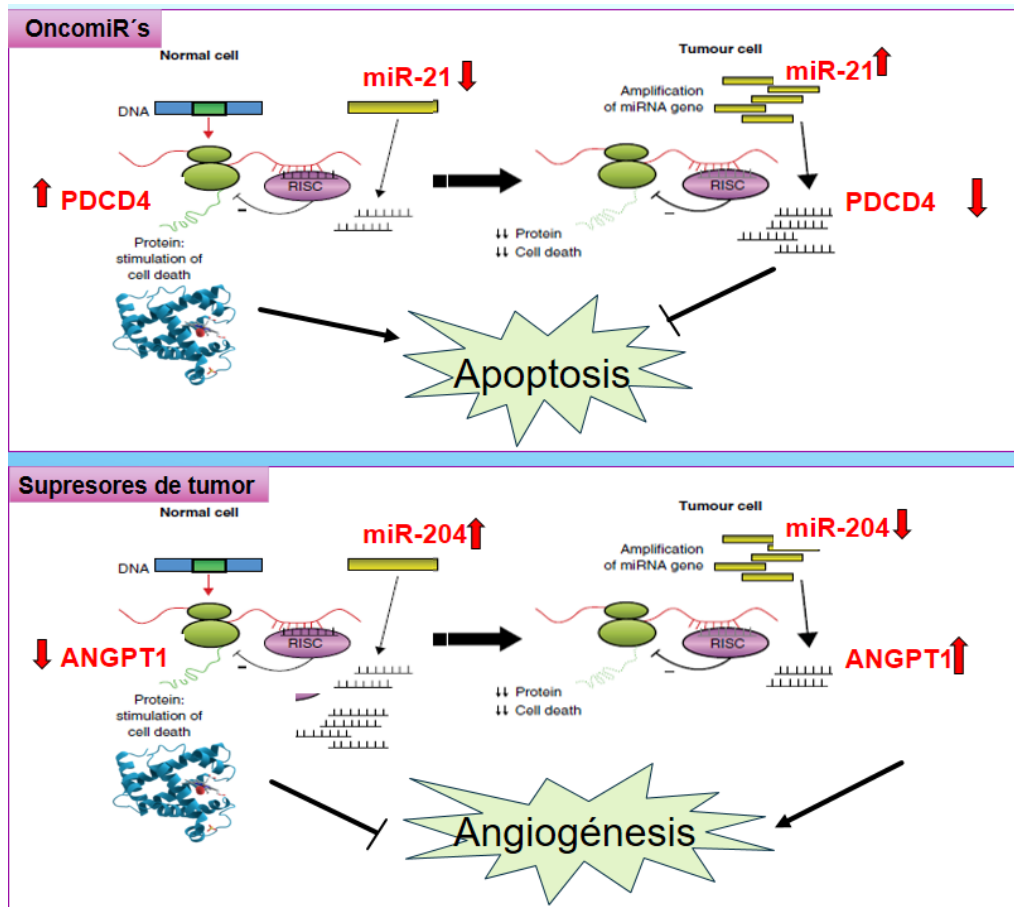


Figura 5. Papel de los microRNAs en cáncer. Los miRNAs suprimen la expresión de sus genes blancos. Un miRNA oncogénico, denominado oncomiR, puede reprimir la traducción de un gen supresor de tumores, estimulando la tumorigénesis y conduciendo a la formación de tumores. Por el contrario, un miRNA supresor de tumores es capaz de inhibir la expresión de oncogenes, bloqueando el proceso de tumorigénesis y consecuentemente el desarrollo de cáncer.

Interesantemente, se encontró que los miR-26a, miR-26b, miR-125a, miR-125b, miR-145, miR-486-5p y miR-99a presentaban funciones proapoptóticas y se encontraron reprimidos en pacientes con cáncer de mama comparados con el tejido mamario normal (Sharma *et al.*, 2016). Similarmente, la represión de la expresión del miR-145 está involucrado en el desarrollo y progresión de cáncer de mama, así como el la proliferación, migración y crecimiento del tumor (Liu *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2011). La restauración de la expresión del miR-145 en líneas celulares de cáncer de mama inhibe los hallmarks del cáncer a través de la represión de la oncoproteína ROCK1, fascin-1, c-myc, SMAD2/3 y IGF-1R, por lo que este miRNA podría ser utilizado como una herramienta terapéutica contra en el cáncer de mama (Zheng *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2011). Otro microRNA que se encuentra reprimido en cáncer de mama es el miR-944. La restauración de la expresión del miR-944 en líneas celulares de cáncer de mama inhibe la migración e invasión a través de la inhibición de SIAH1 y PTP4A1 (Flores-Pérez *et al.*, 2016).

1.5 Antecedentes particulares

1.5 El miR-204 y cáncer de mama.

El miR-204 ha adquirido recientemente gran atención por su participación en la regulación de diferentes procesos celulares involucrados en la tumorigénesis, incluyendo la regulación de la carcinogénesis en tumores de la vaina del nervio periférico y migración e invasión en líneas celulares de cáncer endometrial (Gong *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2012). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los mecanismos por los cuales el miR-204 regula el crecimiento del tumor, metástasis, proliferación, migración en cáncer de mama en particular. Imam y colaboradores encontraron que el *loci* cromosómico que contiene al miR-204 se pierde con frecuencia, resultando una menor expresión en múltiples cánceres, incluyendo el cáncer de mama (Imam *et al.*, 2012). Demostraron que la expresión del miR-204 era inversamente proporcional a la expresión del factor neurotrópico derivado del cerebro (*BDNF*) (Lewin *et al.*, 1996). *BDNF* activa al receptor de tirosina cinasa (TrkB), que a su vez activa la vía de señalización AKT/mTOR/Rac1, causando la reorganización del citoesqueleto de actina, para que se lleve a cabo la migración e invasión (Segal *et al.*, 1996; Tajbakhsh *et al.*, 2017). La sobre-expresión de *BDNF*/TrkB está

implicado en un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, ya que promueve la migración e invasión favoreciendo la metástasis (Imam *et al.*, 2012). Otra vía de señalización implicada en un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama es STAT3/BLC-2 que participa en la apoptosis e invasión celular (Wang *et al.*, 2015). Esta vía, se encuentra activada por la pérdida genómica del miR-204. La restauración de la expresión del miR-204 en líneas celulares de cáncer de mama, inhiben la proliferación, crecimiento celular, migración e invasión a través de sus genes blancos como JAK2, MX1, TXNIP y BDNF (Wang *et al.*, 2015; Imam *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha observado que la desregulación de miR-204 es capaz de regular la diferenciación celular esto mediante la regulación negativa del factor de transcripción RUNX2 (Huang *et al.*, 2010). Esta proteína es esencial para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis ósea además actúa como un andamio para los ácidos nucleicos y los factores de regulación implicados en la expresión génica del citoesqueleto. La deficiencia en la expresión de miR-204 en células progenitoras del mesenquima y células estromáticas de la médula ósea, inhibió la osteogénesis y promovió la adipogénesis alterando el proceso de diferenciación celular en estos tipos celulares (Huang *et al.*, 2010). También, el miR-204 está relacionado con el proceso de diferenciación celular denominado transición epitelial-mesenquimal, evento en el cual las células normales y tumorales son capaces de adquirir características propias de células mesenquimales como la pérdida de la polaridad celular así como de interacciones con otras células, un incremento en la capacidad de migración e invasión celular además una disminución de los procesos relacionados con activación de la apoptosis, reorganización y expresión de proteínas involucradas en la remodelación de citoesqueleto y la adquisición de características similares a las observadas en células madre (Lee *et al.*, 2016). Zhang y colaboradores, demostraron que el restablecimiento de la expresión del miR-204 es capaz de revertir la transición epitelial-mesenquimal inducida por la proteína SIRT-1 la cual es blanco directo del miR-204 en células de cáncer gástrico, así mismo, se demostró que la sobre-expresión del miR-204 promueve la resistencia a anoikis y promueve la invasión celular (Zhang *et al.*, 2013). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que el miR-204 inhibe la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* a

través de la inhibición de dos genes pro- angiogenicos la Angiopoyetina 1 (ANGPT1) y TGF β R2 (Flores-Pérez *et al.*, 2016).

1.6 Mimetismo vasculogénico.

El tumor requiere del suministro de sangre para su crecimiento, supervivencia y metástasis, estos mecanismos se han centrado en procesos dependientes de la angiogénesis. El término de la angiogénesis describe la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red pre-existente (Folkman *et al.*, 1987). De manera interesante, en 1999 Maniotis y colaboradores, describieron un nuevo sistema de suministro de sangre en células de melanoma maligno independiente de la angiogénesis, denominado mimetismo vasculogénico (MV) (Maniotis *et al.*, 1999). El MV es la formación de estructuras tipo capilar a partir de células tumorales altamente invasivas y genéticamente desreguladas, a diferencia de la angiogénesis, la formación de estas estructuras es de *novus* y sin la participación de células endoteliales (Li *et al.*, 2016). El MV se ha observado en varios tumores agresivos, tales como cáncer de mama, próstata, ovario, pulmón, riñón y tejidos de sarcoma, sugiriendo que es una novedosa característica de tumores agresivos (Hendrix *et al.*, 2003; Vartanian *et al.*, 2012). Recientemente, en el grupo de Hendrix diseñaron el estándar de oro para la detección de mimetismo vasculogénico, el cual consiste en una doble tinción con ácido peryodico de Schiff (PAS) y CD31, un marcador de células endoteliales, donde se estableció, que la presencia de mimetismo vasculogénico será positivo para PAS y negativo para CD31 (Maniotis *et al.*, 1999). Generalmente, las características del MV se pueden enlistar: (1) Positivo para la tinción de PAS y negativo para CD31, (2) células tumorales altamente invasivas, (3) expresión de células multipotenciales, (4) remodelación de la matriz extracelular y (5) la conexión de las estructuras del mimetismo vascular con la microcirculación del tumor (Qiao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2007). El MV es diferente de la angiogénesis y vasculogénesis. El suministro de sangre en los tumores involucra tres tipos de estructuras: los vasos sanguíneos dependientes de células endoteliales (angiogénesis clásica), los vasos sanguíneos mosaico y los canales MV (Figura 6. Zhang *et al.*, 2007).

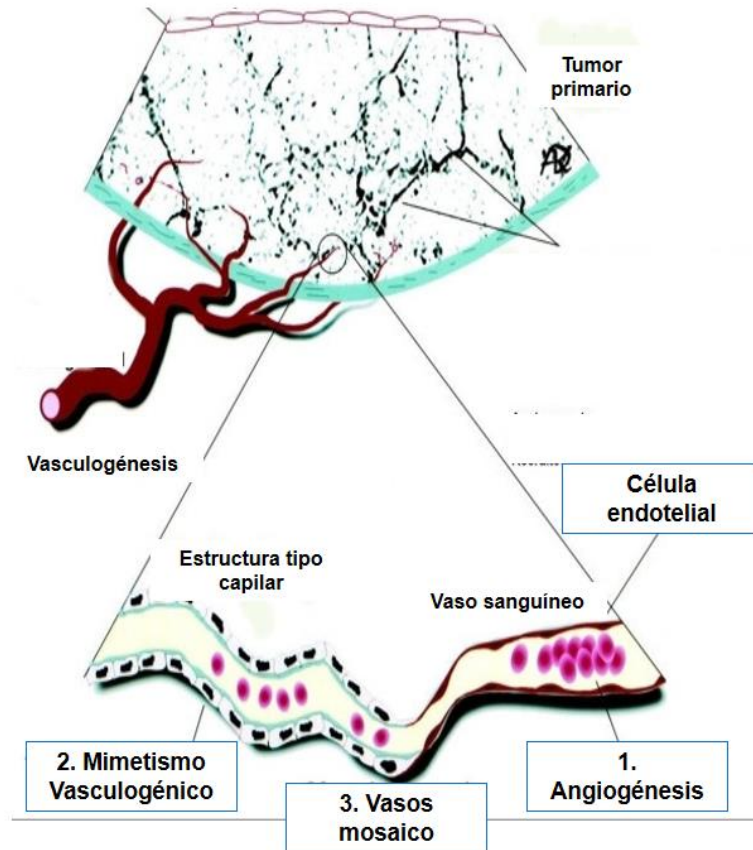


Figura 6. Estructuras implicadas en el suministro de nutrientes a los tumores.

(1) Vasos sanguíneos dependientes de células endoteliales típicos de la angiogénesis clásica. (2) Estructuras en 3D tipo capilar o mimetismo vasculogénico. (3) Vasos sanguíneos mosaico una mezcla de angiogenesis y mimetismo vasculogénico. Tomada y modificada de (Folberg R *et al.*, 2000).

Varios estudios reportan que las células tumorales se encuentran en las paredes de los vasos sanguíneos y forman parte de la superficie de los vasos, mientras que la parte restante es cubierta por células endoteliales, esto se le conoce como “vasos mosaico”. Los canales de MV pueden ser la principal fuente de suministro de oxígeno en estados tempranos del crecimiento del tumor, los vasos sanguíneos (angiogénesis clásica) pueden remplazar a los canales de MV generando una transición de vasos mosaico, y esto se observa en estados tardíos del crecimiento del tumor (Li *et al.*, 2016). Algunos factores son necesarios para la formación de MV, incluyendo el microambiente tumoral.

1.7 Mecanismos moleculares y vías de señalización involucradas en la formación de mimetismo vasculogénico

La participación de las vías de señalización en la formación de MV se muestra en la figura 7 (Figura 7)

1.7.1 Hipoxia y mimetismo vasculogénico

El suministro adecuado de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función y fisiología de las células de mamíferos. Bajo condiciones de hipoxia se activan cascadas de señalización que promueven la inducción o represión de la transcripción de una multitud de genes implicados en eventos tales como la angiogénesis, el mimetismo vasculogénico, metabolismo de la glucosa, supervivencia y muerte celular. Esta respuesta está regulada por el factor inducible por hipoxia (HIF) (Kirschmann *et al.*, 2012). HIF es un factor de transcripción α/β -heterodimérico, que consiste en una subunidad, HIF-1 β , expresada constitutivamente y otra subunidad, HIF-1 α , cuya expresión se encuentra considerablemente regulada. La expresión de esta última la determina el ritmo de su síntesis y degradación. La síntesis del HIF-1 α está regulada por mecanismos independientes del oxígeno, mientras que su degradación se regula principalmente por mecanismos que dependen del oxígeno (Vartanian *et al.*, 2012). La subunidad HIF-1 α , bajo condiciones de hipoxia se estabiliza y se transloca al núcleo, donde se unirá con la subunidad HIF-1 β , en el elemento de respuesta a hipoxia (HREs), regulando la

transcripción de genes implicados en la angiogénesis, mimetismo vasculogénico, invasión, metástasis y aumento en el metabolismo glucolítico (Qiao *et al.*, 2015; Kirschmann *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han identificado más de 100 genes cuya expresión es activada por HIF, estos genes son de suma importancia en el cáncer ya que codifican para: factores angiogénicos, transportadores de la glucosa y enzimas glucolíticos, factores de supervivencia y factores de invasividad. La expresión de varios de los genes angiogénicos que participan en la formación de MV, tales como VEGF, son inducidos por hipoxia en la mayoría de tipos celulares (Li *et al.*, 2016; Vartanian *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la hipoxia induce el MV en carcinoma hepatocelular, melanoma y recientemente en cáncer de mama (Sun *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2012; van der Schaft *et al.*, 2005). La angiogénesis y el MV juegan un papel importante en la adquisición y suministro de sangre en los tumores (Li *et al.*, 2016). Estudios previos han demostrado que la formación de canales de MV son inducidos bajo condiciones de hipoxia, generando una sobreexpresión de la cadherina endotelial vascular (VE-cadherin), el receptor de ephrin tipo A 2 (EphA2), VEGF y la cinasa de adhesión focal (FAK), induciendo una cascada de respuesta celular que finalmente da lugar a células cancerosas invasivas para la formación de MV a través de la remodelación de la MEC por MMPs (Saito *et al.*, 2015). La hipoxia también puede inducir la transición epitelio mesenquimal, caracterizada por la pérdida de la unión de las células generando la ganancia de la migración celular (Li *et al.*, 2016).

1.7.2 Papel de VEGF en el mimetismo vasculogénico

El VEGF es el más potente y específico factor angiogénico, el cual se ha descrito como un regulador crucial de la angiogénesis (Vartanian *et al.*, 2013). La unión de VEGF-A a su receptor da como resultado la activación de las CE's, estimulando la proliferación y formación de canales vasculares en tumores, especialmente en regiones vasculares. Vartanian y colaboradores en el 2007 demostraron que el MV al igual que la angiogénesis es mediado por VEGF-A (Vartanian *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que MV depende de la producción autocrina de VEGF. Recientemente se demostró que la expresión de VE-cadherina, EphA2 y MMP's, podría ser regulada por la sobre expresión de VEGF-A en cáncer de ovario,

contribuyendo así a la plasticidad de la matriz extracelular y la formación MV (Wang *et al.*, 2008). En otro estudio, donde se silenció VEGF utilizando siRNA, se estimuló la apoptosis celular y se abatió la proliferación celular y la formación de MV en osteosarcoma (Mei *et al.*, 2008). Brantley-Sieders y colaboradores observaron que la formación de vasos sanguíneos inducidos por VEGF, se redujeron a través de la represión de la actividad EphA2 en cáncer de mama y cáncer de páncreas (Brantley-Sieders *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha observado que los receptores de tirosina cinasas, VEGFR1 y VEGFR2, se unen a VEGF y poseen características diferentes. VEGFR1 tiene una mayor capacidad de unión a VEGF pero una menor actividad cinasa en comparación con VEGFR2; pero este está relacionada con la angiogénesis tumoral (Qiao *et al.*, 2015; Tallquist *et al.*, 1999). En otro estudio donde se inhibió la expresión de VEGFR1 usando siRNA en melanoma, la formación de estructuras tipo capilar se abatió. Sin embargo, la inhibición de la expresión de VEGFR2 por un inhibidor específico, no afectó la formación de las estructuras de tipo capilar, indicando que la formación de MV estaba principalmente influenciada por la actividad de VEGFR1 en lugar de VEGFR2 (Qiao *et al.*, 2015).

1.7.3 Vía de señalización PI3K/AKT y MV

La fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) es una cinasa lipídica que actúa a través de procesos de fosforilación de sus sustratos, tales como, fosfatidilinositol o sus derivados en el grupo 3-hidroxilo. Así mismo, regula la activación de Akt, también conocida como proteína cinasa B (PKB) (Qiao *et al.*, 2015). La vía de señalización PI3K/AKT participa en procesos celulares como proliferación, supervivencia, diferenciación, metabolismo y motilidad. Además, estudios recientes han demostrado que la vía de señalización PI3/Akt también participa en la formación de MV mediante la regulación de la actividad de la matriz tipo-1(MT1)-MMP y la metaloproteasa-2 (MMP-2), estimulando la escisión de la cadena Ln-5 γ 2, generando los fragmentos γ 2' y γ 2x (Hess *et al.*, 2013). Los fragmentos γ 2' y γ 2x, juegan un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular permitiendo la migración, invasión y formación de MV (Fan *et al.*, 2010). La inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt ha sido el centro de atención de tratamientos en tumores, esta inhibición se ha realizado con diferentes herramientas como siRNA, miRNAs e inhibidores comerciales específicos.

