



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Alteraciones en los perfiles de
expresión de miRNA en pacientes
mexicanas con cáncer de mama

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

PRESENTA

SANDRA LORENA ROMERO CÓRDOBA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MEXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Comité tutorial:

Dr. Rafael Villalobos Molina	Presidente
Dr. Santiago Martínez Calvillo	Vocal
Dr. Alfredo Hidalgo Miranda	Secretario
Dr. Serrgio Vaca Pacheco	Suplente
M. en C. Ma. de Jesús Laura Castañeda Partida	Suplente

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo incondicional, por sus sabios consejos, por estar en todo momento para escucharme, para brindarme una palabra de aliento, por preguntar cómo iba todo, por darme su sabia opinión al enfrentar nuevos retos y proyectos. Gracias por que sin ustedes este sueño jamás se hubiera vuelto realidad, gracias por estar siempre en mi vida.

A mis maestros por formarme, por brindarme el conocimiento biológico pero más importante por enseñarme parte de la vida, por exigirme y por felicitarme en cada loro. Gracias por su tiempo, su apoyo y amistad.

A mi tutor Alfredo Hidalgo que me abrió la puerta a nuevos retos, a nuevas posibilidades y a nuevos proyectos. Gracias por enseñarme que el laboratorio no sólo es trabajo también es una experiencia de vida, gracias, también por tu confianza y apoyo.

A los investigadores de INEMGEN Laura, Mauricio y Valeria por brindarme su tiempo para enseñarme el trabajo de laboratorio y por siempre tener una frase chusca para alegrar el día

A Luis por estar conmigo en todo momento, por soportar los malos días y apoyarme en los momentos difíciles y por felicitarme en los logros. Gracias por forma parte en este trayecto de vida.

A mi muy querida universidad porque simplemente soy de piel dorada y puma de corazón.

Al FUCAM por abrirnos sus puerta para la recolección de muestras haciendo posible la realización de este trabajo.

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
GENERALIDADES DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	7
GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	10
CÁNCER DE MAMA.....	11
<i>Tipos de cánceres de la glándula mamaria</i>	12
<i>Tratamiento</i>	14
CÁNCER: UN NUEVO RETO EN LA SALUD PÚBLICA.....	14
<i>Estadísticas del cáncer de mama, en México y el mundo</i>	16
BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA.....	18
BIOLOGÍA MOLECULAR DE MIRNAS.....	21
<i>Maquinaria de síntesis y maduración de miRNA</i>	24
<i>Regulación de miRNA</i>	29
<i>miRNA: futuras herramientas diagnósticas y terapéuticas</i>	31
MIRNA Y CÁNCER.....	33
<i>miRNA y cáncer de mama</i>	35
<i>Rol de los miRNA en el cáncer de mama metastásico</i>	44
PCR EN TIEMPO REAL: UNA HERRAMIENTA PARA EL ANÁLISIS DE MIRNA.....	45
JUSTIFICACIÓN.....	51
OBJETIVOS.....	52
OBJETIVO GENERAL.....	52
OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
HIPÓTESIS	52
MATERIALES Y MÉTODO.....	53
RESULTADOS.....	58
INFORMACIÓN CLÍNICA DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	59
EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	59
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	61
REPLICADOS TÉCNICOS Y CORRELACIÓN ENTRE LAS MUESTRAS PROCESADAS.....	64
PERFILES DE EXPRESIÓN DE MIRNA.....	68
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS MIRNA QUE CONFORMA EL PERFIL TUMORAL.....	72
PREDICCIÓN DE POSIBLES BLANCOS.....	73
ESTRATIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	85
CORRELACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE MIRNA CON ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS.....	85
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIÓN	98
ANEXOS	100
ANEXO A.....	100

<i>Extracción con trizol</i>	100
<i>Extracción con kit MirVana</i>	100
ANEXO B	102
<i>Plataforma de arreglos de baja densidad Megaplex</i>	102
ANEXO C	103
<i>miRNA evaluados en cada placa del arreglo de baja densidad Megaplex</i>	103
ANEXO E	105
REFERENCIAS	109

Resumen

Los microRNAs son transcritos de entre 21 y 25 nt que participan en el control de la expresión génica a través de su hibridación con los RNA mensajeros blancos, inhibiendo su traducción. De manera normal los miRNA participan en procesos de diferenciación, crecimiento y muerte celular. Las alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs contribuyen a la aparición y desarrollo del cáncer, actuando como oncogenes o como supresores de tumor. Los perfiles de expresión de miRNA podrían ser también herramientas de diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama.

El cáncer de mama representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, entre las mujeres siendo un importante problema de salud que ha sido abordado desde diversos niveles celulares. El establecimiento de perfiles de expresión de miRNA constituye una de las metodologías que permiten distinguir el cáncer de mama de otro tipo de neoplasias, así como para identificar los distintos subtipos tumorales.

En este trabajo se evaluaron un total de 45 muestras; 25 muestras de tejido tumoral de cáncer de mama de pacientes mexicanas sin tratamiento previo y 20 muestras de tejido normal adyacente, extrayendo con el método de trizol el RNA total incluyendo la fracción pequeña (miRNA). La integridad del RNA total y el porcentaje de la fracción pequeña se evaluaron mediante electroforesis capilar con el sistema Bioanalyzer. La expresión de miRNAs se evaluó usando la plataforma Megaplex PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Este sistema analiza 667 miRNA en un juego de dos arreglos de baja densidad.

Esta investigación permitió estandarizar, de forma exitosa, el procedimiento de extracción de RNA total, así como los métodos para evaluar la presencia de la fracción de miRNAs y los procesos de control de calidad del mismo. De igual forma, este trabajo ha permitido establecer la metodología de análisis de miRNAs con la plataforma de arreglos Megaplex en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos del análisis comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) realizado con el software Data Assist v 1.0, mostró que existen diferencias en los perfiles de expresión de miRNA entre el tejido normal y el tumoral, expresándose aberrantemente un conjunto de 65 miRNA en las muestras tumorales. Los miRNA significativamente desregulados son *miR-411*, *miR-874*, *miR-125b*, *miR-488*, *miR-29c*, *miR-337-5p*, *miR-192**, *miR-136**, *miR-132**, *miR-744** que están subexpresados; y *miR-326*, *miR-431*, *miR-548d-3p*, *miR-96*, *miR-210* que están sobreexpresados. Mediante un análisis matemático correlacionamos la expresión alterada de estos miRNA y su acción

sobre sus posibles blancos putativos con ciertas rutas celulares que pudieran estar siendo alteradas por dichos transcritos; entre las que se encuentran la ruta de las MAP cinasas, del oncogen HER2 y su relación con HER3, procesos oncogénicos en los que se involucra la familia RAS y procesos de muerte celular.

Palabras clave: miRNA, cáncer de mama, perfiles diferenciales de expresión, pacientes mexicanas.

Introducción

Generalidades de la glándula mamaria.

La glándula mamaria es una de las características anatómicas, morfológicas y fisiológicas única de mamíferos; es un órgano productor de leche, el cual brinda diversos nutrientes a la descendencia. La mama es una estructura evolutiva que genera diversos beneficios tanto para la progenitora como a la progenie. El proceso de amamantar beneficia a la madre pues promueve la involución uterina posparto y la progenie recibe inmunidad pasiva a través de la leche (Arraztoa, 2004; Bland y Copeland, 2007) (Fig. 1).

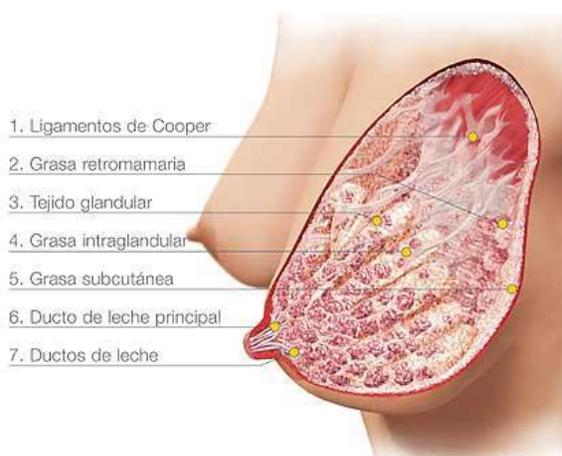


Fig. 1 Anatomía de la glándula mamaria. Tomado de www.medelasmml.com.ar

La mama está constituida primordialmente por la glándula mamaria (tejido secretor), anexa al tejido cutáneo por lo que su origen embriológico es ectodérmico. Posee una forma hemiesférica y está localizada entre la segunda y la sexta costillas, prologándose hasta la axila; la estructura principal está constituida por parénquima (tejido funcional) y por el epitelio glandular; así como por el estroma formado por tejido conjuntivo (mesénquima) que brinda sostén a toda la mama. El elemento glandular presenta

conductos galactóforos, denominados lóbulos, que se abren en el pezón y se subdividen en estructuras más pequeñas llamadas lobulillos (Arraztoa, 2004; Bland y Copeland, 2007).

Durante el desarrollo embrionario comienza la formación y diferenciación del tejido mamario en ambos sexos. Para la sexta semana de desarrollo embrionario se forman los primordios mamarios, a lo largo de la zona anterior del tronco, como dos engrosamientos epiteliales conocidos como crestas mamarias o líneas lácteas. Los dos tercios inferiores desaparecen a lo largo del desarrollo (Arraztoa, 2004).

En la 13ª semana de desarrollo los cuerpos mamarios emiten conductos galactóforos al mesénquima subyacente. Durante el tercer semestre estos conductos son inducidos por el mesodermo para desarrollar las células epiteliales secretoras. La inducción es realizada principalmente por los fibroblastos que expresan receptores a estrógenos, progesterona y testosterona, y por los

preadipocitos, los cuales controlan la ramificación de los conductos (Fig. 2.) (Arraztoa, 2004).

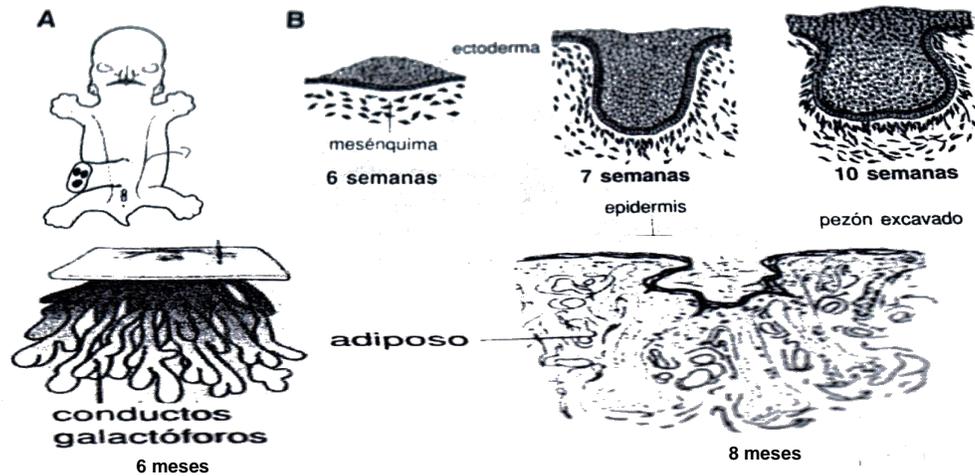


Fig 2. Desarrollo embriológico de la glándula mamaria. Tomado de Arraztoa, 2004.

Durante esta etapa embrionaria hay un claro dimorfismo sexual. Mientras que en las mujeres, los niveles bajos de testosterona permiten que los cordones vayan incursionando al mesodermo, en el hombre los altos niveles de esta hormona detienen el desarrollo primario en la semana 15 (Fig. 3) (Arraztoa, 2004).

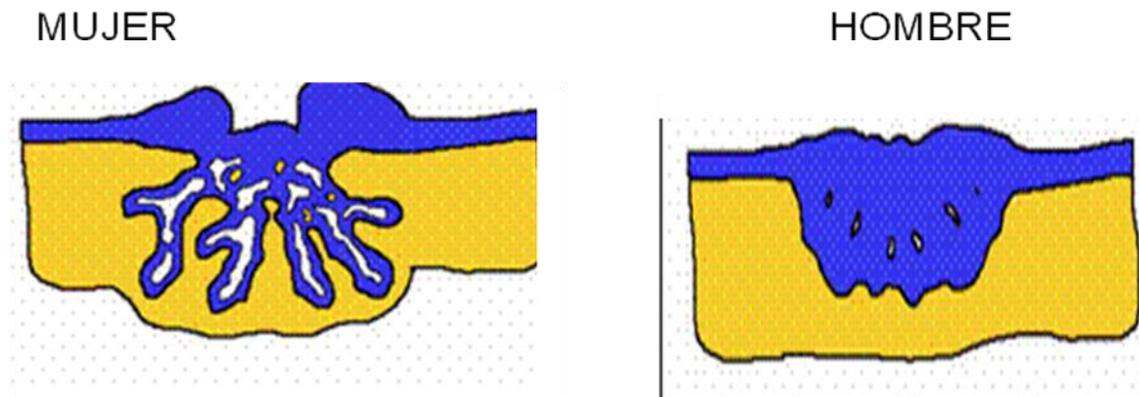


Fig. 3. Dimorfismo sexual en el desarrollo de la mama bajo la influencia de testosterona en la embriogénesis. Tomado de:

<http://www.mastologia.net/contenidospecial/2anatomiya/EMBRIOLOGIA.HTML>

Diversas biomoléculas tienen un rol fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria, sobresaliendo las diferentes hormonas como estrógenos, que estimulan crecimiento y diferenciación del epitelio ductal y conectivo, y la progesterona, la cual es necesaria para el desarrollo del lóbulo alveolar y la diferenciación de las células epiteliales alveolares. Otras hormonas de gran relevancia son: la hormona

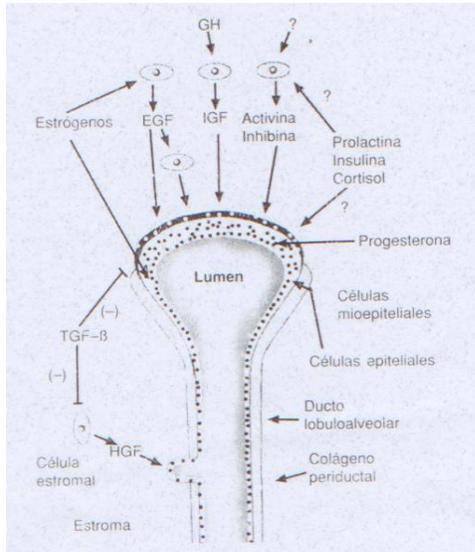


Fig. 4. Participación de las hormonas en el desarrollo mamario. Tomado de Arraztoa, 2004.

del crecimiento que estimula la maduración epitelial y el metabolismo para la producción de leche durante la lactancia; la prolactina, necesaria para la ramificación lateral de los ductos y la hormona paratiroidea, que permite el desarrollo normal del sistema ductal (Fig. 4) (Arraztoa, 2004; Roses, 2005).

El desarrollo de la mama es un proceso continuo que abarca gran parte de la vida de las mujeres. La segunda etapa de desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria ocurre en la pubertad, periodo en el que las hormonas estimulan el desarrollo de la glándula funcional, seguida por el estado adulto en el que los ductos galactóforos desembocan en el pezón y el tejido glandular se extiende hasta los

extremos de la mama. Las últimas etapas tienen lugar durante el embarazo, cuando ocurre un cambio en la arquitectura ductal a una estructura lóbulo-alveolar y durante la lactancia, tiempo durante el cual se produce leche (Fig. 5) (Arraztoa, 2004; Bland y Copeland, 2007).

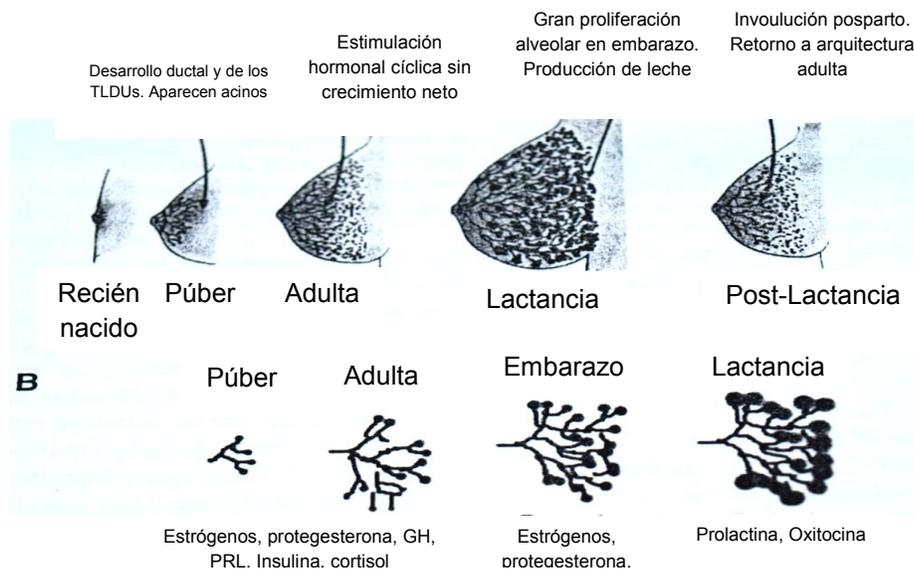


Fig. 5. Desarrollo mamario en la etapa de la pubertad, estadio adulto, embarazo y lactancia. Tomado de Arraztoa, 2004.

Generalidades del cáncer.

El cáncer es una patología en la que la división celular es anormal y sin ningún control, con proliferación no restringida capaz de invadir otros tejidos normales a través de los sistemas sanguíneo y linfático, y metastatizar a otros órganos. El cáncer no es una enfermedad, es el cúmulo de varias patologías, y tan diverso que en los seres humanos existen más de 100 tipos de cánceres (National Cancer Institute, 2008; Stratton *et. al.*, 2009).

El cáncer se origina en las células cuando su material genético (DNA) cambia o es dañado. produciendo mutaciones que afectan el crecimiento y la división celular normal; cuando esto ocurre las células no mueren cuando deberían y la formación de nuevas células ocurre cuando el cuerpo no las requiere, esas células extras pueden generar una masa de tejido denominado tumor (Fig. 6) (National Cancer Institute, 2008). El desarrollo del cáncer se basa, primordialmente, en dos procesos: la adquisición continua de variaciones genéticas individuales debido a mutaciones al azar y a la selección natural que actúa sobre la diversidad de fenotipos resultantes; así las células que poseen una alteración que les confiere la capacidad de proliferar y sobrevivir son más efectivas que las células vecinas, pues poseen una mutación ventajosa. De esta forma, el genoma del cáncer es la acumulación de mutaciones adquiridas a lo largo de la vida del paciente, de las cuales una fracción muy pequeña se han convertido en mutaciones fijas promoviendo el desarrollo tumoral (Stratton *et. al.*, 2009).

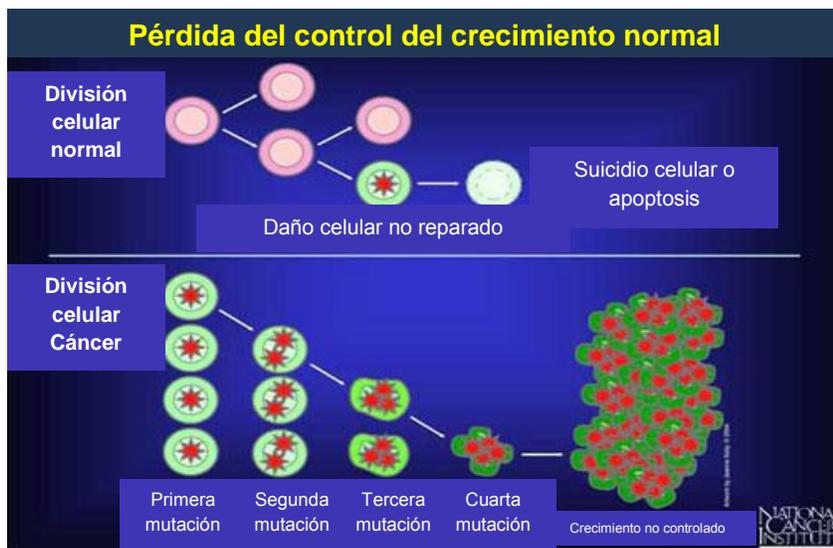


Fig. 6. Crecimiento celular normal celular y durante el desarrollo de cáncer.
Tomado de National Cancer Institute, 2008.

Las mutaciones somáticas presentes en el genoma del cáncer se deben a muy variadas clases de cambios en la secuencia del DNA, incluyendo sustituciones de una sola base, inserciones o deleciones de pequeños o largos fragmentos,

rearreglos, incremento en el número de copias, inserciones de material exógeno, entre otros (Stratton *et. al.*,2009).

Los tipos tumorales se agrupan en diferentes categorías según su origen:

- ✓ Carcinomas: Comienzan en la piel o en tejidos cubiertos por epitelio en órganos internos.
- ✓ Sarcoma: Comienza en hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos o cualquier otro tejido conectivo o de soporte.
- ✓ Leucemia: Comienza en el tejido sanguíneo causando un gran número de células sanguíneas anormales.
- ✓ Linfoma y mielomas: Comienza en el sistema inmune.
- ✓ Cáncer del sistema nervioso central: Comienza en el tejido cerebral y columna vertebral.

Cáncer de mama

Se forma en el tejido mamario, usualmente en los conductos y lóbulos, a causa de la acumulación de daños en el material genético, causados por mutaciones e inducciones en la proliferación celular. Las mutaciones pueden ocurrir en genes críticos en la regulación del crecimiento, muerte y diferenciación celular generando la patología mamaria (Roses, 2005; National Institute of Cancer, 2008) (Tabla 1).

La transformación de las células mamarias normales a células tumorales depende de la alteración de genes causada por factores internos (procesos intracelulares y extracelulares) y externos (exposición a factores radioactivos, mutagénicos y cancerígenos). Los procesos internos abarcan gran variedad de mecanismos como exposición a estrógenos, siendo este aspecto un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer, y mutaciones de genes que incrementan la propensión al cáncer.

Factores de riesgo. A continuación se enlistan los principales factores que contribuyen al desarrollo de cáncer de mama:

- Ⓢ Peso: El sobrepeso, sobre todo en mujeres postmenopáusicas. El tejido graso es una fuente importante de estrógenos después de la menopausia, cuando los ovarios dejan de producir hormonas. Así, cuando se tiene mucho tejido graso también se presentan mayores niveles estrogénicos.
- Ⓢ Consumo de alcohol: diversos estudios muestran que se incrementa el riesgo a padecer cáncer pues el alcohol limita la capacidad del hígado de controlar los niveles hormonales.

- Ⓢ Exposición a estrógenos: Ya que los estrógenos favorecen el crecimiento celular, el estar expuesto por largos periodos de tiempo, sin pausas, aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama:
 - Comienzo de menstruación a edades tempranas (antes de los 12 años)
 - Inicio de la menopausia a edades avanzadas (después de los 55 años)
 - Exposición de estrógenos (ambiente hormonal adverso): administración de suplementos hormonales, anticonceptivos estrogénicos y exposición ambiental.
- Ⓢ Sexo: las mujeres tienen un mayor riesgo ya que las células mamarias de la mujer están continuamente en cambio y crecimiento, principalmente por la acción del estrógeno y la progesterona.
- Ⓢ Edad e historia personal: una edad mayor a los 40 años, padecimiento previo de cáncer en una mama y cambios fibroquísticos significativos en la estructura mamaria.
- Ⓢ Historia familiar: Familiares de grado directo con cáncer de mama.
- Ⓢ Raza: Las mujeres de raza blanca tienen mayor propensión que las Afroamericanas, Asiáticas, Hispanas y Nativas Americanas.
- Ⓢ Embarazo y lactancia: Edad del primer embarazo y tiempo de lactancia, estos aspectos disminuyen el número de ciclos menstruales y por tanto la exposición a estrógenos.

(Arraztoa, 2004; Roses, 2005; Bland y Copeland, 2007; National Institute of Cancer, 2008).

Tipos de cánceres de la glándula mamaria

Tabla 1. Principales tipos de cáncer mamario de acuerdo a su origen. (Pérez-Tamayo, 2007).

Origen de tumor	Tipo de Tumor	Características Patológicas	Epidemiología y Pronóstico
Epitelio glandular (adenocarcinoma de mama)	Carcinoma Ductal	5 subtipos: 1. Intraductal 2. Ductal infiltrante 3. Medular 4. Mucinoso 5. Papilar. Se distingue como lesiones en los conductos galactóforos, generalmente en forma de nódulos.	Es el más común de los cánceres de mama (aproximadamente el 80% de los casos). El intraductal es el más común dentro de los no invasivos mientras que el infiltrante es el invasivo más común. El pronóstico depende del grado de infiltración y diferenciación del tumor.

	Carcinoma lobulillar	Dos tipos: 1. <i>In situ</i> 2. Infiltrante. Se le localiza en los lobulillos secretores de leche, como nódulo.	Tumores raros, por lo general aparecen en mujeres jóvenes. Su pronóstico depende del grado de infiltración y diferenciación del tumor.
	Enfermedad de Paget	Lesión de tipo eccematoso que afecta la región aureolar.	Poco común (1 a 2 % de los casos de CA de mama). Tiene mal pronóstico por su diagnóstico tardío.
Tejido mesenquimatoso (sarcoma de mama)	Cistosarcoma filoide	Tumores de aspecto escamoso con un patrón en forma de hojas, muy celularizado.	Representan menos del 1% de los tumores mamarios. Se presentan en mujeres de edad avanzada, con un comportamiento agresivo y mal pronóstico.
	Angiosarcoma mamario	Masas hemorrágicas mal definidas muy vascularizadas con células endoteliales en mitosis.	Representa menos del 0.5% de los tumores de mama. Presentes en mujeres en la segunda o tercera décadas de la vida, con muy mal pronóstico y mortandad elevada, debido al elevado grado de metástasis
Metástasis a la mama	Tumor secundario: Metástasis de tumor primario a la mama.	Tumores primarios que metastatizan a la mama: linfomas, leucemias, melanomas, Cáncer de pulmón y endometrio.	Su pronóstico es malo por el estadio avanzado del cáncer.

Tratamiento.

A lo largo de los años el tratamiento del cáncer de mama ha ido evolucionando y han surgido nuevas terapias. El tratamiento hormonal era ya una opción, al menos teórica, a comienzo del siglo XX para el manejo del cáncer de mama; los primeros

intentos fueron los de crear un envejecimiento prematuro para eliminar las fuentes hormonales, mediante un proceso denominado ooforecomía. Para la segunda mitad del siglo XX se popularizó el uso de este tratamiento junto con la adralectomía que inhibe las fuentes de estrógenos del organismo. En los últimos años el tamoxifeno y otros moduladores selectivos de receptores estrogénicos se han desarrollado para el tratamiento y prevención del cáncer de mama (Bland y Copeland, 2007).

Por otro lado el uso de moléculas químicas, como el arsénico, para la erradicación de las células tumorales tiene una gran historia, la cual comienza durante los últimos años del siglo XIX. A lo largo del tiempo diversas investigaciones emplearon otras sustancias con acción alquilante, intercalantes y antagonistas de pirimidinas y purinas. Hoy en día se cuenta con una gran variedad de sustancias antineoplásicas y su uso múltiple se ha popularizado. Asimismo, durante estas últimas décadas la mastectomía (disección de ganglios mamarios) ha representando un tratamiento eficiente del cáncer de mama, aunque este método tradicional es muy agresivo y es una de las últimas opciones en el tratamiento del cáncer de mama (Bland y Copeland, 2007).

La nueva era de la biología molecular en el tratamiento del cáncer de mama ha tenido grandes avances durante los últimos años, sobre todo a partir de la descripción del genoma humano. Durante este periodo la biología molecular ha permitido tener un mejor entendimiento del desarrollo y comportamiento del cáncer de mama lo que permitirá desarrollar nuevas terapias. A continuación se citan varios ejemplos: la identificación de los genes cancerígenos *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales al estar mutados aumentan el riesgo de padecer cáncer; la determinación de la contribución de los estrógenos al desarrollo de cáncer de mama, los cuales brindan al tumor la capacidad proliferativa; y la identificación de los genes que codifican para los receptores transmembranales *HER*, que se unen a factores de crecimiento; en cáncer de mama se presenta frecuentemente desregulada la expresión de *HER1* y *HER2*, lo cual tiene efecto en la tumorigénesis, invasión y metástasis (Roses, 2005; Bland y Copeland, 2007).

Cáncer: un nuevo reto en la salud pública.

El cáncer, es en la actualidad uno de los mayores retos en la salud pública mundial, pues es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad que va en aumento. Se prevé que las muertes a causa del cáncer aumentarán un 45% entre 2007 y 2030, pasando de 7.9 millones a 11.5 millones de defunciones,

mientras que el diagnóstico de nuevos casos de cáncer también aumentará de 11.3 millones en 2007 a 15.5 millones en 2030 (OMS, 2008).

La epidemiología y la demografía de este padecimiento son interesantes. En la mayoría de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa de muerte siguiendo a las enfermedades cardiovasculares, mientras que en los países en vías de desarrollo y subdesarrollados como Latinoamérica y Asia (Fig. 7), la incidencia es más alta, correspondiendo a estos países el 50% de los casos de cáncer que se registran año con año; asimismo, cerca del 72% de las muertes por cáncer en 2007 ocurrieron en estos países (OMS, 2008; OMS 2009).

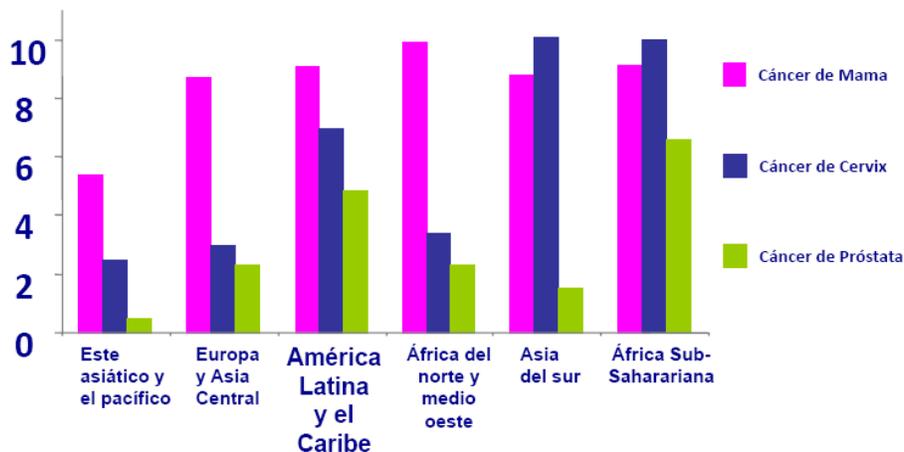


Fig. 7. Porcentaje de cánceres de mama, cervix y próstata en las diversas regiones del mundo. Fuente: Estimaciones de Brown, M. L., S. J. Goldie, et al. (2006). Health service interventions for cancer control in developing countries. Disease Control Priorities in Developing Countries, 2º ed.

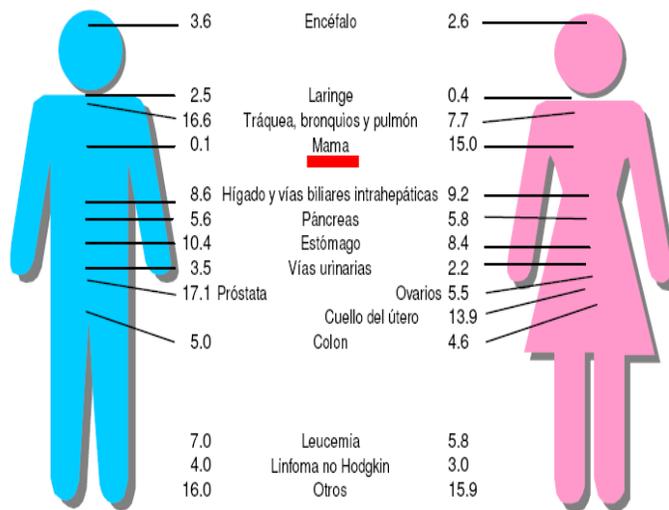
Si bien hoy en día contamos con mejores métodos de detección temprana y tratamiento, son muchos los factores que determinan la aparición y desarrollo del cáncer, como el modo de vida, la esperanza de vida cada vez mayor, el entorno laboral o el medio ambiente (contaminación aérea), radiación (por ejemplo ultravioleta o ionizante) algunas infecciones y desregulación de los procesos biológicos, por ello el estudio del cáncer es un reto científico y tecnológico, cuya comprensión brindará nuevas y mejores soluciones (OMS, 2009).

Las estadísticas revelan que los cánceres con mayor número de muertes anuales a nivel mundial corresponden a pulmón, estómago, hígado, colon y mama, de los cuales al menos el 30% de los decesos son prevenibles (OMS, 2009); por ello el estudio del cáncer de forma interdisciplinaria es vital para su entendimiento y mejora de tratamiento y diagnóstico.

Estadísticas del cáncer de mama, en México y el mundo

En el año 2007, se diagnosticaron 1.3 millones de nuevos casos de cáncer de mama en el mundo y más de 465 000 mujeres murieron por esta enfermedad, representando la primera causa de muerte por cáncer en países desarrollados y la segunda causa de morbi-mortalidad en la mayoría de los países en vías de desarrollo (American Cancer Society, 2007).

Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos según sexo, 2006



La distribución es para cada sexo

Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2006. Base de datos.

Fig. 8. Distribución porcentual de los principales cánceres en México. Fuente: INEGI, 2008.

El cáncer de mama en México es la primera causa de muerte en mujeres, correspondiendo al 15% del total de los tumores, lo cual puede explicarse por diversas hipótesis, por ejemplo la mayor edad del primer embarazo y el menor número de embarazos por mujer, disminución en los tiempos de lactancia, terapias de reemplazo hormonal, factores ambientales y nutrimentales, transición epidemiológica, entre otros (INEGI, 2008; Knaul *et.al.*, 2008) (Fig. 8). Para el 2006 4,451 mujeres murieron a causa de esta enfermedad, abarcando un rango de edad muy diverso, desde los 20 años hasta los 64 (Fig.9). Los datos sobre su detección revelan que para el año 2020 se prevén 16 500 casos nuevos (Knaul *et.al.*, 2008); asimismo, de acuerdo con las cifras de la Secretaría de Salud 46% de las pacientes mexicanas padecen esta enfermedad antes de cumplir 50 años; esto es, la incidencia de cáncer de mama en nuestro país se presenta una década antes que en las poblaciones Europeas o Estadounidenses, lo cual puede deberse a la estructura poblacional en la que hay un amplio porcentaje de población joven.

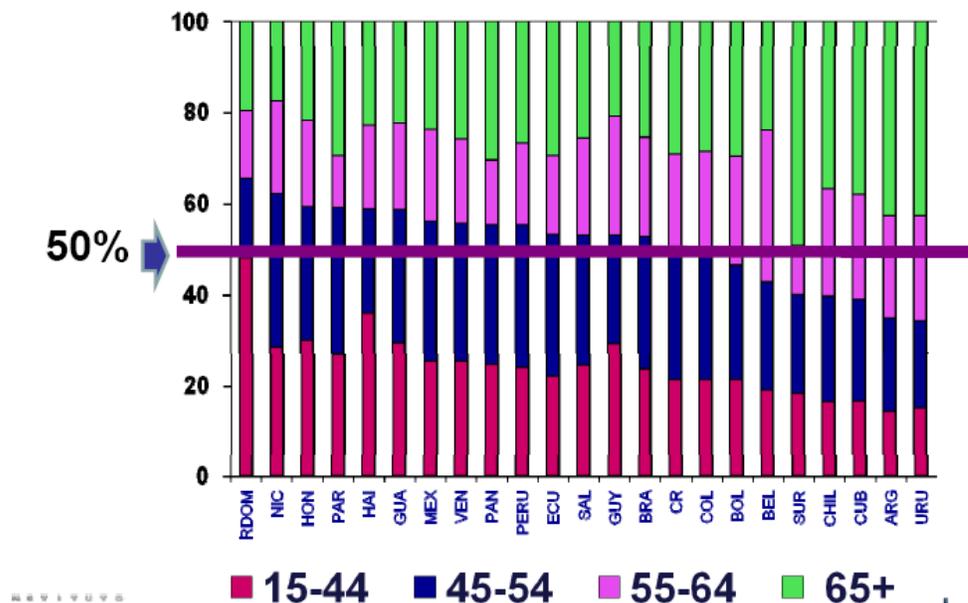


Fig. 9. Frecuencia de los casos de cáncer de mama según grupo de edad en América Latina y el Caribe, 1970-2005. Fuente: Globocan 2002, OMS.

Las cifras muestran un panorama grave en México; en el 2009 la Secretaría de Salud reportó que en los últimos 10 años la incidencia de cáncer de mama ha aumentado en 50 %, por ello los métodos de diagnóstico temprano deben ser una estrategia básica en los programas de detección y prevención del cáncer de mama. Asimismo los programas científicos deben ir encaminados a ampliar los esquemas de diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, pues del total de las pacientes mexicanas tan sólo del 5 al 10% se detectan en los primeros estadios, el resto es diagnosticado en estadios 3 o 4 lo que dificulta el tratamiento y aumenta los costos y la incertidumbre para la paciente. Por el contrario, en países desarrollados como Estados Unidos el 50% de los casos es detectado en estadios tempranos (Fig. 10) (Knaul *et.al.*, 2008).

En nuestro país el diagnóstico y elección de tratamiento se realiza en base a criterios clínicos y biológicos, como la edad, el grado del tumor, el estadio y la expresión de receptores hormonales, dicho cuadro es eficiente; sin embargo, los avances tecnológicos y científicos han permitido implementar nuevas herramientas que clasifican este padecimiento a nivel molecular mediante biomarcadores, que potencialmente, pueden ser empleados para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento, por ello el objetivo de este trabajo es identificar biomarcadores de relevancia clínica en cáncer de mama mediante el análisis de perfiles de expresión de microRNAs en pacientes mexicanas.

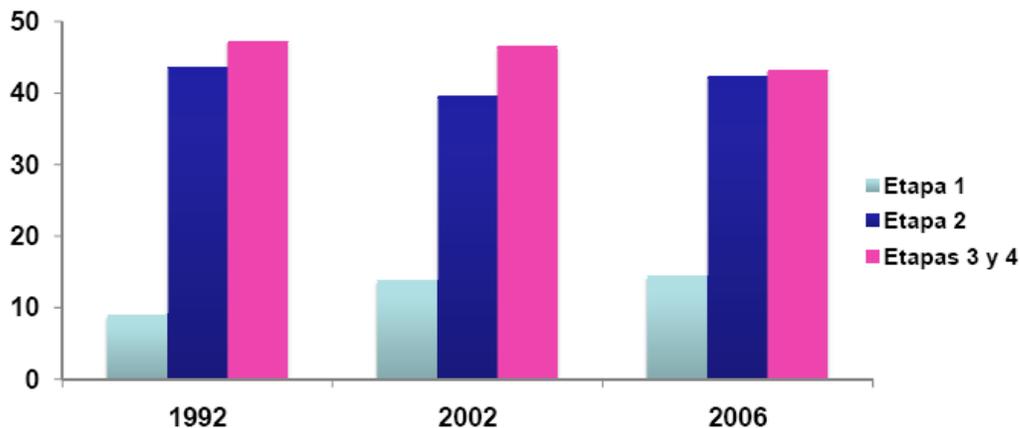


Fig. 10. Evolución de la detección según etapas. Fuente: IMSS, 1992-2006, 2007. Tomado de Knairl *et al* 2008

Biología molecular del cáncer de mama.

La biología molecular ha logrado establecer uno de los grandes paradigmas genéticos del cáncer, al definir su origen como la consecuencia de la acumulación de mutaciones en los genes que controlan la proliferación, diferenciación o muerte celular. De hecho, la historia molecular del cáncer surge con el descubrimiento de los oncogenes, los cuales tienen un efecto promotor en la proliferación celular, su mutación en los tumores les confiere la capacidad dominante de proliferación; por otro lado se encuentran los genes supresores de tumor los cuales son reguladores negativos de la proliferación celular. Así pues, su mutación en los tumores les confiere un comportamiento recesivo. Al estudiar el cáncer como un compendio de diversos procesos celulares nos es posible entender que cualquier alteración funcional en los reguladores y participantes del ciclo celular podría generar una progresión maligna, por ello el enfoque molecular en su estudio es fundamental y de gran interés (Bertram, 2000).

Durante las últimas décadas ha ocurrido un gran progreso en la taxonomía del cáncer de mama, sobre todo al enfocar los estudios e investigaciones al entendimiento de los eventos genéticos y moleculares que afectan e intervienen en el desarrollo del cáncer de mama, lo cual podría ayudar a los investigadores y clínicos a tener una mayor idea de la biología de esta enfermedad (Chung, et. al., 2002).

En los años 90s, se descubrieron varios genes cuya expresión predispone al desarrollo del cáncer de mama. Usando diversas metodologías se determinó que el gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17, denominado *BRCA1*, podría

estar involucrado en un 45% de los cánceres mamarios y que su variación le confiere al portador un mayor riesgo (aumentando su probabilidad de e 30 a 40 veces de padecer cáncer de mama) (Miki, *et. al.*, 1994). Otro de los genes con gran relevancia en el desarrollo tumoral mamario es el gen supresor tumoral *TP53*, el cual está mutado en 25 a un 40% de los casos esporádicos de cáncer de mama y se ha asociado con un curso clínico más agresivo y una menor prognosis (Malkin, 1990).

Los estudios de biología molecular también han permitido identificar otros factores que participan en la carcinogénesis mamaria y que podrían ser blancos terapéuticos ayudando a controlar de mejor manera la tumorigénesis mamaria. Un claro ejemplo es la sobreexpresión del oncogen *ERBB2 (Her2)* en algunos tipos de tumores mamarios. Este gen codifica para un receptor transmembranal de tirosina cinasas que se ha convertido en blanco terapéutico, permitiendo reducir la tasa de mortalidad de los tumores Her2+ (Slamon, 1989).

El análisis de tumores de mama a través de métodos de biología molecular ha permitido determinar e identificar alteraciones específicas en cuanto al número de copias y perfiles de expresión de RNAm, lo cual evidentemente tiene consecuencias sobre la expresión de los genes que potencialmente juegan un papel en el desarrollo del cáncer de mama.

La tecnología molecular ha ido desarrollándose rápidamente con distintas variedades de microarreglos más exactas que detectan diversas alteraciones citogenéticas en el tumor mamario. Uno de los primeros intentos por conocer estas alteraciones fue el estudio de CGH en microarreglos de cromosomas artificiales de bacterias (BACs), cuya resolución era mínima (1 Mb) (Chin, *et. al.*, 2007; Han, *et. al.*, 2006), continuaron los microarreglos de cDNA (Pollack, *et. al.*, 2002) y los microarreglos de oligonucleótidos, con una resolución de 40-50 Kbs (Chin, *et. al.*, 2006). Los resultados de estos estudios han identificado regiones específicas con amplificaciones en los loci: 8q11, 1q21, 17q11, y 11q13, y zonas deletadas en donde se encuentran genes codificanetes de supresores tumorales como *PTEN* y *CDKN2A*.

Durante los últimos años, los investigadores han centrado su atención en generar microarreglos con mayor resolución; siendo una de las plataformas mas evolucionadas y robustas los microarreglos SNP 6.0 que evalúan 1,800,000 marcadores genéticos a lo largo de todo el genoma (Walter, *et. al.* 2009). El conjunto de estos nuevos microarreglos han detectado nuevas anormalidades citogenéticas en cáncer de mama: amplificaciones en los cromosomas 11q13–14.1, 17q y 20q que contienen ciclinas N, D1, los genes *BCAS1* y *BCAS3*;

pérdidas de los cromosomas 6q, 9p y X, las cuales incluyen al receptor de estrógenos y al gen p16INK4A (Johnson, *et. al.*, 2008)

Otro de las áreas del conocimiento recientemente estudiadas que ha generado importantes contribuciones al análisis genómico del cáncer de mama ha sido el estudio de los perfiles de expresión de RNAm. Este tipo de estudios ha logrado definir 5 subgrupos moleculares basados en perfiles de expresión de RNA mensajero, cada uno de ellos con características biológicas y clínicas particulares (Sorlie, *et. al.*, 2003).

La correlación entre variables clínicas, tiempo libre de metástasis y tiempo de supervivencia general, y perfiles de expresión, ha permitido identificar aquellos perfiles genómicos que pueden ser usados como herramientas de predicción de curso clínico. Por otro lado también se identificó un patrón de 70 genes predictivos para el desarrollo de metástasis distante en un período de cinco años en pacientes sin evidencia de metástasis linfática regional (van 't Veer, *et. al.*, 2002).

Este tipo de aplicaciones muestran la gran utilidad de estas firmas moléculas para la detección de patrones de expresión predictivos, que relacionados con los parámetros clínicos tradicionales, permite identificar a los pacientes que pueden verse beneficiados de estas nuevas herramientas moleculares representadas por los microarreglos de expresión como los modelos de progresión de 70 genes de MammaPrint; puntaje de recurrencia de OncotypeDX™ (Paik, *et. al.*, 2004); modelo de subtipos intrínsecos (luminal A, luminal B, ERBB, receptor de estrógenos negativo, basal y parecido a normal); entre otros (Sorlie, *et. al.*, 2003).

Los avances moleculares en el cáncer de mama han sido amplios, sin embargo, falta por estudiar muchos mecanismos de regulación y expresión génica. Hoy contamos con conocimientos que permiten detectar secuencias específicas de material genético y algunas otras biomoléculas que están siendo empleadas como biomarcadores de la progresión tumoral y que han ayudado a la elección del tratamiento; de igual forma al tener más información del genoma humano y de otras especies animales, usadas como modelos biológicos, se han generado modelos de aproximación molecular mucho más confiables y predictivos que permiten evaluar, por ejemplo, el diseño y la caracterización de fármacos antitumorales. Por último, el creciente avance de la tecnología como los microarreglos de expresión de ácidos nucleicos o proteínas o bien, la nueva ventana de secuenciación ofrece nuevos campos para la investigación molecular.

La función de nuevos actores biológicos, así como su participación en el desarrollo de la carcinogénesis mamaria está siendo estudiada ampliamente. Aun cuando años atrás el interés radicaba en los genes codificantes de proteínas, hoy en día

surge un nuevo interés por otras moléculas que podrían ser protagonistas en el cáncer. Particularmente en los últimos años se ha determinado claramente cómo pequeños transcritos no codificantes que regulan la expresión de los RNAm denominados miRNA pueden ser empleados para clasificar una gran variedad de los cánceres humanos. Recientemente las evidencias han mostrado que estos transcritos tienen un papel importante en el desarrollo tumoral; y así el mejor entendimiento de sus alteraciones moleculares en el genoma del cáncer y en su propiedad oncogénica podría contribuir a la diagnosis y tratamiento del cáncer (Ramaswamy, *et. al.*, 2001; Lu, *et. al.*, 2005).

Biología molecular de miRNAs.

Durante los últimos años, el cáncer de mama se ha abordado desde muy diversos puntos de vista, siendo el análisis genómico una de las principales herramientas de estudio, pues permite crear nuevos métodos de predicción, respuesta clínica al tratamiento y la identificación de firmas moleculares de los diversos tipos tumorales (Iorio *et. al.*, 2008).

Diversas tecnologías como los arreglos de expresión han sido empleados como una poderosa y novedosa herramienta para generar nuevo conocimiento acerca del cáncer de mama. Recientemente se ha descrito el importante papel de otro grupo de moléculas en el desarrollo y regulación de esta patología: los microRNAs (miRNAs), pequeños RNAs no codificantes de 21 a 25 nucleótidos. Los miRNA están incorporados en complejos de silenciamiento, los cuales están dirigidos a secuencias complementarias blanco homólogas de RNAs mensajeros, provocando la inhibición de la transcripción del RNA blanco o bien generando su completa degradación. De esta forma, los miRNAs representan una importante fase de la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional (Finnegan y Matzkee, 2003; Eldering *et. al.*, 2003; Iorio, *et. al.*, 2005; Tomari *et. al.*, 2005; Ezquela-Kerscher y Slack, 2006; Vázquez-Ortiz *et. al.*, 2006; Jackson y Standart, 2007; Rana 2007; Iorio *et. al.*, 2008).

Los miRNA se han clasificado dentro del grupo de los RNA pequeños cuyo efecto en la maquinaria celular es silenciar la expresión génica. Dentro de este grupo de transcritos se encuentran también los RNA pequeños de interferencia (RNAi), los cuales por complementariedad perfecta a sus blancos activan los mecanismos de degradación del RNAm, silenciando la expresión de los genes codificantes de proteínas, representando uno de los mecanismos de defensa contra ácidos nucleicos foráneos. Otro grupo de moléculas que se encuentran en esta categoría son los RNA temporales pequeños los cuales son elementos regulatorios de los promotores de los genes y los RNAi heterocromáticos, los cuales actúan sobre la organización cromosómica y en las zonas modificadas epigenéticamente

(metilación, acetilación y fosforilación) a lo largo del genoma (Finnegan y Matzkee, 2003; Chalk et. al., 2005).

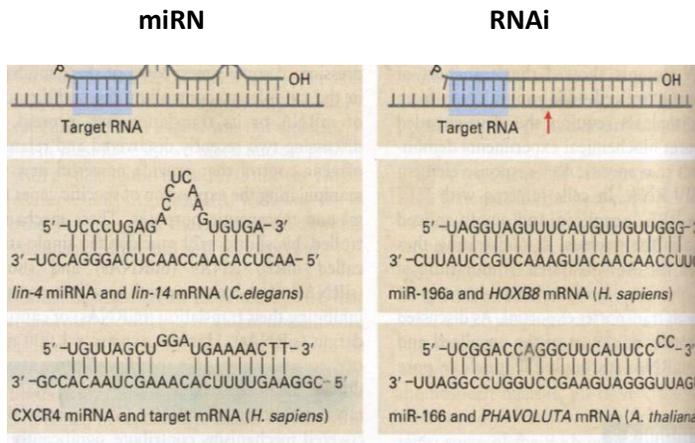


Fig. 11. Diferencias estructurales y de complementariedad entre miRNA y RNAi. Tomado de Lodish et. al., 2008.

Es importante señalar que a través de los estudios filogenéticos se ha determinado que los miRNAs son producidos como un transcrito distinto a los RNAi; también, existen diferencias funcionales muy puntuales entre los RNA de interferencia y los miRNA. Evolutivamente se cree que los RNAi han jugado un papel importante como mecanismo de defensa contra virus y ácidos nucleicos de parásitos

exógenos, mientras que los miRNAs son esencialmente mecanismos de regulación postranscripcional (He y Hannon, 2004). Por otro lado, los miRNA son transcritos en horquillas, mientras que los RNAi son RNA dúplex, es decir de cadena doble. Los miRNA son moléculas de hetero silenciamiento, es decir, el producto de un gen puede silenciar varios genes blanco mientras que los RNAi son de auto silenciamiento, esto es, silencian y degradan el transcrito del mismo gen que les dio origen (Vázquez-Ortiz et. al., 2006) (Fig. 11).

Los miRNA juegan un papel importante en la mayoría de las células eucariontes incluyendo plantas, hongos, insectos (por ejemplo *Drosophila melanogaster*), mamíferos y nemátodos, como *Caenorhabditis elegans* en los cuales en 1993 fueron descubiertas las moléculas de silenciamiento al describirse miRNA lin-4. La función biológica de los miRNAs en este organismo es la de controlar el desarrollo larvario a través de sus cuatro etapas (Li-L4). lin-4 se expresa en las primeras etapas embrionarias (L1, L2) hibridizándose con los RNA mensajeros del gen lin-14, el cual genera una proteína nuclear que actúa como precursor neuronal, dirigiendo así un patrón específico de la división celular; y lin-28 el cual promueve la transición entre la etapa L2 y L3. Conforme avanza el desarrollo hacia la etapa L2 la expresión de lin-4 disminuye dando lugar al segundo estadio larval. En las últimas etapas embrionarias los niveles bajos de expresión de esta molécula silenciadora permite la traducción de estas proteínas y con ello la madurez del sistema nervioso, funcionando pues como un reloj regulatorio del linaje celular (Chalife et.al, 1981; Ambros y Horvitz, 1984; Wightman et. al, 1991; Lee et. al. 1993; Wightman et.al, 1993; Lodish, et. al., 2008). Para el año 2000 un

segundo miRNA es identificado en este mismo organismo: lin-7, el cual codifica para un RNA de 21 nucleótidos que se une a lin-41 y lin-57 (hbl-7) los cuales se encargan de transición del estadio L4 a la etapa adulta (Reinhart *et. al.*, 2000; Blenkiron y Miska, 2007).

Entre las funciones biológicas naturales de los miRNA podemos citar que participan la diferenciación y crecimiento celular, respuesta al estrés, muerte celular, diferenciación hematopoyética, morfogénesis de la piel, metabolismo, desarrollo neuronal e inactivación del cromosoma X en los mamíferos. Su acción depende básicamente del tejido y tipo celular en el que se encuentre; siendo altamente específicas a la etapa de desarrollo y tejido en el que se localice (Cheng *et. al.*, 2005; Blenkiron y Miska, 2007; Ma *et. al.*, 2007; Iorio *et. al.*, 2008; Lodish *et. al.*, 2008; Lowery *et. al.*, 2008).

Diversos estudios han reportado que esta regulación postranscripcional es muy amplia, puesto que un sólo miRNA puede poseer hasta 200 genes blanco con muy diversas funciones; así, con base en estos datos los miRNA potencialmente controlan un tercio de la expresión de los genes humanos, esto es aproximadamente 30% de los genes codificantes de proteínas, haciendo de los miRNAs las moléculas reguladoras más abundantes. Lo anterior se explica debido a que la inhibición de la transcripción de la mayoría de los RNAm blanco se da por una complementariedad imperfecta, es decir no hay una hibridación del 100% entre el RNA mensajero y los complejos de silenciamiento de miRNA, lo cual permite la gran variedad de blancos que posee un mismo miRNA (Lewis *et. al.*, 2005; Griffiths-Jones *et. al.*, 2006; Ouellet *et. al.*, 2006; Ezquela-Kerscher y Slack, 2006; Lodish *et. al.*, 2008; Lowery *et. al.*, 2008).

En el ser humano se han predicho aproximadamente 1000 diferentes miRNA, muchos de ellos expresados en un único tipo celular, asimismo los estudios evolutivos han mostrado que 53 miRNA son únicos de primates. Por otro lado, organismos como la planta *A. thaliana*, posee cerca de 1.5 millones de miRNAs. La diversidad de miRNA es el resultado de un proceso evolutivo complejo, en el que se observa la variabilidad de los genes codificantes de estas moléculas, debido a que se han duplicado y mutado en las bases codificantes o bien se encuentran altamente conservados en la filogenia eucarionte (Rana, 2007; Lodish *et. al.*, 2008). De igual forma, las mutaciones que ocurren en las secuencias blanco permiten crear nuevos sitios blanco, lo cual afecta la expresión del transcrito; de esta forma la diversidad de secuencias tiene gran impacto sobre la evolución de los posibles blancos (Farth *et. al.*, 2005; Clop *et. al.*, 2006).

Conforme el estudio de los miRNA ha avanzado, las diversas bases de datos han aumentado la información que se tiene sobre estas moléculas, pudiendo predecir

blancos de los miRNA, sin embargo, no es una tarea sencilla ya que estos transcritos presentan una longitud pequeña y la complementariedad entre el miRNA y su blanco no es enteramente perfecta, por lo que se debe desarrollar algoritmos matemáticos complejos. De acuerdo con la base de datos miRBase release 14.0 existen 721 miRNAs registrados y por tanto un amplio número de blancos posibles (Sanger Institute, 2009).

Maquinaria de síntesis y maduración de miRNA.

Los miRNAs son RNAs no codificantes de cadena sencilla de 21 a 25 nucleótidos de longitud, derivados de un RNA en forma de tallo dando como resultado, tras su biogénesis, en una molécula en forma de horquilla.

El proceso global de síntesis y maduración de los microRNAs se puede dividir en dos etapas, de acuerdo al sitio en donde ocurre la biogénesis y maduración de los mismos: nuclear y citoplasmática (Fig. 12).

El proceso de formación inicia en el núcleo, donde la mayoría de los miRNA son polymerizados por una RNA polimerasa II generando un transcrito denominado pri-miRNA (transcrito primario) en forma de tallo-burbuja, el cual puede poseer la secuencia de uno o más miRNA (policistrónico); con una longitud que puede variar de 1000 nucleótidos hasta varias kilobases (Lee *et. al.*, 2004).

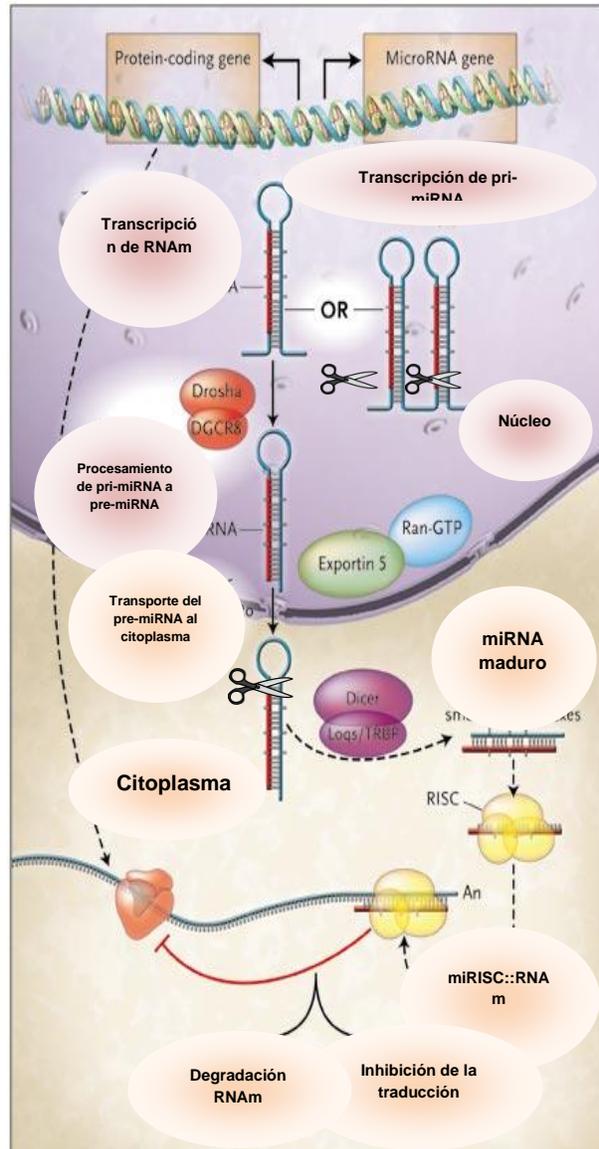


Fig. 12. Biogénesis de miRNAs. Tomado de Chang-Zheng, 2005.

El pri-miRNA contiene en su estructura la firma característica de la polimerización por RNA pol II: una caperuza (m7'G) en el extremo 5' y una cola poli A en el

extremo 3'; Asimismo la secuencia de aproximadamente 33 nucleótidos que genera la estructura de tallo, presenta un apareamiento imperfecto en algún par de bases (Knight *et. al.*, 2001; Cai *et. al.*, 2004; Gregory *et. al.*, 2004; Han *et.al.*, 2004; Kim, 2005; Rana, 2007; Lowery *et. al.*, 2008).

A continuación el microprocesador formado por Drosha, una RNasa tipo III de la familia de la ribonucleasas que reconoce la doble cadena generada por la estructura de tallo-burbuja junto con el complejo proteico DGCR8, que posee dos puntos de unión con el pri-miRNA (lo cual sugiere una función de reconocimiento de este complejo), generan un pre-miRNA con forma de pasador de entre 60 y 70 nucleótidos, del cual fue liberado una doble cadena. Como parte de esta digestión la enzima Drosha introduce 2 nucleótidos en el sitio de corte en el extremo 3' (firma de la RNasa III) (Filippov *et. al.*, 2000; Knight *et. al.*, 2001; Lee, 2003; Denli *et. al.*, 2004; Gregory *et. al.*, 2004; Han *et.al.*, 2004; Landthaler *et. al.*, 2004; Lin, *et. al.*, 2005; Kim, 2005; Rana, 2007; Lodish, 2008; Lowery *et. al.*, 2008). La RNasa Drosha cuenta en el extremo Amino terminal con una región rica de prolina y argininas/serinas, mientras que el extremo Carboxilo cuenta con un dominio de unión a la doble cadena (dsRBD) y dos dominios de RNasa III (RIIID) los cuales cortan independiente la hebra 3' (RIIIDa) y la 5' (RIIIDb) (Wu *et. al.*, 2000; Lee *et. al.*, 2003; Han *et. al.*, 2004). La eficiencia del procesamiento de la enzima Drosha depende directamente del tamaño de la zona terminal de la estructura de tallo burbuja y la secuencia que flanquea el sitio de unión de Drosha con el pri-miRNA el cual está localizado aproximadamente dos vueltas después del tallo (Lee *et al.*, 2002; Lee *et. al.*, 2003; He y Hannon, 2004).

En seguida el pre-miRNA es reconocido por los cofactores Ran-GTP, del transportador nuclear Exportin 5, el cual interactúa con los dominios FG de las nucleoporinas permitiendo el paso del pre-miRNA al citoplasma, a través de un canal interno nuclear. Una vez en el citoplasma, el GTP es hidrolizado en GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo (Bohnsack *et. al.*, 2004; Lund *et. al.*, 2004; Rana, 2007; Lodish, 2008).

A continuación, la RNasa III DICER actúa junto con la proteína citoplasmática *TRBP* (Transactivating response RNA-binding protein) para procesar el pre-miRNA en un miRNA maduro de doble cadena, con dos nucleótidos no pareados en los extremos 3' (Lodish, 2008). En esta segunda digestión actúan diversos complejos y dominios de DICER:PAZ, el cual reconoce la cola cohesiva del pre-miRNA y se une a ella, el dominio DUF283 que reconoce el RNA de doble cadena asociándose con la base de la horquilla para procesar el pre-miRNA y dos dominios de RNasa III los cuales digieren el transcrito después de dos vueltas de la α hélice, justo en el extremo opuesto del sitio de corte de DROSHA (Tijsterman *et.al.*, 2002; Lingel *et. al.*, 2003; Yi *et. al.*, 2003; He y Hannon, 2004; Daniels *et.al.*, 2009).

Cuando esta segunda digestión concluye, se genera una doble hélice de entre 21 a 25 nucleótidos(miRNA:miRNA*); de la cual una de las hebras es seleccionada por TRBP al actuar como biosensor en la elección de la cadena “guía” incorporándola al complejo RISC (RNA-Induced Silencing Complex) de acuerdo a su estabilidad en el extremo 5'. Diversos estudios han revelado ciertas características de esta cadena: entre menor estabilidad termodinámica (menor estabilidad entre los puentes de hidrógeno) tenga la hebra en el extremo 5' se facilitará su incorporación al complejo ribonucleoproteico denominado RISC. Así como, la presencia de nucleótidos específicos en posiciones particulares, por ejemplo, la cadena guía es abundante en A y G, mientras que la hebra sobrante complementaria denominada pasajera es rica en C, lo cual genera ciertas estructuras secundarias que favorecen su incorporación. La hebra pasajera es degradada por un mecanismo aun no descrito (He y Hannon, 2004; Gregory *et.al.*, 2005; Rana, 2007; Lodish *et. al.*, 2008; Ahmed *et. al.*, 2009; Daniels *et.al.*, 2009).

El complejo RISC que contiene el miRNA maduro llamado miRISC, está compuesto por varias proteínas: Dicer, Ago2 y TRBP; las dos primeras tienen una actividad de RNasa mientras que TRBP es importante para la introducción de la cadena correcta al complejo. Este complejo posee una estrecha asociación con la proteína de multidominio Argonauta la cual reconoce diversas secuencias brindándole especificidad a cada miRNA para unirse a un RNAm determinado para suprimir su traducción. También, el dominio proteico Piwi interactúa con este complejo, al inhibir el dominio de unión de DICER y la RNasa H (RNasa de tipo III) es decir, actúa como centro catalítico entre Ago2 y la RNasa H, por lo que se cree que esta relación puede estimular la liberación del miRNA del sustrato blanco (Fig. 12), (Carthew, 2002; He y Hannon, 2004; Song *et. al.*, 2004; Gregory *et.al.*, 2005; Kolb *et. al.*, 2005; Ma *et. al.*, 2005; Rana, 2007; Daniels *et.al.*, 2009; Lodish *et. al.*, 2008).

El mecanismo por el cual el miRISC localiza al transcrito blanco es probablemente mediante escaneo de los posibles RNAm; al unirse el miRNA y el transcrito blanco se genera un cambio conformacional, generándose una doble hélice en forma A, lo cual contribuye a disminuir la eficiencia catalítica y con ello facilita la inhibición de la traducción. Cuando un miRISC se une a secuencias que no son blancos se disocia hasta encontrar la secuencia correcta que genere dicho cambio estructural (Rana, 2007). Todo el silenciamiento de la expresión por parte del complejo miRNA-RISC (miRISC) no requiere ATP y al finalizar el proceso de catálisis, RISC se recicla para hibridizarse con otro transcrito blanco (Gregory, *et.al.*, 2005).

El complejo miRISC se une a través de la proteína argonauta a la región 3' no traducida (3' UTRs) del RNAm blanco de forma imperfecta. Las bases 2 a 7 juegan un papel importante en la interacción miRNA-RISC y RNAm, pues estos

conjunto eliminan la caperuza de los RNAm lo cual da como resultado en la degradación del transcrito y silenciamiento (knock out) del gen. Los cuerpos P son estructuras altamente dinámicas y su acción está directamente relacionada con la complementariedad entre los ribonucleótidos del miRNA y el RNAm lo cual define el grado de degradación (Rossi, 2005; Brengues *et. al.*, 2005; Liu *et. al.*, 2005; Teixeira *et. al.*, 2005; Rana, 2007; Lodish, *et. el.*, 2008).

Así, hay dos tipos de complejo RISC-miRNA, el digestivo presente en los RNA de interferencia en el que el RNAm sufre la inhibición de la traducción y su degradación; y el no digestivo hallado en los miRNA que únicamente reprime la traducción pero no tienen acción de endonucleasa (Okomura, *et. al.*, 2004; Gregory, *et. al.*, 2005; Chiu, *et. al.*, 2005). En los últimos años algunos estudios han revelado procesos alternativos de silenciamiento de la expresión génica de los miRNAs, los cuales pueden ser la deadenilación de la cola de poli A y la eliminación de la caperuza para la degradación del RNAm en el citoplasma. (Pillai *et. al.*, 2005; Schier y Giraldez, 2006; Wu *et. al.*, 2006; Chendrimada *et. al.*, 2007).

Otros estudios sugieren que la regulación puede generarse incluso durante el proceso de traducción, específicamente durante su inicio al inhibir la función de factor *eIF4E*, lo que genera disminución significativa en la eficiencia de la síntesis de proteínas. Los grupos de trabajo de Doench y Peterson (2003) proponen diversos modelos que revelan estos mecanismos alternos de silenciamiento. Los resultados al transfectar células 293T para analizar la represión del promotor de luciferasa, con un RNAsi, revelaron que la acción de los miRNAs pudiera tener efecto en la iniciación de los procesos transduccionales. Lo anterior es apoyado por Olsen y colaboradores (1999), quienes concluyen que la iniciación y elongación del RNAm blanco es normal, sin embargo la reducción de los niveles de proteína se debe a la posible degradación de la nascente cadena proteica.

La inhibición de la traducción en los RNAm blancos es un proceso complejo y diversas evidencias sugieren que para que esto ocurra se requiere que al menos dos o más complejos RISC-miRNA se unan a la región 3' UTRs del RNAm, por lo que se cree que la regulación es combinada, es decir las diversas combinaciones regulan distintos RNAm (Lodish *et.al.*, 2008). Este fenómeno es reportado también como una estrategia para lograr la inhibición de la traducción del transcrito blanco. Supongamos que un miRNA tiene una complementariedad con el RNA mensajero muy baja con una pobre afinidad de entre 9 y 8 nucleótidos, si varias copias de este miRNA se unieran al blanco se compensaría la baja afinidad en la interacción de miRISC y el RNAm, pudiendo así suprimir la expresión del transcrito blanco (Rana, 2007).

Un aspecto interesante de la organización de los genes codificantes de miRNA es que aproximadamente, una tercera parte de los miRNA están organizados en

clusters; imaginemos que fuera un operón en el que los transcritos son expresados de forma coordinada en tiempo y acción mediante transcritos policistrónicos, lo cual sugiere que estos miRNA actúan coordinadamente durante las etapas de desarrollo (He y Hannon, 2004; Ying y Lin, *et. al.*, 2005; Lowery *et. al.*, 2009). Algunos otros miRNA se localizan aislados en zonas exónicas (intergénicas) o intrónicas; estas últimas pueden ser producto de procesos como la maduración de los RNAm (Rodríguez *et. al.*, 2004; Altuvia *et. al.* 2005; Ying y Lin, *et. al.*, 2005).

Regulación de miRNA.

Una vez que ya sabemos qué son y cómo actúan, la pregunta más lógica es ¿qué mecanismos regulan la expresión de los miRNA? Si bien ésta es una pregunta muy básica hoy en día no tenemos una idea clara sobre este proceso. Diversos estudios reportan que la regulación de los miRNA ocurre por mecanismos clásicos epigenéticos como metilación, acetilación y fosforilación que responden a estímulos endógenos y exógenos o bien mediante otros procesos de regulación a nivel de transcripción o rutas metabólicas (Kulshreshtha *et. al.*, 2007; Lehmann *et. al.*, 2008).

El grupo de trabajo de Kulshreshtha (2007) sugiere que la regulación mediante factores inducibles de hipoxia (FIH) es uno de los mecanismos que regulan a los miRNA en respuesta a niveles bajos de oxígeno, condición muy común en los microambientes generados en las zonas neoplásicas, sobre todo en aquellas que presentan una pobre prognosis y resistencia a las terapias convencionales. Sus resultados demuestran la relación existente entre las condiciones específicas de estrés de la zona tumoral con los miRNA *miR-21*, *miR-23a*, *miR-23b*, *miR-24*, *miR-26a*, *miR-27a*, *miR-30b*, *miR-93*, *miR-103*, *miR-106a*, *miR-107*, *miR-125b*, *miR-181a*, *miR-181b*, *miR-181c*, *miR-192*, *miR-195*, *miR-210* y *miR-213* los cuales son inducidos en respuesta de la condición hipóxica generada en las células tumorales de cáncer de mama y colon evaluadas; por otro lado los siguientes miRNAs se encontraron subregulados bajo condiciones hipóxicas: *miR-122a*, *miR-565*, *miR-195*, *miR-30e-5p*, *miR-374*, *miR-19a*, *miR-101*, *miR-424*, *miR-29b*, *miR-186*, *miR-141*, *miR-320*, *miR-422b* y *miR-197* en líneas celulares SCC y *miR-15b*, *miR-16*, *miR-20a*, *miR-20b*, *miR-30b*, y *miR-224* en líneas celulares de CNE.

Con respecto a los mecanismos epigenéticos, Satio y colaboradores (2006) demostraron que la inactivación de *miR-124a* se debe a la hipermetilación de su promotor. Lehmann y colaboradores (2008) reportaron que algunos de los miRNA

que se encuentran subexpresados pueden estar silenciados en los tumores mediante hipermetilación aberrante de las islas de CpG. El experimento realizado por este grupo de trabajo consistió en elegir 12 genes candidatos de miRNA regulados por hipermetilación, con base en predicciones bioinformáticas de la localización de las islas CpGs. Posteriormente se realizó una segunda selección, donde se obtuvieron 5 candidatos fuertes a los cuales se les sometió a un tratamiento de desmetilación. Los resultados mostraron que *miR-9-1*, *miR-124a3*, *miR-148*, *miR-152* y *miR-663* estaban regulados por hipermetilación en la mayoría de las muestras de tumores mamarios analizados. Tras aplicar un tratamiento de desmetilación (5-aza-2'-deoxicitidina) se reduce la metilación en *miR-9-1* y se reactiva su expresión.

Blenkiron y colaboradores (2007) han reportado que los cambios en la expresión y alteraciones genómicas de miRNAs pueden ser explicados por cambios cromosómicos, por ejemplo, en cáncer de mama los *miR-33* y *miR-320* están asociados a la no expresión de ciertos genes, Asimismo se ha visto que la expresión de clusters de miRNA como *miR-30b* y *miR30d*, así como *miR-15b* y *miR16-2* están regulados por el número de copias de los genes que los transcriben.