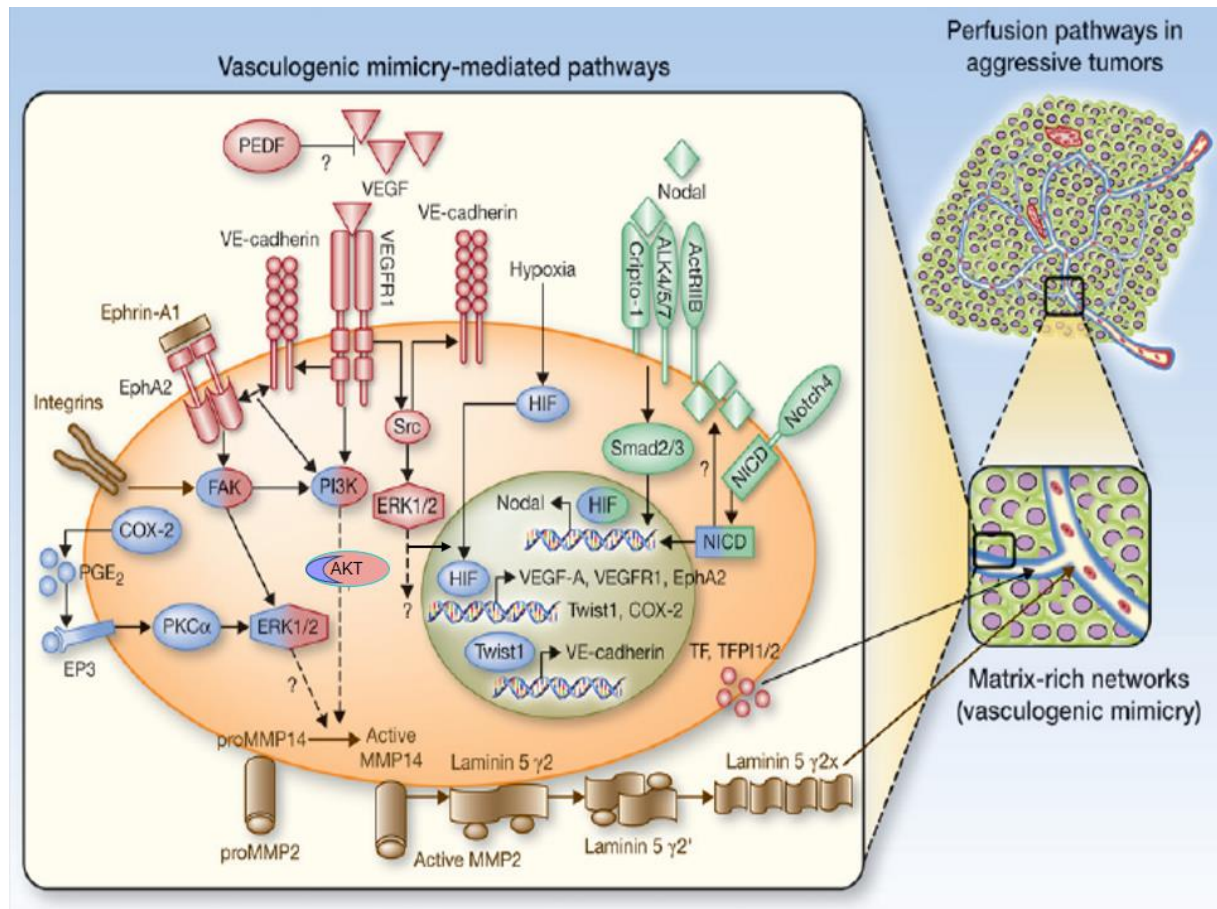


Figura 7. Modelo esquemático de mecanismos moleculares y vías de señalización involucradas en la formación de MV. Tomada de Hendrix MJ, et al. 2012

Recientemente, las terapias anti-angiogénicas mediante la inhibición de la vía de la señal de PI3K/Akt y la activación de las MMPs se han convertido en otro tema de investigación importante en el campo de la terapia contra el cáncer. Sin duda, la combinación de terapias que abaten la formación de MV mediante la inhibición de la vía de la señal PI3K/Akt puede ser un objetivo importante del tratamiento y se necesitan más investigaciones para encontrar fármacos más eficaces para suprimir la tumorigénesis.

1.7.4 Papel de VE-cadherina, EphA2, FAK en el mimetismo vasculogénico

La proteína VE-cadherina, es una proteína transmembranal perteneciente a la familia de las cadherinas, que se expresa especialmente en células endoteliales. VE-cadherina tiene como función mantener la interacción célula-célula y juega un papel importante en la vasculogénesis (Fan *et al.*, 2010). Estudios han demostrado que VE-cadherina se expresa solamente en células de melanoma altamente agresivas y que su inhibición abate la formación de MV. La función de VM-cadherina en la formación de mimetismo vascular esta mediada por la activación de EphA2. EphA2 es un miembro de la familia ephrin, es un receptor de tirosina cinasa (PTK's), se expresa en células de melanoma con un fenotipo metastásico y tiene una participación en la angiogénesis (Paulis *et al.*, 2010). La interacción de EphA2 con su ligando promueven la activación de PI3K a través de FAK y ERK1/2. Finalmente, promueven la activación de la MMP-2 generando la escisión en la cadena Ln-5γ2 para la formación de mimetismo vascular (Kirschmann *et al.*, 2012). FAK, es una tirosina cinasa citoplasmática que promueve la adhesión focal. Recientemente, se ha observado que FAK, puede regular la migración, invasión y la formación de mimetismo vascular en tumores malignos. Por otra parte, FAK, puede regular la activación de la cinasa de regulación extracelular (ERK1/2), su fosforilación media la activación de MT1- MMP y MMP-2 a través de la vía de señalización PI3K, que está involucrada en la migración, invasión, plasticidad de la matriz y formación MV (Qiao *et al.*, 2015; Kirschmann *et al.*, 2012).

1.8 Importancia del mimetismo vasculogénico en cáncer de mama

El CM es uno de los tumores más malignos, alrededor de 1,4 millones de personas son diagnosticadas en todo el mundo con más de 450.000 muertes por año (Jemal *et al.*, 2011). Entre estos casos, aproximadamente el 15-20% pertenecen al subgrupo de triple negativo (TNBC) (Nielsen *et al.*, 2004). Los pacientes con TNBC tienen un mal pronóstico de sobrevivencia ya que está asociado con una alta tasa de metástasis y recurrencia (Amos *et al.*, 2012). Una de las primeras proteínas descritas en CM que participan en la formación de MV fue la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2). La COX-2 permite al organismo producir la prostaglandina primaria E₂, para la activación de la vía de señalización PI3K/AKT. En este estudio, se trataron a las líneas celulares de CM con Celecoxib que es un inhibidor específico de COX-2 y se abatió la proliferación celular, apoptosis y MV (Basu *et al.*, 2005). En otro estudio, analizaron la expresión de la Claudina-4 en tejidos así como, en líneas celulares de CM y la encontraron sobre-expresada. Además, las células MDA-MB-231 son capaces de formar estructuras tipo capilar, y al inhibir la expresión de la Claudina-4 con un short hairpin (siRNA), se abatió la formación de estas estructuras, indicando que la Claudina-4 juega un papel crucial en el desarrollo de MV en CM (Cui *et al.*, 2015). El MV se ha asociado con la progresión del tumor y a un mal pronóstico en pacientes con CM (Shen *et al.*, 2017).

1.9 El mimetismo vasculogénico y su regulación por miRNAs en distintos tipos de cáncer

Estudios sugieren que la desregulación de miRNAs puede contribuir a la progresión tumoral. Sin embargo, existen pocos estudios de miRNAs que regulan el MV (Figura 8), tal es el caso del miR-26b que se encuentra reprimido en pacientes y en líneas celulares derivadas de glioma. Al restaurar la expresión de este miRNA se inhibió la formación de estructuras tipo capilar a través de la modulación negativa de la proteína Eph2A (Wu *et al.*, 2011). Similarmente, el miR-200a inhibió el MV a través de la modulación de la proteína Eph2A en cáncer de ovario (Sun *et al.*, 2014). Otro miRNA que inhibe la formación de estructuras tipo capilar en cáncer de ovario es el

miR-27b, pero a través de la modulación negativa de la proteína VE-cadherina (Liu *et al.*, 2017).

Uno de los principales tumores con alto índice de malignidad es el glioma, es por eso que muchos investigadores se han centrado en el estudio de este tipo de tumor y su capacidad de formar MV. Song Y y colaboradores demostraron que el miR-9 se encuentra reprimido en líneas celulares de glioma y que al restaurar su expresión se abatió la proliferación celular y el MV; a través de la modulación de la proteína Stathmin (STMN1) que participa en la regulación de los microtúbulos (Song *et al.*, 2013). Similarmente, la restauración de la expresión de let-7f en líneas celulares de glioma reprimió la formación de MV a través de la inhibición de la proteína perostina (POSTN) (Xue *et al.*, 2016). Por último, el miR-584-3p, se encuentra reprimido de igual manera y modula a la proteína ROCK1, por lo que, funciona como supresor de tumor inhibiendo la formación de MV en células tumorales de cáncer de glioma, antagonizando la formación de fibra de estrés dependiente de ROCK1 inducida por hipoxia (Xu *et al.*, 2017). A pesar de todos estos estudios, a la fecha no se ha reportado el papel de miRNAs en el MV en CM. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar si las rutas de señalización VEGF/PI3K/AKT están involucradas en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204 en cáncer de mama. Estos datos nos permitirán establecer si el miR-204 posee actividad “multi-target” al reprimir diversos genes que participan en rutas de señalización involucradas en la formación de MV.

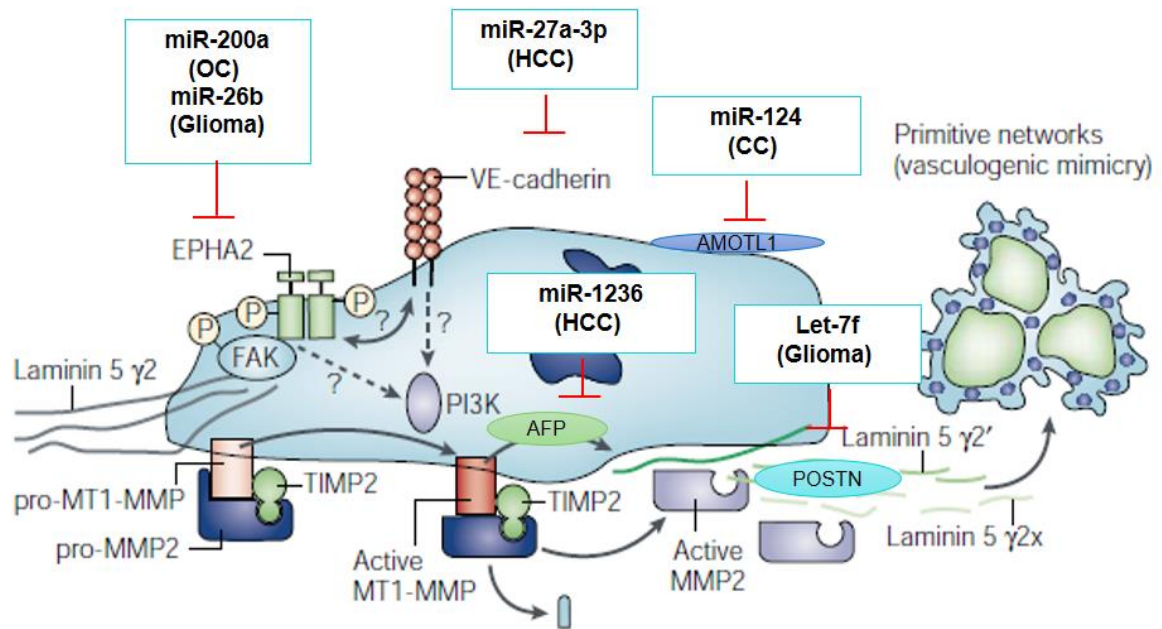


Figura 8. miRNAs que regulan la formación de mimetismo vasculogénico, en distintos tipos de cáncer. Tomada y modificada de (Hendrix MJ *et al.*, 2003).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar las rutas de señalización VEGF/PI3K/AKT en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204 en cáncer de mama

2.1.1 Objetivos específicos

1. Determinar si la restauración del miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico a través de la modulación del eje VEGF/PI3K/AKT en condiciones de hipoxia.
2. Identificar los genes blancos potenciales que se reprimieron al restaurar la expresión del miR-204 y que participan en eje VEGF/PI3K/AKT.
3. Validar funcionalmente un gen blanco del miR-204 que participe en el eje VEGF/PI3K/AKT y el mimetismo vasculogénico.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

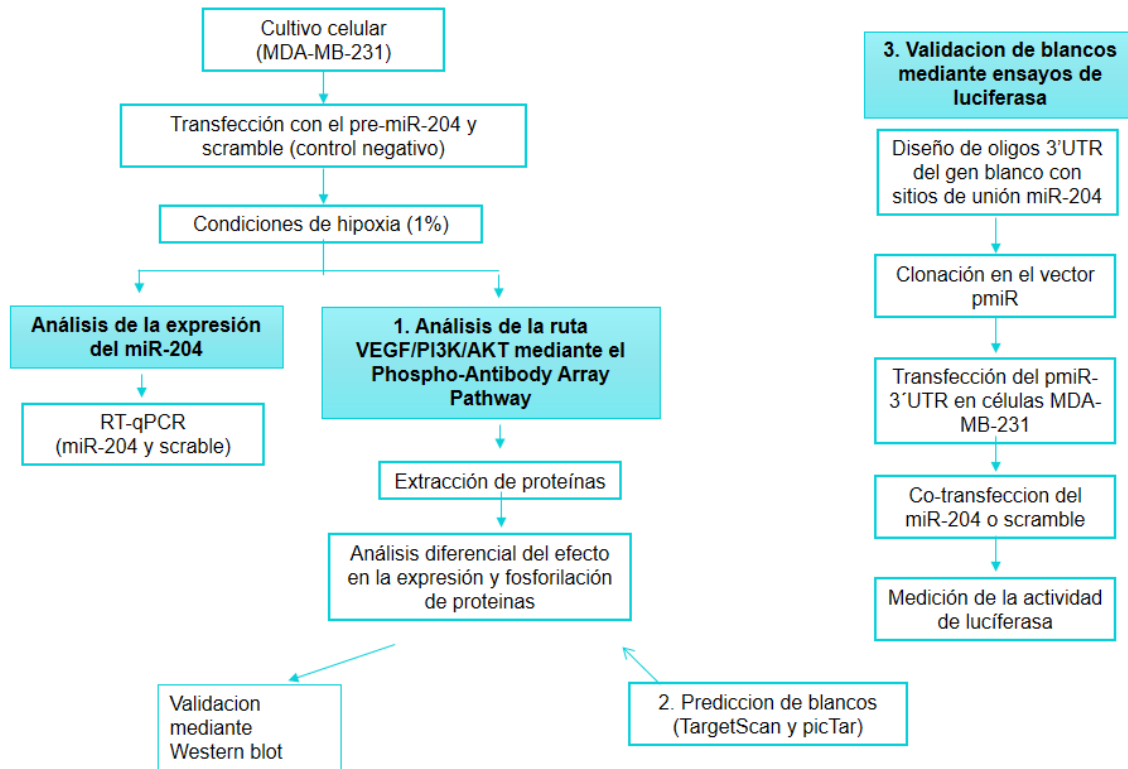


Figura 9. Estrategia experimental.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama.

4.1.1 Condiciones de cultivo de la línea celulares

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

4.1.2 Sub-cultivo de la línea celular MDA-MB-231

Para el mantenimiento de línea celular, primero se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con Buffer fosfato salino (PBS) 1x a pH 7.0. Posteriormente se retiró el PBS y se agregó PBS 1x pH 7.0-EDTA 6.8 mM (milimolar), luego se añadió tripsina 0.25 % (Gibco) 64 µL (microlitros) por cada 1.5 mL (mililitros) de PBS-EDTA (1 %); se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Una vez transcurridos los 5 min de incubación con tripsina se visualizaron en microscopio para observar si se despegaron las células y se dió un pequeño golpe a la caja para separar por completo las células. Consecutivamente, se le agregó 1 mL de medio DMEN y se mezcló por pipeteo sobre toda la superficie, se transfirieron las células despegadas a un tubo falcón de 15 mL y centrifugaron a 1500 r.p.m (revoluciones por minuto) por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 1 mL de medio de cultivo fresco y se distribuyeron en cajas nuevas y estériles con el medio de cultivo DMEN suplementado.

4.1.3 Congelamiento de las líneas celulares

En general, por criovial se emplearon aproximadamente 2×10^6 células que se procesaron de manera similar a cuando se realiza un subcultivo pero en lugar de resuspenderlas en 1 mL de medio fresco, se agregó 1 mL de medio de

congelamiento (500 µl de SFB, 400 µL de medio de cultivo completo y 100 µL de DMSO). A continuación se cerró herméticamente el tubo eppendorf y se colocó en a -20 °C durante aproximadamente 30 min y posteriormente se almacenaron los tubo eppendorfs a -80 °C, hasta su uso.

4.1.4 Descongelamiento de las líneas celulares

Los crioviales son colocados en hielo durante 2 min y se limpiaron con benzal, rápidamente se colocaron en baño a 37 °C hasta que se descongelara el medio. Una vez que el medio se descongeló, se pasó a un tubo falcón de 15 mL y se centrifugó a 1200 r.p.m durante 5 min a 4°C, luego se retiró el medio de congelamiento y se resuspendieron las células en el medio DEMEN suplementado, y se colocaron las células en cajas nuevas y estériles.

4.2 Análisis de la expresión del miR-204 en la línea celular MDA-MB-231

4.2.1 Transfección del precursor del miR-204

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fue transfectada con la molécula precursora del miR-204, así como con la secuencia scramble. Un día previo a la transfección, 250,000 células MDA-MB-231 fueron sembradas por pozo en placas de 6 pozos. Al día siguiente, en un tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclaron 100 µL de medio reducido OptiMem con 5 µL del agente de transfección siPORT™ Amine (Applied Biosystems) para cada pozo a transfectar, al mismo tiempo, en otro tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclaron de 100 µL de medio reducido OptiMem con 7.5 µL del precursor pre-miR-204 o del premiR-Neg-Ctrl (scramble) a una concentración de 10 (µM) y se incubaron ambos tubos a T.A (temperatura ambiente) durante 10 min, transcurrido el tiempo, se pasó la mezcla de un tubo eppendorf al otro y se homogenizó por pipeteo, se le dió un spin y se incubó por 10 min a T.A. Consecutivamente, esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (con un volumen final 2.5 mL/pz). Se agitó suavemente, se incubó a 37°C y 5% de CO2 hasta su análisis. La expresión relativa del miR-204 expresado fue evaluada a las 48 h, mediante qRT-PCR con sondas

TaqMan. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta ct}$, usando como normalizador la expresión del control endógeno RNU44

4.2.2 Lisis y extracción de ARN total a partir de la línea celular MDA-MB-231.

Extracción del ARN total de la línea celular MDA-MB-231 cultivada en placas de 6 pozos. Primeramente, se despegaron las células, para eso se le colocaron 0.75 mL de PBS-EDTA pH 7.0 y 32 μ L de tripsina 0.25 % (Gibco) por pozo y se incubaron durante 5 min a 37 °C, pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1,200 r.p.m a 4 °C durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 mL de PBS pH 7.0, se centrifugó nuevamente a 1,200 r.p.m a 4 °C durante 5 min y se tiró el sobrenadante. Se obtuvo una pastilla de células, a las que se les agregó 1 mL de trizol y se mezcló por pipeteo, se recuperó el lisado celular en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se incubó durante 5 min a T.A, se agregaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de trizol utilizado y se mezcló por agitación vigorosa durante 15 seg, se incubó el tubo eppendorf durante 3 min a T.A y se centrifugó a 12,500 r.p.m por 25 min a 4°C. Posterior a la centrifugación, se recuperó la fase acuosa cuidando de no mezclar las otras fases, y se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL, se le adicionaron 500 μ L de isopropanol para precipitar el ARN y se incubó en hielo durante 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 12,500 r.p.m durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1mL de etanol al 75 % y se dejó secar durante 5 min. Posteriormente, fue re-suspendido en 20 μ L de agua libre de RNAsas. Finalmente el ARN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1%.