Datos recientes han abierto un nuevo campo de investigación en el que se estudia la regulación de los miRNA durante el proceso de síntesis y maduración, es decir, la interacción y la relación que se da entre los miRNA y las proteínas que se unen a ellos, lo cual podría tener un papel clave en el desarrollo de ciertas patologías, por ejemplo la interacción entre los pre-miRNA y ribonucleoproteínas heterógenas, las cuales también están desreguladas en los diferentes cánceres humanos (Carpenter *et. al.*, 2006).

p53 es un supresor tumoral de gran relevancia en el desarrollo del cáncer y diversos estudios han reportado que p53 regula directamente la expresión de un grupo específico de miRNAs entre los que se encuentran *miR-34* (*miR-34a*, *miR-34b* y *miR-34c*). La expresión de estos miRNAs tiene gran importancia fisiológica pues impacta la actividad de p53 al inducir el arresto celular y la senescencia, Asimismo facilita la muerte celular. Varios reportes indican que éstos miRNAs tienen como RNAm blanco a moléculas como cinasa 4 dependiente de ciclina (*CDK4*) y ciclina E2, el proto-oncogen *Met* y al factor antiapoptótico *Bcl2*. Existen otros estudios que han determinado que *miR-192* y *miR215* inducen a p53, al promover la expresión de p21, que a su vez regula la expresión de p53 (Vousden y Prives, 2009).

Otras de las posibles rutas de regulación propuestas es por estrógenos en las células cancerígenas de mama, estroma endometrial y células musculares

miométriales; la disminución en los niveles de estradiol (precursor hormonal de los estrógenos), ha sido implicada en la desregulación de la expresión de algunos miRNA, así como en la expresión de los genes blancos de estos miRNAs (Klinge, 2009).

Ahora bien, uno de los mecanismos de regulación de la expresión de miRNAs más importantes es la epigenética. En esta área diversos artículos reportan la desregulación de los perfiles de metilación en cáncer de mama, teniendo un patrón inverso a las células normales, donde las islas de CpGs no están metiladas; encontrándose hipermetiladas lo que provoca inestabilidad genómica y activación de las rutas oncogénicas. Un aspecto de suma importancia es que, si bien, la epigenómica participa en la regulación de miRNAs, estos transcritos participan en la mediación de la metilación de DNA (Baylin, *et. al.*, 2006; Ting, *et. al.*, 2006; Esteller, *et. al.*, 2007), es decir, son como comúnmente se dice: juez y parte. Reportes muy recientes han demostrado que Dicer está involucrado en la modulación de la metilación de DNA, mediante la regulación directa de la expresión de los genes *DNMT3*, los cuales catalizan la metilación de DNA (Kim, 2005; Benetti, *et. al.*, 2008; Pang-Kuo y Sukumar, 2008; Sinkkonen, *et.al.*, 2008). Aunado a ello la subexpresión del cluster *miR-290* provoca la sobreexpresión de uno de sus blancos biológicos, *Rbl-2* el cual es un mediador de la represión transcripcional causando que la metilación se vea afectada, sobre todo los perfiles globales de hipometilación (Benetti, *et. al.*, 2008; Sinkkonen, *et.al.*, 2008).

miRNA: futuras herramientas diagnósticas y terapéuticas.

El compendio de conocimientos que hasta ahora se tiene ha permitido establecer posibles futuras herramientas diagnósticas, terapéuticas y de prognosis. Por ejemplo, hoy sabemos que con un perfil de expresión de relativamente pocos miRNA, aproximadamente 200, se pueden clasificar los distintos tipos de cánceres humanos (Lu *et. al.*, 2005); así, el establecimiento de bibliotecas de firmas moleculares de perfiles de expresión de miRNA, podrá servir para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, de igual forma ciertos miRNA han mostrado ser buenos predictores del curso clínico, pudiendo así brindar un tratamiento óptimo. De esta forma se pueden generar tratamientos clínicos personalizados, atendiendo a las características propias del tumor, por ejemplo la expresión de ciertos miRNA junto con variantes moleculares como receptor de estrógenos y HER2 permitirían brindar estrategias óptimas para la quimioterapia (Shi y Guo, 2009 y Salter *et.al.*, 2008).

Desde un punto de vista terapéutico, los perfiles de expresión de miRNA representan una poderosa herramienta para definir un régimen de tratamiento, pues permiten caracterizar y diferenciar tumores que histológicamente son considerados como no diagnosticables (Lu *et. al.*, 2005; Esquela-Kerscher y Slack, 2006). Aunado a ello los miRNA son moléculas muy estables lo que permite realizar análisis de muestras embebidas en parafina; y comparadas con otras moléculas, como proteínas o RNAm presentan muchas más ventajas entre las que se incluyen su pequeño tamaño, lo que los hace ser menos susceptibles a la acción enzimática y degradación pudiendo entonces representar un posible biomarcador de los diversas patologías humanas (Blenkiron *et. al.*, 2007; Sempere *et. al.*, 2007).

Ya que la acción silenciadora de los miRNA está implicada en muy diversas rutas metabólicas involucradas en el desarrollo del cáncer, el desarrollo de medicamentos cuyos blancos terapéuticos sean los miRNA puede mejorar la respuesta a tratamientos como la hormonoterapia, quimioterapia o radioterapia permitiendo sensibilizar a las células cancerosas a la droga administrada. Un ejemplo claro es el desarrollo de nuevas estrategias para obtener una mejor respuesta al tratamiento de cáncer de mama con Trastuzumab al inhibir los miRNA *miR-221* y *miR-222* que se han implicado en la regulación de ciclo p27, el cual es mediado por el Trastuzumab, mediante oligonucleótidos anti sentido (Iorio *et. al.*, 2005), las investigaciones han revelado otro claro ejemplo con los potenciales biomarcadores: *miR-221/miR-222* los cuales están relacionados con la resistencia a tamoxifen (Miller *et. al.*, 2008; Zhao, *et. al.*, 2008), el cual podría ser tratado con el método basado en miRNAs denominado antagomirs, como 2'-O-metil oligoribonucleotidos, que actúa disminuyendo la expresión de los miRNAs que potencialmente son oncogenes (Blenkiron y Miska, 2007).

La aplicación terapéutica de los miRNAs no se limita a actuar como blancos terapéuticos, también pueden actuar como reguladores de la expresión de ciertas proteína- reguladores post-transcripcionales, aunado a ello un sólo miRNA es capaz de regular varios blancos, que estén implicados en una misma ruta metabólica, superando a los fármacos actuales que actúan bajo el principio de la bala mágica, en el que un agente terapéutico inhibe un sólo blanco (Carlenton *et. al.*, 2007).

Si bien los miRNA han abierto una nueva ventana para el desarrollo de fármacos más efectivos y menos agresivos, aun hay muchos retos por enfrentar, uno de ellos es cómo modular la actividad de los miRNA en el tejido huésped, pues un gran número de RNAm podrían ser blancos de estas moléculas pudiendo inhibir parcialmente otros procesos biológicos. La forma de administración es otro gran reto, la cual puede ser directa pues se ha visto que su absorción es idónea o bien

mediante el uso de vehículos como fórmulas lipídicas que permiten su distribución primaria (Ezquela-Kersher y Slack, 2006; Carleton *et. al.*, 2007; Lowery *et. al.*, 2008).

miRNA y cáncer.

Diferentes estudios han relacionado perfiles específicos de expresión de miRNA con el desarrollo de diversas patologías humanas, incluyendo el cáncer, en el que ciertos miRNAs están desregulados y algunos se expresan únicamente en tejido tumoral o tejido sano, permitiendo diferenciar a ambos a través de los miRNAs, pudiendo crear de esta forma firmas moleculares en base a la expresión del miRNA de tejido sano y tumoral. Las primeras evidencias que relacionan la expresión de

miRNA específicos con el desarrollo del cáncer surgen en el 2002 cuando se determina que los genes codificantes de *miR-15* y *miR-16* se localizan en una región de 30 kb del cromosoma 13 que se encuentra deletada en casos crónicos de leucemias linfoides; y por ende la expresión de ambos miRNA también se reduce incrementado la expresión de RNAm blanco: el gen antiapoptótico *BCL2* (Calin, 2002; Blenkiron y Miska, 2007).

Los diversos estudios y reportes han mostrado que, en el cáncer, los miRNA se expresan de forma aberrante, actuando como oncogenes o como supresores de tumor, encontrándose sobreexpresados o subexpresados, respectivamente (Iorio *et. al.*, 2005; Negrini, 2008). El papel de los miRNAs en el desarrollo del cáncer puede observarse, también, en la regulación de estos transcritos sobre oncogenes o supresores de tumor, así como en genes que controlan diferentes funciones

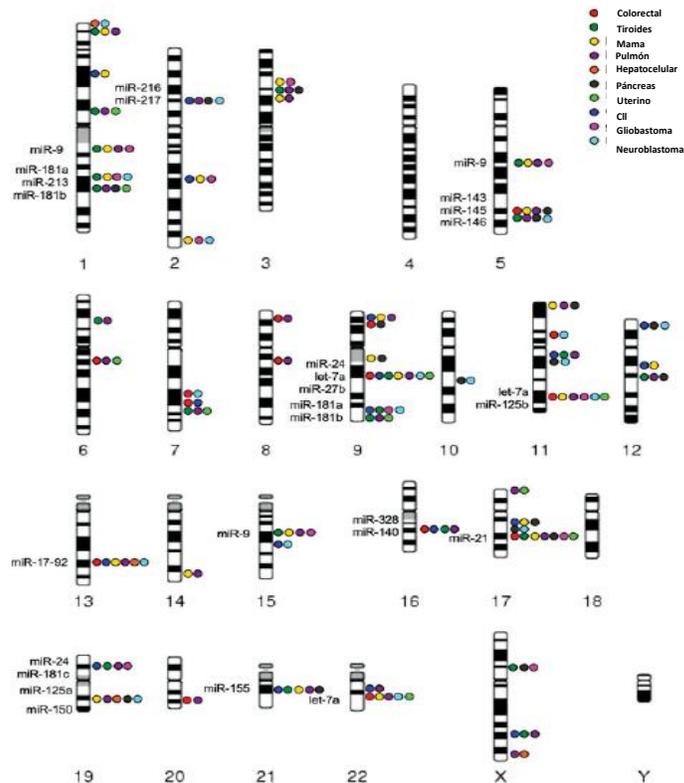


Fig. 14. Mapa de algunos miRNAs involucrados en el desarrollo del cáncer. Tomado de Blenkiron y Miska, 2007.

biológicas como el ciclo celular, apoptosis, migración celular y angiogénesis (Blenkiron y Miska, 2007; Lowery *et. al.*, 2008).

En la literatura científica podemos encontrar trabajos que muestran la acción de los miRNA en la etiología del cáncer y cómo su desregulación puede contribuir en la proliferación del cáncer humano (Fig.14). El grupo de Johnson (2005) reportó uno de los primeros mecanismos descritos mediante el cual los miRNAs contribuyen con la carcinogénesis; estudiando la relación entre la sobreexpresión del cluster de miRNAs *miR-17-92*, que actúa como oncogen interactuando con la ruta oncogénica Myc en linfomas de células B.

Por otro lado, otros grupos descubrieron miRNAs específicos cuya función es la supresión de tumores como el miRNA *let-7*, uno de los primeros grupos de miRNAs en los que se demostró que su acción es la de regular la expresión del proto-oncogen *RAS*, el cual regula el crecimiento y la diferenciación celular (Sassen y Caldas, 2007). Lu y colaboradores (2005) observaron cómo éste miRNA, junto con otro grupo, están subexpresados en los diversos cánceres humano.

Durante los últimos años se ha descubierto que uno de los aspectos importantes en la relación entre el cáncer y la expresión de miRNA, es que los genes codificantes de estas moléculas, se localizan en regiones previamente definidas como alteradas en esta patología. Menos del 50% de los genes que codifican para un miRNA están localizados en regiones cromosómicas, denominadas como sitios frágiles, zonas alteradas en número de copias, áreas con aberraciones cromosómicas, zonas con anomalías en los mecanismos epigenéticos o anomalías en el mecanismo de maduración de los miRNA, así como regiones deletadas o amplificadas comúnmente en el genoma del cáncer (Calin *et. al.*, 2004; Iorio *et. al.*, 2005; Esquela-Kerscher y Slack, 2006; Sassen y Caldas, 2007).

El grupo de Zhang (2006) mostró cómo, en tumores sólidos (cáncer mamario, ovárico y melanomas), el 73% de los genes codificantes de miRNAs se localizan en zonas con anomalías en el número de copias. Apoyando esta hipótesis Iorio y colaboradores (2005) reportaron una correlación entre los perfiles de expresión y zonas del genoma mutadas; así 82% de los miRNA sobreexpresados correspondían a zonas amplificadas, mientras que el 60% de los miRNA subexpresados se localizan en áreas deletadas.

La desregulación de la expresión de los miRNA tiene, también, una amplia relación con un mal funcionamiento en el mecanismo de maduración, principalmente por mutaciones en los genes codificantes de DICER o DROSHA, lo

cual se ha reportado en el desarrollo del cáncer (Karube *et. al.*, 2005; Ouellet *et. al.*, 2006; Blenkiron y Miska, 2007).

La expresión de ciertos miRNAs también está claramente asociada con cursos clínicos patológicos, así como con la diferenciación tumoral, pudiendo ser marcadores para el diagnóstico y prognosis, y posiblemente en un futuro, blancos terapéuticos (lorio, *et. al.*, 2008). Un ejemplo, es como varios estudios han reportado que la expresión de ciertos miRNAs se comparte en tumores de un mismo origen embrionario, como por ejemplo los órganos provenientes del endodermo, permitiendo brindar mejores herramientas diagnósticas y terapéuticas para cánceres poco diferenciados (Vázquez-Ortiz *et. al.*, 2006).

Es importante señalar que existe un debate sobre los perfiles globales de expresión de miRNA en cánceres humanos pues hay gran variabilidad en los resultados reportados, lo cual puede deberse a la elección de las muestras normales para su comparación, las distintas plataformas de análisis, la falta de estándares para su medición y diferencias en los análisis bioinformáticos (Lu *et.al.*, 2005; Volinia *et. al.*, 2006; Boyd, 2008).

miRNA y cáncer de mama.

Investigaciones recientes, al comparar los patrones de expresión de tejido mamario sano y carcinomas de mama, encontraron un grupo de miRNA diferencialmente expresado; la mayoría de los cuales se encuentran generalmente subexpresados, y un número menor de miRNAs están sobreexpresados en cáncer (Gregory *et. al.*, 2005). Dentro de los primeros estudios que reportan la posible relación de la expresión de miRNA específicos con ciertos cánceres de mama se encuentra el de lorio (2005) y Lu (2005) quienes describen el posible vínculo entre los miRNA y la patogénesis tumoral. Lu y colaboradores (2005) reportaron por citometría de flujo, que los perfiles de expresión de miRNAs son distintos en cada tipo de tumor evaluado, es decir en cada linaje celular, lo cual bien podría clasificar los diversos tipos de cáncer humano en distintos estadios de desarrollo. Asimismo, concluyeron que hay diferencia en los niveles de expresión entre tejido normal y tejido tumoral en cáncer de mama.

lorio y colaboradores (2005) identificaron 29 miRNA expresados diferencialmente entre tejido tumoral y normal, capaces de discriminar entre muestras cancerosas o sanas con una exactitud del 100%. En estudios posteriores (2008) este grupo analizó 76 muestras de cáncer de mama contra 10 muestras normales identificando los perfiles de expresión de diversos miRNA. Entre sus conclusiones

se encuentra el hallazgo de 15 miRNA capaces de correlacionar la naturaleza de las muestras, es decir si son tejido tumoral o normal con un rango de confianza del 100%. Los perfiles de expresión de miRNA en tumores mamarios presentan un claro patrón: *miR-10b*, *miR-125b* y *miR-145*, *miR-451* se encuentran subexpresados, y *miR-21* y *miR-155* están sobreexpresados (Tabla 2). Los datos anteriores sugieren la función de dichos miRNA como supresores de tumor u oncomiRNA (oncogenes), respectivamente. Teniendo en cuenta esto, se han predicho algunos de los blancos de estos miRNA, por diversas bases de datos, encontrando que para los oncomiRNA sus RNAm blancos bien podrían corresponder a supresores de tumor tales como *TGFB* y *PTEN* para *miR-21*, *SOCS1*, *FLT1*, *APC* para *miR-155*. Los miRNA subexpresados tienen blancos que actúan como oncogenes o genes que codifican para proteínas con actividad oncogénica, como por ejemplo el factor de crecimiento *BDNF* y el factor de transducción *SHC1* para *miR-10b*, los oncogenes *YES*, *ETS1*, *TEL* y *AKT3* para *miR-125b* y los oncogenes *MYCN*, *FOS*, *MAP3K10*, *MAP3K11* y *MAPK14* como blancos predichos para *miR-145*. (Sempere *et. al*, 2007; Iorio, 2008). Asimismo, sugieren la utilidad de firmas moleculares basadas en miRNA para diferenciar tejido normal y tejido tumoral en cáncer de mama.

El grupo encabezado por Volinia (2006) reportó 43 miRNAs que están claramente diferenciados en su expresión entre tejido con cáncer de mama y tejido normal adyacente al tumor, 26 de los cuales están sobreexpresados y 17 subexpresados en el tejido tumoral con respecto al normal. Lo anterior permitió concluir que el espectro de expresión de los miRNA de las muestras de tumores sólidos es muy diferente a las células normales. También caracterizaron un grupo de miRNA que están significativamente sobreexpresados en todos los tipos de

Tabla 2. MiRNAs implicados en cáncer de mama (lorio *et. al.*, 2008; Esquela-Kerscher y Slack, 2006; Sanger Institute mirBase, 2008; Wang y Wu, 2007).

miRNA	Locus	Perfil de expresión	Función	RNAm Blancos	Clusters	Método de estudio
<i>miR-21</i> (Lu <i>et.al.</i> , 2005; Si <i>et.al.</i> , 2006; Volinia <i>et.al.</i> , 2006, Li-Xu <i>et. al.</i> , 2008)	17q23.2	Sobreexpresado	Rol oncogénico promueve supervivencia celular e inhibe actividad apoptótica de caspasas (Chan, 2005).	<i>BCL2</i> , <i>TPM1</i> , <i>PDCD4</i> , Activador de la proteína RAS p21, <i>PTEN</i> .		Northern blot, citometría de flujo, microarreglos de miRNA, TaqMan RT-PCR
<i>miR-155</i> (lorio <i>et. al.</i> , 2005; Volinia <i>et.al.</i> , 2006; Li-Xu <i>et. al.</i> , 2008)	21p21.3	Sobreexpresado	Rol Oncogénico con importante acción en el sistema inmune.	<i>c-Maf</i> , <i>FGF7</i> , <i>GDF6</i> , <i>TP53NP1</i>		Northern blot y microarreglos de miRNA
<i>miR-206</i> (lorio <i>et. al.</i> , 2005; Volinia <i>et.al.</i> , 2006; Kondo <i>et.al.</i> , 2008).	6p12.2	Sobreexpresado	Metilación de islas CpG del promotor de RE α	ER α (583 blancos conservados)		Northern blot y microarreglos de miRNA.
<i>miR-125a</i> (lorio <i>et. al.</i> , 2005; Volinia <i>et.al.</i> , 2006)	19q13.41	Submodulado	Oncosupresor	<i>ERB2</i> , <i>ERBB3</i>	<i>miR-99b</i> y let-7e	Northern blot y microarreglos de miRNA.
<i>miR-125b</i> (lorio <i>et. al.</i> , 2005; Volinia <i>et.al.</i> , 2006).	11q24.1	Deletado	Supresor de tumor	Dedos de zinc de oncoproteínas		Northern blot y microarreglos de miRNA.
<i>miR-126</i> y <i>miR-335</i> (Tavozeie <i>et. al.</i> , 2008).		Submodulado	La pérdida de su expresión está asociada con una pobre supervivencia en metástasis distales.			qPCR
<i>miR-145</i> (Michael <i>et.al.</i> , 2003)	5q32	Submodulado	Supresor tumoral	<i>RAF1</i> cinasa, proteína G- γ 7, y supresor de tumor del subfragmento 1. Proto-oncogen YES	<i>miR-143</i>	Northern blot
<i>miR-143</i> (Michael <i>et.al.</i> , 2003)	5q32-33	Subexpresado	Supresor tumoral	Genes homeóticos de D10, <i>RAF1</i> cinasa, proteína G- γ 7, y supresor de tumor del	<i>miR-145</i>	Northern blot

				subfragmento 1.		
<i>miR-17-5p</i> (También conocido como <i>miR-91</i>) (Hossain <i>et al.</i> , 2006)		Subregulado, Subexpresado	Oncosupresor	<i>AIB1</i> (Coactivador de los receptores nucleares como Receptores a estrógeno) resultando en el decrecimiento de receptores de estrógeno (mediados e independientes).		Northern blot.
<i>miR-10b</i> (Iorio <i>et al.</i> , 2005; Volinia <i>et al.</i> ; 2006).	2q31.1	Submodulado	Asociado a potencial metastásico. Niveles elevados de expresión están asociados con metástasis y pobre pronosis.	Genes homeóticos D10		Northern blot y microarreglos de miRNA.
<i>miR-9-1</i> (Lehmann <i>et al.</i> , 2008)	1q22	Submodulado	Hipermetilación	Genes supresores de tumor		Pirosecuenciación
<i>miR-27a</i> (Mertens-Talcott <i>et al.</i> , 2007).	19p13.12	Subexpresado en líneas celulares MDA-MB-231.	Supresor de oncoproteínas Sp1, Sp3, and Sp4 las cuales contribuyen a la proliferación de células cancerígenas.	Gen de dedos de zinc ZBTB10/RINZF, un represor de proteínas Sp.	<i>miR-23a</i> <i>miR-24-2</i>	
<i>miR-27b</i> (Tsuchiya <i>et al.</i> , 2006).	9q13.43	Subexpresado	Supresor de coactivadores estrogénicos. Limita el crecimiento en del tejido mamario.	CYP1B1 proteína que está relacionada con el desarrollo de cáncer de mama dependiente de estrógenos.	<i>miR-23b</i> y <i>miR-24-1</i>	
Familia <i>miR-16</i> (Linsley, <i>et al.</i> , 2007).	13q14.3 3q26.1	Subregulado	Regula negativamente la progresión del ciclo celular induciendo acumulación de células G0/G1	Genes <i>CDK6</i> , <i>CDC27</i> , <i>C10orf46</i> , <i>CARD10</i> , <i>PPP1R11</i> , y <i>RAB11FIP2</i>	<i>miR-15a</i> <i>miR-15b</i>	Análisis cinéticos y microarreglos de miRNA

<i>MiR-210</i> (lorio <i>et. al.</i> , 2005; Volinia <i>et. al.</i> , 2006; Camps <i>et. al.</i> , 2008, Foekens <i>et. al.</i> , 2008).	11p15.5	Sobreexpresado y regulado por mecanismos hipóxicos	Altamente relacionado con firmas hipóxicas de tumores mamarios. Los bajos niveles de expresión están relacionados con cánceres mamarios más agresivos y metástasis.	99 genes regulados por hipoxia.		Northern blot, microarreglos de miRNA y qPCR.
Familia de Let-7 (Let-7a, Let-7b, Let-7c, Let-7d, Let-7e, Let-7f, Let-7g) (lorio <i>et. al.</i> , 2005; Lu <i>et. al.</i> , 2005; Volinia <i>et. al.</i> , 2006).	9, 11, 22, 21, 19, 3, 12.	Subexpresado y submodulado	Supresor de tumor: regulador de múltiples células madres BT-IC mediante silenciamiento de más de un blanco. Los bajos niveles de expresión están relacionados con pobre prognosis.	<i>RAS</i> y <i>HMGA2</i>		Northern blot, microarreglos de miRNA y qPCR.
Familia de <i>miR-200</i> (<i>miR-20a</i> , <i>miR-200b</i> , <i>miR-200c</i> , <i>miR-141</i> , <i>miR-429</i>) y <i>miR-205</i> (Gregory <i>et. al.</i> , 2008; Yang <i>et. al.</i> , 2008).	1p36.33, 13q31.3, 12p13.31 y 1q32.2	Subregulados	Supresores metastásico en células epiteliales en transición a células mesenquimales.	<i>TGF-β</i> , un factor de crecimiento expresado en los primeros pasos del proceso metastásico.		

cánceres: *miR-21*, *miR-191*, *miR-17-5p*. Posteriormente, Blenkiron y colaboradores (2007), analizando líneas celulares de cáncer de mama reportaron la expresión de un grupo de miRNA que lograban identificar claramente entre tejido mamario normal y tejido tumoral. Li-Xu y colaboradores (2008) evaluaron con microarreglos de tejido tumoral de cáncer de mama y tejido adyacente al tumor determinando un perfil de expresión del tejido neoplásico, nueve miRNAs sobreexpresados: *miR-21*, *miR-365*, *miR-181b*, *let-7f*, *miR-155*, *miR29b*, *miR-181d*, *miR-98*, *miR29c*; mientras que *miR-497*, *miR-31*, *miR-355*, *miR-320*, *miR-140*, *miR-127*, *miR-30a-3p* están subregulados. Este grupo describe la estrecha relación que existe entre los altos niveles de expresión de *miR-21* y una pobre prognosis asociada a avanzados grados tumorales y presencia de metástasis.

Es importante señalar que algunos reportes también han abordado el debate que ha surgido sobre los miRNA y su expresión diferencial entre tejido tumoral y tejido normal. Uno de los principales argumentos que es no hay aun un estándar en la toma de las muestras normales adyacentes al tumor pues se sabe que conforme más avanzado se encuentre el desarrollo tumoral, las células cancerígenas generan ciertas modificaciones en las células normales al crear un microambiente, favoreciendo su crecimiento y procesos micrometastásicos lo que inminentemente tiene efecto sobre los mecanismo moleculares incluyendo la expresión de los miRNA. Es decir en el área tumoral y el espacio circundante se presenta una competencia entre las células tumorales y las normales por la dominancia del hábitat corporal, de esta forma se ha sugerido que la presencia de las células tumorales mamarias crean una reacción local sobre el cúmulo de células normales a través de la secreción de factores de crecimiento específicos, aunado a ello se ha establecido la presencia de micrometástasis oculta en el cáncer de mama, lo cual dificulta la elección óptima del tejido control representado por el tejido normal adyacente a la masa tumoral. Todo lo anterior debe tener efectos sobre los perfiles de expresión de miRNA, lo cual dificulta el análisis y diferenciación de cada clase de las muestras (Pantel y Otte, 2001, Nicola, *et. al.*, 2003; Boyd, 2008)

Diversos grupos han concluido que la expresión de ciertos miRNA se correlaciona con los cursos clínicos patológicos e histotipos, pudiendo crear de esta forma firmas moleculares de los tipos tumorales. En el caso del cáncer de mama, los perfiles de expresión de miRNA son capaces de discriminar entre los diferentes subtipos tumorales y su consecuente prognosis siendo una buena opción para crear una plataforma de clasificación del cáncer de mama para su mejor tratamiento médico (Perou *et. al.*, 2000; Sorlie *et. al.*, 2001; Sorlie *et. al.*, 2003; Hu *et. al.*, 2006; Mattie *et. al.*, 2006; Blenkiron *et. al.*, 2007; Khosravi *et. al.*, 2007).

La expresión de miRNAs distingue entre los siguientes tipos tumorales:

1. Luminal A: Caracterizado por alto nivel de expresión de receptores estrogénicos (RE), así como una amplia expresión de genes codificantes de estrógenos, positivo a receptor de progesterona, por lo anterior uno de los tratamientos más eficaces es la hormonoterapia teniendo un buen pronóstico. Es negativo a HER2 (RE+, RP+, HER2-).
2. Luminal B: Comparte la mayor parte de las características de luminal A, excepto porque este subtipo tumoral es HER2 + (RE+, RP+, HER2+).
3. Basal-parecido a normal: tejido en el cual se expresan productos génicos característicos de células basales del tejido mamario, es decir, está poco diferenciado, sobresaliendo la queratinas 5, 6 y 17. Por sus características inmunohistoquímicas la mayoría son triples negativos, es decir negativos a estrógenos, negativos a receptores de progesterona y negativos a HER2. El pronóstico de este subtipo tumoral no es bueno pues es muy agresivo (RE-, RP-, HER2-).
4. Parecido a Normal: tejido en el cual se localizan productos génicos típicos del tejido mamario normal. Inmunohistológicamente son negativos a receptores de estrógenos (RE-).
5. HER 2+: Es un tejido caracterizado por ser negativo a estrógenos y progesterona, y poseer cierta resistencia biológica al tratamiento quimioterapéutico por lo que su pronóstico es desalentador. Los tratamientos más empleados son el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, el cual actúa contra el ectodominio de HER2 (RE-, RP-, HER2+).

(Heneghan *et.al.*, 2009; Lowery *et. al.*, 2009

lorio y colaboradores (2005 y 2008) reportaron que el cluster *let-7* está submodulado en cáncer de mama, siendo más evidente por sus niveles de expresión en los tumores linfáticos metastásicos con altos índices de proliferación; estos datos sugieren que los bajos niveles de expresión de *let-7* están asociados con mala prognosis. *miR-145* y *miR-21*, aparte de discriminar entre tejido normal y tumoral, también son expresados diferencialmente en los distintos tipos tumorales. La subexpresión de *miR-145* es característica en el cáncer de mama con alto índice de proliferación, mientras que la sobreexpresión de *miR-21* está asociada con etapas avanzadas de cáncer de mama; *miR-30s* se encuentra subregulado en los tumores con receptores negativos a estrógenos y receptores negativos a progesterona, lo cual hace pensar que la expresión de este miRNA está regulada por estas hormonas. Por último *miR9-3* está sub regulado en cáncer de mama invasivo altamente vascularizado o con presencia de nodos linfáticos metastásicos teniendo un rol de gran importancia en el desarrollo de cáncer de mama metastásico (lorio, 2005).

Sorlie y su grupo (2001), reportaron que hay diferencias significativas en los perfiles de expresión de miRNAs de muestras *HER2* positivas y *HER2* negativas. Considerando la relevancia de *HER2*, los receptores a estrógeno (RE) y receptores de progesterona (RP) como unos de los aspectos clínicos con mayor importancia en la clasificación del cáncer de mama y la selección de tratamiento.

Asimismo, Blenkiron y colaboradores (2007) tras el estudio de 99 tumores primarios y 33 muestras de líneas celulares cancerígenas así como 5 muestras de tejido normal reportaron que existen diferencias claras en la expresión de los miRNA entre tumores RE- y RE+, siendo las más representativas la expresión diferenciada de *miR-155* entre RE- y RE+. Estudios iniciales del grupo de Lowery (2008) reportaron que los niveles de expresión de *miR-195* y *mi-154* se correlacionan negativamente con los tumores positivos a estrógenos.

Adams y sus colaboradores (2009), tras estudiar la función de *miR-206* mediante el uso de antagonistas, reportaron que los niveles de expresión de éste se encuentran elevados en tumores con receptores de estrógenos negativos (RE- α).

También, el grupo de investigación de Sempere (2007) tras realizar un estudio con microarreglos de miRNA e hibridación in situ, empleando subpoblaciones de líneas celulares epiteliales normales (IMECs y MCF10A) y aisladas de tumores mamarios (BCLs) reportó claros patrones de expresión de miRNA diferenciales entre los distintos subtipos tumorales. *miR-141*, *miR-200c* (asociados al cromosoma 12) y *miR-183* presentaban un patrón de expresión opuesto a los transcritos *miR-221* y *miR-222* (asociados al cromosoma X) pudiendo de esta forma distinguir claramente entre los subtipos luminal y basal. Coincidiendo con otros trabajos reportaron el miRNA *let-7* como otra molécula que forma parte de estas firmas moleculares tumorales, que junto con *miR-21*, *miR-141*, y *miR-214* están preferentemente expresados en el tipo luminal, mientras que la subregulación de *miR-145* y *miR-205* está asociada con el tipo basal, pues su expresión se restringe a células epiteliales/ basales de los ductos y lóbulos del tejido mamario. Lowery y colaboradores (2009) empleando microarreglos de miRNA y su posterior validación con qPCR, así como la herramienta bioinformática ANN (Artificial Neuronal Network), la cual permite predecir, modelar y responder preguntas biológicas particulares reportaron firmas moleculares muy claras entre los distintos subtipos tumorales. Los tumores positivos a receptores de estrógeno (RE) tienen un perfil de 6 miRNA los cuales pueden discriminar con 100% de confianza, entre células positivas y negativas a estrógenos. El estatus de receptores a progesterona (RP) está caracterizado por la expresión de 4 transcritos de miRNAs, finalmente el histotipo de *HER2/neu* puede ser predicho por una firma de 5 miRNAs (Tabla 3). La mayoría de los miRNAs que diferencian a cada uno de los histotipos han

sido previamente reportados como transcritos pequeños alterados en distintos tipos de cánceres humanos.

Tabla 3. Firmas de miRNA que predicen histotipos en cáncer de mama (Lowery *et. al.*, 2009).

Histotipo	Firma molecular	miRNA	Loci
Receptor estrógenos RE+	a 6 miRNA	<i>miR-342</i> <i>miR-299</i> <i>miR-217</i> <i>miR-190</i> <i>miR-135</i> <i>miR-218</i>	14q32 14q32 2p16.1 15q22.2 3p21.1 5q35.1
Receptor progesterona RP+	a 4 miRNA	<i>miR-520g</i> <i>miR-377</i> <i>miR-527-528a</i> <i>miR-520f-520c</i>	19q13 14q32 19q13 19q13
HER2/ <i>neu</i> +	5 miRNA	<i>miR-520d</i> <i>miR-181c</i> <i>miR-302c</i> <i>miR-376b</i> <i>miR-30e</i>	19q13 19q13 14q32

La expresión de estrógenos en cáncer de mama ha sido explorada por muchos grupos de trabajo, y en la actualidad se comienza a analizar la relación que tiene su expresión con los miRNA; los datos del grupo de Smith y colaboradores (2008) mostraron que muchos de los genes que codifican para miRNA que están sobreexpresados en tumores RE- han sido previamente identificados como biomarcadores para la transformación neoplásica en múltiples cánceres humanos. Siguiendo esta línea de investigación el grupo de Kondo (2008) reportó la sobreexpresión del *mir-206* en tumores positivos a estrógenos alfa.

McCafferty y colaboradores (2009) abrieron la puerta al estudio de la interacción de los receptores estrogénicos, sus cofactores y los miRNAs expresados en cáncer de mama. Este reporte es de gran interés pues describe la relación entre dos moléculas reguladoras fundamentales en la expresión hormonal: los cofactores nucleares, lo cuales son proteínas que coordinan procesos celulares facilitando las reacciones bioquímicas, y los miRNAs, que en el proceso cancerígeno se ven alterados generando respuestas como resistencia endócrina. La literatura ha reportado que muchos miRNAs tiene como posibles blancos a los cofactores hormonales; un ejemplo claro es el que este grupo describe entre el *miR-17-92*, que se encuentra subexpresado en cáncer de mama, y el cofactor estrogénico SRC-3, que esta sobreexpresado, favoreciendo el crecimiento tumoral.

Los cambios en la expresión de miRNA en los distintos subtipos tumorales no sólo se centra en los distintos niveles de expresión de los transcritos también se han visto cambios en las enzimas que participan en la biogénesis de los miRNA así pues Dicer 1 está subexpresado en los tipos tumorales más agresivos: Basal, HER2+ y luminal B. Los niveles bajos de esta enzima también se han relacionado con mayores niveles de tumorigénesis, por otro lado AGO2 está elevado en estos mismos subtipos tumorales (Blenkiron *et. al*, 2007).

Rol de los miRNA en el cáncer de mama metastásico.

La metástasis es un proceso por el cual un tumor primario invade el tejido adyacente, entrando a través del sistema circulatorio proliferando como crecimientos microscópicos en otras zonas del cuerpo. Finalmente, se desarrollan tumores secundarios representando una de las principales causas de mortalidad en pacientes con tumores sólidos. Diversos estudios han sugerido el papel de los miRNA como una de las moléculas implicadas en la progresión maligna del cáncer incluyendo la metástasis, así pues diversos estados de metástasis están asociados con la expresión de miRNA específicos los cuales pueden actuar como mediadores de este complejo proceso (Ma *et. al.*, 2007; Tavazoie *et. al.*, 2008).

Ma y su grupo (2007), empleando un modelo biológico de ratón y humano, hallaron que el *miR-10b* se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de mama metastásico y regula positivamente la migración celular y la invasión. El mecanismo de este miRNA consiste en inducir la transcripción del factor Twist, el cual se une directamente al promotor putativo del *miR-10b*. El factor Twist inhibe la transcripción del RNA mensajero codificante de gen homeótico D10 el cual es un supresor tumoral de *RHOC*; como consecuencia los niveles de este gen pro metastásico se elevan considerablemente, promoviendo entonces el proceso de invasión maligna, por lo tanto los niveles de *miR-10b* en los tumores primarios se correlacionan con la progresión clínica de la masa tumoral (Negrini y Calin, 2008).

Otros estudios realizados por Huang y colaboradores (2008) correlacionan a *miR-373* y *miR-520c* como promotores de la invasión tumoral y la metástasis, al inhibir la expresión del gen CD44 en muestras de casos clínicos de cáncer de mama metastásico. Tavazoie y colaboradores (2008) reportaron un grupo de miRNAs que están especialmente subexpresados en los cánceres con alto potencial metastásico, así pues la pérdida de la expresión de *miR-335*, *miR-206* y *miR-126* promueve metástasis a pulmón y hueso, la metástasis más común en cáncer de mama, al actuar como supresores de tumor. La pérdida de

miR-335 activa *SOX4* y *TNC* los cuales favorecen el proceso de invasión (Negrini y Calin, 2008).

El conocimiento de estos miRNA brinda una nueva opción para generar anticancerígenos y antimetastásicos.

PCR en Tiempo Real: una herramienta para el análisis de miRNA.

Entender y determinar los patrones de expresión génica permite entender las complejas redes biológicas y podrían ayudar a la identificación de genes relevantes en los procesos implicados en la enfermedad, para ello los investigadores han echado mano de varias herramientas de la biología molecular y la biotecnología. Uno de los métodos más confiables y específicos para la evaluación de la expresión de miRNAs es el PCR en Tiempo Real, con sus diversas variantes de cuantificación ya sea absoluta o relativa, así como flourocromos específicos o no específicos.

La PCR en Tiempo Real es un método ampliamente utilizado en biología molecular cuyo objetivo final es amplificar de forma específica un fragmento de ácido nucleico y de esta manera aumentar la cantidad de material genético original, así como cuantificar la cantidad de material genético en cada ciclo de amplificación. La técnica es una variante de la PCR, la cual emplea la enzima Taq Polimerasa cuyas características naturales permiten polimerizar nuevas cadenas de material genético a muy altas temperaturas junto con dNTPs, cebadores específicos y fluoróforos (Costa J., 2004; Krenke, 2007).

Cuando este método se emplea para evaluar la expresión génica de los distintos tipos de RNAs se debe realizar un paso previo a la PCR en Tiempo Real, conocido como retrotranscripción, el cual consiste en la generación de una cadena de ácido desoxirribonucleico copia (DNAC), a partir de la cadena molde de RNA la cual es complementaria a esta nueva cadena. La retrotranscripción se realiza gracias a la acción de la enzima transcriptasa reversa, la cual es una DNA-polimerasa capaz de sintetizar DNA a partir de RNA.

Subsecuente a esta polimerización de DNAC, se prosigue con la amplificación en tiempo real en un termociclador en tiempo real con un lector de fluorescencia, el cual registra la fluorescencia emitida por la secuencia blanco en cada ciclo de amplificación. Inicialmente se desnaturaliza el ácido nucleico, en este caso el miRNA para evitar que se formen estructuras secundarias que impidan la polimerización, a una temperatura de 94°C, a continuación se disminuye la temperatura para el alineamiento de los cebadores los cuales iniciarán la polimerización de la cadena complementaria, seguido por la acción de la Taq Polimerasa que elonga la copia del miRNA en conjunto con los

dNTPs a una temperatura promedio de 75°C sintetizando la cadena complementaria al DNAc generado durante la retrotranscripción procesada previamente al PCR en tiempo real (Krenke, 2007).

Para la cuantificación de la expresión génica se emplean dos tipos de metodologías: una en donde se usa un fluorocromo que se intercala de forma inespecífica entre las moléculas de doble cadena de los ácidos nucleicos (SybrGreen), aumentando la fluorescencia en cada ciclo, cuando las dobles cadenas de los productos de amplificación se están formando, lo cual refleja el incremento en el producto de PCR (ácido nucleico). Sin embargo, este método tiene una baja especificidad, dado que se une indistintamente a cualquier producto de doble cadena generado por la amplificación (Fig. 14.1-A.) El otro método está basado en el uso de sondas específicas, de las cuales hay varias clasificaciones de acuerdo a su mecanismo de unión (Costa, 2004).

Una de las principales sondas son las de hidrólisis (Fig. 14.1-B), conocidas como TaqMan. Este sistema consta de varias moléculas: cebadores específicos para la iniciación de la polimerización, oligonucleótidos denominados sondas TaqMan complementarias a una región interna del amplicón. Estas sondas están constituidos por nucleótidos previamente marcados con un fluorocromo en el extremo 5' que emite fluorescencia y un aceptor (quencher) en el extremo 3'. Al haber cercanía entre el fluorocromo y el aceptor la fluorescencia es absorbida por el aceptor y ésta no es liberada; el último elemento de este método es una Taq polimerasa con acción de exonucleasa, la cual al avanzar en la polimerización de la nueva cadena se encontrará con la sonda TaqMan, comenzándola a degradar liberando de esta forma al fluorocromo, permitiendo se emita la fluorescencia, pues se pierde la cercanía con el quencher (Fig. 14.2) (Costa, 2004).

Así pues, mientras la sonda esté intacta no habrá emisión de fluorescencia; sin embargo, una vez que ésta se hibridiza con su cadena complementaria la Polimerasa comenzará a polimerizar la nueva cadena hidrolizando el extremo 5' de la sonda TaqMan liberando el fluorocromo, permitiendo la emisión de fluorescencia pues se pierde la cercanía con el aceptor, de este modo se puede monitorear el aumento de fluorescencia ciclo por ciclo.

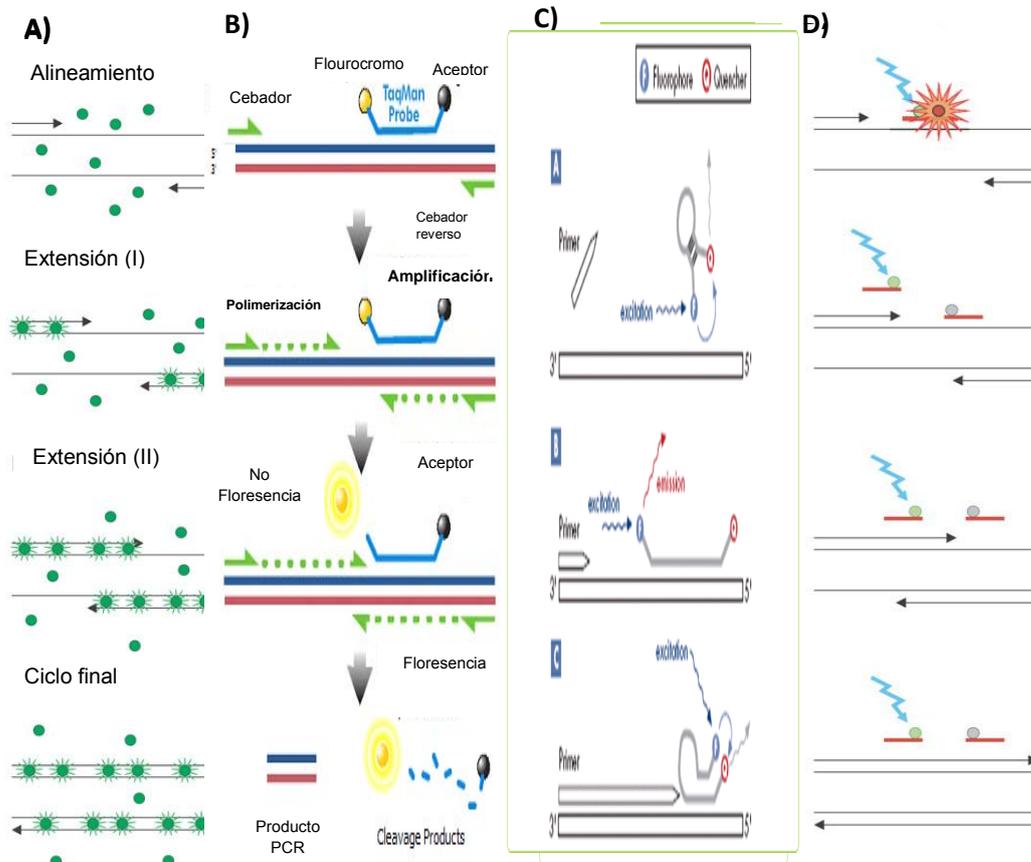


Fig 14.1. Distintos métodos para medir la fluorescencia A) intercalantes- Sybergreen B) sondas de hidrólisis- TaqMan C) sondas Beacon: comparten la química de las sondas de hidrólisis pero poseen una estructura secundaria en forma de asa. Mientras la sonda no se hibride con su secuencia complementaria el donador y el aceptor estarán a una corta distancia (no hay fluorescencia), cuando se hibrida se pierde la proximidad entre las moléculas emitiendo fluorescencia detectada por el equipo en Tiempo Real. D) sondas de hibridación: es un sistema que consiste en dos sondas que se hibridan a secuencias contiguas. Una de las sondas posee un donador de fluorescencia en el extremo 5' y la otra sonda un aceptor en el extremo 3'. Cuando ambas sondas se hibridan se excita el sistema y el donador transfiere la fluorescencia al aceptor la cual es detectada por el lector. Tomado de Nature y www.meduni-graz.at/zmf/mb/ab7900services.html

Cualquiera de los métodos de sondas posee ventajas sobre los intercalantes, ya que el uso de iniciadores específicos para la región de interés, sumado a la especificidad de la sonda interna, disminuye de forma considerable la presencia de amplificación no específica.

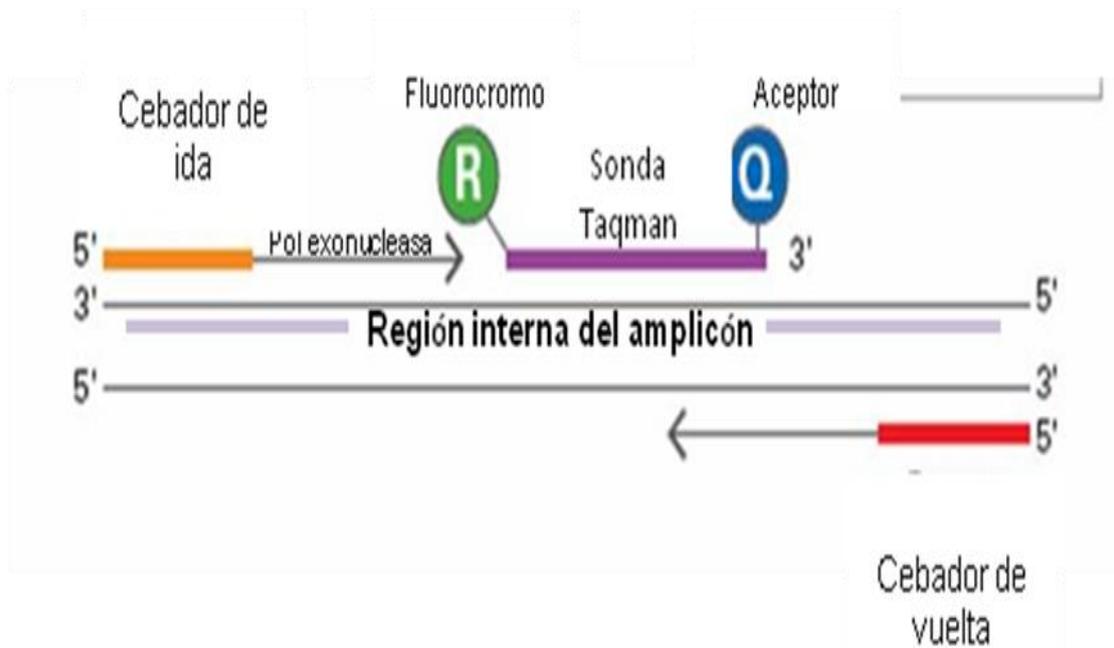


Fig 14.2. Sistema de sondas TaqMan, se muestran los componentes del sistema: Cebadores específicos, sondas Taqman con fluorocromos y aceptores y Polimerasa con acción exonucleasa.

La expresión génica se puede graficar en una curva de amplificación en la que se calculan los datos de expresión: en primera instancia se determina el Ct (threshold cycle o punto de corte), el cual es el número de ciclos en el que se comienza a detectar fluorescencia (intervalo a partir del ciclo 0), es decir el ciclo en el que los niveles de fluorescencia sobrepasan la línea de corte (Threshold), generalmente durante la fase exponencial. Entre mayor concentración de templado, el Ct será menor, es decir existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad original de transcritos y los Ct, así pues un transcrito con una alta concentración se detectará en los primeros ciclos (Ct) de amplificación (Fig. 15) (Krenke, 2007).

Otro concepto importante, mencionado con anterioridad, es la línea de corte, una medida en la que el producto de fluorescencia puede distinguirse del fondo, es decir es una regla de decisión a partir de la cual la fluorescencia se considera expresión génica distinguiéndose del ruido de fondo. La línea basal es otro término que se refiere a la fluorescencia propia de los fluorocromos (ruido de fondo), que es emitida y detectada por el lector y que debe ser considerada como fluorescencia inherente al sistema y no como expresión génica durante el análisis de los datos crudos (Fig. 15) (Krenke, 2007).

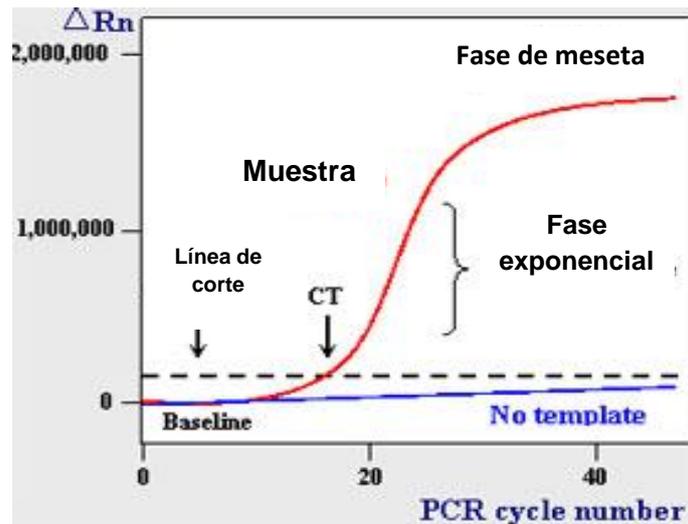


Fig. 15. Curva de amplificación de PCR en tiempo real. Se resaltan la línea de corte y el Ct. Tomado de: www.rt-pcr.com

La medición de fluorescencia permite calcular la expresión génica en dos distintos niveles:

Cuantificación absoluta (AQ): este método nos permite conocer el número de copias presentes en la muestra evaluada, para ello se requiere una curva patrón de una muestra en la que se conoce con certeza la cantidad de copias presentes, la cual se diluye serialmente, finalmente se interpolan las muestras problema.

Cuantificación relativa (RQ): Este método permite evaluar las diferencias que hay en la expresión entre dos grupos muestrales, es decir no determina cuantas copias de transcrito hay en la muestra si no cuanto más o menos se expresa un miRNA entre las muestras. Para ello se emplea el método RQ.

El primer paso consiste en normalizar las muestras contra un control endógeno que se expresa de forma constitutiva, para lo cual se resta el CT del miRNA evaluado menos el Ct del control endógeno (ΔCt) (Fig. 16-1); a continuación se resta el ΔCt de la muestra problema menos el ΔCt de la muestra control para calcular el $\Delta\Delta Ct$ (Fig. 16-2)). Finalmente, considerando una eficiencia del 100% equivalente a 2 se eleva $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fig. 16-3).

Algunas de las principales ventajas de la PCR en Tiempo Real es que es altamente sensible y muy precisa, pues permite medir la expresión en la fase exponencial de la curva de amplificación, permitiendo evaluar los cambios ciclo a ciclo, contrario a la PCR punto final, donde se analiza la fase de meseta, donde existe condiciones determinantes, como la presencia de reactivos limitantes, lo que disminuye su resolución y precisión. Aunado a ello, la PCR en Tiempo Real es una técnica que permite realizar análisis cuantitativo y semicuantitativo, de acuerdo a las necesidades de cada investigación.

$$\begin{aligned} (1) \quad & \text{Ct muestra problema} - \text{Ct controles endógenos} = \Delta\text{Ct muestra problema} \\ & \text{Ct muestra control} - \text{Ct controles endógenos} = \Delta\text{Ct muestra control} \\ (2) \quad & \Delta\text{Ct muestra problema} - \Delta\text{Ct muestra control} = \Delta\Delta\text{Ct} \\ (3) \quad & 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{RQ} \end{aligned}$$

Fig. 16. Cálculos matemáticos del método RQ para PCR en TiempoReal

Justificación

El cáncer de mama es un problema grave de salud pública a nivel mundial y en México. Desafortunadamente, de acuerdo a las estadísticas, éste seguirá en aumento, por ello conocer los diversos aspectos de esta patología es fundamental para su mejor y oportuno diagnóstico, así como para la creación de tratamientos específicos, menos agresivos y más efectivos. Las alteraciones genéticas son uno de los principales factores para el desarrollo del cáncer, por ello los análisis genómicos brindan conocimientos y herramientas para comprender de mejor manera ésta enfermedad y brindar nuevas soluciones.

En la actualidad se han identificado cambios en los patrones de expresión de microRNAs que permiten una mejor clasificación de los tumores mamarios, así como una mejor evaluación de riesgo a padecer enfermedad recurrente, siendo capaces de predecir respuesta a tratamiento e invasión del tumor. Sin embargo, en México no hay datos concretos acerca de las alteraciones de los perfiles de expresión de miRNA en pacientes con cáncer de mama, y no existen estudios que validen la utilidad de dichas firmas como herramientas de evaluación de riesgo en pacientes mexicanas. Asimismo, son escasos los análisis que brindan información de la correlación entre parámetros moleculares asociados a riesgo y parámetros clínicos e histopatológicos, como el grado y estadio del tumor, la amplificación de Her2/Neu la expresión de receptores hormonales con ciertos perfiles de expresión de miRNA.

Por ello es importante conocer las alteraciones en los perfiles de expresión de miRNA en tumores de mujeres mexicanas, y de esta forma, en un futuro, poder generar nuevos métodos diagnósticos, encaminados a la detección temprana, oportuna y específica del cáncer de mama. De igual forma, se podrían crear tratamientos dirigidos a moléculas específicas y, finalmente, mediante la firma molecular de miRNA de cada tumor se podría conocer su curso clínico y de esta forma brindar un tratamiento adecuado y preventivo.

El costo humano y económico derivado de esta neoplasia, hace que la caracterización de alteraciones genómicas asociadas al desarrollo de cáncer de mama se convierta en una necesidad estratégica de salud. Por ello esta investigación contribuirá al desarrollo del conocimiento sobre los perfiles de expresión de miRNA en los procesos patológicos del cáncer de mama en la población mexicana.

Objetivos

Objetivo General.

Identificar los patrones de expresión de microRNAs y determinar las alteraciones de expresión en muestras biológicas de cáncer de mama en pacientes mexicanas.

Objetivos Particulares.

1. Establecer los protocolos experimentales para la obtención de RNA total incluyendo la fracción de RNA pequeños (microRNAs) a partir de muestras quirúrgicas de pacientes con cáncer de mama.
2. Analizar los cambios en los perfiles de expresión de 667 microRNAs en paralelo mediante el uso de una plataforma de arreglos de microfluidos y análisis de PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan.
3. Identificar los microRNAs cuya expresión diferencial permita diferenciar de forma más adecuada al tejido normal del tejido tumoral.
4. Correlacionar los genes codificantes de los microRNAs alterados en cáncer de mama con las zonas identificadas como amplificadas, deletadas, y alteradas en el número de copias en las mismas muestras analizadas para este estudio.
5. Determinar, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, algunos de los transcritos blancos de los microRNAs con expresión diferencial entre tejido normal y tumoral, así como su potencial efecto en diversas rutas metabólicas celulares.

Hipótesis

El análisis de los cambios en los perfiles de expresión de microRNAs permitirá identificar patrones de expresión diferenciales entre tejido sano y tumoral, así como microRNAs cuya expresión se asociará con parámetros clínicos particulares.

Materiales y método

Muestras. Se analizaron un total de 45 muestras; incluyendo 25 muestras de tumores de glándula mamaria de pacientes mexicanas sin tratamiento previo y 20 muestras de tejido normal adyacente al tumor, colectadas en la Fundación Mexicana para el fomento Educativo para la Prevención y Detección oportuna del Cáncer de mama (FUCAM), durante la resección quirúrgica de los tumores (sin que esto interfiriera con los procedimientos normales ni comprometiera la valoración histopatológica o el diagnóstico de la lesión). Previamente se informó a la paciente sobre el proyecto, objetivos, riesgos y beneficios de participar en el estudio, procediendo a la firma del consentimiento informado. Tras obtener las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido (-196°C) en un criotubo debidamente etiquetado; finalmente fueron almacenadas a -80°C para su posterior procesamiento.

Todas las muestras tumorales se evaluaron histopatológicamente mediante cortes obtenidos con criostato y teñidos para asegurar un alto contenido de células tumorales. Únicamente las muestras con un contenido superior al 80% de células tumorales y sin presencia de necrosis se procesaron para la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de RNA total incluyendo la fracción de RNAs pequeños: Previo a la estandarización de la técnica de extracción se realizó una evaluación de dos métodos que permiten extraer RNA total incluyendo la fracción pequeña, el kit MirVana Kit y la extracción trizólica. El primero es una técnica que basa la extracción del RNA total, incluyendo los RNA pequeños, en un proceso químico de extracción orgánica con cloroformo y en la inmovilización del RNA en una columna de fibra de vidrio diseñada para separar de manera física el RNA sin perder la fracción pequeña (fase sólida de extracción). Durante este proceso se utilizan sales y alcohol para reducir la afinidad del RNA con el agua empleando como soporte una membrana de sílica logrando así su purificación. Brevemente el protocolo MirVana consiste en la disrupción del tejido en un buffer de lisis, a continuación se realiza la extracción orgánica, finalizando la purificación del RNA total incluyendo RNA pequeños con lavados de etanol a distintas concentraciones. Este método también permite enriquecer únicamente la fracción pequeña para lo cual se realizan diversas modificaciones en la extracción final (Ver anexo A).

El otro método evaluado fue la extracción trizólica, la cual inicia con la disrupción de la muestra en trizol (Invitrogen, CA) con un homogenizador de tejido. Se prosigue a la extracción orgánica con cloroformo para remover todo el DNA y

proteínas de la muestra y purificar el RNA, a continuación se centrifuga y se recupera la fase acuosa, con la cual se iniciará la extracción de RNA total (con el que se evaluó la calidad y cantidad de RNA antes de iniciar los arreglos). Para la purificación de RNA total, se precipita con isopropanol por toda la noche a -20°C , posteriormente se realizan varios lavados con etanol a diferentes concentraciones. Finalmente se eluye el RNA con agua DPC para inhibir la acción de RNasas.

Una vez purificados, la concentración de los ácidos nucleicos se evaluó mediante espectrofotometría con Nanodrop y la integridad del RNA por electroforesis capilar con el sistema Bioanalyzer que permite evaluar el RNA total y analizar su integridad mediante un algoritmo dedicado que estima el rango que existe entre la fracción ribosomal 28S y 18S del RNA total estimando el grado de degradación de la muestra. El algoritmo provee un control de calidad de la integridad de la muestra, expresándolo en un valor numérico conocido como RIN (RNA Integrity Number) variando en una escala del 1 al 10, siendo 10 la mayor integridad. Basado en ello únicamente se procesaron muestras con un RIN superior a 5.5. Asimismo, se empleó la plataforma de RNA pequeños (transcritos menores a 200nt como miRNA, RNA pequeños de interferencia, RNA pequeños nucleares y RNAt) la cual permite conocer el porcentaje de miRNAs en una muestra, así como la calidad y concentración, con base a factores dinámicos calculados en relación a un marcador de masa y peso molecular, la cual posee una alta resolución.

Una vez comprobada la calidad de los RNA totales se estandarizó la técnica con trizol modificada (ver anexo A) para todo los análisis posteriores, debido a que se obtuvieron mejores resultados en cuanto integridad y cantidad de RNA.

Análisis de patrones de expresión de microRNAs: El análisis de patrones de expresión de microRNAs se llevó a cabo empleando la plataforma de arreglos TaqMan de baja densidad Megaplex usando el equipo 7900 FAST de Applied Biosystems, con un bloque especial de 386 pozos para PCR en tiempo real. La plataforma evalúa la expresión de 667 microRNAs de forma global, de los cuales 380 están ampliamente descritos y se conoce su función biológica (placa A), mientras que el resto de los miRNA son transcritos potenciales, es decir han sido descritos pero se desconoce su función biológica (placa B). Bajo ese método se analizaron 30 muestras de tejido tumoral y 20 de tejido normal adyacente organizadas en dos conjuntos (pooles), formados respectivamente por 5 y 10 muestras, así como cinco muestras independientes. El 82% del total de las muestras fueron procesadas por triplicado tanto para la placa A como para la B, permitiendo conocer de esta forma la variabilidad de la expresión debida a la repetición técnica dada por el procesamiento de las muestras, así como la reproducibilidad de la propia plataforma (Anexos B y C).

El experimento se inició partiendo de 210 μ l de RNA total en 3 μ l, el cual es poliadenilado y convertido a cDNA mediante Megaplex RT Primers, los cuales son un conjunto de cebadores predefinidos para los 380 miRNA que simultáneamente pueden generar la síntesis de DNAC, a partir únicamente de miRNA maduros. A continuación se preamplifican los productos de la transcripción reversa con cebadores específicos con el fin de posibilitar el uso de cantidades muy pequeñas de material inicial, así como para detectar miRNA con niveles muy bajos de expresión. Finalmente, se deposita el producto de la preamplificación en la matriz del arreglo de baja densidad (ambas placas A y B), el cual incluye controles endógenos positivos (RNA pequeños nucleolares constitutivos). En este paso se emplea un arreglo TaqMan para miRNA el cual consiste en cebadores y pruebas TaqMan con el fin de evaluar por PCR tiempo real la fluorescencia de cada transcrito, la cual corresponderá a la cantidad relativa de templado (microRNA) presente en la muestra original (Fig. 17).



Fig. 17. Protocolo de "TLDA Megaplex".

Transcripción reversa de los miRNA: se emplea un kit de transcriptasa Reversa (Applied Biosystems) en combinación de un grupo de cebadores Megaplex específicos para miRNA en forma de horquilla permitiendo simultáneamente la transcripción reversa de 380 miRNA maduros y los controles endógenos con una alta especificidad. Brevemente, la reacción consiste en 3 μ l de RNA total, RT primer mix, RT buffer, Multiscribe Reverse Transcriptase, dNTPs, MgCl₂ e inhibidor de RNasas teniendo un volumen total de 7 μ l. La reacción de RT se realiza en 40 ciclos de 16° por 2 min., 42°C por 1 min y 50°C por 1s, seguido por la inactivación de la enzima de transcripción reversa a 90° por 10 min (Fig. 18).

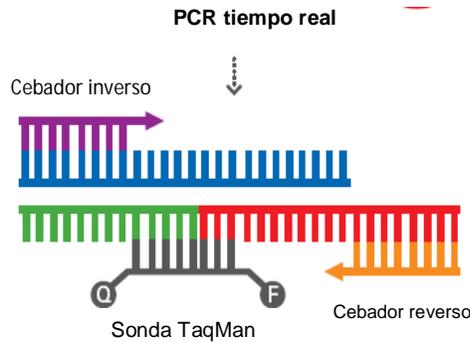


Fig. 18. Reacción de PCR en tiempo real con sondas TaqMan.

Preamplificación de cDNA: El producto de la RT se pre-amplificó usando TaqMan PreAmp Master Mix, que consiste en cebadores específicos para cada uno de los 380 miRNA y el PreAmp Primer Mix, el cual es un cebador universal, en 25 μ l de reacción de PCR. Las condiciones de PCR fueron 95°C por 10 min, 55°C por 2 min y 72°C por 2 min, seguido por 12 ciclos de 95°C por 15s y 60°C por 4 min y la inactivación de la reacción a 99.9°C por 10 min.

PCR en Tiempo Real: La reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen total de 900 μ l, los cuales contienen 441 μ l de agua libre de RNasa, 450 μ l de TaqMan Master Mix y 9 μ l del producto de la Preamplificación. La reacción se lleva a cabo en el sistema de PCR tiempo real de Applied Biosystems con las siguientes condiciones 95°C por 10 min seguido por 40 ciclos a 95°C por 15s y 60°C por 1 min (Fig. 18-19).

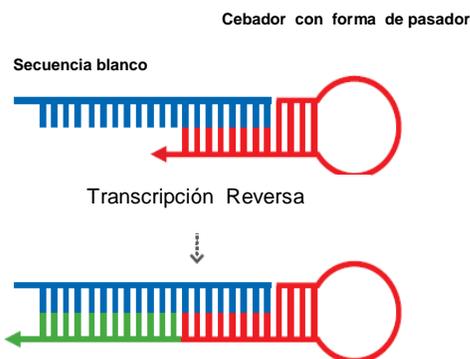


Fig. 19. Reacción de transcriptasa reversa con cebadores específicos en forma de horquilla para los 380 miRNA

Análisis bioinformáticos: El análisis de los datos se realizó empleando el software RQ Manager 1.2 de Applied Biosystems, DataAssist (2009) v1.0 de Applied Biosystems y el programa Partek Genomics Suite calculando la expresión de cada transcrito mediante el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los controles endógenos positivos MammU6-4395470 y RNU48, incluidos en el arreglo de baja densidad Megaplex, se usaron como normalizadores para el análisis estadístico, mientras que el calibrador correspondió a los 20 tejidos normales adyacentes (control positivo experimental).

Predicción de los blancos de miRNA: Se emplearon dos métodos: TargetScan 5.1 (2009) y MIRANDA (2008), los cuales analizan algorítmicamente los posibles blancos basados en la región semilla. Para el análisis combinado de ambos algoritmos se empleó la base de datos miRGator: "An integrated system for functional annotation of microRNAs", con lo cual se logró una búsqueda más limitada y astringente. También se consultó la base de datos mir2disease (2009) la cual permite realizar una búsqueda documental de la expresión de ciertos miRNAs y su relación con cierta patología humana. El análisis funcional se enriqueció empleando las bases de datos mirGator y ArrayXPath para correlacionar la expresión aberrante de los miRNA y la posible alteración de las rutas celulares

Resultados

Se evaluaron un total de 45 muestras, 25 de tejido tumoral mamario de pacientes mexicanas sin tratamiento previo y 20 muestras de tejido normal de las mismas pacientes.

En primera instancia se evaluaron histológicamente cada una de las muestras; este trabajo se desarrolló en la Unidad de Biomarcadores del Instituto donde una fracción del tejido fresco se separa para su inclusión en parafina de la cual se realizaron cortes mediante el microtomo para su posterior evaluación con tinciones de hematoxilina-eosina. De este modo se seleccionaron las muestras cuyo contenido celular tumoral fuera mayor al 80%, evitando procesar tejidos que tuvieran una gran cantidad de estroma que pudiera afectar los perfiles de expresión (Fig. 20)

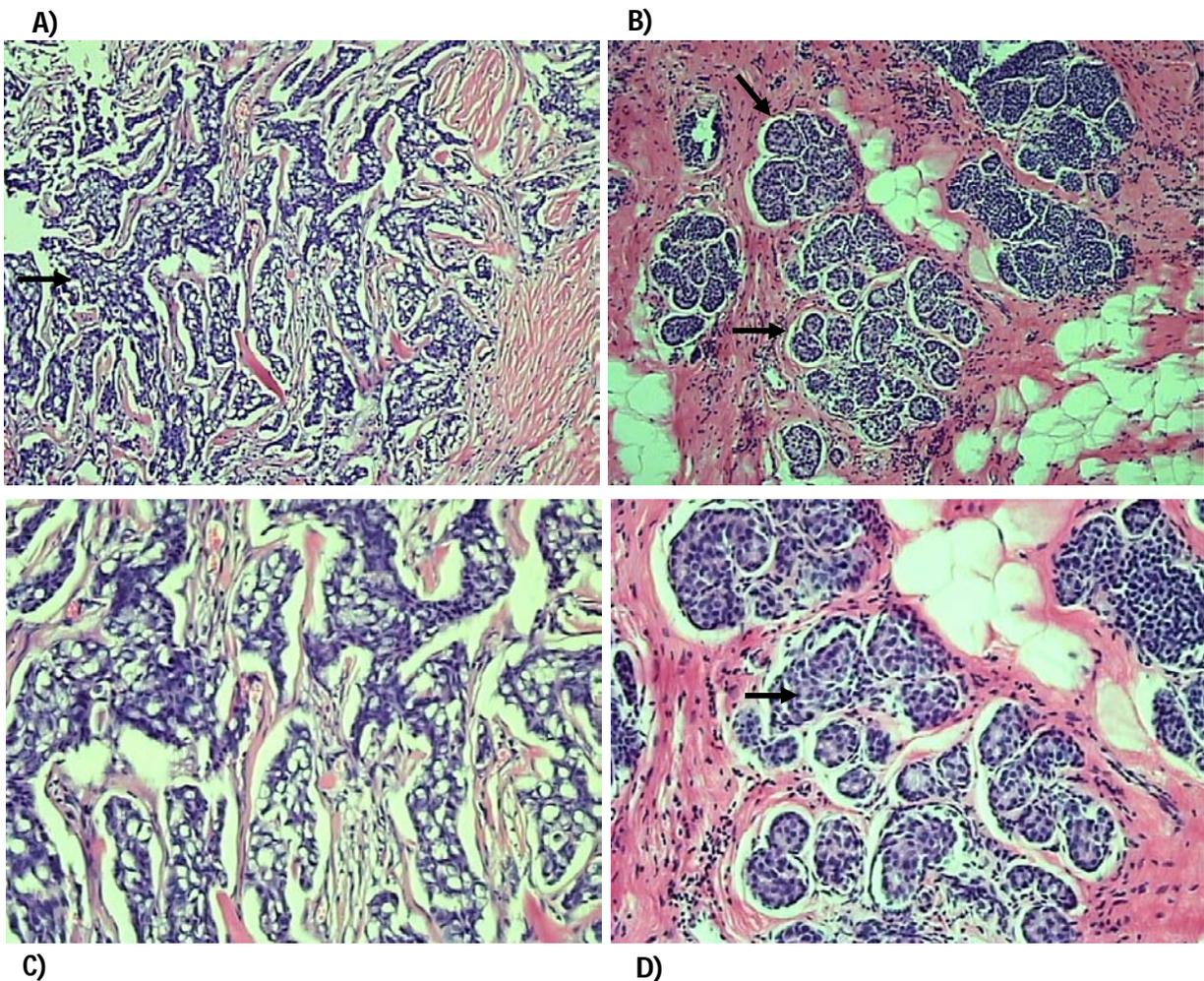


Fig. 2. Cortes de tejido tumoral teñido con hemetoxilina-eosina; en color azul se observan la estructuras nucleares mientras que en rosa el citoplasma. A-B) Corte de 20μ (10X), C-D) Corte de 20μ (20X). Marcado con flechas se observa la proliferación de células ductales con núcleos aumentados de tamaño, creciendo en pequeños nidos o cordones, formando sábanas densas.

Información clínica de las muestras biológicas.

Las muestras biológicas analizadas en este proyecto provienen de las piezas quirúrgicas obtenidas durante la recesión de tumores mamarios de pacientes con un rango de edad de entre 37 y 71 años, con una media de 54. El 89.6% de las muestras presentaban un diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal, de los cuales el 88.46% son infiltrantes y el resto *in situ*. En cuanto a la expresión de receptores hormonales y proteína ERBB2, el 69% son RE+, el 69% RP+ y las muestras que únicamente son Her2+ corresponden al 34.48%. La minoría (10.35%) corresponde a tumores triple negativos (RE-, RP- y Her2-) (Tabla 4).

Tabla 4. Información clínico patológica de las pacientes cuyas muestras fueron procesadas en este estudio.