4.2.3 Análisis de la expresión del mir-204 mediante sondas Taqman.

Para determinar si hubo una restauración de la expresión del miR-204 en las células MDA-MB-231, se realizó la síntesis de cADN a partir del ARN total; utilizando sondas stem-loop RT (Applied Biosystems) específica para el miR-204 y para el ARN pequeño nucleolar RNU44. Se mezclaron en un tubo eppendorf 10 μ g de ARN total, 3 μ L de primers RT, 0.15 μ L de dNTPs con dTTP (100mM); 1.0 μ L de la enzima

transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ μ L); 1.5 μ L de buffer RT 10X; 0.19 μ L de inhibidor de RNasa (20 U/ μ L) y 4.16 μ L de H₂O libre de RNasa, para una reacción total de 15 μ L. La mezcla se agitó suavemente. La reacción de RT se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems), programando tres temperaturas a 16 °C por 30 min; 42 °C por 30 min; y 85 °C por 5 min, más un paso final a 4 °C ∞ . una vez que finalizó la reacción de RT-PCR, se realizó la reacción de PCR en tiempo real mediante la utilización de sodas TaqMan, para lo cual en una placa óptica de 96 pozos se mezclaron 1.33 μ L del producto de la reacción de RT, 10 μ L del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No 4 AmpErase UNG, 2X), 7.67 μ L de agua libre de RNAsas, y 1.0 μ L de la sonda PCR (específica para el miR-204 y para RNU44) por pozo para una reacción de 20 μ L total. Cada una de estas reacciones se realizó por triplicado. La reacción se corrió en un equipo 7500 de Applied Biosystems. Programando un paso a 95 °C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60 °C por 1 min. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de ct ($2^{-\Delta\Delta ct}$), usando como normalizador la expresión del control endógeno RNU44.

4.3 Análisis de la expresión de las proteínas y su estado de fosforilación en células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-204 analizada por Phospho-antibody arrays

4.3.1 Extracción de proteínas

250,000 células MDA-MB-231 se sembraron en una placa de 6 pozos y se transfectaron con el pre-miR-204 como se describió anteriormente, se sometieron a condiciones de hipoxia (1 % O₂) durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se hicieron 3 lavados con PBS 1x pH 7.0, se le adicionaron 200 μ L del amortiguador de lisis del fosfo-arreglo (Full Moon BioSystems, USA) para recuperar 2 millones de células en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron perlas de lisis. Por 1 min se vortexearon, 5 veces y se centrifugaron a 12,000 g a 4 °C por 5 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se desecharon las perlas, posteriormente se centrifugaron 18,000 g a 4 °C por 20 min y se colocó en un tubo eppendorf nuevo.

4.3.2 Purificación de proteínas

Para la purificación se abrió la columna y se le agregaron 650 μL del amortiguador de etiquetado, se vortexeo por 5 seg y se incubó 1 min a T.A, posteriormente se le dió un spin a la columna por 1 min para remover el líquido y se le adicionaron 100 μL de las proteínas obtenidas previamente, se le colocó el tubo colector a la columna y se centrifugaron a 750 g por 2 min, se desechó la columna y se cuantificaron las proteínas purificadas.

4.3.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas purificadas se realizó mediante dos métodos:

Mediante nanodrop a una A280 y por Bradford, la curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (1 mg/ml). Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

4.3.4 Marcaje de proteínas.

Una vez cuantificadas las proteínas, se hicieron alícuotas de 25 μL del lisado con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se le adicionó el amortiguador de marcaje a volumen final de 75 μL , se le añadió 3 μL de la solución Biotina/DMF (100 μL DMF (N, N-Dimethylformamide) a 1 mg de la solución de biotina), se dejó incubando T.A y cada 10 min se vortexearon por 2 h. Transcurrido el tiempo se le adicionó 35 μL de solución de paro, se vortexeo y se dejó incubando a T.A por 30 min.

4.3.5 Bloqueo del fosfo-arreglo

El fosfo-arreglo de anticuerpos se incubó por 1 h a T.A sin abrirlo, transcurrido el tiempo, el fosfo-arreglo de anticuerpos se abrió y se incubó por 30 min más. Posteriormente, se añadieron 30 mL de solución de bloqueo en una caja Petri (100 x15 mm), se sumergieron las laminillas y se dejaron incubando en el shaker a 55 r.p.m por 45 min, se lavaron las laminillas con agua MiliQ, para eso; cada laminilla se colocó en un tubo eppendorf de 50 mL y se le adicionaron 45 mL de agua MiliQ, se mezclaron por inversión y se decantó el agua, se realizó 10 veces.

4.3.6 Acoplamiento de proteínas con el fosfo-arreglo

En un tubo se le adicionaron 6 mL de solución de acoplamiento, se le agregó la proteína marcada con biotina, se mezcló. Posteriormente, en la cámara de acoplamiento, se adicionaron los 6 mL de la mezcla de la proteína con el amortiguador de acoplamiento, y se sumergió la laminilla (fosfo-arreglo de anticuerpos) suavemente, nos aseguramos de que estuviera completamente cubierta con la mezcla y se dejó en el shaker de rotación a 35 r.p.m durante 2 h a T.A. Transcurrido el tiempo, se transfirió la laminilla, a una caja Petri (100x15 mm) y se adicionaron 30 mL de solución de lavado, se aumentó la revolución a 55 r.p.m durante 10 min, se desechó la solución de lavado y se repitió este paso. Posteriormente se hicieron los lavados, en un tubo falcon de 50 mL se colocó la laminilla y se le adicionaron 45 mL de agua MiliQ se mezcló por inversión suavemente durante 10 min, y se desechó el agua, se repitió 10 veces.

4.3.7 Detección antígeno/anticuerpo

Para la detección de la interacción Ag/Ac, se adicionaron 60 μ L de estreptavidina acoplada a Cy3 en 60 mL de amortiguador de detección; se colocaron 30 mL, de la solución anterior en una caja Petri y se sumergió la laminilla, se incubó en el shaker de rotación a 35 r.p.m durante 20 min a T.A, cubierto de aluminio, se transfirió la laminilla a una caja Petri nueva con 30 mL de solución de lavado a 55 r.p.m durante 10 min a T.A, se repitió este paso. Posteriormente se hicieron los lavados, en un tubo falcon de 50 mL se colocó la laminilla y se le adicionaron 45 mL de agua MiliQ se mezcló por inversión suavemente durante 10 min, y se desechó el agua, se repitió 10 veces. Después, se tomó la laminilla con los dedos del lado del código de barras y se sacudió suavemente para eliminar el agua, se colocó la laminilla en un tubo falcón de 50 mL y se centrifugo a 1,300 r.p.m durante 5 min para secarla. Una vez seca, se escaneo la laminilla en el Scanner GenePix® Microarray a 530 nM.

4.3.8 Análisis de datos

Para cada spot (1,100 spots por laminilla) de las laminillas, tanto de la control como la transfectada con el miR-204, se obtuvo la señal de intensidad media utilizando el software myImage Analysis. Después se llevó acabo la normalización de los datos,

para eso obtuvimos el promedio de los 6 replicados para cada spot entre la señal media (la mediana de todos los datos de cada laminilla). Una vez generados los datos, determinamos el radio de fosforilación para cada Ab (spot) utilizando la ecuación:

Radio de fosforilación= (fosforilada miR-204/ no fosforilada miR-204) / (fosforilada control/ no fosforilada control).

Donde los valores van de 0-2, el punto de corte es 1, valores >1 disminuye el estado de fosforilación y <1 aumenta el estado de fosforilación.

Se realizaron ensayos de western blot para validar el fosfo-arreglo.

4.4 Validación del fosfo-arreglo mediante ensayos de Western blot

4.4.1 Obtención de extractos proteicos totales.

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

4.4.2 Determinación de la concentración de proteínas

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

4.4.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

30 µg de proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12%. Para correr el gel se empleó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

4.4.4 Transferencia de proteínas a membrana PVDF.

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se realizó la transferencia en la membrana PVDF (polyvinylidene difluoride) (MILLIPORE). Para eso la membrana fue activada previamente con etanol durante 20 seg. Transcurrido el tiempo la membrana, el gel, los papeles whatman y esponjas se incubaron 15 min en la solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y, 20 % de metanol). Se armó el cassette y se realizó la transferencia en el Trans-Blot (BIORAD) a 25 V, 1.0 A a 40 min. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó tinción con rojo Ponceau, inmediatamente después se lavó la membrana con PBS 1x pH 7.

4.4.5 Ensayos de Western blot

Posterior a la transferencia, las membranas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween20 (0.05%) durante 5 min, tres veces, y se agregó el anticuerpo primario diluido (Tabla 3) en PBS 1x-Tween20 0.05%, se incubó toda la noche a 4°C, en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS 1x-Tween20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido en PBS 1x-tween20 al 0.05%, se incubó durante 1 h a T.A en agitación. Posterior a la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con PBS 1x-tween20 al 0.05% y se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 5 min con el reactivo ECL (Amherham Pharmacia Biotech, USA). Cada membrana fue analizada en el equipo ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). Las bandas detectadas en las membranas se les realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo Cientific).

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados para hacer el ensayo de inmunodetección.

Anticuerpo	Marca (# catalogo)	Origen	Dilución
Akt	Sigma-Aldrich p-2482	Ratón	1:5000
p-Akt	Santa Cruz sc-7985-R	Conejo	1:1000
Mek1	Serotec AHP904	Ratón	1:1000
p-Mek1	Invitrogen 13-3500	Conejo	1:1000
MAPK	Santa Cruz sc-27112	Ratón	1:500
p-MAPK	Invitrogen 13-3500	Conejo	1:1000
PI3K	Cell Signaling 4292S	Conejo	1:1000
p-PI3K	Cell Signaling 4228S	Conejo	1:1000
Src	Santa Cruz sc-19	Ratón	1:500
p-Src	MyBioSource y-416	Conejo	1:1000
HIF-1 α	Abcam	Ratón	1:500
GAPDH	Cell Signaling	Conejo	1:1000

4.5 Análisis bioinformáticos.

Para la predicción *in silico* de los blancos del miR-204 se utilizaron los programas TargetScan versión 5.2 (<http://www.targetscan.org>), PICTAR (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar Vertebrate.cgi>) y miRwak versión 4.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>). Cada programa fue utilizado con los parámetros que los programas generan por defecto. Se analizaron cuáles de estos blancos predichos estaban modulados en el phospho-antibody array y participaban en la formación del mimetismo vasculogénico.

4.6 Ensayos de mimetismo vasculogénico.

4.6.1 Condiciones de hipoxia

Las células MDA-MB-231, se sometieron a condiciones de hipoxia (1 % O₂), utilizando la cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg), durante 48 h.

4.6.2 Ensayo de formación de estructuras tipo capilar *in vitro*.

Para determinar si el miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico en condiciones de hipoxia. 250,000 células MDA-MB-231 se sembraron y transfectaron con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl como se describió anteriormente, se sometieron a condiciones de hipoxia (1 % O₂) durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se realizó un cultivo en 3D, para eso la matriz extracelular, las placas de 96 pozos y las puntas fueron incubadas a 4° un día antes. 900 µL matriz extracelular se mezclaron con 100 µL de PBS 1x, la mezcla se homogeneizó lentamente por pipeteo en hielo evitando la formación de burbujas. 50 µL de matrigel diluida se distribuyó por pozo en una placa de 96 pozos fría evitando la formación de burbujas en los pozos. La placa se incubó 1 h a 37°C, pasado este tiempo se adicionaron 10,000 células MDA-MB-231 para cada condición, sin transfectar, transfectas con el pre-miR-204 y el control negativo scramble, e inhibidores PI3K (Wortmannin), Src (PP2) y FAK (PF-573228), y se incubaron en medio DMEM sin complementar. Adicionalmente, todos los grupos fueron incubados a 37 °C, 5% CO₂ y 1 % O₂, por 12 h. Se tomaron imágenes a las 0 h, 3 h, 6 h, 9 h y 12 h. Se realizó el conteo de los túbulos formados, así como los puntos de ramificación.

4.6.3 Inhibición de PI3K, FAK Y Src, utilizando inhibidores específicos

Todos los inhibidores comerciales fueron obtenidos de Sigma. El inhibidor FAK (PF-573228), el inhibidor de Src (PP2) y el inhibidor de PI3K (wortmannin), fueron diluidos en dimetil sulfoxido (DMSO) y subsecuentemente diluido a una concentración de 10 μ M

250,000 células MDA-MB-231 se sembraron en una placa de 6 pozos. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS, y se incubaron con DMEM que contenía PF-573228, PP2 o wortmannin a una concentración final de 10 μ M. Un pozo con células MDA-MB-231 se trató con volumen igual de DMSO, que fue usado como control en todos los experimentos. Después de 1 h se removió el medio, se reemplazó con DMEM y se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y 1% O₂ durante 48 h. Transcurrido el tiempo se prosiguió a realizar el ensayo de MV.

4.7 Construcciones pmiR-LUC-3'UTR.

4.7.1 Hibridación y clonación de las secuencias 3'UTR de los genes PI3K y Src silvestres y mutadas

4 pares de oligonucleótidos correspondientes a un fragmento de 59 pb de la región 3'UTR de los genes PI3K y Src (pro-oncogén) fueron diseñados, 2 pares de oligonucleótidos correspondieron a la región 3'UTR silvestre de estos genes y los otros 2 pares de oligonucleótidos presentan un cambio en 3 bases en el sitio de unión al mir-204 (Tabla 4). Cada par de oligonucleótidos se re-suspendió a una concentración de 500 picomol (p/mol) y se le adiciono el amortiguador de hibridación a un volumen final de 20 μ L y se hibridaron a 95 °C durante 5 min, 70 °C durante 15 min y a 37 °C durante 45 min posteriormente, el dúplex (sentido/antisentido) se diluyó a una concentración final de 50 nanogramos por microlitro (ng/ μ L) y se corrió en un gel de agarosa al 2 % para verificar la hibridación.

4.7.2 Ligación de los insertos 3'UTR dentro del plásmido pmiR-report-Luc.

Una vez que los insertos fueron diluidos a 0.5 ng/ μ L, se preparó la reacción de ligación (0.5 μ L de T4 ADN ligasa (5 U/ μ L), 2 μ L de amortiguador de ligasa T4 5x, 1 μ L del vector pmiR-repor-luc (25 ng), para la relación 1:3 se le agregaron 1.38 μ L del inserto (0.5 ng/ μ L), para la relación 1:5 se le agregaron 2.3 μ L del inserto (0.5 ng/ μ L) y se llevó a un volumen final de 10 μ L con agua libre de nucleasa. Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto. Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 14 °C. Los productos de las reacciones de ligación fueron empleados para transformar células E. coli DH5 α competentes. Todas las construcciones fueron expandidas y purificadas por lisis alcalina, posteriormente se secuenciaron.

Tabla 4. Oligonucleótidos correspondientes a la región 3'UTR de los genes PI3K, Src y FAK.

Oligonucleótidos silvestre	
Fw wtFAK	CTAGTCCAGCACTAGGGACTCAGACTCCAAAGGGAGGGATTTGAGTGAATTTTTTCCAA
Rv wtFAK	AGCTTTGGAAAAAATTCACCTCAAATCCCTCCCTTTGGAGTCTGAGTCCCTAGTGCTGGA
Fw wtPI3K	CTAGTCAAGAAAAGTAAATTTGAAGATTAAGGGAACCTACTTCTGCAAACGTCTTGCA
Rv wtPI3K	AGCTTGCAAGACAGTTTGCAGAAGTAAGTTCCCTTAATCTTCAAATTTACTTTTCTTGA
Fw wtSrc	CTAGTCCTTCAGAGCCAGCCGGCTATGAAAGGGAGCGAGCCCCCTCGGCTCTGGAGGCA
Rv wtSrc	AGCTTGCCTCCAGAGCCGAGGGGCTCGCTCCCTTTCATAGCCGGCTGGCTCTGAAGGA
Oligonucleótidos mutados	
Fw mutFAK	CTAGTCCAGCACTAGGGACTCAGACTCCGATTGATGGGATTTGAGTGAATTTTTTCCAA
Rv mutFAK	AGCTTTGGAAAAAATTCACCTCAAATCCCATCAATCGGAGTCTGAGTCCCTAGTGCTGGA
Fw mutPI3K	CTAGTCAAGAAAAGTAAATTTGAAGATT GATGAC ACTTACTTCTGCAAACGTCTTGCA
Rv mutPI3K	AGCTTGCAAGACAGTTTGCAGAAGTAAGTGTCATCAATCTTCAAATTTACTTTTCTTGA
Fw mutSrc	CTAGTCCTTCAGAGCCAGCCGGCTATGAA CGTGG GCGAGCCCCCTCGGCTCTGGAGGCA
Rv mutSrc	AGCTTGCCTCCAGAGCCGAGGGGCTCGCCACGTTTCATAGCCGGCTGGCTCTGAAGGA

4.8 Validación de blancos mediante construcciones LUC-3'UTR.

4.8.1 Transfección de las construcciones pmiR-LUC-PI3K, pmiR-LUC-Src, pmiR-PI3K.MUT y pmiR-Src-MUT en células MDA-MB-231.

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones pmiR-report-LUC. 200,000 células MDA-MB-231 se sembraron por pozo en una placa de 6 pozos y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente las células fueron transfectadas mediante lipofección en condiciones de esterilidad: (Reacción de transfección para un pozo), en un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 5 µg de la construcción pmiR-LUC-PI3K o pmiR-LUC-Src o pmiR-PI3K.MUT o pmiR-Src-MUT y se mezclaron con 150 µL de OptiMEM, por otro lado en otro tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 9 µL de lipofectamina 2000 reagent (invitrogen) y se mezcló con 150 µL de OptiMEM. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 10 min a TA. Pasado el tiempo de incubación se mezcló el contenido de ambos tubos en uno solo por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 min a TA para permitir la formación de los complejos Lipofectamina-ADN. Durante el tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se lavaron 2 veces con PBS pH7.0, se les adicionó 1.8 mL de medio DMEM sin complementar. Pasado el tiempo de incubación se le adicionaron los complejos lipofectamina-ADN (200 µL) correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 4 h en condiciones normales. Pasado el tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se les adicionó 2000 µL de DMEM debidamente complementado, las células se incubaron en condiciones normales durante 24h. Como normalizador se utilizó el plásmido pMIR-REPORT β-gal.