Característica	Número de pacientes (%)	
Edad		
Media:	54 años	
Máxima:	71	
Mínima	37	
Diagnóstico histopatológico	Ductal <i>in situ</i>	10.3
	Ductal infiltrante	79.3
	Otros	
	Lobulillar infiltrante	3.44
Mucinoso invasivo	3.44	
Papilar invasivo	3.44	
Grado histológico	II	83.33
	III	16.66
Expresión de receptores hormonales y proteína Her2.	RP+	69
	RE+	69
	Her2+	34.48
	Triple negativo	10.35

Extracción de RNA total

Para la extracción del RNA total se evaluaron dos técnicas: el kit MirVana Paris diseñado para la extracción química de miRNA basado en columnas y la extracción trizólica. Los resultados de la comparación entre ambos métodos, en cuanto a la eficiencia de recuperación de RNA y la integridad del mismo, indicaron que la metodología más adecuada resultaba ser el método de Trizol, la cual, además de permitir la obtención de una mayor cantidad de RNA con una mejor calidad, resulta más económica que el kit (Fig. 21). En base a los resultados óptimos de calidad y cantidad se estandarizó la técnica de extracción trizólica modificando el tiempo de reprecipitación del ácido nucleico durante toda una

noche a -20°C , seguido de tres lavados adicionales con etanol al 80%, 90% y 100% con el fin de eliminar macromoléculas como proteínas y grasas propias del tejido.

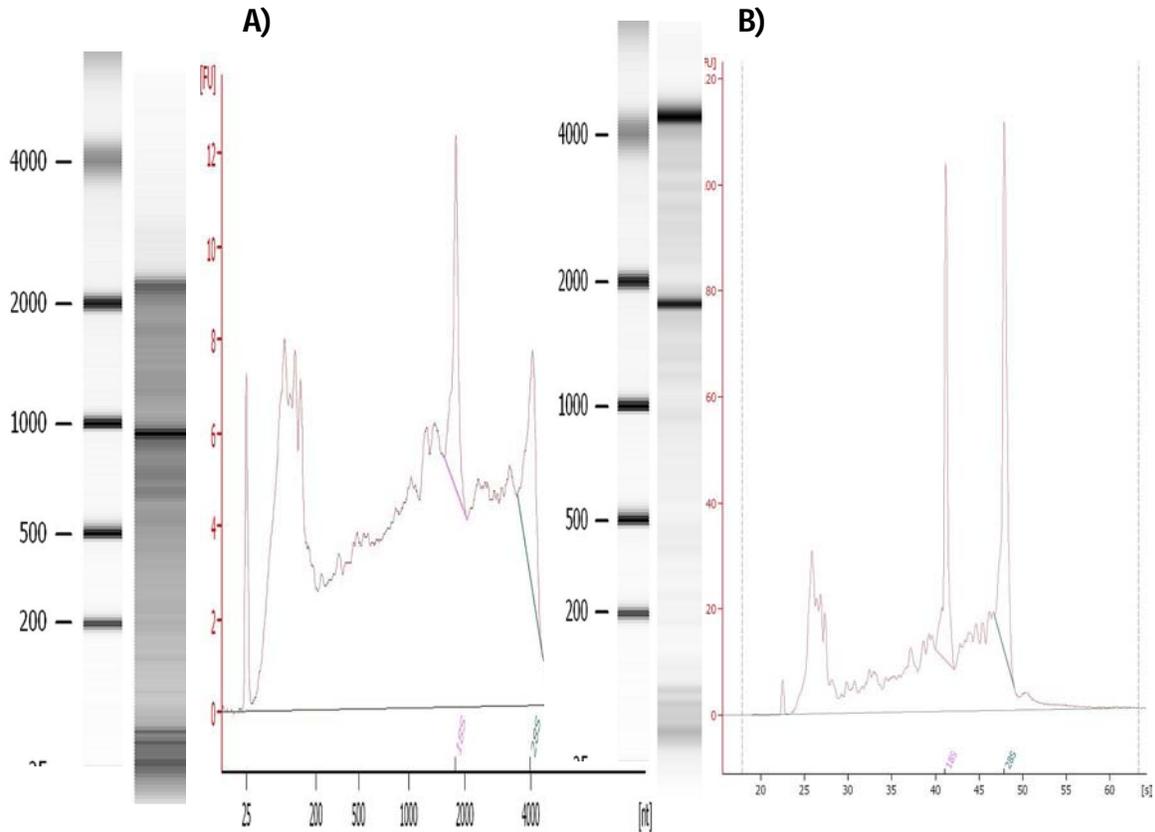


Fig. 21. Comparación de electroferogramas procesados con el chip NANO Eukaryotic de RNA total de la misma muestra obtenida con dos técnicas diferentes. A) Electroferograma de RNA total extraído con Kit Mirvana, RIN: 4.0 B) Electroferograma de RNA total extraído con Trizol, RIN 7.2.

Aún cuando la literatura establece que los miRNA son muy estables y su degradación es mínima, se evaluó la integridad del RNA total para poder tener un control de calidad interno de las muestras procesadas, analizando únicamente las muestras con un RIN superior a 6, Asimismo se determinó el porcentaje de RNA pequeños y en específico de miRNAs de cada una de las muestras. La figura 22 muestra ejemplos de la evaluación de la integridad de RNA total (A) y de la evaluación del porcentaje de microRNAs en una muestra, analizadas mediante electroforesis capilar con el sistema Bioanalyzer.

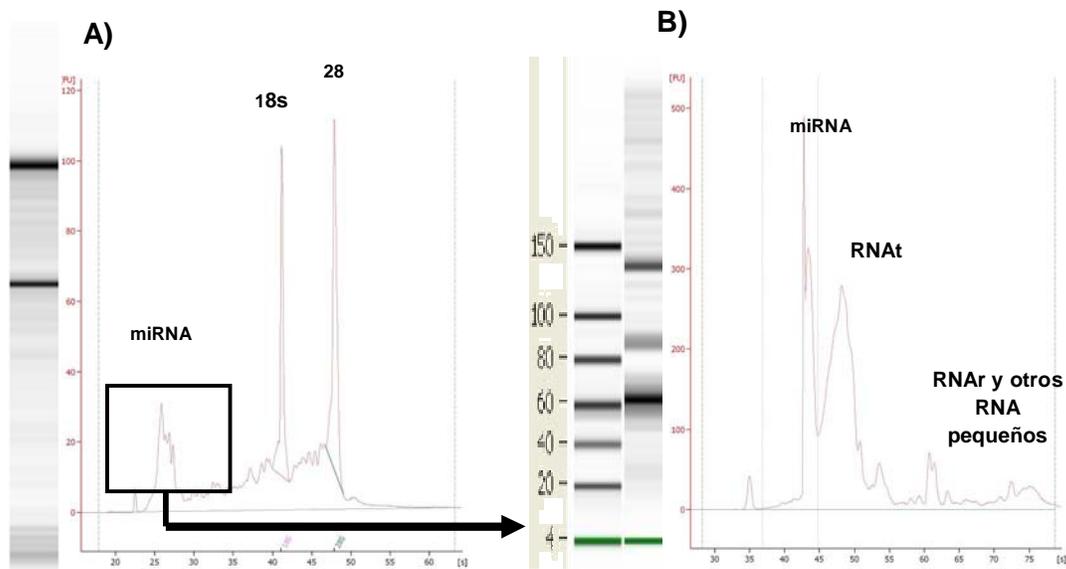


Fig. 22. Electroferogramas obtenidos mediante la plataforma Bioanalyzer con electroforesis en capilar. A) Electroferograma de RNA total procesado con el chip RNA NANO en el que se observan las bandas de 18S y 28S, RIN: 7.2. B) Electroferograma de RNA pequeños procesados con el chip SMALL RNA en los que se observa la presencia de diversas clases de transcritos pequeños.

Una vez corroborada la concentración e integridad del RNA total, se procedió al análisis de los perfiles de expresión de microRNAs con la plataforma Megaplex TLDA, la cual fue establecida exitosamente en el laboratorio gracias al trabajo desarrollado en esta tesis. En el análisis de la expresión de miRNA se agrupó el RNA de los tejidos normales de la siguiente forma: un total de 10 tejidos se combinó de forma equimolar para formar un primer grupo, mientras que un segundo grupo estaba representado por la combinación del RNA de otras cinco muestras. De forma paralela, el resto de las muestras normales corresponden a cinco muestras normales que se analizaron de forma independiente.

De igual forma, este trabajo permitió establecer los métodos de análisis de perfiles de expresión de microRNAs, el cual se llevó a cabo usando las herramientas RQ manager, DataAssist (ABI) y Partek Genomics Suite.

Análisis bioinformático.

Se realizaron diversos análisis bioinformáticos de las 45 muestras procesadas en PCR en tiempo real de la placa A y B del arreglo Megaplex. Cada placa evalúa paralelamente 380 miRNA, haciendo un total de 667 miRNA. Para la evaluación de la expresión génica se determinó emplear el método RQ el cual analiza muestras cuya concentración original varía, es decir que no hay una total

uniformidad en las concentraciones iniciales con las que se inició el proceso de la RT y la PCR en tiempo real.

Para el análisis de la cuantificación relativa (RQ) se empleó el programa RQ manager 1.2 de Applied Biosystems para obtener los Cts crudos de cada uno de los detectores (microRNA) del arreglo de expresión con los siguientes parámetros: una línea de corte manual definida en un Ct de 0.2 y una línea basal automática. El valor de Ct se estableció en base a la recomendación del fabricante (Applied Biosystems), el cual fue determinado durante el desarrollo de este producto. Esto permite localizar la línea de corte por arriba de la señal de fluorescencia de fondo, la cual no corresponde a la expresión real de los transcritos; pero por debajo del primer tercio de la fase lineal, evitando excluir la expresión de ciertos transcritos (Fig.23).

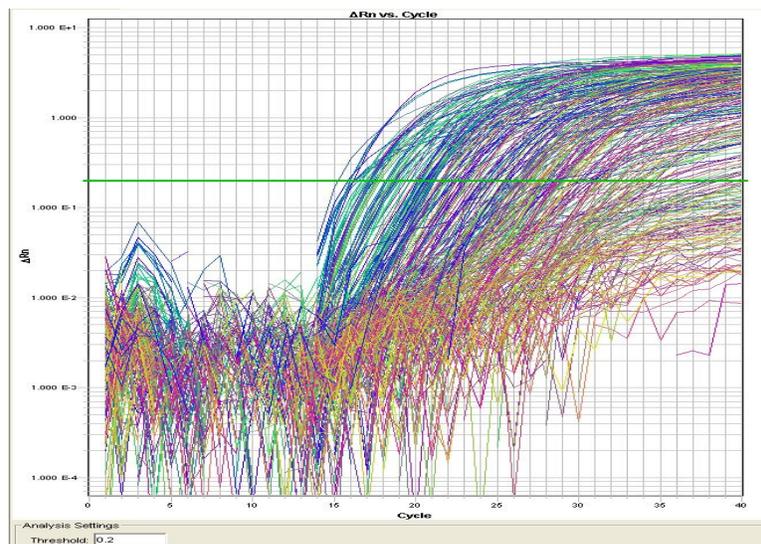


Fig.23. Curva de amplificación de la placa A con una línea de corte manual establecida en un Ct de 0.2 y una línea basal automática. En el eje x se grafica los ciclos de la PCR y en el eje y se muestra la forma linealizada de Rn (valor que resulta de la división de la intensidad de la emisión del Reportero entre la intensidad de la emisión de la referencia pasiva).

Para el análisis de la cuantificación relativa se empleó el programa DataAssist de Applied Biosystems con el método RQ. Los parámetros iniciales del análisis matemático consistieron en el filtrado y la exclusión de los miRNAs cuyo valor de Ct fuera mayor a 40. Lo anterior se debe a que la expresión en ciclos tan tardíos, aumenta el ruido en el análisis de los perfiles de expresión. Vale la pena mencionar que de acuerdo a las especificaciones de la misma técnica los Ct óptimos se encuentran entre los ciclos 15 y 25, que es donde se ubican los Cts de la mayor parte de los miRNAs analizados. También se empleó como método de

normalización el análisis con media geométrica, la cual considera todos los valores de la distribución y es menos sensible a los valores extremos que otros métodos matemáticos; permitiendo, una mejor selección de los controles endógenos. A continuación se cálculo el ΔCt utilizando como normalizador 2 de los controles endógenos con los que cuenta el arreglo: MammU6-4395470 (medida de estabilidad génica: 2.17) y RNU48 (estabilidad: 1.3453), los cuales son RNA pequeños nucleolares que se expresan de forma constitutiva en mamíferos con alta estabilidad entre las muestras evaluadas y cuyos transcritos son altamente estables. Debido a las variaciones inherentes a la expresión de estos transcritos constitutivos se seleccionaron estos dos controles endógenos, con el fin de normalizar apropiadamente las muestras. Es importante recalcar que el patrón de la expresión génica de los controles endógenos entre las muestras es bastante consistente, como podemos observar en la Figura 24, habiendo gran similitud entre los replicados técnicos.

Elegir controles estables es de fundamental importancia, pues un control poco estable no puede eliminar completamente la variación no específica en la tasa de expresión, y de hecho agrega ruido al análisis. Asimismo, elegir un sólo normalizador aumenta el riesgo de normalizar erróneamente aumentando el rango de error (Van Roy, et. al., 2002) (Fig. 24). La normalización es un paso importante en este tipo de experimentos dado que en algunas muestras se partió de diferentes cantidades de RNA total, permitiendo así disminuir o eliminar la variación entre las muestras debida a la cantidad original de RNA con la que se inicio el proceso, disminuyendo el grado de error, Asimismo permite hacer más eficiente el análisis estadístico, pues considera en el análisis aspectos biológicos como la eficiencia enzimática, la cual depende de las características bioquímicas de las secuencias de cada uno de los transcritos, y las diferencias propias de cada

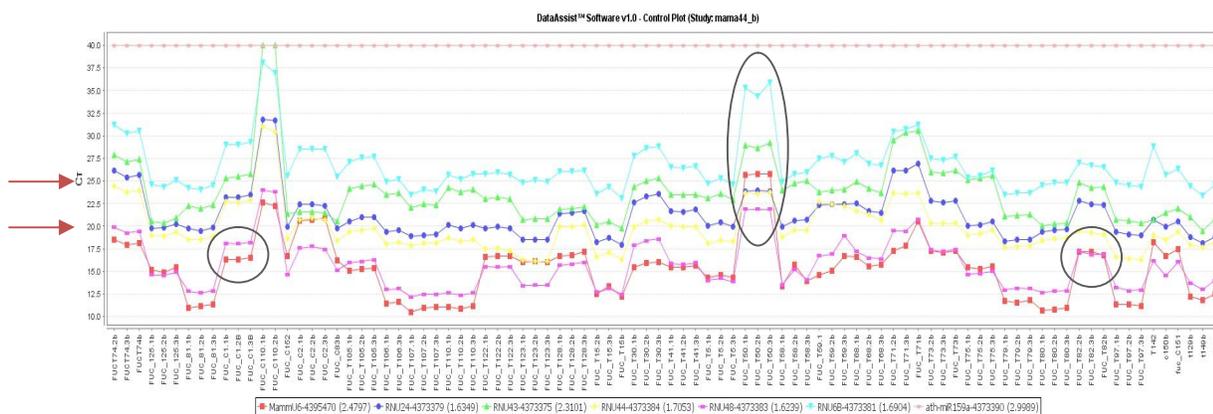


Fig. 24. Gráfica de la expresión de los 6 controles endógenos incluidos en el arreglo Megaplex en las muestras analizadas, evaluando la estabilidad de cada candidato a control. Con flechas rojas se indican los controles que fueron seleccionados para el análisis de la expresión génica. Con círculos se resaltan las réplicas, en la que podemos observar un comportamiento muy similar entre los replicados técnicos.

una de las muestras de tejido.

El $\Delta\Delta C_t$ se analizó empleando como calibrador el conjunto de tejidos normales adyacentes. El programa Datta Assist de manera predeterminada realiza un filtrado de las replicas técnicas excluyendo del análisis los valores extremos.

Los datos de la cuantificación relativa se analizaron posteriormente con el programa DataAssist (2009) y Partek Genomic Suites. En este último se realizó un Análisis de Componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) de los ΔC_t s en el cual podemos reducir la dimensionalidad del conjunto total de datos obtenidos de las 30 muestras (un total de 186 placas A y B, incluyendo replicados técnicos), asimismo podemos determinar el número de factores que determinan la variabilidad de la expresión de miRNA. De igual forma, la gráfica de PCA permite observar la distribución de las muestras tumorales con respecto al normal, así como la distribución de los replicados técnicos (Fig. 25).

Replicados técnicos y correlación entre las muestras procesadas

Se evaluó la variabilidad de la expresión de miRNA entre las réplicas técnicas mediante diversos métodos matemáticos. Debido a que los datos crudos obtenidos del análisis en tiempo real (C_t) son valores exponenciales, éstos se linearizaron usando la fórmula (2^{-C_t}) para calcular posteriormente la desviación estándar real entre los replicados técnicos (Tabla 5). Los datos indican que el error o la variación con respecto a la media es mínimo; de esta forma podemos determinar que la dispersión de los datos de expresión entre las replicas técnicas no es significativo matemáticamente. Esta medida de incertidumbre muestra la correcta agrupación de los replicados técnicos alrededor del valor de 0, que es lo que se esperaría si existiera una similitud del 100% entre los datos de expresión de los replicas.

Tabla 5. Desviación estándar entre los replicados técnicos calculados en base a los C_t linearizados.

Placa	Promedio de la división estandar
Replicados técnicos muestras tumor *	0.023136473
Replicados técnicos muestras control **	0.043021841

* 27 muestras de tejido tumoral procesadas por triplicado lo cual resulta en 81 placas por cada arreglo (A y B) haciendo un total de 162 arreglos de baja densidad procesados.

** 2 muestras de tejido adyacente al control procesadas por triplicado lo cual resulta en 6 placas por cada arreglo (A y B) haciendo un total de 12 arreglos de baja densidad procesados.

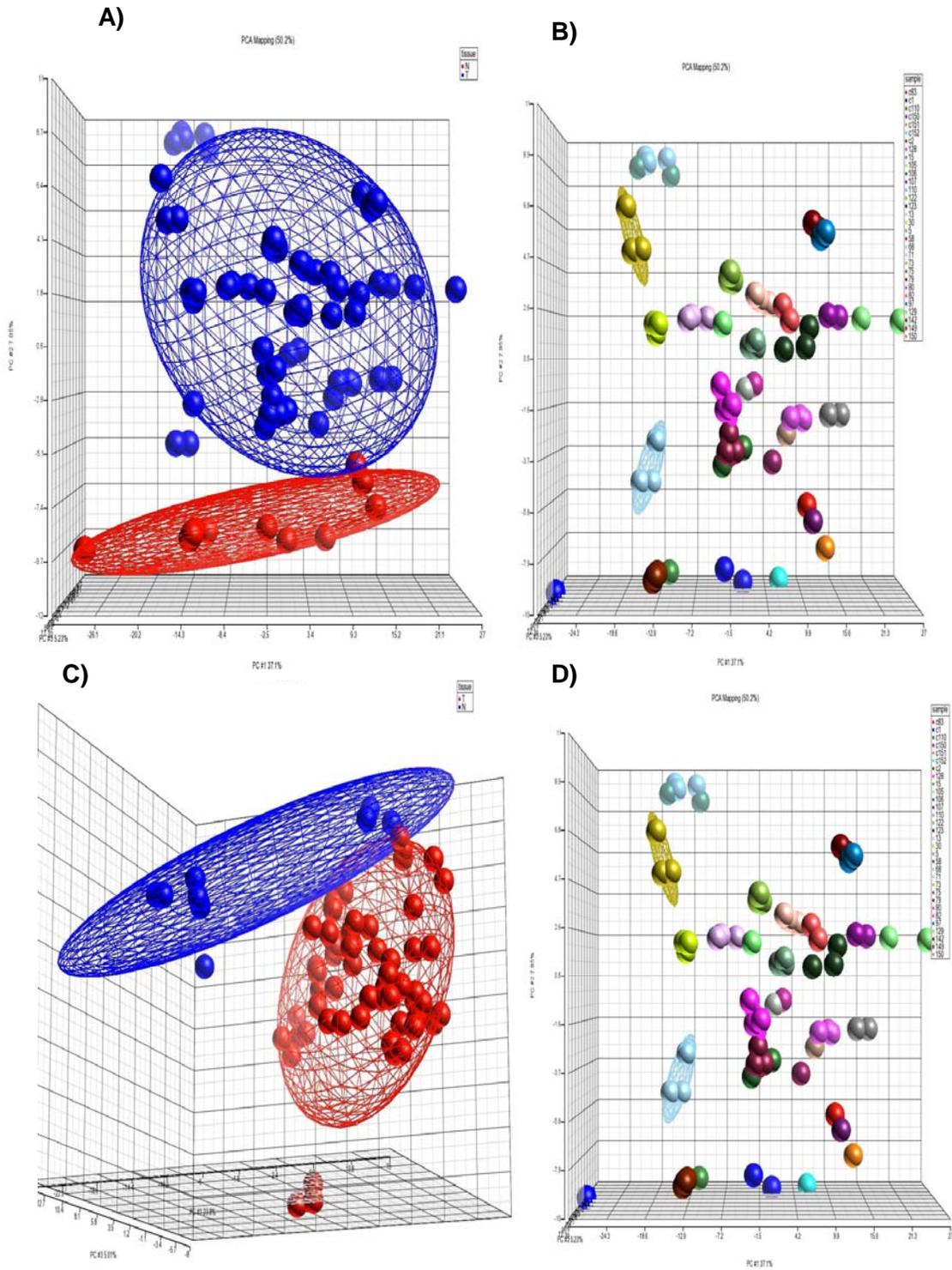


Fig. 25. Análisis de componentes principales de los Delta Ct (ΔCt) de los miRNA evaluados en cada placa (A y B) **A)** PCA de las muestras tumorales (azul) y tejido adyacentes al tumor (rojo) de la placa A. **B)** PCA de las replicas técnicas (triplicado comparten color) de la placa A. Las elipses representan algunos triplicados **C)** PCA de las muestras tumorales (azul) y adyacentes al tumor (rojo) de la placa B. **D)** PCA de las replicas técnicas (triplicado comparten el mismo color) de la placa B. Las elipses representan algunos grupos de muestras procesadas por triplicado

Mediante el programa DataAssit se obtuvo una gráfica de dispersión, la cual permite evaluar la similaridad de un par de muestras mediante el coeficiente de correlación de Pearson, graficándolo a lo largo de una línea de tendencia. El coeficiente de Person es un índice estadístico que evalúa la relación lineal entre dos variables cuantitativas, de esta forma permite conocer la posible relación entre ambas, en esta caso en un par de muestras. De esta forma, lo que se esperaría de este análisis es tener una alto grado de correlación entre las replicas técnicas de una misma muestra (Valor de r cercano a 1).

El análisis de los triplicados técnicos presenta una r que varía entre 0.96 y 0.99 lo que indica que existe una relación directa entre ambas muestras y un alto grado de asociación. Por otro lado se evaluó la correlación existente entre muestras pareadas tumor-control de la misma paciente, con el fin de conocer la correlación en la expresión génica de los miRNAs entre el tejido tumoral y el normal adyacente de la misma pieza quirúrgica. Los resultados obtenidos de este análisis es una r de entre 0.85 y 0.90 lo que sugiere que existe una correlación positiva entre las muestras, pero no una total dependencia, como entre los replicados técnicos, cuyos valores tienen una r superior (Fig. 26).

Complementando este análisis se realizó una gráfica de correlación la cual determina los porcentajes de similitud entre los Ct de las muestras en cada grupo; el coeficiente de correlación se calculó con el coeficiente de Pearson (Fig. 27). En las muestras normales adyacentes al tumor se tuvo un rango de correlación entre el 100 y el 90% para la placa A y del 100 y el 87% para la placa B; en cuanto a las muestras tumorales presentaron un porcentaje de correlación de entre el 100% y 79% para la placa A; y para la placa B del 100 y el 79%. Los replicados técnicos presentan una correlación de entre el 100% y el 97.5%.

Los resultados obtenidos en este conjunto de análisis matemáticos hace posible determinar que el trabajo experimental se realizó adecuadamente siguiendo cuidadosamente los protocolos y modificaciones pertinentes, así como la alta reproducibilidad de la plataforma Megaplex. Se puede observar que la relación existente entre los tumores muestra la heterogeneidad propia del cáncer de mama. Es importante señalar que este análisis fue una evaluación global donde se incluyeron distintos subtipos tumorales y estadios, sin hacer ninguna estratificación de las muestras por lo que existen diferencias biológicas importantes en el grupo tumoral evaluado, lo cual también ha sido reportado por diversos estudios los cuales concluyen que existen firmas moleculares claras de cada tipo tumoral, es decir cada subtipo tumoral presenta ciertos perfiles de expresión.

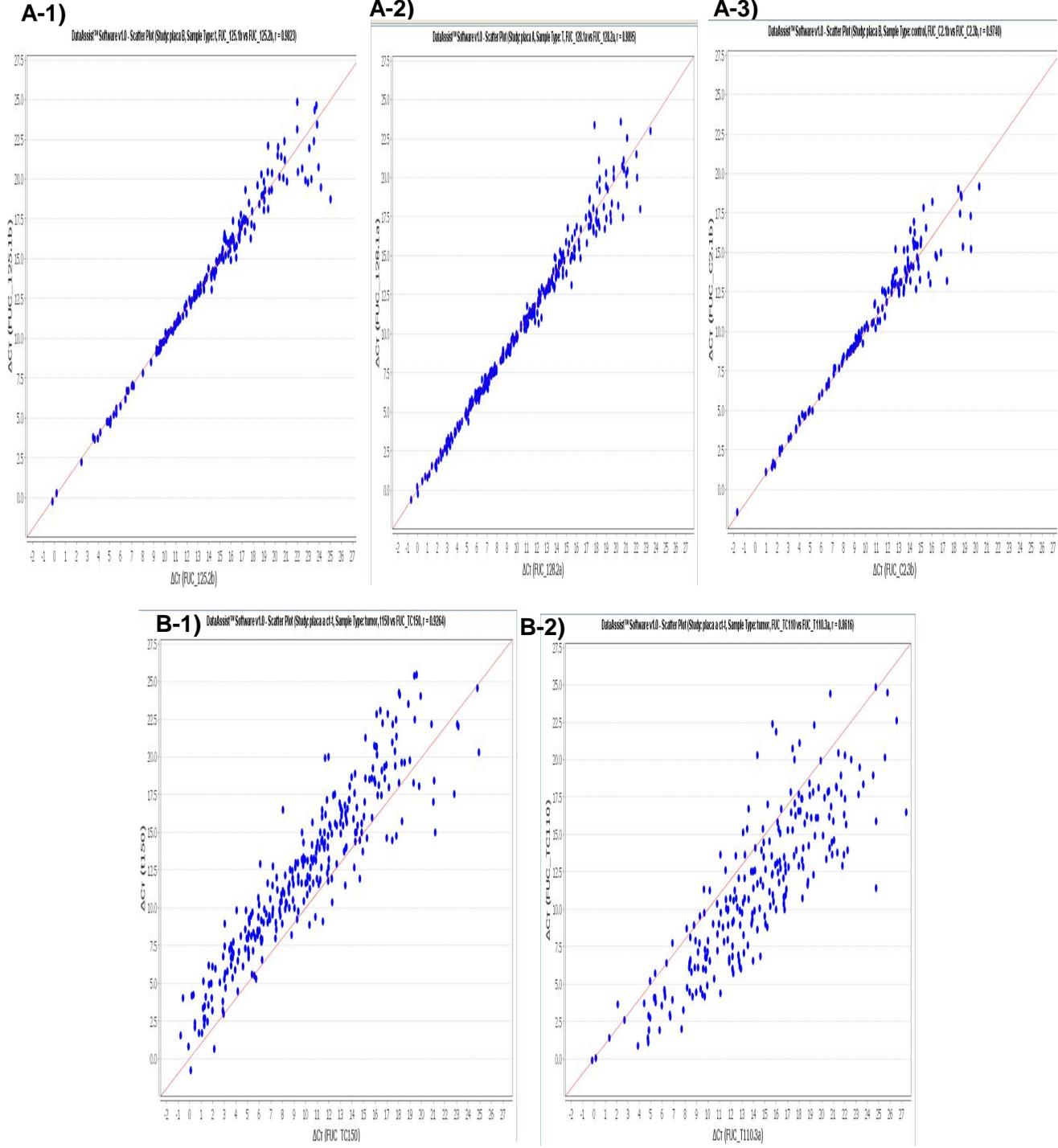
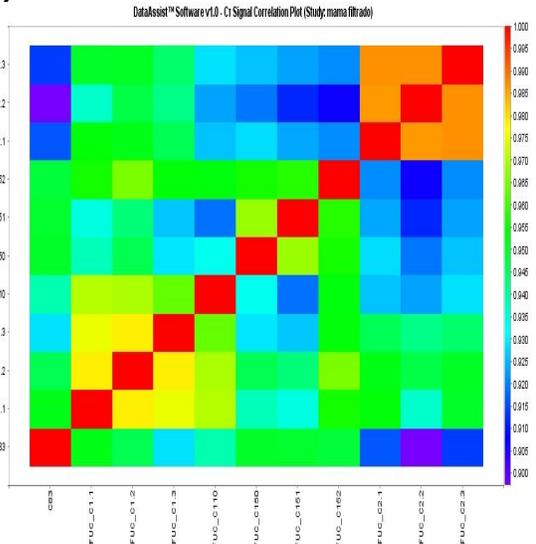
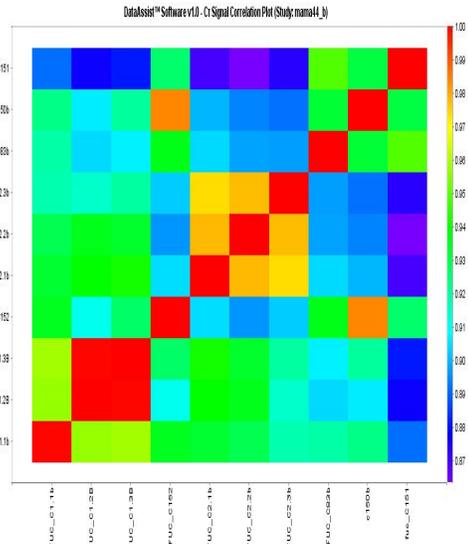


Fig. 26. Gráfica de correlación con coeficiente Pearson. A-1), A-2) y A-3) Correlación entre replicas técnicas. B-1) y B-2). Correlación pareada entre muestra tumoral y normal adyacente al tumor.

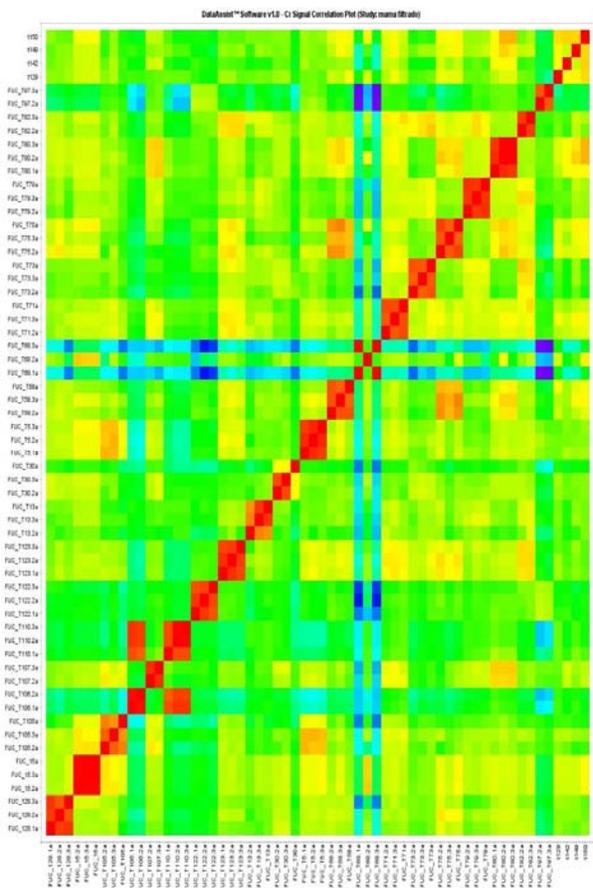
A-1)



B-1)



A-2)



B-2)

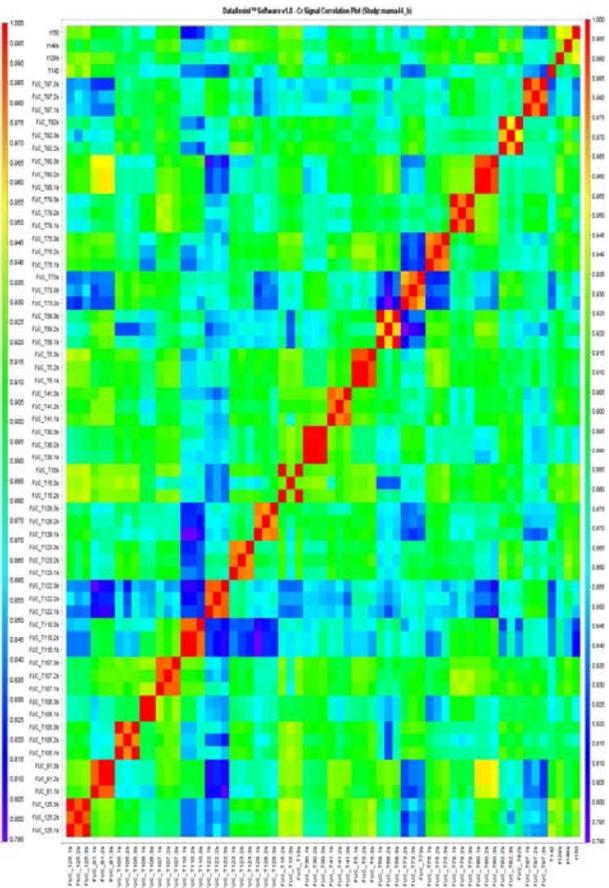


Fig. 27. Scatter Plot calculado con coeficiente Pearson. A-1) Correlación entre muestra adyacente al tumor (control experimental) de la placa A; A-2) Correlación entre muestra adyacentes al tumor (control experimental) de la placa B. B-1) Correlación entre muestras tumorales de la placa A; B-2) Correlación entre muestras tumorales de la placa B.

Perfiles de expresión de miRNA.

La expresión diferencial de los miRNAs se calculó considerando un tasa de cambio de 2 ($\log_2 RQ \pm 2$), es decir que la expresión de las muestras tumorales varían en un rango de 2 o más con respecto al control y un valor de P de 0.05 (5% de error) para poder concluir con una confianza estadística del 95% (Fig. 28).

Para determinar los miRNAs diferencialmente expresados en las muestras tumorales en relación al tejido normal adyacente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los resultados de esta prueba se presentan en una gráfica de volcán, la cual permite identificar los miRNAs que presentan cambios estadísticamente significativos y aquellos en los que los cambios son mayores en las magnitudes de expresión entre dos condiciones, en este caso muestra tumoral y normal, generando así un gráfico que representa las dimensiones biológicas y estadísticas (Fig.28).

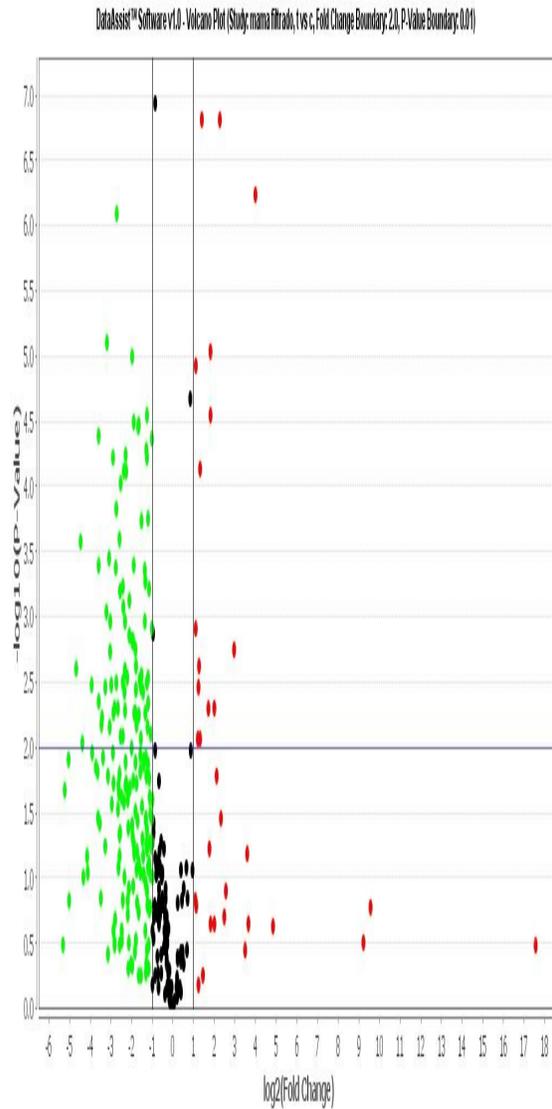
La gráfica muestra en el eje "y" los valores de P (porcentaje de error) del ANOVA indicando las diferencias entre las muestras en una escala logarítmica negativa para que de esta forma los valores más reducidos de P se observen más altos y visualmente sea más sencillo analizarlos. En el eje de la "x" se muestra la tasa de cambio (RQ) en una escala logarítmica de esta forma la sobreexpresión y la subexpresión aparece simétricamente (Fig. 28).

De esta forma los perfiles de expresión diferenciales son los siguientes (Tabla 6):

- ✓ **Subexpresión:** *miR-411, miR-874, miR-488, miR-129-3p, miR-125a, miR-125b, miR-205, miR-483-5p, miR-216b, miR-199b-5p, miR-204, miR-424, miR-654-5p, miR-199a-5p, miR-139-5p, miR-195, let7b, let-7c, miR-29c, miR-486-5p, miR-130a, miR-381, miR-9, miR-212, miR-100, miR-132, miR-140-3p, miR-410, miR-34a, miR-337-5p, miR-192*, miR-136*, miR-132*, miR-744*, miR-770-5p, miR-768-3p, , miR-206, miR-566, miR-380*, miR-944, , miR-9*, miR-34b*, miR-650, miR-100*, miR-145*, miR-505*, miR-125b-2*, miR-99a*, miR-551b*, miR-221*, miR-130a*, miR-378*, miR-138-2* y miR-604.*
- ✓ **Sobreexpresión:** *miR-431, miR-326, miR-96, miR-548d, miR-210, miR-33b, miR-615-5p, miR-876-3p, miR-449a, miR-592, miR-454*, miR-610, miR-25*, miR-149*, miR-190b, miR-935 y miR-148b*.*

NOTA: Es importante señalar que el número original de muestras fue de 30 muestras de tejido tumoral el cual se redujo a 25 tras generar los análisis de cuantificación relativa, determinando en base a los análisis de expresión y correlación que presentaban

A)



B)

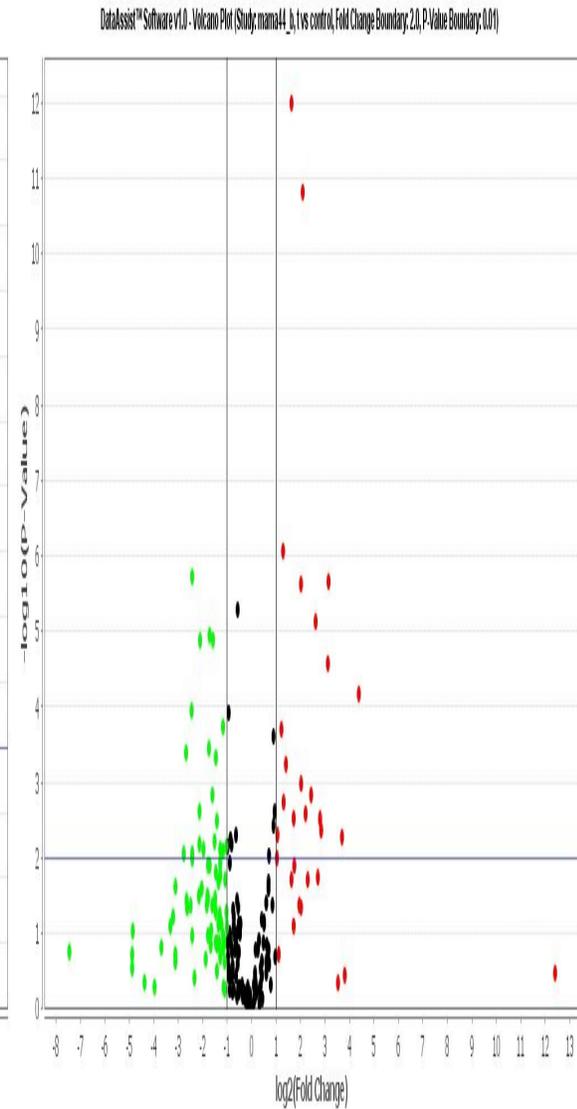


Fig. 28. MiRNAs diferencialmente expresados A) Gráfica de volcán de microRNA de la placa A, con una línea de corte con un valor de P de 0.05 ($-\log_{10}=1.30$). Mostrando los miRNA diferencialmente expresados con una tasa de cambio de 2 ($\log_2:1$) B) Gráfica de volcán de miRNAs de la placa A, con una línea de corte con un valor de P de 0.05 ($-\log_{10}=1.30$). Mostrando los miRNA diferencialmente expresados con una tasa de cambio de 2 ($\log_2:1$).

Tabla 6. miRNAs subexpresados y sobreexpresados indicando valor de RQ y de P. Los valores se encuentran ordenados de acuerdo a los cambios en la tasa de expresión (RQ) de mayor a menor.

miRNAs subexpresados							
Placa A				Placa B			
miRNA	Loci	Log ₂ RQ	Valor de P	miRNA	Loci	Log ₂ RQ	Valor de P
<i>miR-129-3p</i>	11p11.2	-4.9794	0.0302	<i>miR-125b-2*</i>	21q21.1	-4.2351	0.0441
<i>miR-204</i>	9q21.12	-4.3599	0.0481	<i>miR-551b*</i>	3q26.2	-4.1533	0.0455
<i>miR-381</i>	14q32.31	-4.2598	0.051	<i>miR-132*</i>	17p13.3	-3.5942	0.0108
<i>miR-216b</i>	2p16.1	-3.9817	0.0358	<i>miR-138-2*</i>	16q13	-3.0386	0.0496
<i>miR-488</i>	1q25.1	-3.851	0.0202	<i>miR-130a*</i>	11q12.1	-2.9692	0.0479
<i>miR-483-5p</i>	11p15.5	-3.6602	0.0456	<i>miR-604</i>	10p11.23	-2.8334	0.0515
<i>miR-205</i>	1q32.2	-3.2324	0.0287	<i>miR-206</i>	6p12.2	-2.4715	0.0185
<i>miR-654-5p</i>	14q32.31	-3.1871	0.0481	<i>miR-337-5p</i>	14q32.2	-2.4628	0.004
<i>miR-139-5p</i>	11q13.4	-3.0327	0.0434	<i>miR-9*</i>	7p15.2	-2.2828	0.028
<i>miR-195</i>	17p13.1	-2.8646	0.0443	<i>miR-136*</i>	14q32.2	-2.1805	0.0067
<i>miR-125b</i>	11q23.24	-2.8252	0.0172	<i>miR-566</i>	3p21.31	-2.1655	0.0206
<i>let7c</i>	21q21.1	-2.6675	0.0361	<i>miR-744*</i>	17p12	-2.1266	0.016
<i>miR-101</i>	1p31.3	-2.2557	0.0318	<i>miR-34b*</i>	11q23.1	-2.0362	0.03
<i>miR-874</i>	5q31.2	-2.1943	0.005	<i>miR-99a*</i>	21q21.1	-1.9296	0.0445
<i>miR-486-5p</i>	8p11.21	-2.1610	0.0449	<i>miR-221*</i>	Xp11.3	-1.8704	0.0469
<i>miR-212</i>	17p13.3	-2.1047	0.04	<i>miR-378*</i>	5q33.1	-1.8468	0.0484
<i>miR-29c</i>	1q32.2	-2.0782	0.0277	<i>miR-378</i>	5q32	-1.8468	0.0484
<i>miR-9</i>	1q22	-1.9669	0.0424	<i>miR-380*</i>	14q32.31	-1.8079	0.022
<i>miR-130a</i>	11q12.1	-1.7939	0.0341	<i>miR-505*</i>	Xq27.1	-1.7809	0.044
<i>miR-132</i>	17p13.3	-1.7217	0.0381	<i>miR-145*</i>	5q33.1	-1.7447	0.0359
<i>miR-34a</i>	1p36.22	-1.6497	0.0508	<i>miR-770-5p</i>	4q32.2	-1.6561	0.0166
<i>miR-424</i>	Xq26.3	-1.61	0.0442	<i>miR-944</i>	3q28	-1.5938	0.0244
<i>miR-199a-5p</i>	19p13.2	-1.5752	0.046	<i>miR-650</i>	22q11.22	-1.5782	0.032
<i>miR-411</i>	14q32.2	-1.54	0.0047	<i>miR-100*</i>	11q24.1	-1.2640	0.0358
<i>miR-199b-5p</i>	19p13.2	-1.3853	0.0416	<i>miR-768-3p</i>	16q22.3	-1.2257	0.017
<i>miR-140-3p</i>	16q22.1	-1.2092	0.0304	<i>miR-192*</i>	11q13.1	-1.1348	0.0052
<i>miR-410</i>	14q32.31	-1.1307	0.0392				

miRNAs sobreexpresados							
miRNA	Loci	Log ₂ RQ	Valor de P	miRNA	Loci	Log ₂ RQ	Valor de P
<i>miR-326</i>	11q13.4	4.0920	0.0001	<i>miR-25*</i>	7q22.1	3.8042	0.0157
<i>miR-431</i>	14q32.2	2.1927	0.0004	<i>miR-190b</i>	1q21.3	3.5877	0.0209
<i>miR-548d-3p</i>		2.1247	0.0011	<i>miR-454*</i>	17q23.2	2.2977	0.008
<i>miR-96</i>	7q32.2	1.6549	0.0015	<i>miR-149*</i>	2q37.3	2.0354	0.0182
<i>miR-210</i>	11p15.5	1.3394	0.0025	<i>miR-610</i>	11p14.1	1.7510	0.0144
				<i>miR-592</i>	7q31.33	1.7170	0.0042
				<i>miR-935</i>	19q13.42	1.2684	0.0212

Análisis de la expresión diferencial de los miRNA que conforma el perfil tumoral.

Los miRNA que conforman el perfil de expresión diferencial se evaluaron mediante un análisis de componentes principales. Uno de los primeros aspectos que podemos determinar con este estudio matemático, es que ambos arreglos (Placa A y B) presenta diferencias entre la expresión normalizada (ΔCt) de los miRNA expresados aberrantemente en el tejido normal y tumoral, lo cual nos indica que posiblemente este perfil discrimina entre muestras tumorales y normales en base a la expresión de cada uno de estos miRNA.

La figura 29 nos muestra el gráfico del PCA; en rojo observamos a las muestras control y en azul las tumorales; evidenciando la agrupación de estos dos tipos de tejidos en dos conjuntos que se logran distinguir, y brindan cierta individualidad a cada uno de los grupos de las muestras tumorales con respecto de las muestras de tejido normal adyacente.

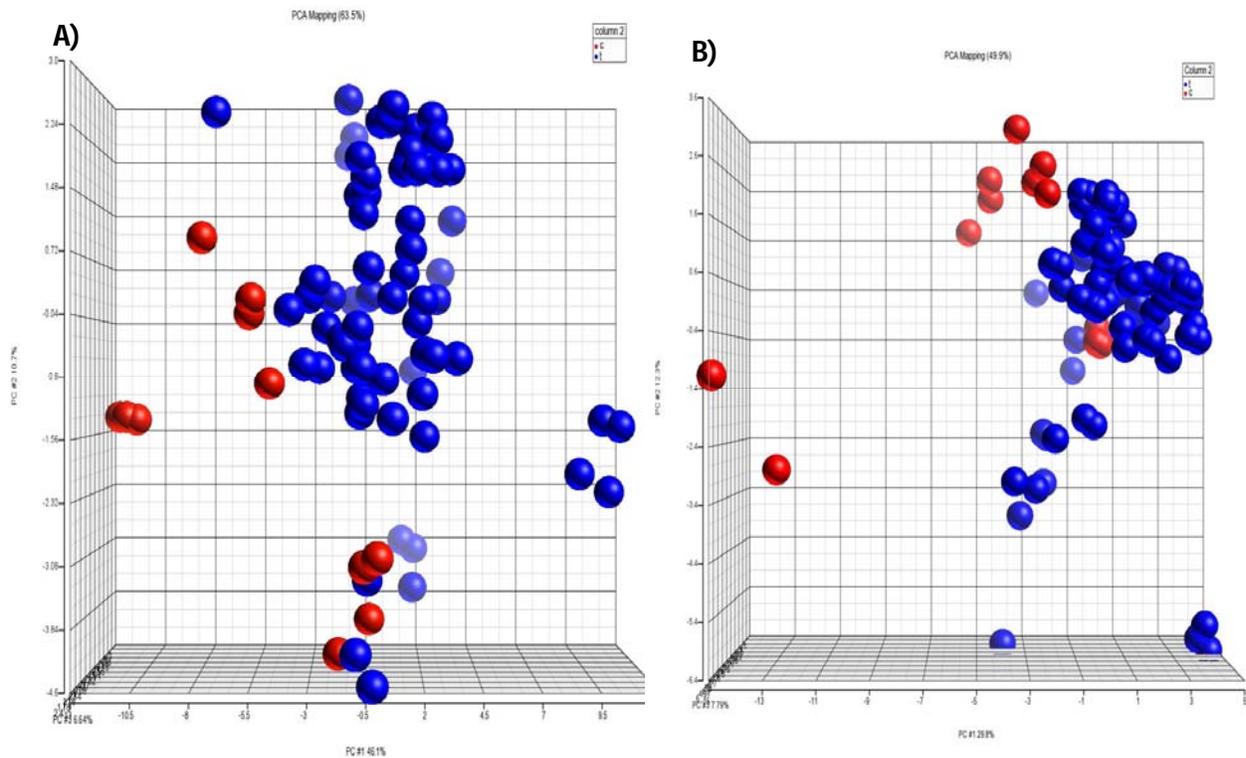


Fig. 29. Análisis de componentes principales de los Delta ct (ΔCt) de los miRNA que conforma el perfil diferencial de expresión de cada placa (A y B) **A)** PCA de las muestras tumorales (azul) y tejido adyacentes al tumor (rojo) de la placa A. **B)** PCA de las replicas técnicas (triplicado comparten color) de la placa A. Los círculos rojos representan algunos triplicados.

La convergencia de algunas muestras control con las muestras tumorales podría deberse a que las células del tejido normal estaban siendo influenciados por el microambiente biológico generado por las propias células neoplásicas que modifican ciertos procesos biológicos-celulares, modificando hasta cierto punto lo perfiles de expresión de miRNA de las muestras control, sin embargo esta situación se observa en tan solo un par de muestras normales adyacentes al control.

Predicción de posibles blancos

Cada microRNA puede tener hasta 200 RNAs mensajeros blanco, por lo tanto, los cambios en los perfiles de expresión de estas moléculas afectará a un gran número de RNAm y rutas bioquímicas en las cuales intervienen muchos actores biológicos. Esta situación se complica todavía más, tomando en cuenta el hecho de que existen grupos de miRNAs que actúan de forma coordinada para llevar a cabo la represión traduccional.

De esta forma, la predicción de RNAs mensajero blancos de los miRNAs es un proceso complejo, para lo cual existen diversas herramientas que permiten llevar a cabo un pronóstico de los blancos putativos y las rutas metabólicas afectadas por los cambios en los miRNAs.

El análisis fue generado con un análisis coordinado de dos bases de datos que consideran diferentes aspectos biológicos, prediciendo blancos con una mayor relación biológica.

Los 5 miRNAs más sobreexpresados y los 5 más subexpresados se analizaron para la predicción de blancos biológicos usando la herramienta mirGator (<http://genome.ewha.ac.kr/miRGator/>). Los RNAs mensajeros blancos se obtuvieron con el análisis coordinado de los logaritmos Target Scan 5.01 y MiRanda, usando un valor de P menor o igual a 0.05 (Tabla 7). Es interesante hacer un análisis de este tipo, pues identifica genes que son predichos por ambos logaritmos. La base de datos de TargetScan maneja criterios muy estrictos en el apareamiento de la región semilla, mientras que MiRanda es un poco más moderada. Otra diferencia sustancial es que TargerScan emplea un método de predicción considerando tanto los sitios conservados como el contexto biológico y de accesibilidad, tales como el contenido de uracilos y adeninas en la secuencia y la proximidad de clusters, que aumentan la eficiencia en el silenciamiento génico de un RNAm, mientras que MiRanda únicamente filtra en base de los sitios de unión sin considerar la conservación de las regiones.

Es lógico pensar y esperar que los miRNAs que se encuentran subexpresados actúen como supresores de tumor de forma normal, mientras que los miRNAs sobreexpresados actúan como oncogenes o genes que codifican a proteínas con potencial oncogénico, sin embargo debemos recordar que los miRNAs tienen una gran flexibilidad en cuanto a su hibridación con los RNAm teniendo hasta 200 blancos, asimismo la expresión de un mismo miRNA varía en los distintos tejidos, por ello un miRNA puede presentar blancos que actúan como represores tumorales en ciertos tejidos y como oncogenes en otros tejidos (Boyd, 2008).

A continuación, se presenta un resumen de los RNAm blancos predichos por las diversas bases de datos empleadas que pudieran tener cierta relevancia en el desarrollo del cáncer de mama, incluyéndose los artículos que han reportado las alteraciones en la expresión de los productos génicos en la patología mamaria y describiendo la posible acción biológica de las proteínas en el desarrollo tumoral.

Dentro de los blancos predichos destacan algunos genes involucrados en vías de importancia oncogénica como la sobreexpresión de factores relacionados con oncogenes como RAS o bien con supresores tumorales como WTN, o con moléculas reguladoras de la traducción y transcripción como las cinasas, que a su vez interactúan con otras rutas biológicas, como los procesos apoptóticos o bien con la organización cromosómica y génica mediante la interacción con histonas.

El análisis realizado en este trabajo se enriqueció al predecir las rutas biológicas que pudieran estar siendo alteradas por la expresión anormal de los miRNA. Esta evaluación se realizó empleando la base de datos mirGator vía la base de datos TargetScan V5.1, mostrando las rutas cuyo valor de P sea igual o menor a 0.05. Las rutas se muestran en el anexo E.

El análisis global tanto de los transcritos blancos de manera independiente así como la interacción de ellos en las rutas biológicas muestran la complejidad de la regulación de los miRNA, y la relevancia de la alteración de su expresión en las células cancerosas.

Tabla 7. miRNA de tumores mamarios con expresión diferencial predichos. Valor de P (0.05) (NCBI, 2002). + miRNAs que fueron analizadas únicamente con Target Scan 5.1.

miRNA	Posibles blancos
Subexpresados	
<i>miR-411</i> ⁺	<ul style="list-style-type: none"> • RANBP2: Proteína de unión a GTP perteneciente a la superfamilia RAS, la cual está asociada con la membrana nuclear controlando varias funciones celulares a través de distintas interacciones con otras proteínas. Esta proteína está implicada en el ciclo de la GTPasa • RAPGEF2 (Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2): Miembro de la familia RAS y de la subfamilia de la GTPasas señalizando y regulando la transducción de GTP/GDP. Esta molécula actúa como un activador de RAS promoviendo la adquisición de GTP. • PREX1. La proteína codificada por este gen actúa como factor de intercambio del nucleótido guanina para un grupo de las proteínas RHO y RACs. La sobreexpresión de esta molécula puede inducir la transformación celular, la invasión y la metástasis. • EIF2C1. este gen codifica a un miembro de la familia Argonauta, proteína que juega un papel fundamental en el silenciamiento de la expresión génica mediante microRNAs y RNAi. La sobreexpresión de esta proteína puede tener efectos sobre el transcriptoma al aumentar la degradación de los RNA mensajeros. • MAP2K1 (mitogen-activated protein kinase 1) este gen codifica para una proteína de la familia de las cinasas que actúa como activador mitogénico, actuando en la integración de múltiples señales bioquímicas y procesos celulares como la proliferación, diferenciación, transcripción y desarrollo. Los estudios han reportado que esta proteína podría estar relacionada en el desarrollo de cáncer al actuar como un factor de crecimiento dependiente de hormonas (estrógeno) por lo que se ha visto elevado su expresión en varias muestras de tumores mamarios sobre todo en aquellos dependientes de estrógenos. Otros estudios han abordado la expresión de esta proteína a través de su actividad enzimática en el tejido mamario encontrando que hay una mayor actividad en el tejido tumoral (Santen et. al., 2002). • EGR1 (Human early growth response-1): también conocido como NGFI-A, Zif268, Krox24 yTis8 es una fosfoproteína nuclear que forma parte de la familia de factores transcripcionales de dedos de zinc. Diversos reportes han sugerido el rol regulatorio que juega esta molécula en el cáncer de mama al estar íntimamente relacionada con la transformación, crecimiento, resistencia a multidrogas y respuestas anti estrógenas. Asimismo muchos de sus respuestas biológicas se activan por estrógenos (condición común en los tumores mamarios) en asociación de cinasa RAF (Mitchell, et. al., 2004) • SET (SET nuclear oncogene): Estimula la migración celular mediante mecanismos dependientes de RAC-1 actuando como un señalizador de amplificación. • PPFIA1 (protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF): Este gen codifica para una proteína de LAR conocida como Lipirin la cual se une a la membrana intracelular en los dominios de tirosina fosfato. Recientemente algunos artículos han sugerido que LAR esta incrementado en cáncer de mama, asociándosele a potencial metastásico y como un posible predictor clínico que permite conocer la progresión del cáncer mamario (LeVea, et. al., 2000). • MAP3K1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1): es un miembro de las vías de señalización RAS /RAF/MEK/ERK, asociado en varios estudios al desarrollo de cáncer de mama, al estar involucrado en procesos como la susceptibilidad en los tumores positivos a receptores hormonales (Rebbeck, et. al., 2009)

miR-874⁺

- **PTPN12 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12).** La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de las tirosina fosfatasas (PTP), las cuales son moléculas de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento, diferenciación, ciclo mitótico y transformación oncogénica. Recientemente en el artículo "PTP-PEST phosphatase variations in human cancer," se describe como los mecanismos de transducción de la tirosina fosfatasa como un mecanismo clave en la tumorigénesis, pues juega un papel relevante en la adhesión celular y motilidad; probablemente esté involucrada en la metástasis
- **HIF1AN (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor):** la sobreexpresión de esta proteína se ha implicado en un gran número de tumores, con un impacto negativo en la respuesta terapéutica y pronosis. La sobreexpresión de esta proteína juega un rol importante en la carcinogénesis mamaria, correlacionándose con un pobre pronóstico (Dendale, *et. a*, 2003).
- **SATB1 (SATB homeobox 2):** Este gen codifica para una proteína nuclear que recientemente se ha reportado como un organizador genómico que delinea modificaciones epigenéticas específicas, así como procesos metastásicos asociados a la subregulación de supresores tumorales. Patani y su grupo de colaboradores (2009) concluyeron que la expresión de SATB1 esta significativamente asociada con un pobre pronóstico.
- **ESR1 (estrogen receptor 1 estrogen receptor 1):** Este gen codifica para un receptor estrogénico, un ligando activado por factores de transcripción compuesto por diversos dominios de unión a esta hormona. La proteína se localiza en la membrana pudiendo de esta forma crear homodímeros o heterodímeros con el receptor estrogénico 2.
- **ESRRA (estrogen-related receptor alpha).** Gen que codifica para un receptor nucleolar ampliamente relacionado con receptores estrogénicos. Esta proteína actúa en sitios específicos de la regulación transcripcional de los factores TFIIIB. Un estudio clínico (Ariazi et al., 2002; Suzuki et al., 2004) implicó a ESRRA en la progresión del cáncer de mama. La expresión de ESRRA esta significativamente asociada con los tumores RE- y RP-, así como con el histotipo HER2. Suzuki y colaboradores demostraron una correlación directa entre la expresión de ESRRA y la progresión desfavorable en las pacientes con cáncer de mama.
- **RAS -GEF1A (RasGEF domain family, member 1A)** codifica para una proteína putativa de RAS - GEF la cual activa a las proteínas K-RAS, H-RAS, y NRAS, lo que consecuentemente incrementará la expresión exógena y la actividad de RAS.

miR-488⁺

- **IGF-1 (insulin-like growth factor 1, somatomedin C):** Esta gen codifica para la proteína cuya función y estructura es similar a la insulina, al participar como mediador de crecimiento y desarrollo. En el estado patológico esta hormona participa en el crecimiento tumoral. Hankinson (1998) en un estudio en el que llevó a cabo el seguimiento de pacientes durante 10 años, concluyó que la sobreexpresión de IGF-1 está relacionada con el riesgo a padecer cáncer, sobre todo en mujeres postmenopáusicas. Los datos obtenidos de este estudio sugieren que los niveles altos de esta hormona es causa del cáncer de mama.
- **AKAP13 (A kinase -PRKA- anchor protein 13):** Este gen corresponde a una cinasa que de acuerdo a la isoforma codificada presenta diversas funciones como activadora de las proteínas Rho/Rac GTPasas al coordinar la señalización de la vía de Rho. El grupo de investigación de Wirtenberger (2005) concluyó que la función de AKAP13 en el cáncer de mama es primordial, al interactuar con la señalización de la ruta oncogénica Rho, las variaciones en la expresión de esta proteína tiene efectos sobre el desarrollo de la tumorigénesis mamaria.
- **EIF3A (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A):** Se ha sugerido que la proteína codificada por eIF3a juega un papel crítico en la regulación traduccional, la progresión del ciclo celular y por ende en la proliferación celular. Diversos estudios han examinado la expresión de este gen en los tumores mamarios. La reducción de eIF3a reduce también la proliferación celular mediante la elongación del ciclo celular y su arresto en la fase de síntesis (S). También, eIF3a parece tener una función importante en la respuesta

celular a los moduladores externos del ciclo celular que podrían afectar la síntesis de moduladores transduccionales.

- **SMARCC1**: Este gen codifica para una proteína que es parte de la familia de SW1/SNF, las cuales presentan una actividad de ATPasas y que se cree son parte de los mecanismos de regulación de la transcripción de ciertos genes, mediante mecanismos que alteran la estructura de la cromatina. Esta proteína tiene una relación importante con la actividad biológica del supresor tumoral BRCA-1, el cual interactúa con un dominio de SMARCC1. El resultado de esta relación es la posible acción de BRCA1 como regulador transcripcional mediante la modulación de la estructura cromática (Bochar, *et. al.* 2000).
- **RHOT1**: El producto génico de este gen es una oncoproteína que forma parte de una amplia familia de proteínas tumorales humanas: RAS. Esta proteína tiene una potencial acción en la carcinogénesis al generar señales transduccionales mediante la hidrólisis de GTP. La importancia de esta proteína se puede abordar desde la perspectiva estructural y bioquímica pues posee un alto grado de conservación a lo largo del desarrollo eucariota.
- **HIF1AN (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor)**: El trabajo de Tan y colaboradores (2007) correlacionó la expresión de este gen con el carcinoma mamario invasivo y con una mala prognosis. Los resultados de este grupo de investigación sobre la expresión de HIF1AN y la hipoxia en tumores mamarios sugiere que los altos niveles de expresión de este gen está relacionado con respuestas hipóxicas, por lo que la regulación en la que participa HIF1AN es un mecanismo importante en la ruta de activación de los factores hipóxicos que a su vez regulan muchos procesos celulares en las neoplasias mamarias.

miR-125b

Acciones biológicas:

Supresión coordinada de ERB2 y ERB3.
Actúa sobre dedos de zinc de oncoproteínas

RNA blancos:

- **ESRRA (estrogen-related receptor alpha)**. Gen que codifica para un receptor nucleolar ampliamente relacionado con receptores estrogénicos. Esta proteína actúa en sitios específicos de la regulación transcripcional de los factores TFIIIB. Un estudio clínico (Ariazi, *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004) implicó a ESRRA en la progresión del cáncer de mama. La expresión de ESRRA está significativamente asociada con los tumores RE- y RP-, así como con el histotipo HER2. Suzuki y colaboradores (2004) demostraron una correlación directa entre la expresión de ESRRA y la progresión desfavorable en las pacientes con cáncer de mama.
- **MAP3K11 (2)**: Esta proteína codifica para un gen miembro de la familia de la serina/tirosinas cinasas. Esta cinasa contiene un dominio SH3 y un cierre de leucina. Su acción biológica se desarrolla en la ruta de las MAPK8/JNK cinasa, su función es actuar como un regulador positivo de la ruta de señalización JNK, al poder fosforilar directamente y activar a I κ B cinasa α y β . También se ha reportado su participación en la actividad transcripcional de NF- κ B, mediando a Rho (GTPasa) y a CDC42. Algunos estudios que abordan la generación de nuevos biomarcadores han sugerido MAP3K11 como un candidato interesante para el diagnóstico de esta patología, ya que codifica a una cinasa activada por mitógenos que interviene en el control de señalización celular.
- **HOXC6 (2)**: Este gen pertenece a la familia de los genes homeóticos HOM/Hox, una familia de factores transcripciones altamente conservada la cual juega un papel de suma importancia en la morfogénesis de todos los organismos multicelulares, al regular la expresión coordinada de múltiples genes involucrados en el desarrollo, diferenciación y transformación maligna. Chariot y colaboradores (1996), con el fin de caracterizar la expresión de los genes homeóticos en cáncer de mama, clonaron dos isoformas de HOXC6, sugiriendo que las proteínas codificadas por este gen podrían contribuir al fenotipo de las células mamarias cancerosas.
- **EIF4EBP1 (4E-binding protein 1, 4E-BP1) (3)**: Este gen codifica para un miembro de las familias de las proteínas de represión de la transcripción. Esta proteína interactúa directamente con los factores de iniciación de la traducción en eucariotes: 4E (eIF4E). La

interacción de esta proteína eIF4E inhibe el complejo de asociación y represión de la traducción. Esta proteína es fosforilada en respuesta a varias señales incluyendo la irradiación de UV y las señales insulínicas, resultando en la disociación del factor eIF4E y activando la traducción de los RNAm. Las investigaciones del grupo de trabajo de van Vliet (2008), analizaron la posible acción de algunos de los genes descritos previamente como marcadores de la proliferación y pobre pronóstico en diferentes tipos de cáncer. EIF4EBP1 fue una de las más interesantes al tener un papel crítico en el control de la síntesis de proteínas, por lo que varios reportes, incluyendo a este, han descrito la sobreactivación de EIF4EBP1 en los tumores mamarios, asociándose con un mayor grado de malignización, tamaño del tumor y recurrencia.

- **MAP3K10 (2):** La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de la serina/tirosina cinasa. Esta cinasa se ha demostrado que actúa sobre MAPK8/JNK y MKK4/SEK1, y por sí misma puede fosforilarse, para activar a la cinasa JNK. La acción biológica de MAP3K10 se presenta principalmente en la ruta metabólica y de señalización JNK.
- **PTPN18 (2):** La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de las fosfatasa tirosinas (PTP), las cuales son moléculas señalizadoras que regulan una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica. El producto proteico de este gen puede diferencialmente desfosforilar ó autofosforilar a la tirosina cinasa sobreexpresada en el tejido tumoral, Asimismo se ha visto su posible regulación sobre HER2. Ensler y colaboradores (2004) aportaron nuevo conocimiento sobre la función biológica de PTPN18 describiendo la actividad regulatoria de esta cinasa sobre HER2, su posible acción como supresor tumoral y sus múltiples relaciones con el crecimiento tumoral. PTPN18 desfosforila muchas de la tirosina cinasa que están sobreexpresadas en los tumores mamarios. Este mismo grupo de trabajo refiere la coexpresión de PTPN18 con el oncogen HER2.
- **Genes con potencial oncogénico en los tumores mamarios:** YES, ETS1 y TEL

miR-205

Acción biológica:

Regula la transición entre tejido epitelial a mesenquimal al hibridarse con ZEB1 y SIP1.

Regula los receptores de HER3 e inhibe la activación del mediador Akt.

RNAm Blancos

- **ZEB1:** Este gen codifica para dedos de zinc, los cuales son represores de los factores de transcripción, reprimiendo directamente al gen IL2 (Linfocitos T específicos 2). Se ha visto una importante relación de este gen con el desarrollo de cáncer de mama, sobretodo en el subtipo tumoral ductal invasivo y lobular. La sobreexpresión de ZEB1 se acopla perfectamente con los mecanismos de dediferenciación en las células cancerosas. Los datos del grupo de investigación de Aigner (2007), mostraron que ZEB1 representan un actor protagónico en la patología mamaria asociado con la progresión tumoral.
- **SIP 1 (Smad interacting protein-1):** este gen se involucra en la transición epitelial a mesenquimal en las células del tejido mamario normal y patológico. El estudio de Bindels y colaboradores (2006) investigaron el potencial papel que este gen tiene en la regulación de vimentin y su asociación con células tumorales con potencial de migrar e invadir. Tras su estudio con células mamarias tumorales concluyeron que la expresión de SIP1 se da únicamente en las células invasivas. Sus resultados implican a SIP1 en la regulación de las células tumorales con potencial de migración, una posible ruta que pudieran contribuir a la metástasis en el cáncer de mama.
- **AKT:** La fosforilación de éste blanco molecular es muy atractiva ya que este gen contribuye al desarrollo de cancer de mama y confiere Resistencia a las terapias convencionales. Akt es también un señalizador intermediario para los receptores del crecimiento epidérmico dentro de los que se encuentran Her2, el cual es una de las posibles variantes del cáncer (Kucab, *et. al.*, 2005).
- **VEGF:** Este gen es un miembro de la familia de los factores de crecimiento los cuales codifican para una proteína que es un homodominio de los puentes disulfuro, siendo algunos de sus principales actividades biológicas la mediación de la permeabilidad vascular induciendo angiogénesis, crecimiento. Diversos estudios han demostrado la relación entre este gen y el proceso de

angiogénesis, al ser un regulador importante del crecimiento tumoral y la metástasis en varios tipos de tumores sólidos. Schneider y Miller (2005), encontraron la expresión diferencial de éste gen entre tejido normal adyacente al tumor y el tejido tumoral. En otro estudio Brown y su equipo de trabajo encontró en tejido mamario, que VEGF está sobreexpresado en el tipo ductal pero no en el lobular infiltrante. Estas observaciones permiten comprender porque ciertos tipos de cáncer tienen un mayor potencial metastásico que otros.