4.8.2 Co-transfección del pre-miR-204 y scramble en células transfectadas con las construcciones pmiR-LUC-3'UTR.

Después del tiempo de incubación con las construcciones pmiR-3'UTR las células fueron co-transfectadas con el pre-miR-204 o el premiR-Neg-Ctrl o solo agente de transfección. para ello en un tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclaron 100 µL de medio reducido Opti-Mem con 5 µL del agente de transfección siPORT™ Amine

(Applied Biosystems) por cada pozo a transfectar, a la par en otro tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclaron de 100 μ L de medio reducido Opti-Mem con 7.5 μ L del precursor pre-miR-204 o del premiR-Neg-Ctrl (scramble) a una concentración de 10 μ M y se incubaron ambos tubos a TA durante 10 min, posteriormente se mezcló el contenido de cada tubo eppendorf en uno solo, y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó durante 10 min más, posteriormente esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (2.3 mL). Se agitó suavemente con movimientos circulares durante 1 min y se incubó durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂.

4.8.3 Detección de la actividad de luciferasa.

Para la determinación de la actividad luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (promega) para ello primero se diluyó el amortiguador de lisis 5x (CCLR) en agua a TA, las células se lavaron con PBS pH7.0. 150 μ L del amortiguador de lisis 1x se le adicionaron a las células y se mantuvieron en agitación durante 5 min en hielo, después se transfirió el lisado de células a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agitó con vortex 3 veces 10-15 seg, finalmente el lisado celular se centrifugó durante 2 min a 12,000 g y 4 °C, se recuperó el sobrenadante, en una placa de 96 pozos de fondo opaco y se colocaron 100 μ L de Luciferase Assay Reagent II y 20 μ L de lisado celular; se mezcló por pipeteo, la lectura de la placa se realizó en equipo un luminómetro Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer (Thermo Scientific) con 2 seg de retardamiento antes de cada lectura seguida de lecturas de 10 seg para cada pozo.

V. RESULTADOS

5.1 Formación del mimetismo vasculogénico en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.

El mimetismo vasculogénico es la generación de estructuras tipo capilar a partir de células tumorales genéticamente desreguladas, permitiendo al tumor la obtención de nutrientes, el suministro de oxígeno y generar metástasis. Este mecanismo se ha asociado un mal pronóstico (Vartanian *et al.*, 2012). Por lo cual, el objetivo fue determinar si las células MDA-MB-231 bajo condiciones de normoxia e hipoxia, forman estructuras tipo capilar. En la figura 10, se observan células MDA-MB-231 crecidas en matrigel bajo condiciones de normoxia e hipoxia durante 0, 3, 6, 9 y 12 h. Los datos muestran que las células bajo condiciones de normoxia muestran una menor formación de estructuras tipo capilar en comparación con las células bajo condiciones de hipoxia. Interesantemente, las células crecidas en condiciones de hipoxia incrementaron significativamente la formación de mimetismo vasculogénico a partir de las 3 h. El número de puntos de ramificación, marcados en azul, fue dramáticamente incrementado en condiciones de hipoxia, 16 veces más comparado con normoxia, (Figura 10B). Así mismo, la formación de tubos capilares, marcados en rojo, fue dramáticamente incrementado en condiciones de hipoxia 20 veces más comparado con normoxia a las 12 h (Figura 10C).

5.2 Análisis de la restauración del miR-204 en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.

Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que la expresión del miR-204 se encuentra reprimido en tumores de cáncer de mama, así como líneas de CM. Así mismo, demostramos que tiene un papel importante en la inhibición de la angiogénesis (Flores-Pérez A, 2016). Con estos antecedentes, decidimos analizar si miR-204 también participa en la inhibición del mimetismo vasculogénico.

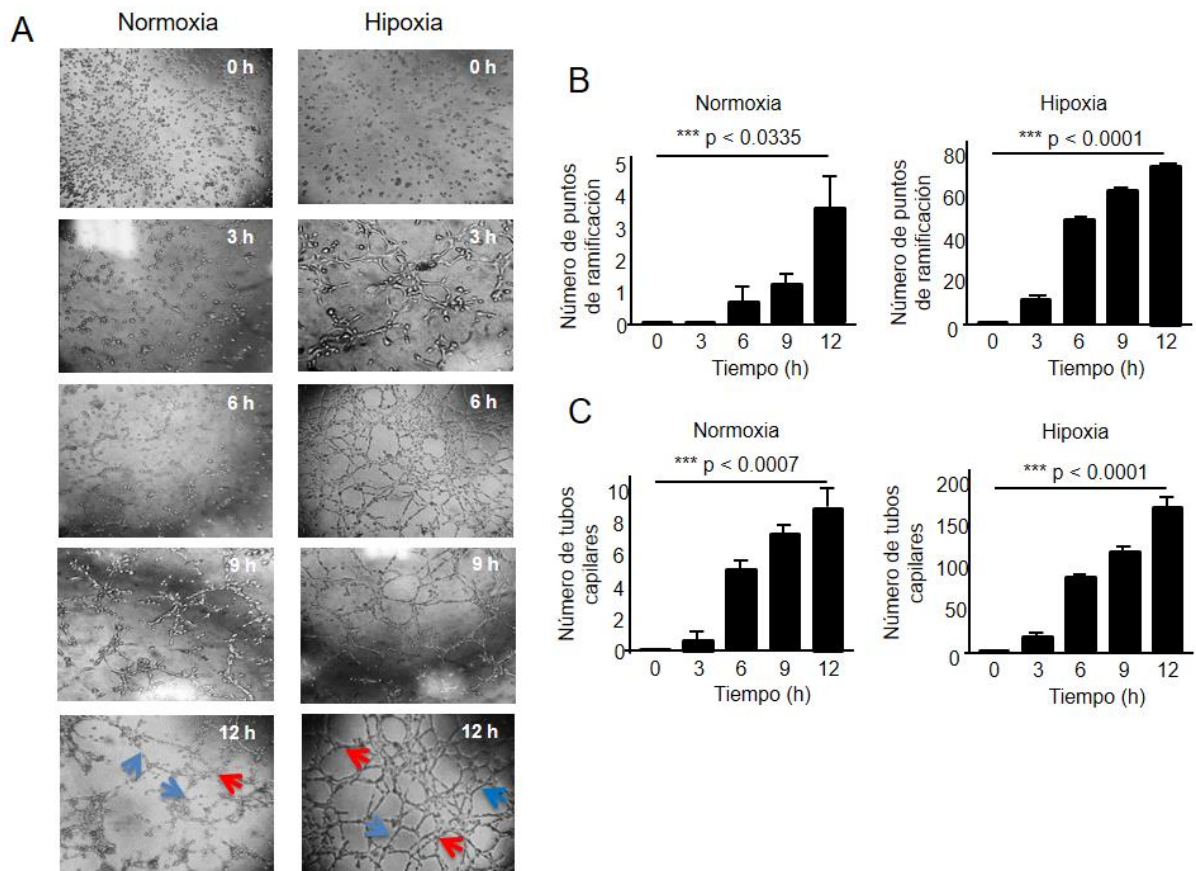


Figura 10. Formación del mimetismo vasculogénico en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia. (A) Las células MDA-MB-231 de cáncer de mama mostraron la presencia de estructuras tipo capilar después de 3 h de incubación (Matrigel) en condiciones de hipoxia comparada con normoxia. (B) La grafica representa la cuantificación de los puntos de ramificación después de las 0, 3, 6, 9 y 12 h bajo condiciones de normoxia e hipoxia. (C) La grafica representa la cuantificación de los tubos capilares después de las 0, 3, 6, 9 y 12 h bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM (Error estándar de la media) *** $p < 0.001$.

Para esto, se realizó la restauración de la expresión del miR-204 en células MDA-MB-231, transfectando el pre-miR-204, así como, el control negativo (scramble). Posteriormente, se realizó la extracción del ARN, con el cual se realizó una reacción de RT-PCR para demostrar la restauración de la expresión en la línea celular MDA-MB-231 comparada con los controles (Figura 11).

5.3 El miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.

Después de restaurar la expresión del miR-204, se investigó el papel del miR-204 en el desarrollo del mimetismo inducido por hipoxia. Como se observa en la Figura 12, la restauración del miR-204 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 inhibió el desarrollo del mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia, comparando con el control, así como, con la secuencia scramble (Figura 12). En azul, se observan los tubos capilares y en rojo, los puntos de ramificación, podemos observar que ambas estructuras se disminuyeron hasta en un 80% en las células transfectadas con el miR-204, comparadas con las células control.

5.4 Vías de señalización que participan en el mimetismo vasculogénico mediado por el miR-204.

Posteriormente, se evaluó que vías de señalización pudieran estar participando en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediado por el miRNA-204. Para esto, se analizó los niveles de expresión de múltiples proteínas usando el Phospho Antibody Arrays, así como su estado de fosforilación (Full Moon BioSystems, USA). Los datos muestran que la restauración del miR-204 en células MDA-MB-231 inhibe la expresión y el estado de fosforilación de 13 de 39 proteínas evaluadas (fold ratio <1.0), como se observa en la figura 13. Estas proteínas están involucradas en las vías de señalización PI3K-Akt, MAPK y FAK (Figura 14, 15 y 16).

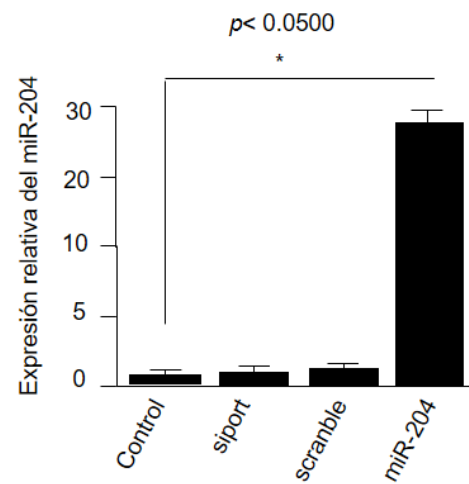


Figura 11. Análisis de la restauración del miR-204 en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia. Restauración de la expresión del miR-204 comparada con el control, así como, el control negativo (scramble), en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

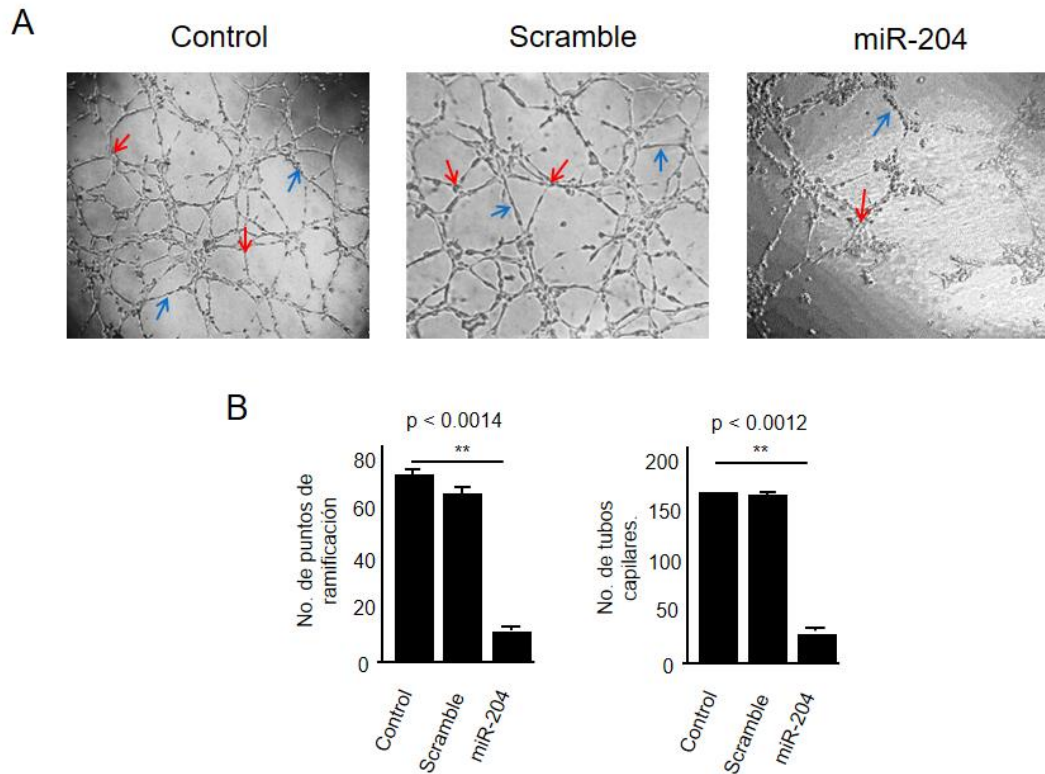


Figura 12. El miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.

(A) Las células MDA-MB-231 no transfectadas (panel izquierdo), scramble (panel medio) y transfectadas con el pre-miR-204 (panel derecho), después de 12 h de incubación (Matrigel) en condiciones de hipoxia. (B) La grafica representa la cuantificación de los puntos de ramificación (flecha roja) y tubos capilares (flecha azul) después de 12 h de incubación (Matrigel) en condiciones de hipoxia. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$.

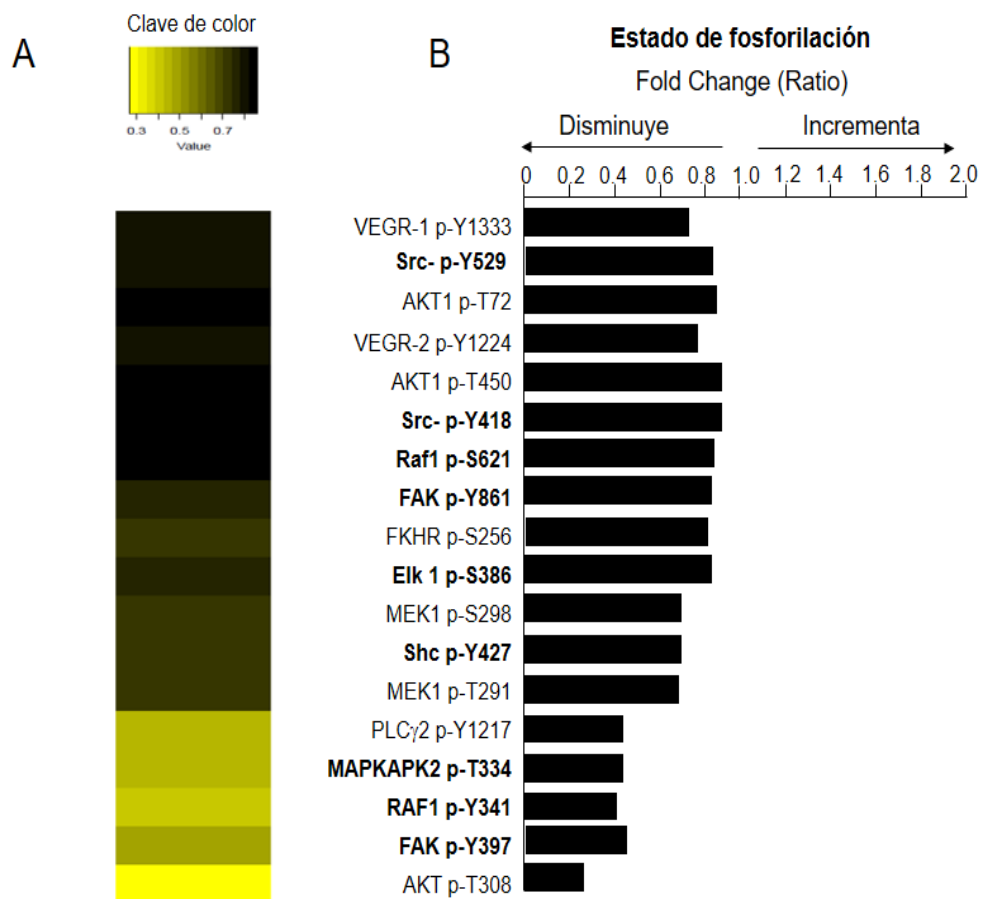


Figura 13. Vías de señalización inhibidas por el miR-204 en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia. (A) El mapa de calor representa los resultados del fosfo-arreglo donde se muestra en color amarillo las proteínas con mayor inhibición el estado de fosforilación por el miR-204. El valor de corte del estado de fosforilación fue de 1. Un valor de fold change menor a 1 significa disminución en el estado de fosforilacion. (B) La gráfica representa los valores del mapa de calor de las 13 proteínas que se disminuyó su estado de forforilación de las células transfectadas con el miR-204.

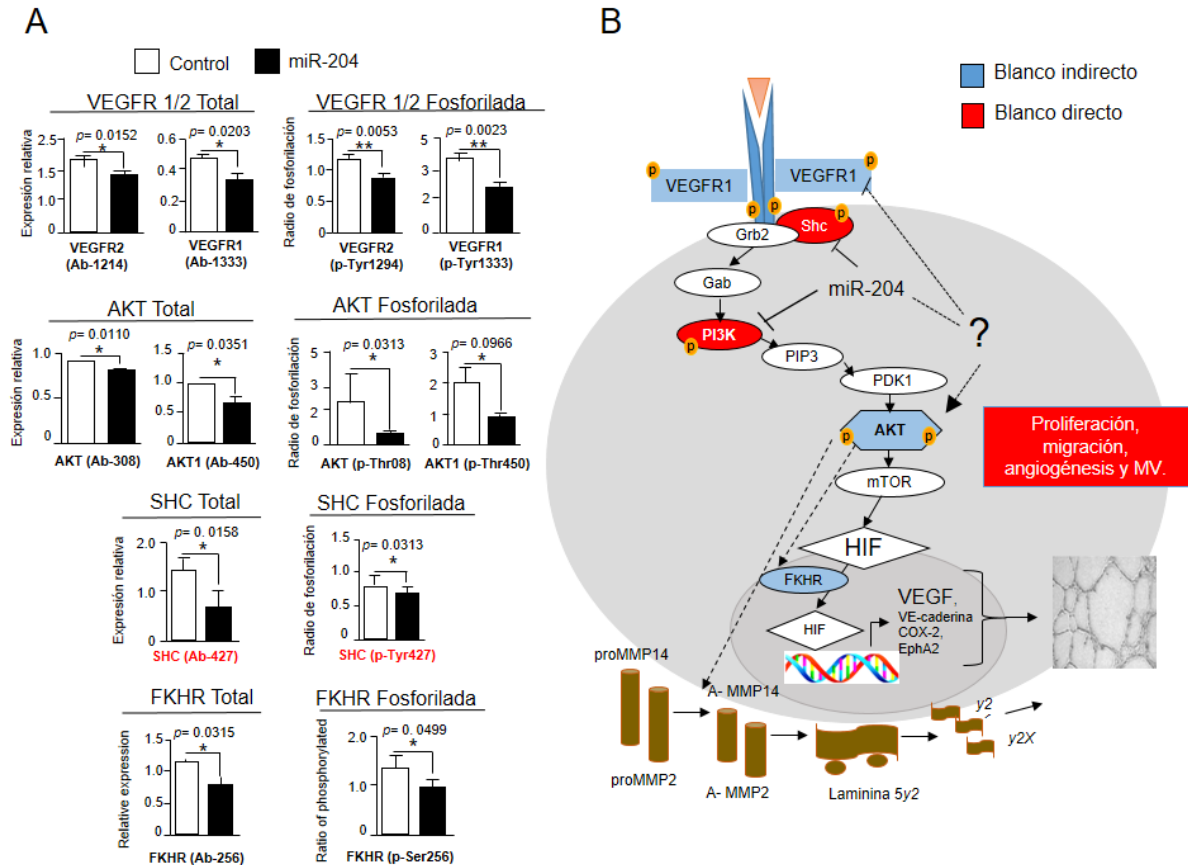


Figura 14. Análisis de las rutas de señalización PI3K/AKT en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204. (A) Las proteínas VEGFR1, VEGFR2, AKT, SHC y FKHR que participan en la vía de señalización PI3K/AKT, disminuyeron tanto la expresión de la proteína, así como su estado de fosforilación en células que se restauró la expresión del miR-204 (barras negras) comparadas con el control (barras blancas), en rojo se marcan las proteínas que son blanco directo del miR-204. (B) Modelo hipotético de la participación del miR-204 en la inhibición del mimetismo vasculogénico a través de la vía de señalización PI3K/AKT. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

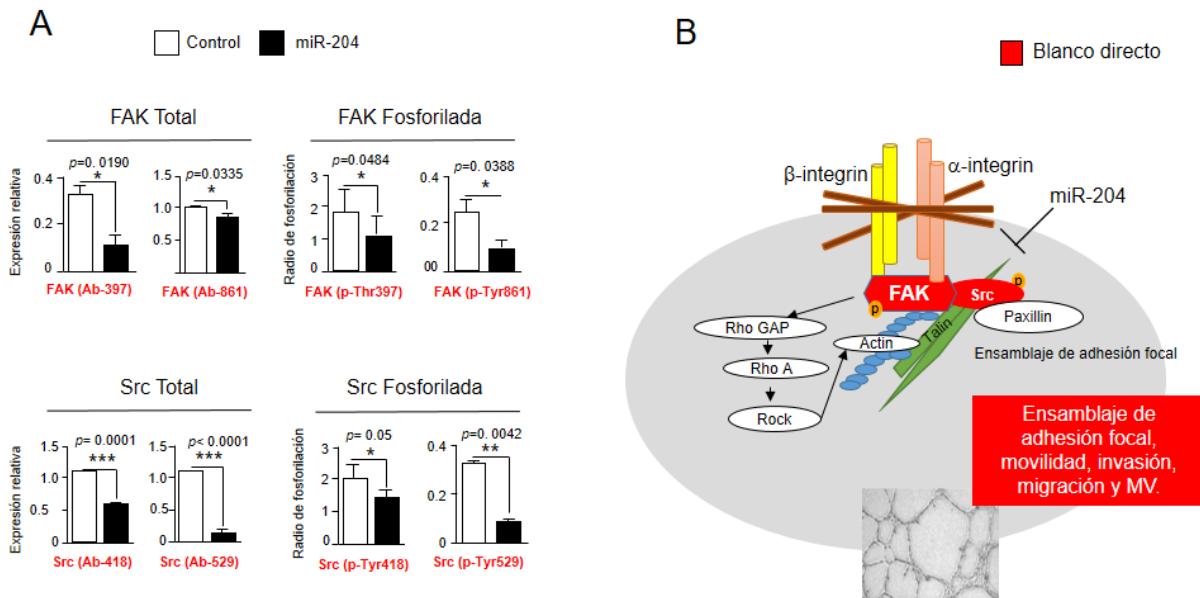


Figura 15. Análisis de las rutas de señalización FAK en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204. (A) Las proteínas FAK y Src que participan en la vía de señalización FAK, disminuyeron tanto su estado de fosforilación, como la expresión de la proteína, en células que se restauró la expresión del miR-204 (barras negras) comparadas con el control (barras blancas), en rojo se marcan las proteínas que son blanco directo del miR-204. (B) Modelo hipotético de la participación del miR-204 en la inhibición del mimetismo vasculogénico a través de la vía de señalización FAK. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

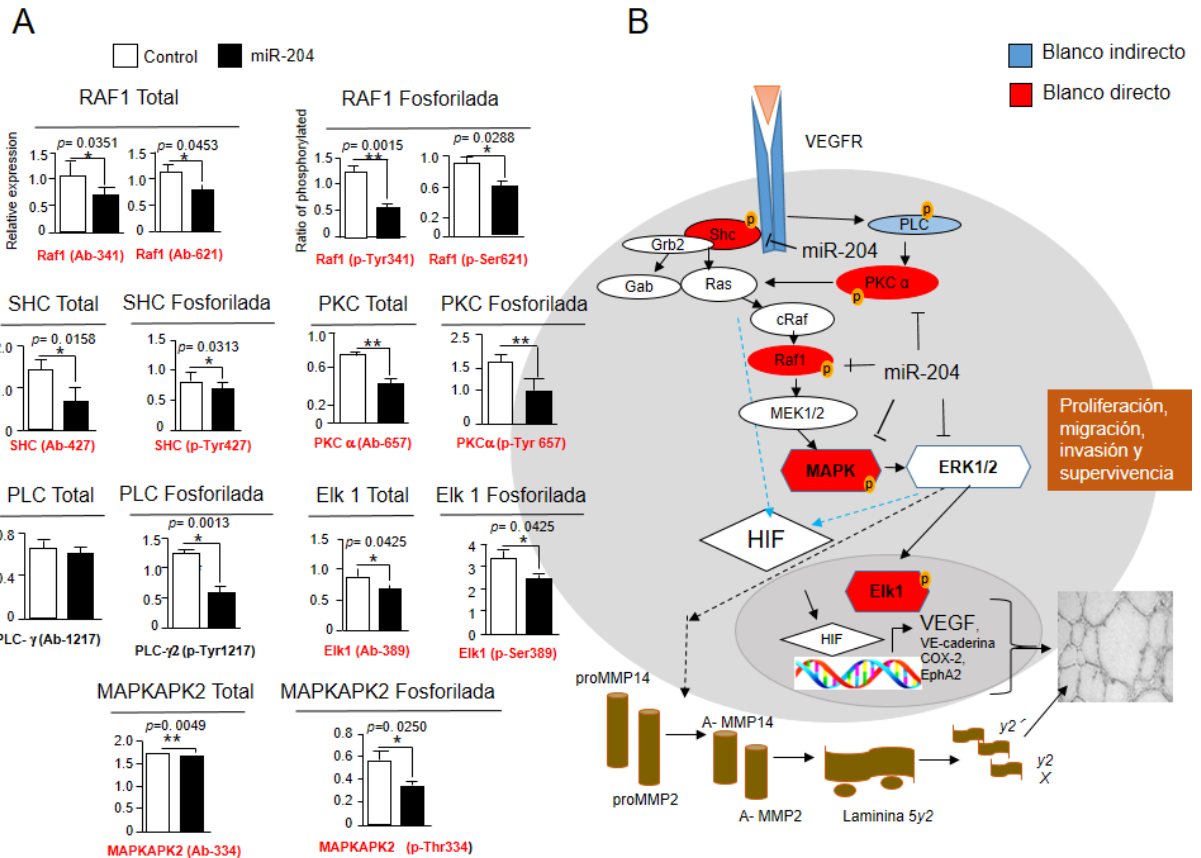


Figura 16. Análisis de las rutas de señalización MAPK en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204. (A) Las proteínas RAF 1, SHC, PKC, PLC, Elk 1 y MAPKAPK2 que participan en la vía de señalización de las MAPK, disminuyeron tanto su estado de fosforilación, como la expresión de la proteína, en células que se restauró la expresión del miR.204 (barras negras) comparadas con el control (barras blancas), en rojo se marcan las proteínas que son blanco directo del miR-204. (B) Modelo hipotético de la participación del miR-204 en la inhibición del mimetismo vasculogénico a través de la vía de señalización MAPK. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

5.5 Predicción de los mRNA blancos del miR-204

Se determinó cuáles son las proteínas desreguladas y que participan en el desarrollo del mimetismo vasculogénico, moduladas por el miR-204 en la línea celular MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia; se analizó si los mRNAs de estas proteínas podrían tener sitios de unión para el miR-204. Para eso, se realizó una predicción *in silico* usando los software's TargetScan, Diana tools y miRwalk. Se encontró que, en la región 3'UTR de los mRNAs de los genes *Fak*, *Src*, factor de transcripción ETS (*Elk1*), proteína cinasa C alfa (*PRKCA*), proto-oncogén cinasa serina/treonina (*Raf1*), proteína adaptadora Shc 1 (*Shc*) y *MAPK*, presentan sitios de unión para el miR-204. En el fosfofosfo-arreglo notamos que la fosforilación de estas proteínas disminuyó, las cuales participan en la formación del mimetismo vasculogénico (Tabla 5). Así mismo, también encontramos que, las proteínas AKT1, AKT2, Receptor del factor de crecimiento epidermal vascular 2 (VEGFR2), MEK1, fosfolipasa C gamma 2 (PLC γ 2) y VEGFR1 se disminuyó su expresión, pero su mRNA no contiene ningún sitio de unión para el miR-204, lo que hace pensar que su regulación puede ser a través de mecanismos indirectos mediados por dicho miRNA. Interesantemente, todas estas proteínas están involucradas en vías de señalización como: proliferación, migración, metástasis, angiogénesis y mimetismo vasculogénico en cáncer de mama. (Paulis YW, 2010). La disminución de la activación de las vías de señalización puede estar representada por la reducción del estado de fosforilación de todas estas proteínas.

5.6 Validación del fosfo-arreglo por inmunodetección

Posteriormente, los resultados obtenidos del fosfofosfo-arreglo fueron validados mediante ensayos de western blot usando anticuerpos específicos. Para ello se obtuvieron, proteínas totales de la línea celular MDA-MB-231 transfectadas con el miR-204 o secuencia scramble bajo condiciones de hipoxia. Con estos ensayos, confirmamos la disminución la reducción del estado de fosforilación de AKT, MEK1, proteína cinasa activada por mitógenos 14 (p38 α MAPK), PI3K y Src (Figura 17), así como la disminución en la expresión de dichas proteínas, estos resultados sugieren la inactivación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK.

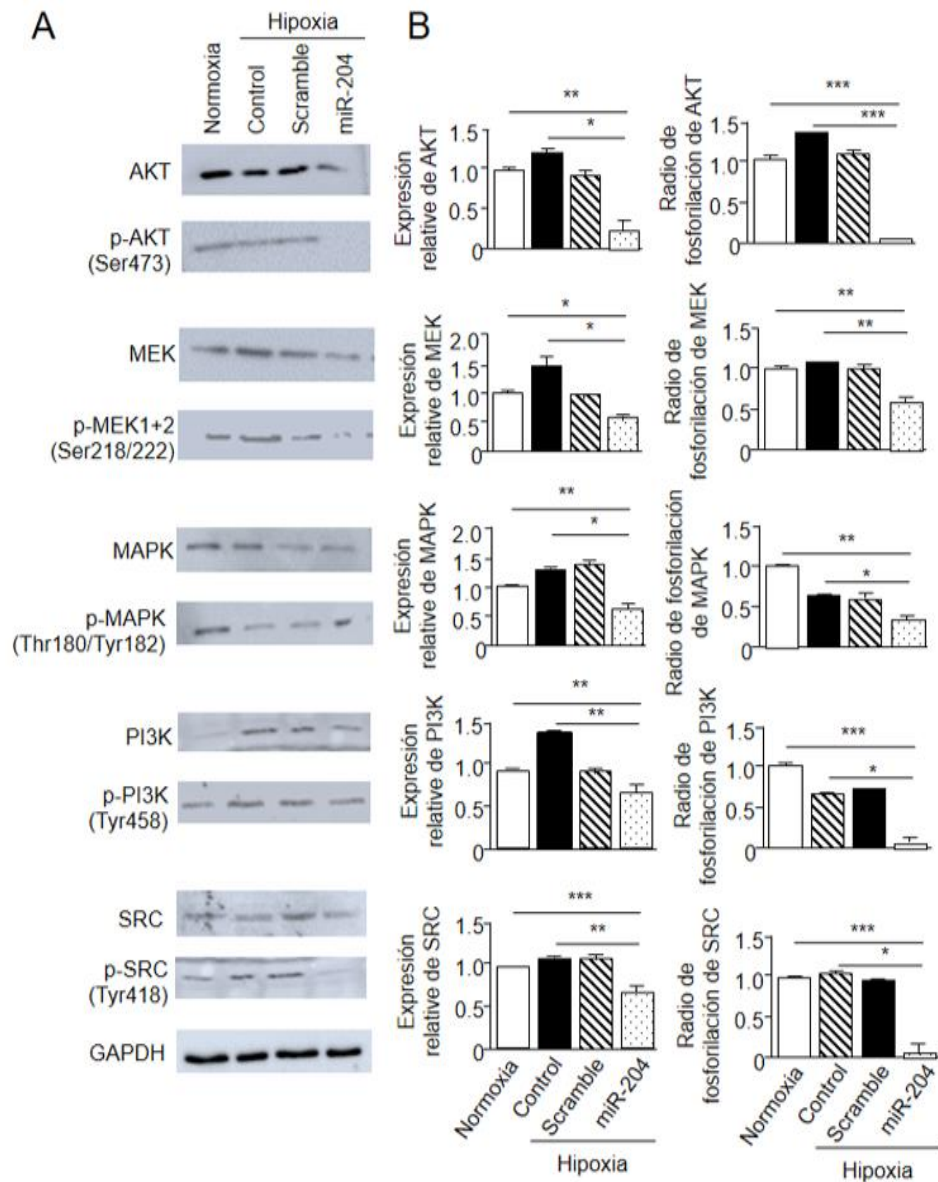


Figura 17. Validación de los cambios en la expresión y fosforilación de proteínas moduladas en el fosfo-arreglo. (A) El ensayo de Western blot fue aplicado para detectar el estado de fosforilación y la expresión de Akt (Ser473), MEK 1 (Ser218/222), p38MAPK (Tyr180/182), PI3K (Tyr 458) y SRC (Tyr 418) en células MDA-MB-231 en condiciones de normoxia (barras blancas), células sin transfectar (barras negras), transfectadas con scramble (barras con diagonales) como controles y transfectadas con el pre-miR-204 (barras con puntos). (B) Análisis densitométrico de los western blot. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.7 Análisis de la expresión HIF-1 α y su participación en el desarrollo del mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia.

El microambiente hipóxico de los tumores afecta al metabolismo, la angiogénesis y la supervivencia de las células tumorales orquestadas por el factor inducible de hipoxia (HIF-1 α). Las condiciones de hipoxia fueron simuladas *in vitro* usando una cámara de hipoxia modular (billupus-rothenberg), las células fueron incubadas durante 48 h en condiciones de normoxia e hipoxia. Para determinar si el miR-204, abate la expresión del HIF-1 α de manera indirecta, se realizó un Western blot (Figura 18). En la figura 18, se observa que la proteína HIF-1 α aumentó su expresión en condiciones de hipoxia comparada con normoxia y que el miR-204 disminuyó su expresión de esta proteína en condiciones de hipoxia.

5.8 Participación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK en la inhibición del mimetismo vasculogénico.

Para determinar si las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK, participan en la inhibición del mimetismo vasculogénico mediada por el miR-204, se realizó el ensayo de mimetismo vasculogénico como se menciona en materiales y métodos, utilizando inhibidores específicos de PI3K, FAK y Src. Previo a eso se realizó un ensayo de viabilidad celular con los inhibidores, en la figura 19 A, se observa que más de 70 % de las células son viables utilizando los inhibidores específicos a una contracción de 10 μ M, En la figura 19B, se observa se observan células MDA-MB-231 crecidas en matrigel bajo condiciones de hipoxia durante 12 h utilizando diferentes inhibidores PI3K (Wortmannin), Src (PP2) y FAK (PF-573228), se puede observar que los distintos inhibidores abaten la formación de mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia en comparación con el control (DMSO). Y hay una disminución hasta del 90 % en la formación de tubos capilares y puntos de ramificación, comparada con el control (Figura 19 F-H).

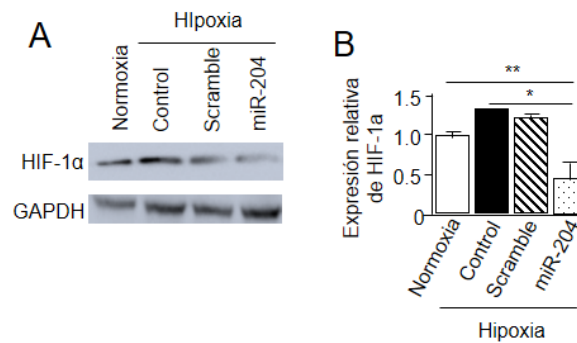


Figura 18. Análisis de la expresión de HIF-1α en células transfectadas con el miR-204 bajo con condiciones de hipoxia. (A) El ensayo de Western blot fue aplicado para detectar la expresión de la proteína HIF-1α en células MDA-MB-231 en condiciones de normoxia (barras blancas), células sin transfectar (barras negras), transfectadas con scramble (barras con diagonales) como controles y transfectadas con el pre-miR-204 (barras con puntos). (B) Análisis densitométrico de los western blot. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

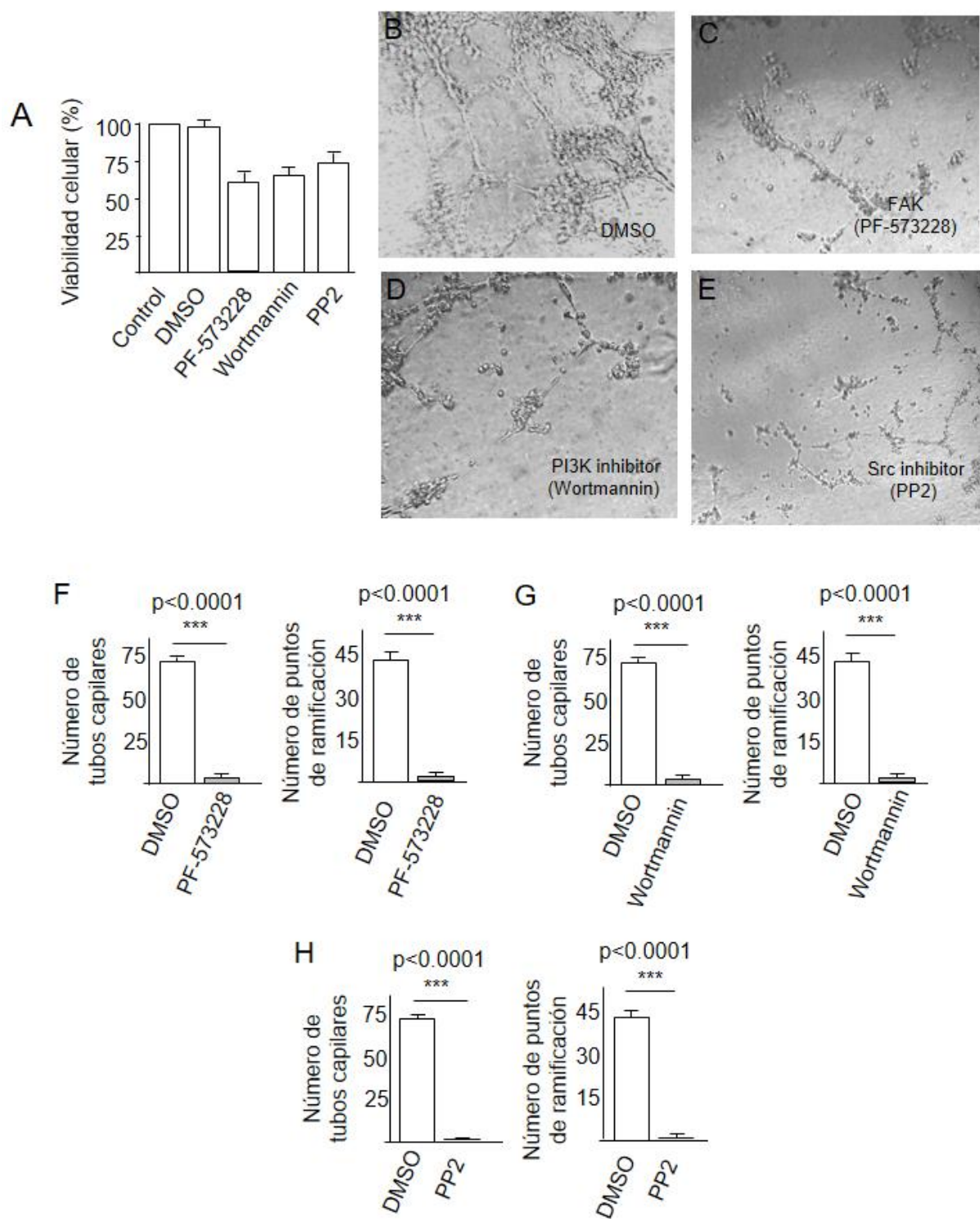


Figura 19. Participación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK en la inhibición del mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia. (A) Ensayo de MTT en células MDA-MB-231 para determinar la viabilidad celular, utilizando los inhibidores FAK (PF-573228), PI3K (wortmannin), Src (PP2) a 10 μ M, y el control (DMSO). (B) Células MDA-MB-231 de cáncer de mama mostraron la presencia de estructuras tipo capilar después de 12 h de incubación (Matrigel) con DMSO (control). (C) Inhibición de las estructuras tipo capilar después de 12 h de incubación (Matrigel) en presencia del inhibidor FAK (PF-573228) a 10 μ M. (D) Inhibición de las estructuras tipo capilar después de 12 h de incubación (Matrigel) en presencia del inhibidor PI3K (wortmannin) a 10 μ M. (E) Inhibición de las estructuras tipo capilar después de 12 h de incubación (Matrigel) en presencia del inhibidor SRC (PP2) a 10 μ M. (F) La grafica representa la cuantificación de los puntos de ramificación y tubos capilares después de 12 h de incubación (Matrigel) en presencia del inhibidor FAK (PF-573228). (G) La grafica representa la cuantificación de los puntos de ramificación y tubos capilares después de 12 h de incubación (Matrigel) en presencia del inhibidor PI3K (wortmannin). (H) La grafica representa la cuantificación de los puntos de ramificación y tubos capilares después de 12 h de incubación (Matrigel) en presencia del inhibidor SRC (PP2). Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.9 Clonación de la región 3'UTR de los genes PI3K y Src en el vector pmiR-report