- **ERBB3:** La sobreexpresión de la familia de las tirosina cinasas correspondientes a ERB juegan un papel importante en el desarrollo de muchos de los tumores de mama. Un estudio reciente sugiere la gran importancia que ErbB3 posee en el desarrollo del carcinoma mamario pues participa en la actividad biológica de Erb2 en las células de cáncer de mama. La relación ErbB2–ErbB3 puede actuar con gran afinidad como co-represor al interactuar con la ruta de MAP cinasas, es decir Erb3 es necesario para la acción biológica tumoral de Erb2 (Perez-Nadales E. y Lloyd A. C., 2004)
- **LRP1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1):** Es un receptor multifuncional con un rol importante en la regulación de la actividad de las proteínas de la matriz extracelular. Muchos estudios también han descrito su papel como señalizador intracelular. Estudios previos mostraron que la expresión de LRP1 está relacionado con células cancerígenas invasivas. También datos recientes sugieren que LRP1 está involucrado en el establecimiento y la progresión en cáncer (Beneš, *et. al.*, 2003)

miR-29c

- **YY1 (YY1 transcription factor):** Es un factor de transcripción perteneciente a la clase de los dedos de zinc GLI. El producto génico de participa en la represión y activación de un gran número de promotores, principalmente mediante la interacción directa con deacetilasas de histonas y acetilasas para de esta forma activar o reprimir un promotor. De acuerdo con los reportes de Begon y colaboradores (2005), YY1 en conjunto de AP-2 inducen la activación del promotor de ERB2 (Her2) uno de los genes sobreexpresados en aproximadamente el 30% de los cánceres mamarios. Este grupo de trabajo detectó altos niveles de este gen en líneas celulares de cáncer de mama. Al realizar un inhibición endógena de la proteína de YY1 mediante moléculas antisentido mostró que la expresión de ERB2 disminuía. Este trabajo científico brindó nuevas evidencias sobre la cooperación de YY1 y Ap-2 para estimular el promotor de ERB2 en tumores mamarios.
- **RND1 (Rho family GTPase 1):** Este gen es parte de la familia de las GTPasas Rho, la cuales regulan la organización de la actinas del citoesqueleto en respuesta a factores de crecimiento extracelular. Las investigaciones de Smid y sus colaboradores (2006) han sugerido que este gen está involucrado en la metástasis más común del tumor mamario: metástasis a hueso. RDN1 junto con *MCAM*, *PTK7*, *CTGF*, *RND1*, *TSPAN1* y *ANXA9* (SAM) pudieran participar en el proceso de adhesión requerido para la colonización a hueso.
- **SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1):** Este gen codifica a un miembro de los inhibidores STAT, siendo reguladores negativos de la señales de citocinas. Estudios sugieren que la expresión elevada de SOCS1 en las lesiones mamarias de cáncer les confiere resistencia a la citocinas proinflamatorias y a los factores tróficas mediante la subexpresión de STAT1/STAT5 los cuales median la función esencial de la glándula mamaria.
- **SETDB1 (SET domain, bifurcated 1):** El producto génico de este gen es una histona metiltransferasa, la cual cataliza la reacción de S-adenosil-L-metionina. La principal acción biológica de esta proteína es la represión transcripcional. El grupo de investigación de Li y colaboradores estudiaron en diversas líneas celulares de cáncer, incluyendo HELA, la expresión de SETDB1 y su acción biológica en la carcinogénesis. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la acción coordinada de este gen junto con otros represores transcripcionales como ESET podría contribuir al mejor entendimiento de la complejidad de la maquinaria de la heterocromatina en el

	<p>silenciamiento de los promotores de gen implicados en el cáncer.</p> <ul style="list-style-type: none"> • TGFB3: El trabajo de Kaartinen, definió los mecanismos moleculares que vuelven a las células cancerosas invasivas y el proceso metastásico en la glándula mamaria enfocando su investigación en el gen TGFB3, factor de transformación del crecimiento TGFB3. Este gen participa en la transformación epitelial a mesenquimal, proceso que en el cáncer de mama requiere la acción de la GTPasa de la familia Rho. Aun cuando aun no hay evidencias contundentes sobre la acción de este gen en el desarrollo de la carcinogénesis mamaria se cree que presenta un papel fundamental en la inducción de la transdiferenciación a células mesenquimales.
<i>miR-337-5p</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RAP2B: La proteína codificada por este gen es miembro de los oncogenes RAS . La conservación y similitud estructural de esta proteína con la proteína RAS es de aproximadamente el 50%, lo que revela su importancia biológica y evolutiva. Diversos estudios han descrito la interacción de Rap2 con los filamentos de actina del citoesqueleto. La proteína codificada por el gen Rap2 está altamente expresada en los carcinomas mamarios y se correlaciona con una pobre prognosis, sugiriendo un posible acción de Rap2 en la oncogénesis de la glándula mamaria.
<i>miR-192*</i>	miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos
<i>miR-136*</i>	miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos
<i>miR-132*</i>	miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos
<i>miR-744*</i>	miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos
Sobreexpresado	
<i>miR-431</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ESRRG (estrogen-related receptor gamma): Diversos estudios han abordado la importancia de receptores hormonales, en específico receptores a estrógenos en el cancer mamario. Ariazi y colaboradores (2002) empleado técnicas de PCR en tiempo real compararon los perfiles de expresión de esta proteína entre el tejido tumoral y el normal. Sus resultados mostraron que este receptor membranal se encontraba sobreexpresado en un 75% de los tumores respondiendo al subtipo de RE- y RP+, Asimismo se correlacionaba a Erb4. Lo anterior sugiere que su expresión está íntimamente ligada a la expresión de las hormonas: estrógenos y progesterona, pudiendo entonces ser buenos predictores y posiblemente blancos terapéuticos. Podría ser un miRNA expresado diferencialmente entre los distintos tumores mamarios ya que su expresión se correlaciona directamente con la presencia de receptores estrógeno o progesterona, • IRS2 (insulin receptor substrate 2): Este gen codifica para un receptor sustrato 2 de la insulina, siendo una molécula de señalización citoplasmática que media los efectos de la insulina (factor de crecimiento) y otras citosinas al actuar como un adaptador molecular entre los diversos receptores de la tirosina cinasas y los efectores rio abajo. En el cáncer de mama el producto génico de este transcrito regula la proliferación celular, protege a las células de apoptosis y cuando se altera su expresión incrementa la metástasis. Jackson y colaboradores (2001) reportaron tras analizar la expresión de IGFs (factores de crecimiento de insulina) en líneas celulares de tumores mamarios con un comportamiento metastásico que la acción de esta proteína es mediada por IRS-2, y que en la variante celular, con células migratorias, IGF-I promueve la adhesión celular y la motilidad, lo que sugiere su acción como mediador del fenotipo metastásico. • SMAD4 (SMAD family member 4): Este gen codifica para un miembro de la familia proteica SMAD, un grupo de proteínas de

	<p>señalización transduccional, las cuales regulan la expresión génica mediante modificaciones post transcricionales, sugiriendo su papel como un supresor tumoral. El estudio de Stuelten y colaboradores (2006) encontró disminuida la expresión de esta proteína en los tumores mamarios comparándolo con el tejido adyacente. Sin embargo un aspecto interesante es que también observaron que la expresión de este gen se relaciona con la sobrevida de la paciente, pues los tumores SMAD4- tenían mayores periodos de sobrevida. Lo anterior muestra la complejidad de la biología tumoral, es decir si bien sabemos que la principal función de SMAD4 es inhibir la proliferación celular, consistente con la actividad supresora tumoral, paradójicamente también exhibe una actividad prometastásica en estadios tardíos de la carcinogénesis mamaria.</p> <ul style="list-style-type: none"> • DAB2IP (DAB2 interacting protein): La proteína codificada por este gen es parte de la GTPasa de activación de RAS las cuales actúan como supresores tumorales en cáncer de mama y que generalmente se encuentran metiladas como parte de las alteraciones de esta patología. Los estudios reportan que su expresión se pierde en un 80 a 90% de los tumores mamarios. La relevancia clínica de Dab2 en el cáncer de mama aun no está bien establecida (Bagadi, <i>et. al.</i>, 2007).
miR-326	<ul style="list-style-type: none"> • ELK1: Este gen es un miembro de la familia de los oncogenes ETS, participando como factor de transcripción y como un blanco nuclear de la cascada de señalización Ras -raf-MAPK. Los resultados obtenidos del trabajo de Chai y colaboradores (2001) demostraron por primera vez la relación existente entre ELK1 y las proteínas BRCA1a/1b en el crecimiento celular. Los datos obtenidos muestran que al parecer BRCA1a/1b actúa como supresor tumoral pues inhibe la expresión de ELK-1 al hibridarse con genes como c- FOS. • MEST (mesoderm specific transcript): Este gen codifica para un miembro de la familia de las hidrolasas. La pérdida de la expresión de este gen se ha relacionado con algunos tipos de cánceres incluyendo el cáncer de mama. El producto génico de este gen podría tener una importante función en el desarrollo tumoral (Pedersen, <i>et. al.</i>, 1999). • RHOBTB2: Diversos estudios han descrito que la expresión de este gen se encuentra disminuida en muestras biológicas con cáncer de mama, proponiéndose pues como un supresor tumoral. Los mecanismos por los cuales actúa son diversos y pueden resumirse de la siguiente manera: a) como adaptador de las ligasas de ubiquitina dependiente de culinas-3. B) Crecimiento y apoptosis; demostrando que al haber niveles altos de expresión de RHOBT2 los mecanismos celulares suprimen efectivamente el crecimiento tumoral in vitro (Schenkova y Rivero, 2008).
miR-96	<ul style="list-style-type: none"> • CELSR2 (cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2): La proteína codificada por este gen es miembro de la subfamilia flamingo, la cual a su vez forma parte del grupo de las cadeherinas. La localización de esta proteína es la membrana plasmática por lo que se ha postulado que su función biológica consiste en ser un receptor involucrado en la mediación de la comunicación celular y al interactuar con los factores de crecimiento EGF-like también participa en la adhesión e interacción de los receptores de ligandos. La relación con el desarrollo tumoral mamario aun no se ha establecido muy claramente sin embargo se cree juega un papel fundamental en el desarrollo del crecimiento celular y mantenimiento de las células epiteliales de la glándula mamaria (Abba, <i>et. al.</i>, 2005). • GPC3 (glypican 3): El producto génico de este gen es una proteína de asociación a la membrana por lo que se ha propuesto que su principal función biológica es la controlar la división celular y regular el crecimiento, Asimismo se ha observado que al interactuar con el péptido CD26 puede inducir apoptosis en ciertos tipos celulares. Diversas investigaciones han reportado el silenciamiento de este gen en células tumorales mamarias. Los resultados del grupo de Xiang y colaboradores (2001) concordaron con la idea de que GPC3 puede actuar como un inhibidor de la proliferación celular y la sobrevivencia, por lo que se cree GPCe pudiera ser un regulador negativo del crecimiento en cáncer de mama. • PTGER3 (prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3): La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de los receptores de la proteína-G. este producto génico es uno de los cuatro receptores identificados para la prostaglandina E2 (PGE2). Las funciones biológicas de esta molécula son varias, entre las que se encuentra su actividad en la digestión, el sistema nervioso, reabsorción renal y contracciones uterinas. Estudios recientes sugieren que este receptor también media la respuesta hormonal. El estudio de Yu y colaboradores (2008) relacionó la baja tasa de expresión de PTGER3 con una mala prognosis, así pues lo tumores con niveles bajos de

expresión son de alto riesgo.

- **FOXA1 (forkhead box A1):** Este gen codifica una proteína que es miembro de las proteínas de unión al DNA. En la célula actúa como un activador transcripcional. Cirillo y Craig reportaron que al silenciar FOXA1 en líneas celulares MCF7 hubo una importante pérdida a la hipersensibilidad de DNAsas y un incremento en los receptores estrogénicos. La habilidad putativa de FOXA1 para leer las firmas de las modificaciones histónicas y su capacidad para alterar la estructura de la cromatina enfatiza su posible acción en el desarrollo mamario. Otros estudios han apoyado esta concepto basados en los datos que describen a FOXA1 como un inhibidor del crecimiento celular en cáncer de mama por lo que han propuesto que la desregulación de sus niveles podría actuar como un potencial marcador de prognosis.
 - **PTPN9 (Protein tyrosine phosphatases 9):** La proteína codificada por este gen es parte de la numerosa familia de enzimas y receptores transmembranales PTPs. Diversas investigaciones han publicado la expresión y función de estas enzimas en el tejido mamario normal y el canceroso. Las alteraciones en los niveles de expresión de estos receptores en muchos cánceres indican la compleja desregulación en el balance de la fosforilación celular, la cual puede ser una de las más importantes responsables de los procesos celulares y el control de la homeostasis en el cáncer de mama. Los nuevos datos han arrojado nueva información sobre la función de PTPN9 como un regulador del crecimiento celular y la apoptosis en los tumores mamarios, sin embargo se requiere de estudios más amplio y concluyentes para tener un idea más clara sobre su función (Freiss y Vignon, 2004).
 - **FOXO1 (forkhead box O1):** Este gen pertenece a la familia de los factores de transcripción caracterizados por la presencia de dominios “cabeza de tenedor”. La función específica de este gen a un no ha sido determinada del todo, pero los datos sugieren que podría tener una importante función en el crecimiento mitogénico y la diferenciación. Estudios recientes han relacionado a FOXO1 en la regulación génica al estar involucrado en la respuesta apoptótica, los puntos de revisión del ciclo celular y el metabolismo celular, Asimismo han establecido que FOXO1 es un supresor tumoral putativo y que su expresión está desregulada en algunos cánceres, incluyendo el cáncer de mama. Sin embargo la información con la que se cuenta sobre los mecanismos moleculares que resultan en la aberrante expresión de FOXO1 a un no se han entendido del todo. Gutilla y White (2009) mostraron que FOXO1 esta subexpresado en los tumores mamarios en comparación con tejido normal, encontrando también la sobreexpresión de los miRNAs miR-27a, miR-96, and miR-182, lo cuales tienen como blanco putativo este gen. Por otro lado la sobreexpresión de FOXO1 resulta en el decrecimiento de la viabilidad celular mediante la inhibición del ciclo celular y la inducción de la muerte celular. La subexpresión de este gen puede contribuir a la transformación y mantenimiento del estado oncogénico en las células tumorales mamarias.
- miR-210+*
- **GIT2 (G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2):** Este gen codifica una proteína que es miembro de la familia GIT, la cual interactúa con las cinasas receptoras de las proteínas de acoplamiento G. La función biológica de esta proteína radica en regular la dinámica del citoesqueleto y participar en la internalización de los receptores y el tráfico membranal. La literatura reporta que este gen tiene una acción indirecta sobre el desarrollo tumoral del tejido mamario pues la proteína codificada por este gen debe regular a la proteína PAK la cual es un efector crítico para la relación de las GTPasa Rho con la reorganización del citoesqueleto y la señalización nuclear. La regulación anormal, debido a bajos niveles del regulador GIT2 podría contribuir a la tumorigénesis de las células cancerígenas de la glándula mamaria.
 - **KCMF1 (potassium channel modulatory factor 1):** El estudio de Kreppel y colaboradores (2006) evaluó la expresión de distintos genes

	<p>en la tumorigénesis mamaria y su acción biológica cuando se alteran sus niveles de expresión en la célula tumoral. Uno de los hallazgos de este estudio fue que de manera general las células tumorales presentan bajos niveles de expresión de KCMF1 el cual pudiera ser un potencial supresor metastásico (Kreppel, <i>et. al.</i>, 2006).</p> <ul style="list-style-type: none"> • EFNA3 (ephrin-A3): Este gen codifica un miembro de la familia efrin. Estos receptores representan uno de los grupos más grandes de la tirosinas cinasas y se le ha implicado en la mediación de los eventos de desarrollo, especialmente en el sistema nervioso. Algunos estudios han relacionado la expresión de este gen con algunos procesos involucrados en la carcinogénesis al participar en la angiogénesis.
<p><i>miR-592+</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • FOXO3 (forkhead box O3): Este gen pertenece a la familia de factores de transcripción “cabeza de tenedor”. Este gen es un promotor de la apoptosis pues su expresión es necesaria para la muerte celular. Los estudios del grupo de Madureira y colaboradores (2006) estudiando la respuesta al tratamiento a Paclitaxel encontraron que el fármaco inhibía la proteína AKT e incrementaba la actividad de FOX3a deteniendo de esta manera el desarrollo tumoral. El grupo de Belguise (2007) por primera vez determinaron de manera concreta el papel de FOXO3a en la inhibición del fenotipo invasivo en células mamarias cancerígenas con actividad a receptores estrogénicos. • ZMYND11 (zinc finger, MYND domain containing 11): La proteína codificada por este gen se localiza en el núcleo presentando una función de represión transcripcional. Algunos estudios han reportado que este gen como una molécula supresora de tumores ya que reprime la transcripción (Dendale, <i>et. al.</i>, 2003) • FOXO1 (forkhead box O1): Este gen pertenece a la familia de los factores de transcripción caracterizados por la presencia de dominios “cabeza de tenedor”. La función específica de este gen a un no ha sido determinada del todo, pero los datos sugieren que podría tener una importante función en el crecimiento mitogénico y la diferenciación. Estudios recientes han relacionado a FOXO1 en la regulación génica al estar involucrado en la respuesta apoptótica, los puntos de revisión del ciclo celular y el metabolismo celular, Asimismo han establecido que FOXO1 es un supreso tumoral putativo y que su expresión está desregulada en algunos cánceres, incluyendo el cáncer de mama. Sin embargo la información con la que se cuenta sobre los mecanismos moleculares que resultan en la aberrante expresión de FOXO1 a un no se han entendido del todo. Gutilla y White (2009) mostraron que FOXO1 está subexpresados en los tumores mamarios en comparación con tejido normal, encontrando también la sobreexpresión de los miRNAs miR-27a, miR-96, and miR-182, lo cuales tienen como blanco putativo este gen. Por otro lado la sobreexpresión de FOXO1 resulta en el decrecimiento de la viabilidad celular mediante la inhibición del ciclo celular y la inducción de la muerte celular. La su expresión de este gen puede contribuir a la transformación y mantenimiento del estado oncogénico en las células tumorales mamarias. • SMAD4 (SMAD family member 4): Este gen codifica para un miembro de la familia proteica nSMAD, un grupo de proteínas de señalización transduccional, las cuales regulan la expresión génica mediante modificaciones post transcripcionales, sugiriendo su papel como un supresor tumoral. El estudio de Stuelten y colaboradores (2006) encontró disminuida la expresión de esta proteína en los tumores mamarios comparándolo con el tejido adyacente. Sin embargo un aspecto interesante es que también observaron que la expresión de este gen se relaciona con la sobrevida de la paciente, pues los tumores SMAD4- tenían mayores periodos de sobrevida. Lo anterior muestra la complejidad de la biología tumoral, es decir si bien sabemos que la principal función de SMAD4 es inhibir la proliferación celular, consistente con la actividad de supresor tumoral, paradójicamente también exhibe una actividad prometastásica en estadios tardíos de la carcinogénesis mamaria.
<p><i>miR-454*</i></p>	<p>miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos</p>
<p><i>miR-610+</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1): La proteína codificada por este gen participa en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la replicación. Su posible relación con la tumorigénesis en particular con el cáncer mamario reside en que se ha observado que la falta de esta proteína causas inestabilidad durante el proceso de formación de nuevas hebras de DNA y genera

mecanismos de reparación de DNA aberrantes.

- **SMAD7:** Varios estudios han propuesto e identificado a este gen como un posible biomarcadores molecular para la acción antemetastásica de este producto génico.
- **BCL2L2:** Este gen codifica a un miembro de la familia supresora de tumor BCL-2, presentando aun acción reguladora anti y pro apoptótica. Por ejemplo se ha demostrado que la expresión de este gen puede contribuir a reducir la apoptosis celular bajo condición citotóxicas.
- **PRLR (Prolactin receptors):** el grupo de trabajo de Neilson (2007) obtuvo datos muy precisos que sugieren que PRLR actuar de forma directa en la activación de Jak1, el cual es una tirosina cinasa que actúa en la ruta de señalización transduccional del interferon-alfa/beta y gama. Esta activación de Jak1 se realiza mediante la activación de ERK y Stat3, es decir PRLR incrementa la señalización de la inducción de Stat5a y AKT.

*miR-25**

miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos

miR-149+*

miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos

miR-935

miRNA que se ha descrito y se conoce su locus pero se desconoce su función biológica y sus posibles blancos

Estratificación de las muestras.

Se evaluaron los resultados de los perfiles de expresión de miRNA en cáncer de mama, analizando su posible correlación con los histotipos tumorales. Se compararon los tumores mamarios que expresan receptores a estrógenos y progesterona y la expresión de HER2. El análisis de esta estratificación es limitado puesto que el número de muestras que conforman a cada uno de los grupos es reducido y en alguno de los casos no tiene una representación matemática. Sin embargo, nos permite tener una idea sobre como varían los perfiles de expresión en cada condición molecular y celular.

En el grupo de los tumores HER2+ hay un conjunto de 64 miRNAs diferencialmente expresados con respecto a los tumores HER2-, con un valor de P de 0.05, destacando algunos transcritos pequeños como la subexpresión de *let-7b*, *let-7g*, *miR-125a*, *miR-30b*, *miR-30c*, *miR520a* y la sobreexpresión de *miR-105*. Estos transcritos pequeños han sido ya reportados alterados en la tumorigénesis mamaria, aun cuando no se les ha relacionado directamente con los tumores positivos a HER2.

En cuanto a la expresión de miRNAs relacionados con los receptores hormonales se presenta un claro patrón, en el que la mayoría de los miRNA están sobreexpresados. En los tumores RE+ destacan *miR-135a* y *miR-190*, los cuales han sido reportados como miRNA diferenciales en tumores RE+ con respecto a los RE- por Lowery y colaboradores (2009). Para los tumores positivos a receptores de progesterona se diferencian 38 miRNA, siendo de los más representativos *miR-509*, *miR-508*, *miR-29c*, que están sobreexpresados.

Correlación de los perfiles de expresión de miRNA con alteraciones en el número de copias.

Las alteraciones en el número de copias del DNA es uno de los mecanismos que modifican la expresión génica y la funcionalidad biológica de los genes, así mismo se ha determinado a través de distintos métodos experimentales que su alteración en las células somáticas contribuyen frecuentemente al cáncer (Pinkel y Albertson, 2005). En el año 2002, se reportó el primer ejemplo de un gen codificante de un miRNA alterado en pacientes con Leucemia, el cual poseía alteraciones en el número de copias; al encontrarse deletada la región 13q14 la cual contiene los genes codificantes para *miR-16-1* y *miR-15a*, los cuales están subexpresados en aproximadamente el 65% de los pacientes (Calin, *et. al.*, 2002). A partir de entonces otros trabajos han reportado la asociación entre la amplificación o delección de ciertos fragmentos con la expresión aberrante de miRNA

Por lo anterior resultó muy interesante correlacionar el perfil de expresión de miRNA generado para nuestras muestras de cancer mamario con el análisis de número de copias realizado para este mismo conjunto de muestras. Este trabajo forma parte de un proyecto interdisciplinario donde el mismo banco de muestras de tejido es evaluado por la Biol. Rosa Rebollar Vega para determinar los cambios en el número de copias que pudieran existir en los tumores mamarios de pacientes mexicanas. El análisis de correlación mostró diversos aspectos biológicos importantes que relacionan regiones alteradas en el número de copias con los genes codificantes de los miRNA definidos como alterados en cáncer de mama (Tabla 8).

Tabla 8. miRNA aberrantemente expresados en tejidos de tumores mamarios y su correlación con el análisis de número de copias

Placa A				Placa B		
Sub-expresados	miRNA	Loci	No. de copias	miRNA	Locus	No. de copias
	<i>miR-139-5p</i>	11q13.4	Deletado	<i>miR-132*</i>	17p13.3	Deletado
	<i>miR-195</i>	17p13.1	Deletado	<i>miR-138-2*</i>	16q13	Deletado
	<i>miR-125b</i>	11q23.24	Deletado	<i>miR-130a*</i>	11q12.1	Deletado
	<i>miR-486-5p</i>	8p11.21	Deletado	<i>miR-206</i>	6p12.2	Deletado
	<i>miR-132</i>	17p13.3	Deletado	<i>miR-337-5p</i>	14q32.2	Deletado
	<i>miR-34a</i>	1p36.22	Deletado	<i>miR-136*</i>	14q32.2	Deletado
	<i>miR-411</i>	14q32.2	Deletado	<i>miR-566</i>	3p21.31	Deletado
	<i>miR-199b-5p</i>	19p13.2	Deletado	<i>miR-744*</i>	17p12	Deletado
	<i>miR-140-3p</i>	16q22.1	Deletado	<i>miR-34b*</i>	11q23.1	Deletado
			<i>miR-221*</i>	Xp11.3	Deletado	
			<i>miR-505*</i>	Xq27.1	Deletado	
			<i>miR-650</i>	22q11.22	Deletado	
			<i>miR-100*</i>	11q24.1	Deletado	
Sobreexpresión	miRNA	Loci	No. de copias	miRNA	Locus	No. de copias
	<i>miR-431</i>	14q32.2	Amplificado	<i>miR-25*</i>	7q22.1	Amplificado
				<i>miR-190b</i>	1q21.3	Amplificado
				<i>miR-454*</i>	17q23.2	Amplificado
				<i>miR-610</i>	11p14.1	Amplificado
			<i>miR-592</i>	7q31.33	Amplificado	

Del total de los miRNA que se encuentran subexpresados y que forman parte del perfil de expresión el 16.25% se podría correlacionar su expresión alterada con el número de copias presente en el genoma del cáncer en las regiones específicas que codifican para estos miRNAs.

Discusión

Este trabajo evaluó un total de 186 placas, correspondiendo a 25 muestras tumorales y 20 muestras de tejido normal adyacente, mediante el arreglo de baja densidad Megaplex evaluando la expresión de 667 miRNAs en paralelo, con el fin de conocer las alteraciones en los perfiles de expresión en muestras de tumorales de mama de pacientes mexicanas.

Este trabajo contribuye al conocimiento del cáncer de mama, asimismo incrementa la escasa literatura sobre esta enfermedad con la que contamos en México. Vale la pena mencionar que este estudio es el primero en emplear esta tecnología en nuestro país, la cual es una novedosa herramienta para el análisis de la expresión de estos transcritos pequeños, aunado a que tienen una amplia sensibilidad por el uso de sondas TaqMan. Los reportes científicos que abordan los miRNAs emplean muy diversos métodos de análisis. Éste estudio se une a la corta lista de reportes científicos que manejan la tecnología Megaplex, planteando las diferencias que podrían diferenciar al tejido tumoral del normal.

Nosotros identificamos un total de 65 miRNA cuya expresión está significativamente desregulada ($P < 0.05$) en el tejido tumoral. 55 miRNAs están subexpresados en contraste con el tejido normal adyacente y 10 sobreexpresados. Lo anterior sin duda sugiere que en el cáncer de mama la expresión aberrante de ciertos miRNA está involucrada en el desarrollo de esta patología.

La literatura reporta que los perfiles de expresión de miRNA, determinados en los estudios de cáncer, presentan un patrón en el que la mayoría de los miRNAs están subexpresados, lo cual puede ser explicado cuando consideramos que los oncogenes son mutaciones de protooncogenes, cuya función biológica normal es de fundamental importancia en el fenotipo celular al promover el crecimiento y la división celular regulada; sin embargo, cuando estos genes están mutados en la condición patológica promueven la transformación de las células normales a tejido maligno que podría desarrollar cáncer. Por otro lado los supresores tumorales son mecanismos naturales con los que cuenta la célula para reducir su transformación a células cancerígenas al actuar sobre el ciclo celular. En el cáncer existen evidencias concretas sobre la submodulación de los supresores y la sobreexpresión de oncogenes, lo cual se ve reflejado de manera clara en los perfiles de expresión de miRNA en este trabajo. Asimismo, este comportamiento donde prevalece la sobreexpresión de los miRNAs alterados en el cáncer, sugiere que la derogación de los miRNA, en general, es en realidad un rasgo común en todos los cánceres humanos.

Del perfil de expresión de miRNAs, los diferencialmente expresados más constantemente en las muestras de tejido tumoral son *miR-411*, *miR-874*, *miR-125b*, *miR-488*, *miR-29c*, *miR-337-5p*, *miR-192**, *miR-136**, *miR-132**, *miR-744**, estos transcritos están subexpresados; mientras que *miR-326*, *miR-431*, *miR-548d-3p*, *miR-96*, *miR-210* están sobreexpresados. Lo anterior sugiere su potencial acción como genes supresores de tumor o como oncoMIRS, respectivamente.

El perfil de expresión aquí reportado presenta varias coincidencias con trabajos previos. El grupo de los miRNAs subexpresados es el más amplio; Iorio y su grupo de trabajo (2005) reporta a *miR-125b* como parte de la firma molecular que distingue tejido tumoral del normal en cáncer de mama. Al ser un miRNA subexpresado, la mayoría de los blancos putativos de este miRNA son genes con potencial oncogénico. Entre los que podemos encontrar, de acuerdo a las predicciones matemáticas, a los oncogenes *YES*, *ETS1* y *TEL*; así como rutas de señalización transduccional *MAP3K10*, *MAP3K11*; moléculas regulatorias como *PTPN18* con importante acción en los tumores HER2+ y receptores nucleolares como *ESRRA* cuya sobreexpresión se ha relacionado con una desfavorable progresión tumoral. En este mismo estudio Iorio reporta la expresión diferencial del *miR-204* entre carcinoma mamario y tejido mamario normal.

Let-7c, es uno de los miRNAs mejor conservados a lo largo de la evolución eucariota; su conservación revela la importancia biológica de este transcrito en la regulación postranscripcional del tejido normal. Varios artículos han reportado la asociación de *let7c*, y en general de la familia de *let-7*, en el desarrollo del cáncer mamario, formando parte de la mayoría de las firmas moleculares que distinguen el tejido tumoral del sano. El trabajo de Yu y colaboradores (2007) sugieren la posible acción biológica de *let-7* en el cáncer mamario al participar en la regulación de la renovación de la células madre de la glándula mamaria, así como en la diferenciación de las células de este tejido, actuando también como regulador de vías como *Ras* y *HMGGA2*. En específico, *let-7c* por sus posibles blancos biológicos es un candidato interesante para conocer la progresión de la tumorigénesis mamaria en los pacientes con cáncer de mama (Shu-rong, *et. al.*, 2009).

Otra de las coincidencias es el *mir-205*, cuya relevancia en la tumorigénesis mamaria radica en los blancos a los que éste regula; entre los que destacan *ZEB1* y *SIP1*, los cuales son transcritos involucrados en el procesos metastásico, por lo que su expresión está sumamente relacionada con la progresión tumoral.

La acción de los miRNAs depende, en gran medida, de la propia regulación de la acción de estos transcritos pequeños, por lo que los mecanismos de regulación

aberrantes, presentes en la condición patológica, afectan de forma indirecta la acción biológica de los miRNAs, teniendo todo un cúmulo de consecuencias en la tumorigénesis. Así pues procesos de metilación, fosforilación y acetilación tienen gran relevancia en la expresión de los miRNA. Relacionado con este aspecto Lehmann y colaboradores (2007) encontraron subexpresado al *miR-9* en el tejido tumoral, al igual que este trabajo. Este grupo sugiere que la sub expresión se debe a la aberrante hipermetilación del *miR-9*, sobre todo en los tipos histológicos ductales. Lo anterior es apoyado por trabajos subsecuentes de este mismo grupo de trabajo (2008), en el que concluyen que los mecanismos epigenéticos en el cáncer de mama, al estar alterados, silencian supresores tumorales como *miR-9*.

En cuanto a los miRNAs sobreexpresados se esperaría tener RNAm blancos que potencialmente actuaran como supresores tumorales. Así pues los miRNA que coinciden con otros reportes son los siguientes: *miR-210*, reportado por Iorio (2005) como diferencialmente expresado estando sobreexpresado en cáncer mamario. Una vez más la regulación de la expresión de miRNA juega un papel importante en el cáncer de mama, pues, la sobreexpresión de *miR-210* está inducida por mecanismos hipóxicos, favorecidos por el ambiente tumoral en donde la condición hipóxica es muy común (Camps, *et. al.*, 2008)

Otro de las similitudes reportadas es la sobreexpresión del *miR-96*. Siendo uno de los blancos más importantes de este transcrito el gen *FOXO1*, el cual orquesta la regulación de genes involucrados en la respuesta apoptótica y el metabolismo celular. La función biológica de *FOXO1* radica en actuar como supresor tumoral, el cual está desregulado en algunos cánceres incluyendo el cáncer de mama; ésta desregulación se da en parte por el silenciamiento anormal, debido a la sobreexpresión del *miR-96*. El trabajo de Guttilla y White (2009) reporta a este miRNA como altamente expresado en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 determinando cómo este miRNA puede contribuir a la transformación y mantenimiento del estado oncogénico de las células cancerosas del tejido mamario.

Si bien las coincidencias en la expresión de ciertos miRNAs entre este trabajo y la literatura científica, reitera la importancia de estos transcritos, lo más interesante es el reporte de nuevos miRNAs que bien podrían representar nuevos biomarcadores o blancos terapéuticos. También, es importante señalar que la plataforma Megaplex analiza todo un conjunto de miRNAs cuya función biológica aun se desconoce (placa B), por lo que la literatura de estos transcritos es muy escasa; sin embargo, estos nuevos miRNA son un campo de trabajo muy interesante pues podrían ser posibles actores moleculares en el cáncer de mama; pero para determinar esto es indispensable ampliar el conocimiento del propio miRNA, como de su acción biológica.

La plataforma empleada en este estudio permitió evaluar una gran cantidad de miRNAs, lo que a su vez permitió encontrar miRNAs diferencialmente expresados entre tejido normal adyacente y muestra tumoral, los que no han sido reportados en la literatura científica, pero que de acuerdo con los análisis biológicos pudieran tener importancia en el cáncer de mama. En este nuevo grupo de miRNAs destaca la subexpresión del *miR-411*, cuya análisis de transcritos blanco reveló algunos RNAm putativos interesantes en el desarrollo del cáncer de mama entre los que se encuentran los genes que actúan sobre la propia maquinaria de síntesis de miRNA como *EIF2C1*, el cual codifica una de las proteínas Argonauta, la cual es indispensable para la incorporación de los miRNA maduros al complejo RISC y es de fundamental importancia durante el proceso de silenciamiento de los transcritos blancos. Otro gen de vital importancia en la regulación del crecimiento celular es la *MAP2K1* que actúa como activador mitogénico de los factores de crecimiento; otra cinasa que participa en rutas biológicas asociadas a cáncer es *MAP3K1*, que señala rutas con importante relación en el desarrollo tumoral: *RAS/RAF/MEK/ERK*. Involucrado con el crecimiento tumoral se encuentra *EGR1* y oncogenes como *SET*.

Otro miRNA de interés que está subexpresado es *miR-874*, el cual regula moléculas de señalización dentro de las que destacan las tirosinas cinasa *PTPN12* participando en mecanismo clave en la tumorigénesis al actuar sobre procesos celulares incluyendo el crecimiento y diferenciación celular, ciclo mitótico y transformación oncogénica. Otro blanco putativo es el factor hipóxico *HIF1AN* el cual participa en la carcinogénesis mamaria, así como el receptor nucleolar *ESRRA*, asociado con la prognosis de los tumores dependientes de hormonas y proteínas que están involucradas en el mecanismo de acción de *Ras*.

Dentro de este perfil de niveles bajos de expresión se presenta el *miR-488* el cual regula la expresión de moléculas como *IGF-1*, un promotor importante del desarrollo de las células de la glándula mamaria, implicado en el desarrollo tumoral al estar sobreexpresado, otros transcritos que posiblemente tiene una importante función en la carcinogénesis mamaria es *AKAP13*, el cual presenta una acción coordinada con el oncogen Rho en los tumores mamarios, relacionado con la acción de este gen, *Rho1* miembro de esta familia también es un blanco putativo de este miRNA. Otros blancos son los reguladores de los procesos de síntesis de RNAm y proteínas *EIF3A* y *SMARCC1*, los cuales actúan directamente sobre la proliferación y regulación celular.

Por otro lado, están los miRNAs sobreexpresados, que de igual forma no han sido reportados en la literatura y que potencialmente juegan un papel importante en la oncogénesis mamaria. Este grupo lo encabeza el *miR-431* cuyos blancos son: *ESRRG*, un receptor membranal estrogénico el cual pudiera correlacionar su

expresión con ciertos tipos tumorales mamarios positivos a receptores de estrógenos; *IRS2* que media la acción proliferativa de la insulina en la células del tejido mamario; y supresores tumorales como *SMAD4* y *DAB2IP* los cuales son factores transcripcionales que regulan la expresión génica de ciertos genes implicados en el cáncer de mama, como *Rho*, inhibiendo así la proliferación celular. Otro miRNA cuyos blancos incluyen un supresor tumoral es miR-326 el cual silencia a *RHOBTB2*, una molécula que detiene la proliferación de las células cancerígenas.

Es interesante observar como *miR-592* silencia la acción de algunos miembros de la familia *FOXO*, considerados reguladores de la proliferación anormal, así pues los factores de transcripción *FOXO3* y *FOXO1* son hibridados y reprimidos por este miRNA. Otro aspecto relevante de este transcrito pequeño es que comparte el blanco *SMAD4*, que sugiere la acción en conjunto de *miR-592* y *miR-431*.

Los posibles RNAm blanco mencionados ya se han implicado, con anterioridad en estudios previos, en la progresión del cáncer de mama ya sea por su sobreexpresión o por silenciamiento. En este contexto estos nuevos miRNA podrían jugar un papel fundamental en la oncogénesis mamaria, o bien en conjunto con otras rutas de regulación participar en la generación del fenotipo que la glándula mamaria cancerosa presenta.

Las diferencias en los perfiles de expresión de miRNAs en tumores mamarios entre los distintos reportes científicos, incluyendo este estudio, pueden deberse a muchos factores que abarcan causas biológicas hasta las técnicas. Uno de los más obvios es la diferencia en los métodos de análisis tanto experimentales como matemáticos. Esta diversidad de métodos enriquece el análisis de la expresión de miRNA en el tejido con cáncer, pues permite tener una idea más clara y global sobre la situación en los perfiles de miRNAs. Dentro de las causas biológicas se pueden considerar varios aspectos, el primero de ellos es que el cáncer de mama es muy poco homogéneo, lo cual afectaría los perfiles de miRNA, es decir no podemos esperar que no haya diferencias significativas entre los tumores positivos a receptores hormonales y los tumores triples negativos; por otro lado, aún cuando es un área poco explorada y no hay una idea clara pudiera haber diferencias entre las distintas razas, dadas por polimorfismos de los genes codificantes de miRNAs.