Para corroborar si el miR-204 puede reprimir a nivel postranscripcional los genes PI3K y Src. Primeramente, se clonó la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región 3'UTR de los genes PI3K y Src en el vector pmiR-report, rio abajo de la región que codifica el gen de luciferasa. Además, se incluyeron en el análisis tres mutaciones puntuales en el sitio de unión de miR-204 predicho en la región 3'UTR de los genes PI3K y Src (tabla 5). En la figura 20 se puede observar una correcta digestión del vector pmiR-report utilizando las enzimas *HindIII* y *SpeI*. Por otro lado, se realizó la hibridación de los oligonucleótidos correspondientes a dichos genes, en la figura 21A se observa en los dos primeros carriles los oligonucleótidos sin hibridar de Src y en el tercer carril el oligonucleótido hibridado de Src silvestres, seguidos de los oligonucleótidos mutados; y en figura 21B se observa en los dos primeros carriles los oligonucleótidos sin hibridar de PI3K y en el tercer carril el oligonucleótido hibridado de PI3K silvestre, seguidos de los oligonucleótidos con la secuencia mutada. Para verificar una clonación exitosa, se realizó una PCR colony (figura 22) y se verificó por secuenciación (figura 23).

5.10 El miRNA-204 tiene dos genes blancos PI3K y Src relacionados con el mimetismo vasculogénico.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes pmiR-LUC-PI3K y pmiR-LUC-Src, tanto los silvestre como los mutados, se transfectaron en células MDA-MB-231. Posteriormente, se realizó una co-transfección con el pre-miR-204, para analizar la actividad de luciferasa. Los resultados mostraron que la actividad de la luciferasa se disminuyó notablemente en las células MDA-MB-231 transfectadas con los plásmidos pmiR-LUC-PI3K y pmiR-LUC-Src silvestres y el pre-miR-204 en comparación con las células transfectadas con los plásmidos mutados y el pre-miR-204 (Figura 24). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que el miR-204 atenúa la expresión de PI3K y Src, uniéndose en su región 3'UTR respectivamente.

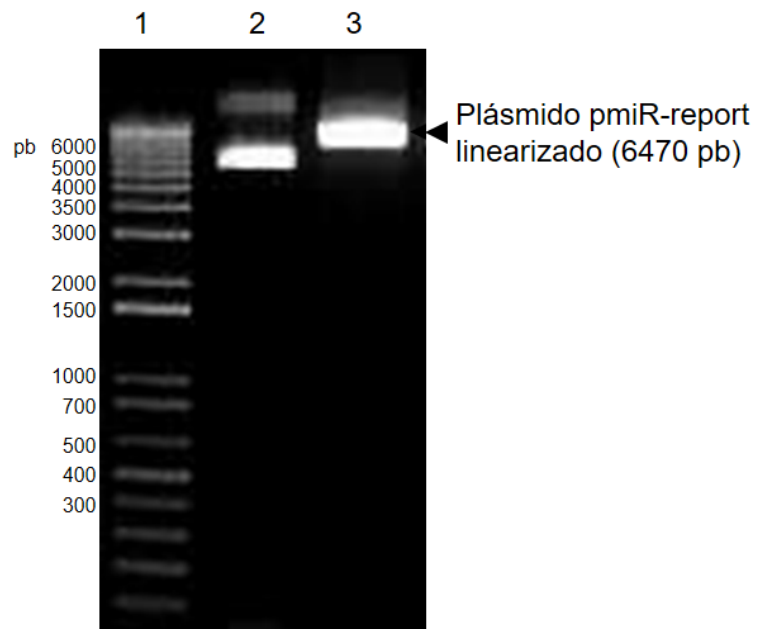


Figura 20. Doble digestión del plásmido pmiR-report con las enzimas *Hind III* y *SpeI*. Carril 1. Marcador de 1kb. Carril 2. Plasmido pmiR-report, sin digerir (control). Carril 3. Doble digestión del plásmido pmiR-report con las enzimas *Hind III* y *SpeI*, tamaño esperado de 6,470 pb. Electroforesis analítica visualizada en un gel de agarosa al 1.0 %.

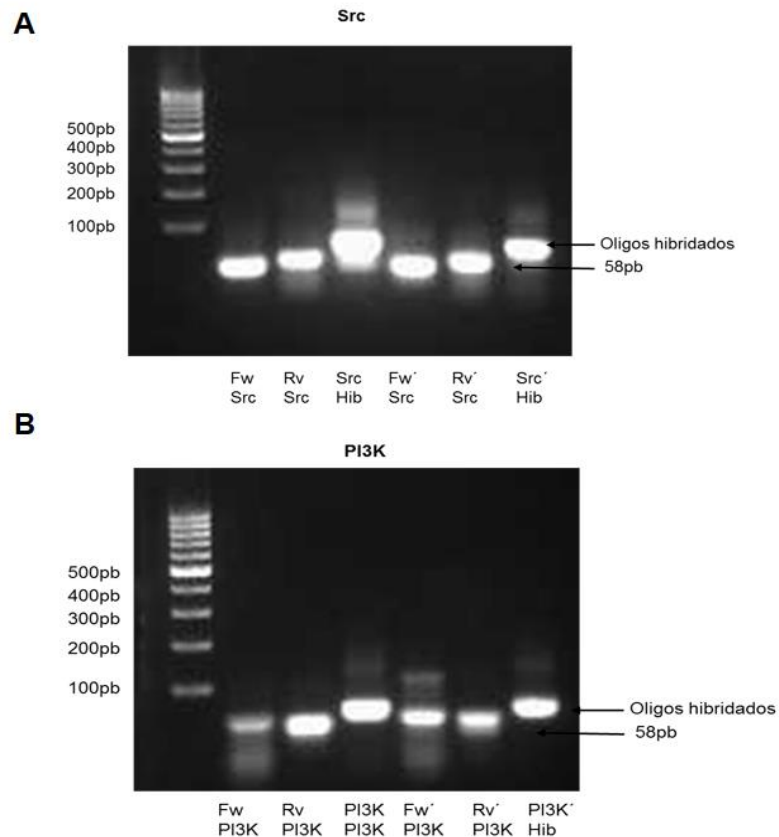


Figura 21. Hibridación de los oligonucleótidos de la región 3'UTR de los genes Src y PI3k visualizada en una electroforesis analítica en gel de agarosa al 2.0 %.

(A). Carril 1. Marcador de 100 pb. Carril 2. Oligonucleótido sentido de la región 3'UTR del gen Src silvestre. Carril 3. Oligonucleótido antisentido de la región 3'UTR del gen Src silvestre. Carril 4. Oligonucleótidos hibridados de la región 3'UTR del gen Src silvestre. Carril 5. Oligonucleótido sentido de la región 3'UTR del gen Src mutado. Carril 6. Oligonucleótidos hibridados de la región 3'UTR del gen Src mutado. Carril 7. Oligonucleótidos hibridados de la región 3'UTR del gen Src mutado. (B). Carril 1. Marcador de 100 pb. Carril 2. Oligonucleótido sentido de la región 3'UTR del gen Src silvestre. Carril 3. Oligonucleótido antisentido de la región 3'UTR del gen PI3K silvestre. Carril 4. Oligonucleótidos hibridados de la región 3'UTR del gen PI3K silvestre. Carril 5. Oligonucleótido sentido de la región 3'UTR del gen PI3K mutado. Carril 6. Oligonucleótidos hibridados de la región 3'UTR del gen PI3K mutado. Carril 7. Oligonucleótidos hibridados de la región 3'UTR del gen PI3K mutado

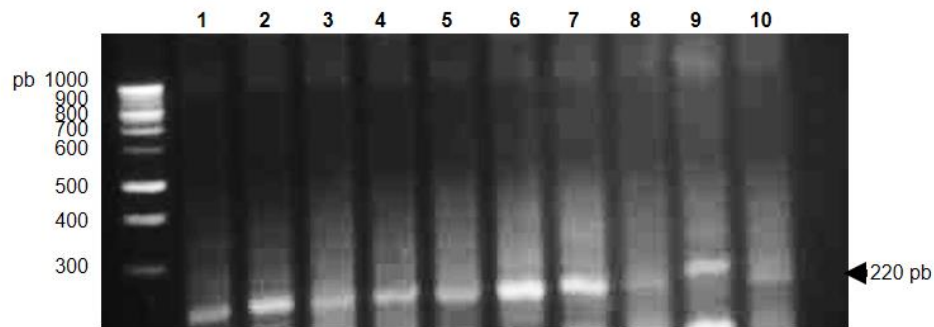


Figura 22. Productos de PCR colony de las distintas clonas visualizadas en electroforesis en gel de agarosa al 2 %. . Marcador de 100 pb. Carril 1. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K wt (1:3) Carril 2. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K wt (1:5). Carril 3. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K mut (1:3). Carril 4 Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K mut (1:5). Carril 5 Producto de la PCR a partir de la clona 2pmiR-LUC-PI3K mut (1:5). Carril 6. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src wt (1:3). Carril 7. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src wt (1:5). Carril 8. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src mut (1:3). Carril 9. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src mut (1:3). Carril 10. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src mut (1:5).

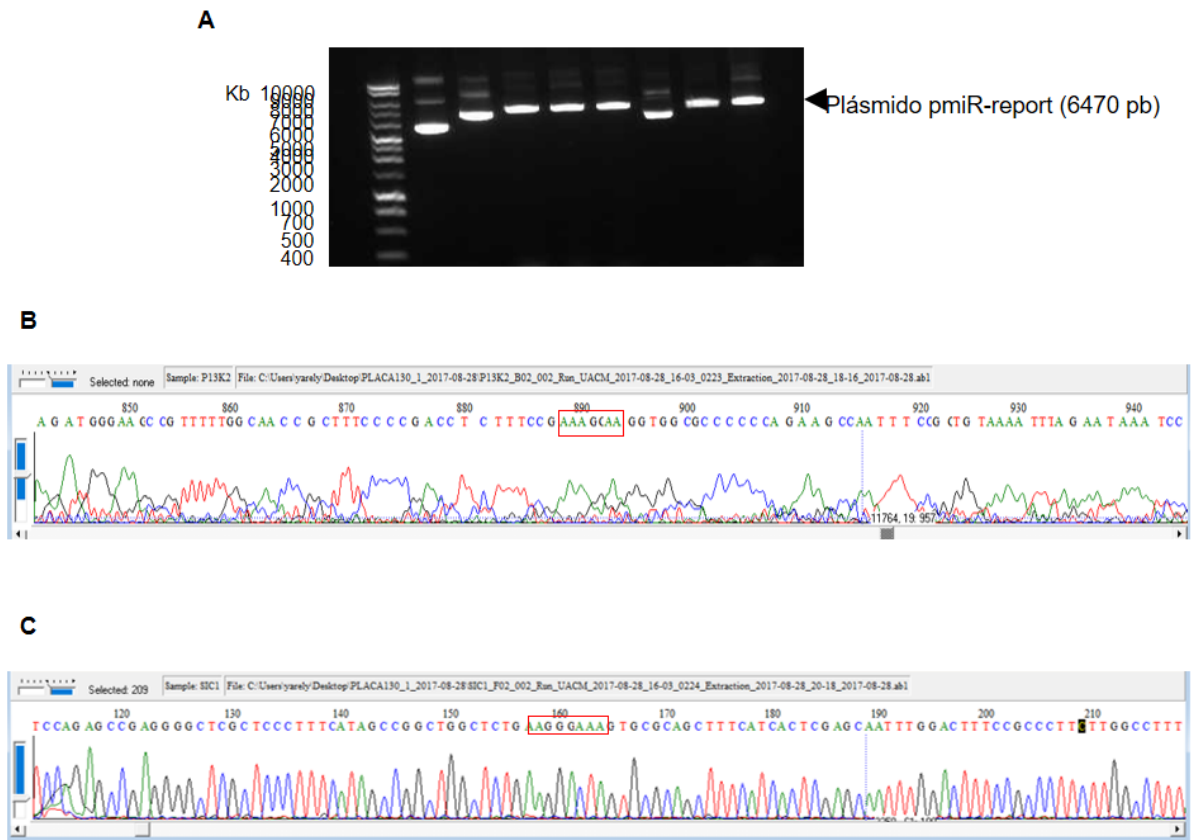


Figura 23. Verificación de las clonas obtenidas. (A) Plásmidos purificados de la PCR colony positivos para la secuenciación. Marcador de 100 pb. Carril 1. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K wt (1:3) Carril 2. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K wt (1:5). Carril 3. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K mut (1:3). Carril 4 Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-PI3K mut (1:5). Carril 5. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src wt (1:3). Carril 6. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src wt (1:5). Carril 7. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src mut (1:3). Carril 8. Producto de la PCR a partir de la clona pmiR-LUC-Src mut (1:5). (B) Secuenciación de la clona pmiR-LUC.wt (1:5). (C) Secuenciación de la clona pmiR-LUC.Src wt(1:5)

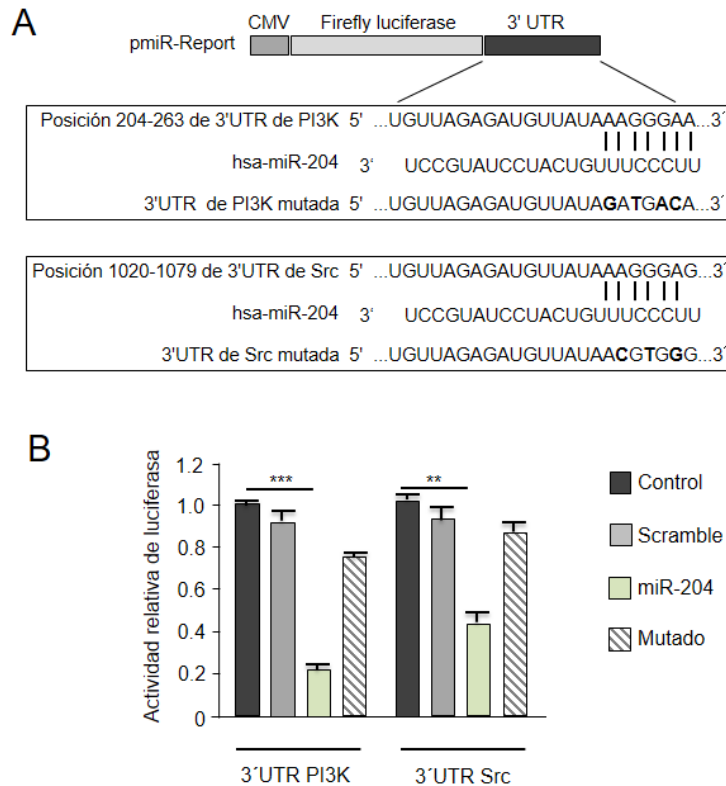


Figura 24. PI3K y Src son blancos predichos del miR-204. (A) Representación esquemática de construcciones de p-miR que contienen la región 3'UTR de los genes PI3K y Src, clonados río abajo del gen de luciferasa. Las mutaciones puntuales en el sitio de unión miR-204 predicho en la región 3'UTR de los genes PI3K y Src se indican en negrita. (B) Ensayos de luciferasa en células MDA-MB-231 transfectadas con pre-miR-204 y con cada una de las cuatro construcciones. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

V. DISCUSIÓN

En contraste con estudios previos, demostramos que el desarrollo del MV fue inducido por hipoxia en los primeros tiempos (3 h) de incubación en matrigel. En segundo lugar, observamos por primera vez que la restauración de la expresión del miR-204 redujo fuertemente el número de puntos de ramificación y las redes tubulares capilares 3D sugiriendo un papel importante para miR-204 en el desarrollo de MV. En tercer lugar, utilizando el fosfo-arreglo encontramos que el miR-204 disminuye la expresión de múltiples proteínas implicadas en la activación de las vías de señalización como PI3K/AKT, MAPK, VEGF y FAK/SRC y también encontramos la disminución en el estado de fosforilación de estas proteínas. Cuatro, hemos demostrado que el MV también se suprimió después del tratamiento con inhibidores específicos de PI3K, SRC y FAK. Por último, utilizando el ensayo de luciferasa comprobamos que el miR-204 tiene como blancos directos a PI3K y SRC.

El MV es el fenómeno en el que las células cancerosas imitan las células endoteliales formando vasos sanguíneos. La formación de vasos sanguíneos tumorales es causada no sólo por la angiogénesis dependiente de las células endoteliales del huésped sino también por el MV, que desempeña un papel igualmente importante en este proceso (Li *et al.*, 2016). El MV fue descrito por primera vez en 1999 por Maniotis y colaboradores, como un proceso en el cual las células agresivas de melanoma pueden generar canales que facilitan la perfusión tumoral independiente de las células endoteliales (Maniotis *et al.*, 1999). El MV se ha observado en varios tumores agresivos, tales como CM, próstata, ovario, pulmón, riñón y tejidos de sarcoma, numerosos estudios han demostrado que la formación de MV es esencial para el crecimiento del tumor, la invasión y metástasis en tumores malignos (Vartanian *et al.*, 2012; Fan YZ, 2010; Hendrix *et al.*, 2003). Para el CM, existen escasos estudios sobre la asociación entre MV y el pronóstico de la enfermedad. Recientemente, se ha encontrado que la formación del MV, se asocia con la progresión del tumor y a un mal pronóstico en pacientes (Shen *et al.*, 2017). Sin embargo, la tasa de MV en pacientes con CM, aún no está claro.

El microambiente tumoral es una condición fundamental para la malignidad del tumor y es un factor clave en este proceso (Kirschmann *et al.*, 2012). La hipoxia promueve la progresión del tumor, ya que activa varias vías de señalización que promueven el MV, lo que facilita la invasión, migración y adhesión de las células tumorales, contribuyendo así a la neoplasia tumoral (Comito *et al.*, 2011). En este estudio, primero demostramos que la línea celular MDA-MB-231 de CM tripe negativo, bajo condiciones de hipoxia forman estructuras tipo capilar a partir de las 3 h, sin embargo, este patrón se estableció bien a partir de las 12 h (Figura 10). Mientras que, en condiciones de normoxia, hay menor formación de estructuras tipo capilar y se da a partir de las 9 h. Por lo que, podemos definir que este fenómeno es dependiente del tiempo y de condiciones de hipoxia.

Posteriormente, investigamos el efecto del miR-204 en la inhibición del MV. En estudios previos, el miR-204 fue reportado que actúa como un supresor de tumor en varios tipos de cáncer (Flores-Pérez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Imam *et al.*, 2012; Huang J, 2010). Por ejemplo, nuestro grupo de trabajo demostró que la expresión del miR-204 se encuentra reprimido en tumores de CM, así como líneas celulares de CM. Así mismo, demostramos que tiene un papel importante en la inhibición de la angiogénesis, proliferación y migración (Flores-Pérez *et al.*, 2016). Sin embargo, el papel del miR-204 en la inhibición del MV no está definido. Nuestros resultados sugieren que la restauración de la expresión del miR-204 puede suprimir el MV, como se observa en la figura 12. Además, se conoce que el miR-204 tiene múltiples blancos que participan en la formación del MV (Tabla 5), tales como PI3K, FAK, Shc, Src, Raf, PKCA, ERK, MAPK14 y ELK 1. Los resultados mostraron que inhibe las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK (Figura 14, 15 y 16). Shc es otra de las proteínas que fue regulada por el miR-204, como se observa en la figura 14. Estudios previos han demostrado que la proteína Shc es capaz de promover la proliferación celular y la angiogénesis en CM (Veeramani *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2000). Esta proteína se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer (Grossman *et al.*, 2007). Recientemente, se demostró que Shc regula la activación de la vía de señalización PI3K/AKT (Zhang *et al.*, 2015). Se conoce que la vía de señalización PI3K/AKT regula la migración, proliferación y angiogénesis.

Estudios previos demostraron la participación de esta vía en la formación de MV en células de melanoma a través de la remodelación de la matriz extracelular, así como, en cáncer hepatocelular y glioma (Zhang *et al.*, 2015; Chiablaem *et al.*, 2014). Nuestros resultados sugieren que la vía de señalización PI3K/AKT juega un papel importante en la formación del MV en CM, por lo que puede ser un blanco importante para la inhibición del MV.

Por otra parte, la vía de señalización FAK, es otra vía clave que regula la formación de MV y que fue modulada por la restauración del miR-204 (Figura 14). Recientemente, se ha demostrado que esta vía es un importante mediador en el fenotipo agresivo en CM, incluyendo MV (Lu *et al.*, 2013). FAK es fosforilada en Tyr397 y Tyr576 causando su activación, así como la interacción y activación de Src, que es otra proteína que también fue regulada por el miR-204. Src es una proteína adaptadora que regula la activación de múltiples vías de señalización como PI3K/AKT, RAS/MAPK y FAK. Esta última regula invasión, migración y MV. Estudios recientes han demostrado que regula el MV, a través de Erk1/2 otra proteína regulada por el miR-204, incrementando los niveles de actividad de urocinasa, regulando así la invasión de las células agresivas de melanoma (Hess *et al.*, 2005). También, Erk1/2 regula la actividad de MMP-2 y MT1-MMP, promoviendo así la invasión y MV (Hess *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2005). Interesantemente, estas observaciones implican que FAK promueve el fenotipo agresivo y el MV, por lo que nuestros resultados obtenidos en CM concuerdan con previos reportes en otros tipos de cáncer, de este modo FAK o Src pueden ser blancos importantes para la inhibición del MV. Además, nuestros resultados también revelan la participación de la vía de señalización de las MAPK en la formación del MV (Figura 15). Gengqiang Ling y colaboradores, reportaron la regulación del MV a través de la vía de señalización de las MAPK en glioma (Ji *et al.*, 2016).

Los múltiples blancos del miR-204 en las vías de señalización relacionadas con la formación de MV es una ventaja sobre los inhibidores específicos, ya que más de una vía de señalización puede contribuir a la formación del MV. Además, como hemos mencionado el MV está regulado por condiciones de hipoxia; la hipoxia está

regulada por el HIF (Kirschmann *et al.*, 2012). HIF es un factor de transcripción α/β -heterodimérico, que consiste en una subunidad, HIF-1 β , expresada constitutivamente y otra subunidad, HIF-1 α , cuya expresión se encuentra considerablemente regulada. La expresión de esta última la determina el ritmo de su síntesis y degradación. La subunidad HIF-1 α , es un mediador bien establecido en cáncer (Qiao *et al.*, 2015; Kirschmann *et al.*, 2012). Estudios previos han demostrado su papel de HIF-1 α en el desarrollo tumoral (Semenza *et al.*, 2003), la sobreexpresión HIF-1 α se ha asociado con un pronóstico desfavorable en la mayoría de los cánceres porque activa genes que regulan el metabolismo del cáncer, la angiogénesis, invasión, diferenciación celular, inestabilidad genética y metástasis (Semenza *et al.*; 2016; Wellmann *et al.*, 2004). Nosotros analizamos la expresión de HIF-1 α ya que las vías de señalización PI3K/AKT, FAK y MAPK que participan en el MV reguladas por el miR-204 convergen en HIF-1 α . Pudimos encontrar que HIF-1 α está sobreexpresado en la línea celular de CM, bajo condiciones de hipoxia. Y que al restaurar la expresión del miR-204 se abate dicha expresión como se observa en la figura 18. Por lo que nuestros datos sugieren que el miR-204 está inhibiendo la formación del MV a través de la modulación de múltiples vías de señalización, de este modo pudimos proponer un modelo hipotético de como el miR-204 inhibe el MV a través de múltiples vías de señalización (Figura 25).

Nuestros resultados indican que PI3K y Src son novedosos genes blancos del miR-204 que participan en la formación del MV, la interacción directa entre el miR-204 y los mARN's (ARN mensajero) de PI3K y Src se apoya de varias evidencias: (1) las regiones 3'UTR de los mARN's de PI3K y Src contiene sitios de unión para el miR-204 respectivamente; (2) el miR-204 suprime la actividad del gen reportero de luciferasa que contiene la región 3'UTR de PI3K y Src (Figura 23); (3) el miR-204 reprime los niveles expresión de las proteínas PI3K y Src; (4) La inhibición de PI3K y Src con inhibidores específicos abatió la formación del MV (Figura 19).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que miR-204 actúa como un supresor de tumor en cáncer de mama triple negativo, inhibiendo la formación de MV inducido por hipoxia, a través de la regulación negativa de sus blancos directos PI3K y Src. Los

datos sugieren que el efecto del miR-204 está mediado por múltiples vías de señalización como PI3K/AKT, FAK y MAPK. Nuestros hallazgos son alentadores y sugieren que el miR-204 juega un papel importante en la regulación del MV y podría ser dirigido para el desarrollo futuro de un tratamiento para pacientes con cáncer de mama triple negativo, especialmente los que forman MV.

Tabla 5. Predicción de genes blancos del miR-204 desregulados en el fosfo-arreglo que participan en la formación del MV.

Gen blanco	Target Scan	Diana tolos	miR walk	Función	Referencia
SHC1	✓	✓	✓	Regula la activación de vías de señalización en células de cáncer de mama.	Ahn R, <i>et al.</i> Cancer Res. 2013 Jul 15;73(14)
PIK3CA	-	✓	✓	Participa en la formación de MV mediante la regulación de la actividad de MT1-MMP, MMP - 2 y la escisión de la cadena Ln- 5g2	Hess AR, <i>et al.</i> Cancer Res. 2003 Aug 15;63(16):4757-62
SRC1	✓	✓		Regula la activación de vías de señalización PI3k/Akt y Ras/MAPK.	Zibara K, <i>et al.</i> Cell Commun Signal. 2016 Nov 12.
Raf1	✓	✓	✓	Promueve la activación de la vía de señalización MEK/ERK, que participan en la formación MV.	Huang B, <i>et al.</i> Med Oncol. 2015 Jan;32(1):
PRKCA	✓	✓	✓	PKC-a activa ERK1 / 2 que media a las MMPs, participando así en la plasticidad de la matriz, migración, invasión y formación MV	Huang B, <i>et al.</i> Med Oncol. 2015 Jan;32(1):
PTK2	-	-	✓	FAK activa ERK1 / 2 que media a las MMPs, participando así en la plasticidad de la matriz, migración, invasión y formación MV	Hess AR, <i>et al.</i> Cell Cycle. 2006 Mar;5(5):478-80.
MAPK1	✓	✓	✓	Activa a las MMPs, participando así en la plasticidad de la matriz, migración, invasión y formación MV	Hess AR, <i>et al.</i> Cancer Res. 2005 Nov 1;65(21):9851-60.
MAPK14	-	-	✓	Participa en la formación de MV mediante la regulación de la escisión de la cadena Ln- 5g2	Ling G, <i>et al.</i> Int J Oncol. 2016 Oct 7.
Elk1	-	✓	✓	Es un factor de transcripción, que regula la expresión de la prostaglandina E2 (PGE2) y COX-2. que participan en el MV.	Kim HR, <i>et al.</i> Mutat Res. 2014 Oct;768:6-15.

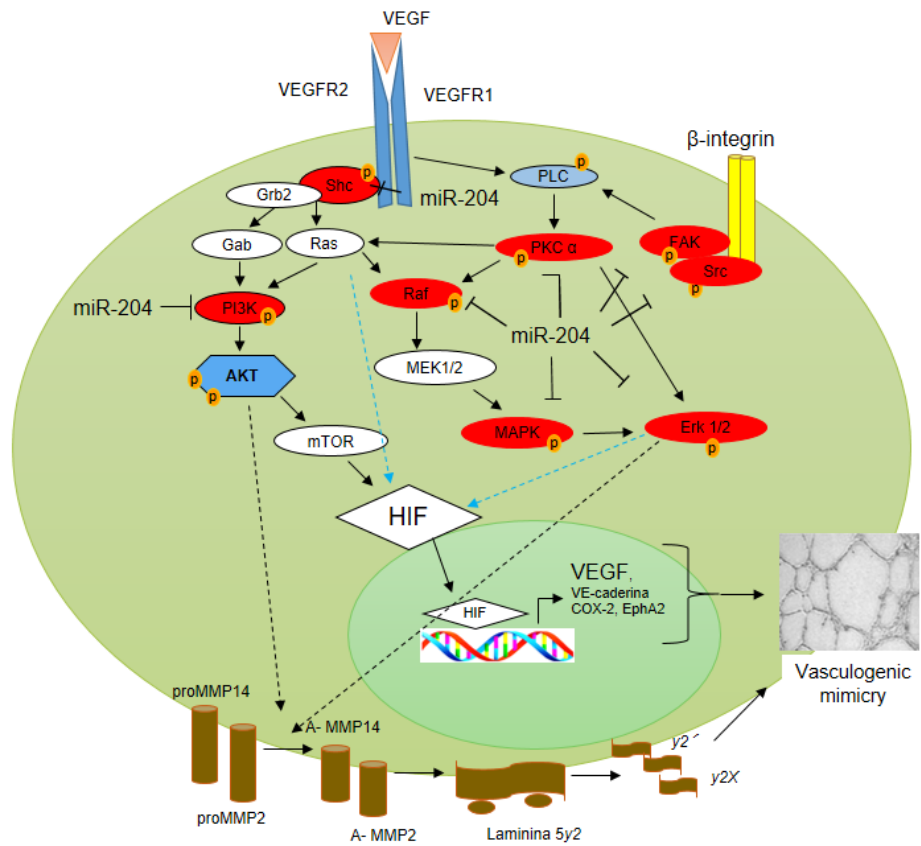


Figura 25. Modelo hipotético de como el miR-204 inhibe el MV a través de la inhibición de múltiples vías de señalización

VII. CONCLUSIONES

- Las células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia muestran una mayor formación de estructuras tipo capilar representativas de mimetismo vasculogénico en comparación con normoxia.
- La restauración de la expresión del miR-204 inhibe el mimetismo vasculogénico en células MDA-MB-231 bajo condiciones de hipoxia.
- La restauración del miR-204 inhibe la expresión y el estado de fosforilación de 13 de 39 proteínas evaluadas en el Phospho Antibody Arrays.
- El miR-204 tiene genes blancos en múltiples vías de señalización como son PI3K-Akt, RAF1-MAPK y FAK
- Se confirmó la disminución de la activación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK por la reducción del status de fosforilación de AKT, MEK1, p38 α MAPK, PI3K y Src.
- La inhibición de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y FAK utilizando diferentes inhibidores abaten la formación de mimetismo vasculogénico.

VIII. FUENTES DE CONSULTA

1. Alberto Muñoz. (1997) cáncer: genes y nuevas terapias. Madrid: Hélice.
2. Amos KD, Adamo B, Anders CK. (2012) Triple-negative breast cancer: an update on neoadjuvant clinical trials. *Int J Breast Cancer*. **2012**, 385978.
3. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, et al. (2005) Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. **7**, R422-R435.
4. Berx G, van Roy F. (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring* **1**, a003129.
5. Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hwang Y, Hicks D, Chen J. (2006) Ephrin-A1 facilitates mammary tumor metastasis through an angiogenesis-dependent mechanism mediated by EphA receptor and vascular endothelial growth factor in mice. *Cancer Res*. **66**, 10315-10324.
6. Burkhart DL, Sage J. (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. **8**, 671-682.
7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 15524-15529.
8. Carmeliet P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. **3**, 4-10
9. Carmeliet P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. **438**, 932-936.
10. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. (2016) MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*. **17**, pii: E1712.
11. Chen L, Fu H, Luo Y, Chen L, Cheng R, Zhang N, Guo H. (2017) cPLA2 α mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer through PI3k/Akt signaling. *Cell Death Dis*. **8**, e2728.
12. Chiablaem K, Lirdprapamongkol K, Keeratichamroen S, Surarit R, Svasti J. (2014) Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular

- carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition. *Anticancer Res.* **34**, 1857-1864.
13. Chung TK, Lau TS, Cheung TH, Yim SF, Lo KW, Siu NS, Chan LK, Yu MY, Kwong J, Doran G, et al (2012) Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *Int J Cancer.* **130**, 1036-1045.
 14. Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, Migliore C, Giordano S, Chiarugi P. (2011) HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* **51**, 893-904.
 15. Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* **2**; 647-656.
 16. Cotran RS, Robbins SL, y Kumar V, (1999) *Patología Estructural y Funcional*, Mc-Graw Hill. **6**, 256-312.
 17. Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews genetics*, **10**, 704-714.
 18. Cui YF, Liu AH, An DZ, Sun RB, Shi Y, Shi YX, Shi M, Zhang Q, Wang LL, Feng Q, Pan GL, Wang Q. (2015) Claudin-4 is required for vasculogenic mimicry formation in human breast cancer cells. *Oncotarget.* **6**, 11087-11097.
 19. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. (2005) Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* **24**, 2909-2915.
 20. Disponible en
<http://www.imss.gob.mx/dpm/dties//DTIES.aspx?Ser=SRV01&OPC=opc06&>
 21. Dumitrescu RG, Cotarla L. (2005) Understanding breast cancer risk- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med.* **9**, 208-221.
 22. Eroles P, Bosch A, Bermejo B, Lluch A. (2010) Mechanisms of resistance to hormonal treatment in breast cancer. *Clin Transl Oncol.* **12**, 246-252.
 23. Eroles P, Tormo E, Pineda B, Espin E, Lluch A. (2016) MicroRNAs in Breast Cancer: One More Turn in Regulation. *Curr Drug Targets.* **17**, 1083-1100.
 24. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* **6**, 259-269.

25. Fan YZ, Sun W. (2010) Molecular regulation of vasculogenic mimicry in tumors and potential tumor-target therapy. *World J Gastrointest Surg.* **2**, 117-127.
26. Fischer M. (2017) Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene.*
27. Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, Bautista VP, Fuentes-Mera L, Romero-Zamora D, Maciel-Dominguez A, de la Cruz OH, Fonseca-Sánchez M, Ruíz-García E, la Vega HA, López-Camarillo C. (2016) Suppression of cell migration is promoted by miR-944 through targeting of SIAH1 and PTP4A1 in breast cancer cells. *BMC Cancer.* **16**, 379.
28. Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, Bautista-Piña V, Hidalgo-Miranda A, Ocampo EA, Martínez MS, Palma-Flores C, Fonseca-Sánchez MA, López-Camarillo C. (2016) Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep.* **6**, 34504.
29. Folkman J, Klagsbrun M. (1987) Angiogenic factors. *Science.* **235**, 4427.
30. Gheldof A, Berx G. (2013) Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **116**, 317-336.
31. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, et al. (2004). Breast carcinoma in men; A population based study. *Cancer* **101**, 51-57.
32. Gómez-Dantés H, Vázquez-Martínez JL, Fernández-Cantón S. (2003) Detección de cáncer de mama en las mujeres derechohabientes del IMSS. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. IMSS;.
33. Gong M, Ma J, Li M, Zhou M, Hock JM, Yu X. (2012) MicroRNA-204 critically regulates carcinogenesis in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro-Oncology.* **14**, 1007-1017.
34. Grossman SR, Lyle S, Resnick MB, Sabo E, Lis RT, Rosinha E, Liu Q, Hsieh CC, Bhat G, Frackelton AR Jr, Hafer LJ. (2007) p66 Shc tumor levels show a strong prognostic correlation with disease outcome in stage IIA colon cancer. *Clin Cancer Res.* **13**, 5798-5804.
35. Ha M, Kim VN. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**, 509-524.
36. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646-674.

37. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. (2003) Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*. **22**, 3070-3075.
38. Hess AR, Hendrix MJ. (2006) Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. *Cell Cycle*. **5**, 478-480.
39. Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE, Nickoloff BJ, Hendrix MJ. (2005) Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res*. **65**, 9851-9860.
40. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. (2010) MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. **28**, 357-364.
41. Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, Chen HI, Chang YF, Panneerdoss S, Zoghi B, et al (2012) Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PLoS One*. **7**, e52397.
42. International Agency for Research on Cancer (IARC) de Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide (GLOBOCAN). Incidencia, Mortalidad y Prevalencia de Cancer en el mundo en el año 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx
Consulta el 14 de julio de 2016.
43. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, et al. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. **65**, 7065-7070.
44. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. **61**, 69-90.
45. Kim SJ, Oh JS, Shin JY, Lee KD, Sung KW, Nam SJ, Chun KH. (2011) Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *J Control Release*. **155**, 427-434.
46. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. (2012) Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. **18**, 2726-2732.

47. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. **294**, 853-858
48. Lai KM, Pawson T. (2000) The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev.***14**, 1132-1145.
49. Lee H, Lee S, Bae H, Kang HS, Kim SJ. (2016) Genome-wide identification of target genes for miR-204 and miR-211 identifies their proliferation stimulatory role in breast cancer cells. *Sci Rep*. **6**, 25287.
50. Lee R, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. **294**, 862-864.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
52. Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134.
53. Lewin GR. (1996) Neurotrophins and the specification of neuronal phenotype. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **351**, 405-411.
54. Li J, Yue Z, Xiong W, Sun P, You K, Wang J. (2017) TXNIP overexpression suppresses proliferation and induces apoptosis in SMMC7221 cells through ROS generation and MAPK pathway activation. *Oncol Rep.***18**.
55. Li S, Meng W, Guan Z, Guo Y, Han X. (2016) The hypoxia-related signaling pathways of vasculogenic mimicry in tumor treatment. *Biomed Pharmacother.* **80**, 127-135.
56. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **15**, 321-333.
57. Ling G, Ji Q, Ye W, Ma D, Wang Y. (2016) Epithelial-mesenchymal transition regulated by p38/MAPK signaling pathways participates in vasculogenic mimicry formation in SHG44 cells transfected with TGF- β cDNA loaded lentivirus in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. **49**, 2387-2398.
58. Liu HT, Xu YT, Li HY, Zhao J, Zhai HY, Chen Y. (2016) Loss of microRNA-145 expression is involved in the development and prognosis of breast cancer complicated by type 2 diabetes mellitus. *Int J Biol Markers*. **31**, e368-e374.

59. Liu W, Lv C, Zhang B, Zhou Q, Cao Z. (2017) MicroRNA-27b functions as a new inhibitor of ovarian cancer-mediated vasculogenic mimicry through suppression of VE-cadherin expression. *RNA*. **23**, 1019-1027.
60. López-Ríos O, Lascano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Hernández-Ávila M. (1997) La epidemia de cáncer de mama en México. ¿Consecuencia de la transición demográfica? *Salud Pública Mex*. **39**; 259-265.
61. Lozano, Knaul, Gómez Dantés, Arreola-Ornelas y Méndez. (2008) Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. *Fundación Mexicana para la Salud*,. 66-78.
62. Lu XS, Sun W, Ge CY, Zhang WZ, Fan YZ. (2013) Contribution of the PI3K/MMPs/Ln-5γ2 and EphA2/FAK/Paxillin signaling pathways to tumor growth and vasculogenic mimicry of gallbladder carcinomas. *Int J Oncol*. **42**, 2103-2115.
63. Ma JL, Han SX, Zhu Q, Zhao J, Zhang D, Wang L, Lv Y. (2011) Role of Twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. **408**, 686-691.
64. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. **155**, 739-752.
65. Marión RM, López de Silanes I, Mosteiro L, Gamache B, Abad M, Guerra C, Megías D, Serrano M, Blasco MA. (2017) Common Telomere Changes during In Vivo Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis. *Stem Cell Reports*. **8**, 460-475.
66. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. (2000) ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. **321**, 624-628.
67. Mei J, Gao Y, Zhang L, Cai X, Qian Z, Huang H, Huang W. (2008) VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro. *Exp Oncol*. **30**, 29-34.
68. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. **1**, 882-891.

69. Murakami T, Hiroshima Y, Miyake K, Hwang HK, Kiyuna T, et al. (2017) Color-coded intravital imaging demonstrates a transforming growth factor-beta (TGF- β) antagonist selectively targets stromal cells in a human pancreatic cancer orthotopic mouse model. *Cell Cycle*.
70. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L,. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. **10**, 5367-5374.
71. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. (2017) Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem*. **8**, 45-56.
72. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, et al . (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. **406**, 747-752.
73. Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y. (2015) Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med*. **19**, 315-326.
74. Quinta Revisión del Consenso Nacional sobre el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. (2013) *Rev Gamo*
75. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2007; **45**,157-166
76. Saito S, Lin YC, Tsai MH, Lin CS, Murayama Y, Sato R, Yokoyama KK. (2015) Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells. *Kaohsiung J Med Sci*. **31**, 279-286.
77. Secretaría de Salud. (2001) Registro histopatológico de neoplasias malignas. México: Dirección General de Epidemiología, SSa;. 5.
78. Segal RA, Bhattacharyya A, Rua LA, Alberta JA, Stephens RM, Kaplan DR, Stiles CD. (1996) Differential utilization of Trk autophosphorylation sites. *J Biol Chem*. **271**, 20175-20181.
79. Semenza GL. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. **3**, 721-732.
80. Semenza GL. (2017) Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J*. **36**, 252-259.

81. Sharma S, Patnaik PK, Aronov S, Kulshreshtha R. (2016) ApoptomiRs of Breast Cancer: Basics to Clinics. *Front Genet.* **7**, 175.
82. Shen Y, Quan J, Wang M, Li S, Yang J, Lv M, Chen Z, Zhang L, Zhao X, Yang J. (2017) Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer. *Oncotarget.*
83. Song Y, Mu L, Han X, Li Q, Dong B, Li H, Liu X. (2013) MicroRNA-9 inhibits vasculogenic mimicry of glioma cell lines by suppressing Stathmin expression. *J Neurooncol.* **115**, 381-390.
84. Sonneborn TM. (1947) A new genetic mechanism and its relation to certain types of cancer. *Q Bull Indiana Univ Med Cent.* **9**, 51-55.
85. Sonnenschein C, Soto AM. (2013) The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: A critique. *Journal of biosciences.* **38**, 651-663.
86. Spencer R. (1950) Current concepts and approaches to cancer research. *J Ky State Med Assoc.* **48**, 314-316.
87. Sun H, Zhang D, Yao Z, Lin X, Liu J, Gu Q, Dong X, Liu F, Wang Y, Yao N, Cheng S, Li L, Sun S. (2017) Anti-angiogenic treatment promotes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther.* **18**, 205-213.
88. Sun Q, Liang Y, Zhang T, Wang K, Yang X. (2017) ER- α 36 mediates estrogen-stimulated MAPK/ERK activation and regulates migration, invasion, proliferation in cervical cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**, 30781-30787.
89. Sun Q, Zou X, Zhang T, Shen J, Yin Y, Xiang J. (2014) The role of miR-200a in vasculogenic mimicry and its clinical significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* **132**, 730-738.
90. Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, Afzaljavan F, Rivandi M, Hassanian SM, Ferns GA, Pasdar A, Avan A. (2017) Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *J Cell Biochem.*
91. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, et al (2004) Reduced expression of

- the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* **64**, 3753-3756.
92. Tallquist MD, Soriano P, Klinghoffer RA. (1999) Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene.* **18**, 7917-7932.
 93. van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, Tran MG, Sciort R, Hauben E, Hogendoorn PC, et al. (2005) Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res.* **65**, 11520-11528.
 94. Vartanian AA, Burova OS, Stepanova EV, Baryshnikov AY. (2007) The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry. *Melanoma Res.* **17**, 1-8.
 95. Vartanian AA. (2012) Signaling pathways in tumor vasculogenic mimicry. *Biochemistry.* **77**, 1044-1055.
 96. Veeramani S, Igawa T, Yuan TC, Lin FF, Lee MS, Lin JS, Johansson SL, Lin MF. (2005) Expression of p66 (Shc) protein correlates with proliferation of human prostate cancer cells. *Oncogene.* **24**, 7203-7212.
 97. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, Liu S, Leung S, Geiss G, Snider J, Vickery T, et al. (2015) Development and verification of the PAM50 based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics.* **8**, 54.
 98. Wang JY, Sun T, Zhao XL, Zhang SW, Zhang DF, Gu Q, Wang XH, Zhao N, Qie S, Sun BC. (2008) Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma: role in vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther.* **7**, 758-766.
 99. Wang X, Qiu W, Zhang G, Xu S, Gao Q, Yang Z. (2015) MicroRNA-204 targets JAK2 in breast cancer and induces cell apoptosis through the STAT3/BCI-2/surviving pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* **8**, 5017-5025.
 100. Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, Eckert C, von Stackelberg A, Lottaz C, Moderegger E, Einsiedel HG, Eckardt KU, Henze G, Seeger K. (2004) Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia.* **18**, 926-933.
 101. World Health Organization (OMS), (2014). "noncommunicable diseases: Country Profile".

102. Wu N, Zhao X, Liu M, Liu H, Yao W, Zhang Y, Cao S, Lin X. (2011) Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2. *PLoS One*. **6**, e16264.
103. Xu S, Zhang J, Xue H, Guo X, Han X, Li T, Guo X, Gao X, Liu Q, Li G. (2017) MicroRNA-584-3p reduces the vasculogenic mimicry of human glioma cells by regulating hypoxia-induced ROCK1 dependent stress fiber formation. *Neoplasma*. **64**, 13-21.
104. Xue H, Gao X, Xu S, Zhang J, Guo X, Yan S, Li T, Guo X, Liu Q, Li G. (2016) MicroRNA-Let-7f reduces the vasculogenic mimicry of human glioma cells by regulating periostin-dependent migration. *Oncol Rep*. **35**, 1771-1777.
105. Yip KW, Reed JC. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. **27**, 6398-6406.
106. Zhang L, Wang X, Chen P. (2013) MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *BMC Cancer*. **13**, 290.
107. Zhang L, Zhu S, Shi X, Sha W. (2015) The silence of p66(Shc) in HCT8 cells inhibits the viability via PI3K/AKT/Mdm-2/p53 signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 9097-9104.
108. Zhang S, Zhang D, Sun B. (2007) Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett*. **254**, 157-164.
109. Zhang X, Song Q, Wei C, Qu J. (2015) LRIG1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via suppression of the EGFR/PI3K/AKT pathway and epithelial-to-mesenchymal transition in human glioma SHG-44 cells. *Cell Stress Chaperones*. **20**, 631-641.
110. Zheng M, Sun X, Li Y, Zuo W. (2016) MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour Biol*. **37**, 8189-8196.

IX. ANEXOS

Preparación de Buffer Fosfato Salino (PBS) 10x, pH. 7.4

Reactivos	Cf	100 mL
NaCl	1.380 M	80.6 g
KCl	30 mM	2.2 g
KH ₂ PO ₄	15 mM	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	81 mM	11.5 g
H ₂ O	Cbp	1 L

Preparación de solución RF1 para células ultracompetentes, ajustar el pH. 5.8 ácido acético 0.2 M.

Reactivos	Cf	500 mL
RbCl	100 mM	6 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	50 mM	4.9 g
Ack	30 mM	1.47 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	10 mM	0.75 g
Glicerol	15 %	59.5 mL
H ₂ O	cbp	500 mL

Preparación de solución RF2 para células ultracompetentes, ajustar el pH. 6.8 con hidróxido de sodio.

Reactivos	Cf	100 mL
RbCl	10 mM	0.12 g
MOPS	10 mM	2 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O	75 mM	1.1 g
Glicerol	75 %	17.0 mL
H ₂ O	cbp	100 mL

Medio SOB

Reactivos	Cf	100 mL
Bactotripton	2 %	2 g
Extracto de levadura	0.5 %	0.5 g
NaCl	10 mM	0.05 g
KCl	2.5 mM	0.018 g
H ₂ O	cbp	100 mL

❖ Soluciones para ensayos de inmunodetección

TNTE

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

Geles de acrilamida

- Separador

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

- Concentrador

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

Tris Glicina 10 X

Tris-base...30 g

Glicina.....144 g

H₂O.....cbp 1 L

Buffer de transferencia

Tris-glicina 10 x...100 mL

Metanol.....200 mL

H₂O.....cbp 1 L

Buffer de corrida

Tris-glicina 10 x...100 mL

SDS 10 %.....200 mL

H₂O.....cbp 1 L

TAE 50 X

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

Ac. acético [1M]...57.1 mL

EDTA [0.05 M]....18.612 g

H₂O cbp.....1000 mL



❖ Parámetros de RT-PCR

- Retrotranscripción (RT)

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

Parámetros de ciclaje en el termociclador para RT

Temperatura

16 °C...30 min

42 °C...30 min

85 °C...5 min

4 °C.....∞

- PCR- tiempo real con sondas TaqMan

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

Parámetros de ciclaje en el termociclador para PCR

95 °C...10 min

95 °C...15 seg
 60 °C...1 min

40 ciclos

4 °C.....∞

-

-

- PCR colony

Reactivos	Cf	Vol (20 µL)
dNTP's	10 mM	1 µL
Buffer de PCR	10 x	2 µL
MgCl ₂	50 mM	0.6 µL
Primer sentido	10 µM	1 µL
Primer antisentido	10 µM	1 µL
Taq Pol	10 unit	0.1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	----	15.9 µL

Parámetros de ciclaje en el termociclador para PCR colony

94 °C...10 min

94 °C...30 seg	} 25-35 ciclos
~55 °C...30 seg	
72 °C...1 min/Kb	

4 °C.....∞

- PCR de secuenciación

Reactivos	Cf	Vol (20 µL)
Buffer de PCR	10 x	2 µL
Primer antisentido	10 µM	1 µL
Bigdye	--	2 µL
Plásmido	400-600 ng	--
H ₂ O libre de nucleasas	cbp	20 µL

Parámetros de ciclaje en el termociclador para PCR de secuenciación

96 °C...6 min

96 °C...10 seg	} 40 ciclos
50 °C...10 seg	
60 °C....4 min	

60 °C ...10 seg

4 °C.....∞

**PREMIO NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
DR. GUILLERMO MONTAÑO 2017**

**El angiomiR mir-204 reprime el mimetismo
vasculogénico a través de la inhibición de
múltiples rutas de señalización
VEGF/PI3K/AKT/FAK/SRC/RAF1
en cáncer de mama.**

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

BIOL. YARELY MARLENE SALINAS VERA

DRA. LAURENCE A. MARCHAT

Laboratorio del posgrado en Ciencias Genómicas
de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México,
Plantel del Valle



**Congreso 35
Nacional
Congreso
Internacional
de Oncología**

**Querétaro, Qro.
17 al 21 de octubre**



c4asupport <c4asupport@costruman.com>
 25 ago. ☆ ↶ ↷

para mí ▾

🇺🇸 inglés ▾ > 🇪🇸 español ▾ Traducir mensaje

Desactivar para: inglés x

Dear Dr. **Tarely Vera**

Your abstract # B59, **"Multi-targeting of PI3K-AKT/MAPK/FAK signaling by miR-204 inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells"** has been accepted for poster presentation at the 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium™, December 5-9, 2017.

The first digit of your assigned program number indicates the poster session to which it is assigned (for example, P4-05-04 would be presented in Poster Session 4, and OT2-01-05 would be presented in Ongoing Trials Poster Session 2). Use the full program number below whenever referencing your abstract and poster and when contacting the SABCS™ office.
 Program Number: P5-09-01

Your poster presentation details are as follows:

Session Title: Tumor cell and molecular biology: Angiogenesis

Session Date: Friday, 12/8/2017

Session Time: 5:00:00 PM-7:00:00 PM

All poster sessions will take place in Hall 1. Please refer to the SABCS Poster Schedule by clicking [here](#) for set-up times and other information regarding all poster & poster discussion sessions.

The San Antonio Breast Cancer Symposium has selected Call4Posters™ as their preferred poster printing service for their upcoming 2017 Symposium. This service is the simple and most convenient way to print your FREE poster and pick it up on-site at the Symposium in San Antonio, Texas. Please refer to www.call4posters.com/sabcs for further information, contact LDI at (800) 450-4194 (with in the United States), or email to posters@vpitarkilover.com. (The Call4Posters website is undergoing improvements at this time. You will receive an e-mail by the end of September when the new site is launched.) Posters will be made available to attendees and the interested professional community through a QR code which SABCS will assign to each poster. The QR codes will be added to the poster display boards by SABCS staff.

MicroRNAs driving invasion and metastasis in ovarian cancer: Opportunities for translational medicine (Review)

CARLOS PALMA FLORES^{1*}, RAÚL GARCÍA-VÁZQUEZ^{2*}, DOLORES GALLARDO RINCÓN³,
ERIKA RUIZ-GARCÍA³, HORACIO ASTUDILLO DE LA VEGA⁴, LAURENCE A. MARCHAT²,
YARELY M. SALINAS VERA⁵ and CÉSAR LÓPEZ-CAMARILLO⁵

¹Catedrático CONACYT and ²Molecular Biomedicine Program and Biotechnology Network, Instituto Politécnico Nacional; ³Translational Medicine Laboratory, National Institute of Cancerology; ⁴Laboratory of Translational Cancer Research and Cellular Therapy, National Medical Center 'Siglo XXI'; ⁵Autonomous University of Mexico City, Genomics Sciences Program, Mexico City, Mexico

Received September 6, 2016; Accepted February 15, 2017

DOI: 10.3892/ijo.2017.3948

Abstract. Epithelial ovarian cancer is the fifth most frequent cause of cancer death in women. In spite of the advantages in early detection and treatment options, overall survival rates have improved only slightly in the last decades. Therefore, alternative therapeutic approaches need to overcome resistance and improve the patient survival and outcome. MicroRNAs are evolutionary conserved small non-coding RNAs that function as negative regulators of gene expression by inhibiting translation or inducing degradation of messenger RNAs. In cancer, microRNAs are aberrantly expressed thus representing potential prognostic biomarkers and novel therapeutic targets. The knowledge of novel and unexpected functions of microRNAs is rapidly evolving and the advance in the elucidation of potential clinical applications deserves attention. Recently, a specific set of microRNAs dubbed as metastamiRs have been shown to initiate invasion and metastasis in diverse types of cancer. We reviewed the current status of microRNAs in development and progression of ovarian cancer with a special emphasis on tumor cells invasion and metastasis. Also, we show an update of microRNA functions in oncogenic pathways and discuss

the current scenario for potential applications in clinical and translational research in ovarian cancer.

Contents

1. Introduction
2. MicroRNAs: novel regulators of gene expression
3. OncomiRs: microRNAs with key roles in cancer
4. Epithelial to mesenchymal transition: a key mechanism for invasion and metastasis
5. MicroRNAs are negative regulators of epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer
6. MetastamiRs: microRNAs driving invasion and metastasis in ovarian cancer
7. Possible exploitation of microRNAs in precision medicine
8. Conclusion

1. Introduction



© 2016 Adobe

2017CBT10571 Receipt of New Paper by Cancer Biology & Therapy

Recibidos x



cancerbiologytherapy@msubmit.net

23 ago. ☆



para genomics, genomics, mi, reichy90, dgallardor, betzabe100, hastud2, lmarchat



inglés ▾



español ▾

[Ver mensaje traducido](#)

[Traducir siempre: inglés](#)

Dear Dr. López-Camarillo,

On August 23, 2017, we received your manuscript entitled "**AngiomRs: MicroRNAs Driving Angiogenesis in Cancer**" by Yarely Salinas-Verá, Raquel Echavarría-Zapeda, Dolores Gallardo-Rincón, Erika Ruiz-García, Horacio Astudillo de la Vega, Laurence Marchat, and César López-Camarillo.

Your manuscript has been assigned the Manuscript #: 2017CBT10571.

This letter has been copied to all listed contributing authors. If you are NOT an author of this paper, please contact me via reply email immediately.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://cbt.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A6BJ7Eak1A3NeA4F4A9ftdY6QBWmtXtchyUB9FSIZAZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your work to the Cancer Biology & Therapy.

Sincerely,

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.