Parte importante del análisis de predicción de blancos es correlacionarlos con las posibles rutas biológicas que pudieran estar siendo afectadas por la alteración en la expresión de los miRNAs y, de esta forma participar, en la proliferación anormal y sobrevida de las células cancerosas. De gran importancia resulta la ruta de las cinasas MAP. Es conveniente establecer la función de las cinasas en la célula; estas son enzimas que transfieren grupos fosfatos, es decir fosforila la molécula a

partir de ATP u otro sustrato específico. Las MAP cinasas son de las moléculas de señalización transduccional más numerosas e importantes en la regulación de muy variados procesos y respuestas celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Diversos textos reportan la desregulación de las MAP cinasas como una de las más comunes en el cáncer humano.

En específico, en cáncer de mama frecuentemente las células tumorales presentan una mayor proporción de MAP cinasas activadas. De hecho, esta activación brinda una medida integral de los procesos biológicos reguladores del crecimiento y muerte celular en cáncer de mama. Otro aspecto fundamental de esta ruta celular es que estas moléculas tienen, no sólo, una función fundamental en el desarrollo tumoral, sino también en la respuesta a los tratamientos del cáncer, como la quimioterapia. La ruta de las MAP cinasa consta de una cascada de eventos de señalización y activación, por lo que la afección en alguna de las moléculas indirectamente afectaría otras respuestas celulares (Cobb, 1999).

Al evaluar los perfiles de expresión de tumores mamarios establecidos a partir de las muestras analizadas, observamos que *miR-411*, molécula subexpresada, presenta como blanco putativo *MAP3K1*, miembro señalizador de la ruta *Ras/Raf/MAPK*. Esta ruta es una de las mejor caracterizadas en la biología celular. Su función es la de transducir señales del ambiente extracelular al núcleo celular donde genes específicos son activados para el crecimiento, división y diferenciación celular. La ruta *Ras /Raf/MAPK* está también involucrada en la regulación del ciclo celular, reparación de tejidos y la migración celular. En algunos tejidos esta ruta es capaz de estimular la angiogénesis mediante el cambio en la expresión de genes involucrados directamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Como podemos percatarnos todos estos procesos celulares son de vital importancia en la tumorigénesis. La desregulación de la ruta *Ras/Raf/MAPK* es sumamente común en cáncer, aunado a que *Ras* es el gen más frecuentemente mutado en los cánceres humanos. Evidentemente la sobreexpresión de los señalizadores y activadores de esta ruta, como lo es *MAP3K1*, tiene gran peso en la oncogénesis (Molina y Adjei, 2006).

Este mismo miRNA podría regular a la cinasa mitogénica *MAP2K1* la cual es un factor de crecimiento dependiente de estrógenos, lo cual se relaciona ampliamente con los tumores positivos a receptores estrogénicos (RE+). Siguiendo con los miRNA subexpresados está el *miR-125b* que posiblemente regula la cinasa *MAP3K11*, regulador de la ruta *JNK/MAPK8* que regula factores de transcripción específicos, los cuales median la expresión inmediata y anticipada en respuesta de los estímulos celulares. Estudios en modelos biológicos como ratón han sugerido que esta cinasa tiene un papel importante en la proliferación, apoptosis y diferenciación celular (Wagner y Nebreda, 2009) (Fig. 31).

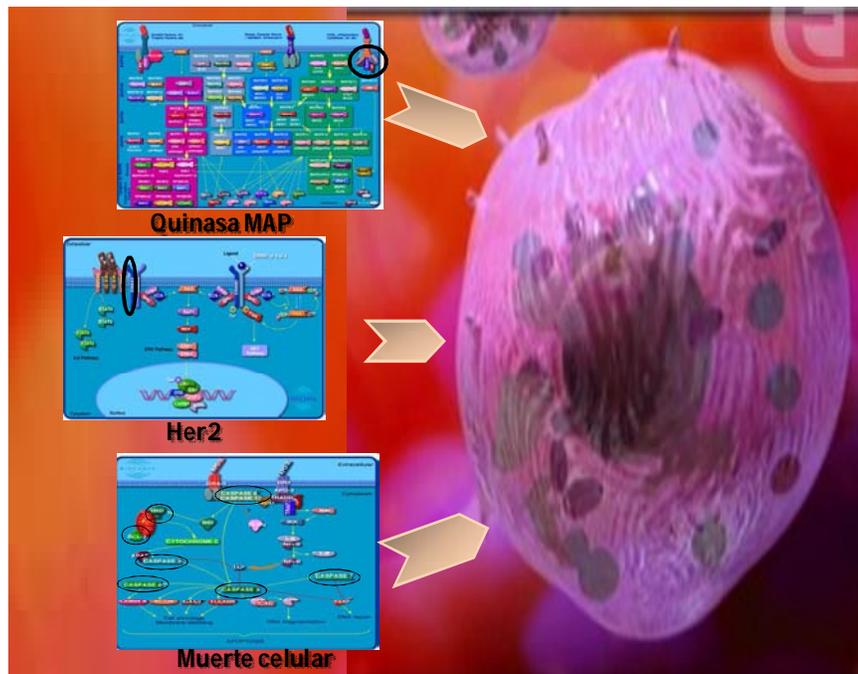


Fig. 31. Ilustración de las posibles rutas metabólicas alteradas debido a la expresión de los miRNA.

Otra ruta que tiene una importante relación con el desarrollo de cáncer de mama es la que involucra a *HER2 (ERB2)*, el cual clasifica a uno de los subtipos tumorales de mama en base a su expresión. La ruta es compleja y fundamental en el desarrollo tumoral y en el tratamiento de la neoplasia positiva a *HER2*, la cual está asociada con una mayor recurrencia de la enfermedad y una mala prognosis. Debido a que por sí sólo *HER2* tiene actividad catalítica pero no tiene ligandos, no puede señalizar por cuenta propia, por lo que requiere de otro complejo para su acción, este gen es *HER3 (ERB3)*. Al actuar de manera conjunta generan el heterodimero *HER2/HER3* el cual es un complejo molecular de gran eficiencia en el proceso de señalización. Un aspecto de gran importancia al analizar el desarrollo del cáncer de mama es la estrecha relación de *HER2/HER3* con la activación de la ruta *Ras -MAP* cinasa, que le confiere la capacidad de dirigir la proliferación celular, promover la supervivencia celular y la resistencia a los

mecanismos apoptóticos (Olayioye, 2001). Algunos de los miRNAs aquí reportados como alterados en el tejido tumoral, poseen una estrecha relación al regular la expresión de transcritos involucrados en esta ruta. Los más representativos son los miRNAs que se encuentran sobreexpresados en cáncer de mama: *miR-205* y *miR-125b*. El primero de ellos, en la condición patológica, silencia de forma anormal a *HER3* permitiéndole generar la asociación con *HER2* y de esta forma promover el desarrollo y crecimiento tumoral descontrolado. Por otro lado *miR-125b* regula la expresión de *PTPN18* la cual es una cinasa que a su vez regula la actividad de *HER2*. Debemos considerar que la expresión de estos miRNAs está alterada en el tejido tumoral por lo que su acción reguladora sobre estos transcritos podría estar perturbada, consecuentemente la expresión de estos oncogenes se realizaría aberrantemente (Fig. 32).

Relacionada con esta ruta metabólica esta la ruta Ras. La familia Ras codifica para un grupo de GTPasas pequeñas (Ras (responsable de la proliferación celular), Rho (actúa a la morfología celular), Rab, Rap, Arf, Ran, RHeb, Rad y Rit) involucradas en la señalización transduccional celular. La activación de esta ruta promueve el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia celular. Cuando esta ruta se ve alterada genera una inapropiada transmisión de señales al interior de la célula, incluso en ausencia de estímulos extracelulares, así, promueve diversos procesos como la oncogénesis y el cáncer. La activación aberrante de esta ruta en cáncer de mama puede ser un aspecto común e importante en el desarrollo tumoral (Eckert, *et. al.* 2004). Alguno de los miRNA descritos como alterados en cáncer de mama, en los perfiles de expresión en este trabajo, tienen blancos que participan activamente en esta ruta oncogénica. *miR-411* regula la expresión de *RANBP2* que es una proteína relacionada con la represión de *Ras*, sobreexpresada en tumores mamarios relacionándose con la subexpresión del miRNA. Otro blanco putativo es *RANGEF2* una GTPasa que activa a *Ras*, y las MAP cinasas que actúan como señalizadores de la ruta *Ras/Raf/Mek/Erk*. La subexpresión del *miR-871* se correlaciona con la actividad de *Ras* al regular, de manera normal, su acción biológica. Otro de los actores de esta ruta que también son regulados por miRNA definidos como alterados, es *RHOT* que es silenciado por *miR-488*. *RHOT* genera señales para la activación de estas rutas oncogénicas; finalmente encontramos a *RAP2B*, el cual es un posible blanco del *miR-337* y que forma parte de la cascada de la ruta *Ras* (Fig. 32).

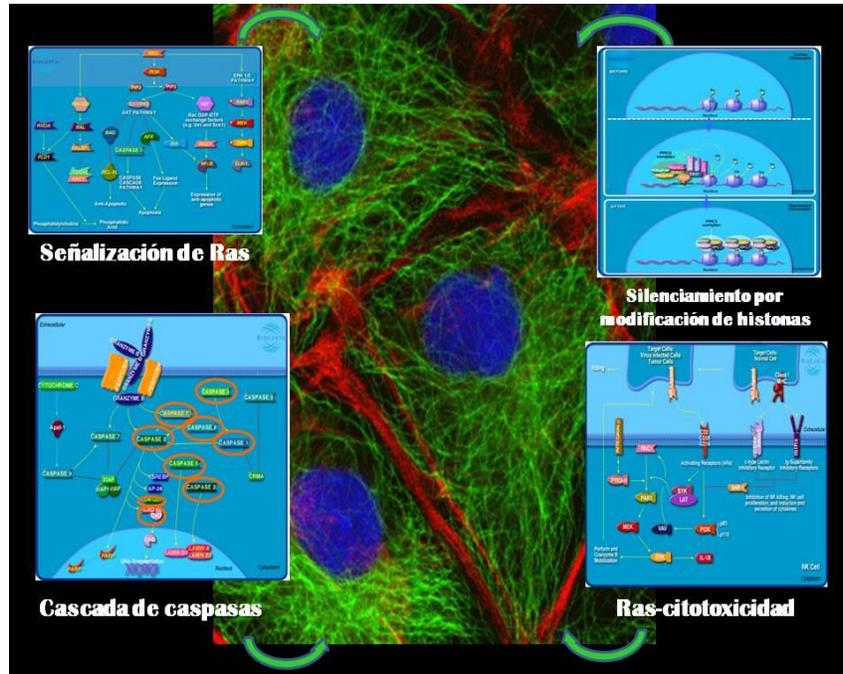


Fig. 32. Ilustración de las posibles rutas metabólicas alteradas debido a la expresión de los miRNA.

Una de las alteraciones más comunes y fundamentales en el cáncer mamario es la pérdida de los mecanismos de muerte celular programada. Uno de estos mecanismos es la cascada de caspasas que resulta en la apoptosis de la célula (muerte programada). Cuando esta ruta falla se convierte en uno de las principales contribuciones para el desarrollo tumoral. La regulación de muchas de las caspasas ocurre a nivel post-transcripcional, lo cual asegura que se puedan activar rápidamente, dichos mecanismos también se ven alterados en cáncer. En relación con la regulación de miRNAs y la ruta de muerte celular programada destacan tres miRNAs sobreexpresados, el primero de ellos es miR-431 que regula la expresión de IRS2, que altera la actividad de la caspasas al proteger a la célula de apoptosis; miR-96 que regula a PTPN9 el cual es un mecanismo de muerte celular y por último, miR-592, el cual silencia al gen FOXO3 que promueve la apoptosis. La acción de los miRNAs sobre esta ruta de muerte es crítica pues no sólo afecta la actividad propia de cada una de las caspasas, también las moléculas reguladoras de su actividad. Si bien los miRNAs no son las únicas estructuras alteradas en el cáncer que afectan la acción biológica de los receptores de muerte celular, sí podrían representar una de los más importantes por su acción sobre las caspasas y los mecanismos que regulan y promueven este proceso biológico.

Se ha reportado que los genes codificantes para miRNAs están frecuentemente localizados en regiones cromosómicas caracterizadas por ser zonas frágiles en diversas patologías, en el caso del análisis integrado para los miRNAs alterados en este estudio se localizaron zonas con regiones amplificadas o deletadas relacionándose directamente con miRNA sobreexpresados o subexpresados, respectivamente.

Un claro ejemplo es el *miR-125b*, el cual ha sido reportado en este trabajo y otros, como un miRNA alterado en cáncer de mama al estar subexpresado y cuya localización en el cromosoma 11 (11q23.24) se ha descrito frecuentemente deletada en cáncer de mama. La correlación existente entre la expresión diferencial de este miRNA y su región codificante, es evidente; coincidiendo con lo que se reporta en los estudios paralelos realizados en la mayoría de las mismas muestras, pues presentan una clara delección de la secuencia codificante de este miRNA.

Otro aspecto interesante y de gran relevancia biológica es que algunos RNAm poseen varios sitios de unión con los miRNA, generando una hibridación sinérgica lo que produce mayor eficiencia en la inhibición de la traducción. Usualmente, estos sitios de unión son ocupados por miRNA sintetizados en clusters, lo cual resulta más interesante pues algunos de los miRNAs que encontramos alterados forman parte de un cluster, y más aún varios miembros de un mismo clusters los reportamos como alterados en cáncer de mama. Un ejemplo son los miembros subexpresados del cluster conformado por *miR-411*, *miR-654*, *miR-381* y el conjunto formado por *miR-132* y *mir-212*. Lo sugerente de estos dos clusters es que los miembros que se encontraron alterados en este estudio comparten el mismo patrón de expresión, es decir, todos los miembros de los grupos se encuentran subexpresados (Anexo D), lo que confirma la idea de que el cluster no es sólo una organización transcripcional también son una unidad coordinada de acción, por lo que los miRNAs que actúan al unísono poseen un comportamiento de expresión similar y por lo tanto los blancos a los que regulan se sobreexpresan.

Los miRNAs que se encontraron diferencialmente expresados en las biopatologías tumorales, no son resultados concluyentes pues se requiere ampliar el número de muestras para generar grupos representativos de cada categoría de estudio; sin embargo, la expresión de algunos miRNA es interesante. Por ejemplo, la expresión de *miR-190* y *miR-135a* que está sobreexpresado en los tumores RE+, y que otros estudios también los han determinado como alterados en los tumores mamarios RE+. Otra interesante observación es la subexpresión de varios miembros de *let-7* en tumores HER2+. Varios miRNA, cuya expresión puede

diferenciar el tejido cancerígeno del normal, también están expresados diferencialmente en los cánceres RP+ como miR-29c y miR-9.

Es importante señalar que la regulación por miRNA no está determinada únicamente por los niveles de expresión de estos transcritos, existen otro numeroso grupo de factores que median la acción biológica de los miRNAs (Israel, *et. al.*, 2009), un claro ejemplo de ello es el estudio de Zhang y colaboradores (2006) quienes reportan que el gen codificante de la proteína Argonauta 2 (AGO2) está frecuentemente duplicado en los tumores lo cual favorece la degradación de los RNA mensajeros blancos, sin que el proceso de biogénesis y expresión de los miRNA se involucre directamente en el silenciamiento de la expresión génica: relacionado con la expresión de *Ago2*, Adams y colaboradores (2009) han reportado que esta proteína se expresa más en tumores negativos a estrógenos que en los positivos en líneas celulares de cáncer de mama, lo que sugiere que su expresión esta correlacionada con la activación de los receptores estrogénicos. Otros estudios han sugerido que la expresión de DICER varía en los diferentes subtipos tumorales de mama, definidos mediante perfiles de expresión.

Por lo anteriormente expuesto, sería interesante estudiar este tipo de factores biológicos como la expresión de diversas proteínas y cofactores participantes en la biogénesis de miRNAs y las moléculas que actúan en la inhibición de la traducción de los blancos, y de esta forma ampliar y correlacionar los resultados presentados en este trabajo.

El nivel de represión de los miRNAs es dependiente tanto de la cantidad de RNAm blanco y la cantidad de miRNA, por lo que la predicción de las interacciones de miRNA::RNAm debe ser vista desde un contexto celular y no como un proceso aislado en donde lo único que determina su acción es su expresión, de nuevo la importancia de investigar y dilucidar otros procesos celulares que intervienen en la regulación post-transcripcional como lo es la función de los cuerpos p o la misma regulación de los miRNAs en los distintos niveles tanto pretranscripcional y post-transcripcional.

Este trabajo brinda un panorama general de la expresión de miRNAs en la condición patológica de cáncer de mama; sin embargo, para poder concluir biológicamente que estos miRNA juegan un papel en el desarrollo de esta enfermedad se deben validar los transcritos cuya expresión resultó tener mayores diferencias significativas con respecto al tejido normal adyacente. Por lo tanto en el futuro se validaran nuestros resultados con sondas TaqMan para PCR en Tiempo Real en muestras independientes, o bien empleando secuencias antagonistas (antagomirs), que supriman la expresión de los miRNA en líneas

celulares específicas, para conocer su efecto biológico sobre el desarrollo tumoral y de esta forma determinar experimentalmente su acción biológica en el cáncer de mama y la relación miRNA::RNAm.

Asimismo ya que una de los nuevos campos de estudio son las mutaciones y polimorfismos de los miRNA involucrados en el desarrollo tumoral, nuestro grupo de trabajo ha planteado ampliar este trabajo mediante el uso de secuenciación de nueva generación para determinar las variaciones en la secuencias de miRNA y analizar su posible consecuencia funcional en el desarrollo del cáncer de mama. Asimismo al emplear métodos tan robusto como es la secuenciación de nueva generación podrían incluso detectarse nuevos miRNA aun no reportados.

Por otro lado, también nos hemos interesado ampliamente en los perfiles de expresión de miRNA circulantes en suero, que pudieran distinguir la presencia de células cancerígenas mamarias; para ello se ha planeado emplear la plataforma Megaplex. Este trabajo podría permitir la posibilidad de encontrar nuevos biomarcadores y su correlación con el perfil de expresión de miRNA de tejido tumoral.

Conclusión

Este trabajo permitió conocer el perfil de expresión de miRNAs en muestras tumorales de pacientes mexicanas con cáncer de mama, identificando posibles moléculas para caracterizar la biología molecular de los tumores mamarios.

El análisis presentado mostró la relevancia de los miRNAs en la regulación del desarrollo tumoral. Los datos obtenidos en este estudio sugieren la importancia de comprender y determinar la expresión de los miRNAs con el fin de conocer y tener una idea más clara de las alteraciones genéticas ocurridas en el cáncer de mama, de esta forma tener un panorama más amplio de las bases moleculares en el cáncer de mama en pacientes mexicanas.

Los miRNAs no deben ser vistos como moléculas independientes que, por sí solas, regulan una gran cantidad de transcritos, pues este panorama limita el entendimiento de los complejos procesos celulares de la regulación post-transcripcional. Como se expuso en la introducción el cáncer de mama es de hecho un cúmulo de alteraciones que afectan todos los niveles celulares y biológicos, por ello no podríamos esperar que uno de los actores que se ven afectados como: los miRNAs sean un mecanismo independiente, pues estos se desarrollan en este mismo ambiente celular.

Los miRNAs junto con otras alteraciones en los RNAm, número de copias de los genes codificantes y proteínas expresadas en los tumores mamarios, son un conjunto de interacciones que se afectan por otros procesos celulares y extracelulares, entre los que se encuentran los mecanismos epigenéticos que a su vez están siendo afectados por la expresión de miRNAs, el ambiente y estilo de vida en el que se desenvuelve la paciente y la expresión de moléculas fundamentales para el desarrollo de tumores en la glándula mamaria (Fig. 33).

No se puede pensar en los miRNAs como moléculas aisladas responsables únicas del desarrollo tumoral, pues si bien tienen, una importante actividad en la carcinogénesis, existen otros actores que en conjunto generan esta patología mamaria.

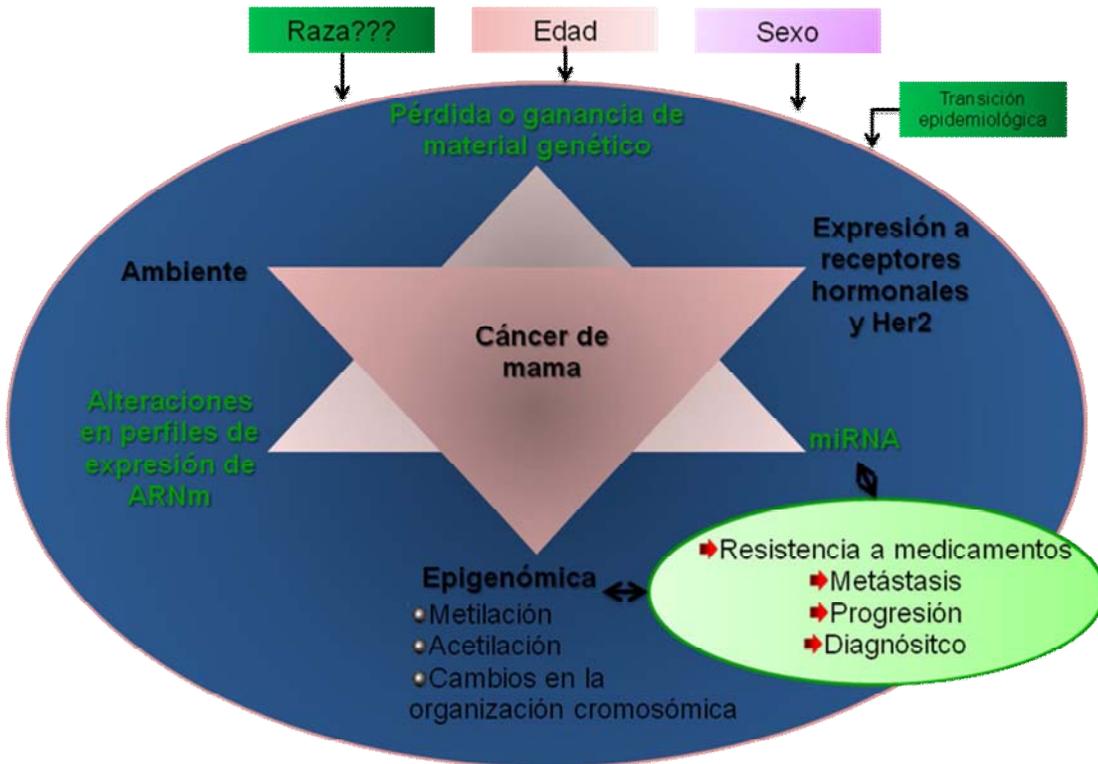


Fig. 33. Ilustración de los miRNA y su interacción con los factores biológicos y ambientales en el cáncer de mama.

Anexos

Anexo A

Extracción con trizol

1. Pasar el tejido por PBS frío, en hielo
2. Moler en trizol (1ml de trizol por cada mg de tejido)
Para muestras líquidas:
Agregar 700 µl de la muestra líquida junto con 700 µl de trizol.
3. Agregar 200 µl de cloroformo y mezclar con vortex.
4. Incubar 10 minutos en hielo
5. Centrifugar 12 min a 12 500 rpm a 4°C
6. Tomar la fase acuosa, dejando la parte más cercana a la interfase, y transferirla a un nuevo tubo.
7. Agregar 200µl de isopropanol frío y mezclar por pipeteo.
8. Reprecipitar toda la noche a -20°C
9. Centrifugar 20 minutos a 12 500 rpm a 4°C
10. Decantar el líquido para secar la pastilla.
11. Agregar 400 µl de alcohol al 70%, mezclar con vortex 10-15 segundos para deshacer la pastilla. Centrifugar 10 minutos a 12 500 rpm a 4°C.
12. Decantar el líquido para secar la pastilla.
13. Agregar 400 µl de alcohol al 80%, mezclar con vortex 10-15 segundos para deshacer la pastilla. Centrifugar 10 minutos a 12 500 rpm a 4°C.
14. Decantar el líquido para secar la pastilla.
15. Agregar 400 µl de alcohol al 90%, mezclar con vortex 10-15 segundos para deshacer la pastilla. Centrifugar 10 minutos a 12 500 rpm a 4°C.
16. Decantar el líquido para secar la pastilla.
17. Agregar 400 µl de alcohol al 100%, mezclar con vortex 10-15 segundos para deshacer la pastilla. Centrifugar 10 minutos a 12 500 rpm a 4°C.
18. Decantar el líquido para secar la pastilla y dejarla por 4-5 minutos en hielo.
19. Resuspender la pastilla en agua dpc (Volumen de acuerdo al tamaño de la pastilla).
Para muestras líquidas no dejar secar la pastilla por mucho tiempo.
20. Cuantificar, esperar un minuto para que la pastilla se disuelva.

Extracción con kit MirVana

Tejido fresco:

Precalear Elution Solution a 95°C.

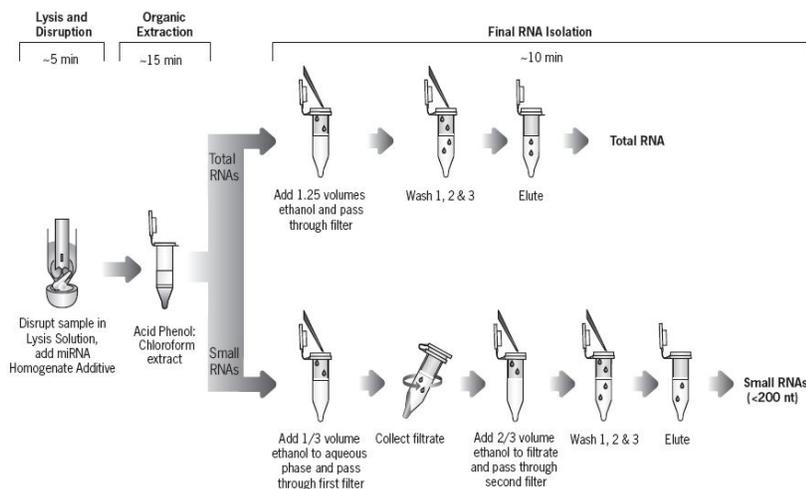
1. Homogenizar el tejido en buffer **Cell Disruption** en **10 volúmenes por masa de tejido.**
2. Agregar **1/10** volúmenes de **miRNA Homogenate Additive** (si el volumen del lisado es 300µl agregar 30µl).

- a. **Mezclar** con vortex o inversión.
 - b. **Incubar** por 10 minutos en hielo.
 3. Agregar un volumen de **Ácido-Fenol:Cloroformo** equivalente al volumen del lisado antes de agregar miRNA Homogenate Additive.
 - a. **Mezclar** con vortex durante **60 segundos**.
 - b. **Centrifugar** 5 minutos a **máxima velocidad**
 4. Recuperar la fase acuosa sin disturbar la interfase o la fase orgánica y transferirla a un nuevo tubo. **Anotar el volumen recuperado**.
- Extracción Final.

Precalentar Elution Solution a 95°C.

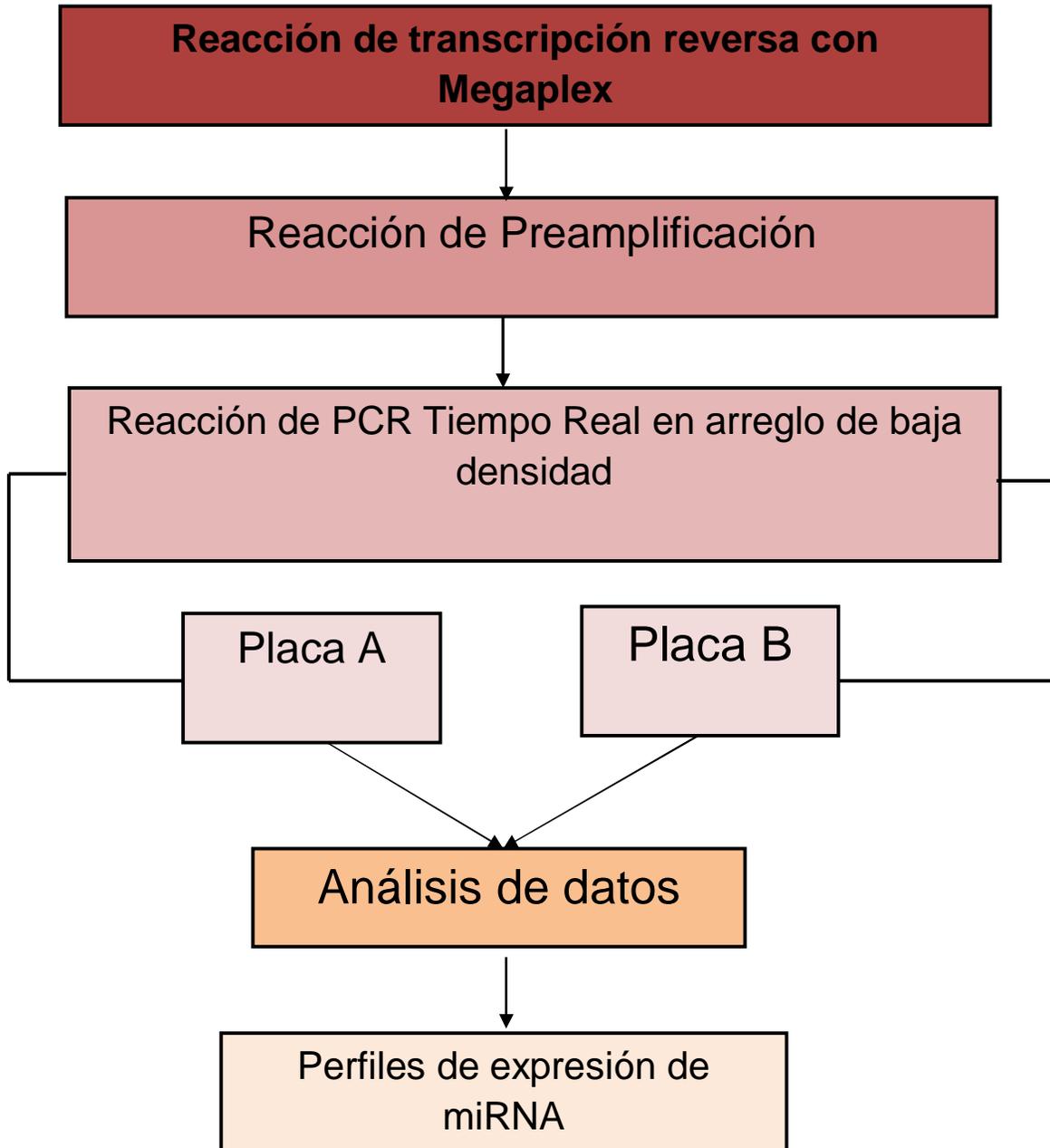
Preparar alcohol absoluto a temperatura ambiente

- Extracción de RNA total
1. **Agregar 1.25 volúmenes de etanol absoluto** y **mezclar** por pipeteo (Ejemplo: si se recupero 300 µl agregar 375µl)
 - a. Transferir 700µl a una columna con su tubo de colecta.
 - b. **Centrifugar** 15 seg a 10 000 rpm.
 - c. Descartar el sobrenadante
 - d. Repetir el proceso para el resto de la muestra
 2. Lavar la columna con **700µl de miRNA Wash Solution 1**
 - a. **Centrifugar** 15 segundos a 10 000 rpm
 - b. Descartar el sobrenadante
 3. Lavar el filtro con **500µl de Wash Solution 2/3 (Dos lavados)**.
 - a. **Centrifugar** 15 segundos por 10 000 rpm.
 - b. Descartar el sobrenadante.
 - c. **Repetir el lavado**.
 - d. **Centrifugar** 1 minuto a máxima velocidad.
 4. Transferir la columna a un **nuevo tubo**.
 5. Eluir el RNA con **50µl de Elution Solution a 95°C**
 - a. Incubar durante 1 min.
 - b. **Centrifugar** 30 segundos a máxima velocidad.



Anexo B

Plataforma de arreglos de baja densidad Megaplex



Anexo C

Anexo D

miRNA evaluados en cada placa del arreglo de baja densidad Megaplex.

TaqMan[®] Human MicroRNA Array A

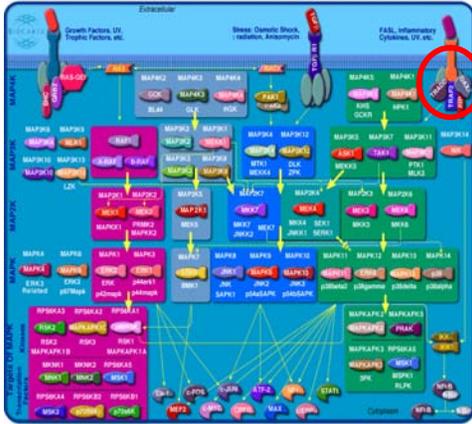
A	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-miR-1	hsa-miR-3	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	Mamm US	Mamm US	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-19c	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22	1
B	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	Mamm US	Mamm US	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-32	hsa-miR-33a	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-92a	hsa-miR-92b	hsa-miR-92c	2	
C	hsa-miR-95	hsa-miR-96	hsa-miR-98	hsa-miR-99a	hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-109a	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-129	hsa-miR-129-3p		hsa-miR-129-5p
D	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-139	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-147a	4	
E	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-151a	hsa-miR-151c	hsa-miR-152	RNU48	hsa-miR-163	hsa-miR-164	hsa-miR-165	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-189	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193c		hsa-miR-194
F	hsa-miR-195	hsa-miR-196b	hsa-miR-197	hsa-miR-199	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-206b	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-216a	hsa-miR-216b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-221	6	
G	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-209-3p	hsa-miR-209-5p	hsa-miR-209-3p	hsa-miR-209-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	hsa-miR-159a	hsa-miR-302b	hsa-miR-303c	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-331-5p		7
H	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-155	hsa-let-7b	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-miR-345	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374a	8	
I	hsa-miR-374c	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-400-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449a	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p		9
J	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-495	10	
K	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-509-3p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a	hsa-miR-516b	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c		11
L	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-518a	hsa-miR-518d	hsa-miR-519a	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-520b-5p	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-526a	hsa-miR-526b-3p	hsa-miR-526b-5p	hsa-miR-527-5p	12	
M	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-549a-5p	hsa-miR-549b-3p	hsa-miR-549b-5p	hsa-miR-549c-3p	hsa-miR-549c-5p	hsa-miR-549d-3p	hsa-miR-549d-5p	hsa-miR-549e-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-555-5p	hsa-miR-559-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-579	hsa-miR-582-3p		13
N	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-652	hsa-miR-653	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-655	hsa-miR-680	hsa-miR-671-3p	14	
O	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-889	hsa-miR-899	hsa-miR-890	hsa-miR-891a	hsa-miR-891b	hsa-miR-892a	hsa-miR-892b	hsa-miR-892c		15
P	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-1-5p	hsa-miR-220	hsa-miR-220a	hsa-miR-220c	hsa-miR-299	hsa-miR-302c	hsa-miR-345	hsa-miR-379c	hsa-miR-384	hsa-miR-412	hsa-miR-448	hsa-miR-482	hsa-miR-505	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-517b	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-520a	hsa-miR-520b	hsa-miR-520c	16	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		Port

TaqMan[®] Human MicroRNA Array B

A	hsa-miR-30a*	hsa-miR-30b*	hsa-miR-34a*	hsa-miR-125*	hsa-miR-154*	hsa-miR-182*	hsa-miR-181a*	hsa-miR-302c*	hsa-miR-373*	hsa-miR-378*	Mamm US	Mamm US	hsa-miR-389*	hsa-miR-200a*	hsa-miR-423*	hsa-miR-493*	hsa-miR-500*	hsa-miR-488*	hsa-miR-517*	hsa-miR-518a*	hsa-miR-518b*	hsa-let-7d*	hsa-miR-383*	hsa-miR-7-1*	1
B	hsa-miR-559*	hsa-miR-559*	hsa-miR-595*	hsa-miR-621*	hsa-miR-629*	hsa-miR-615*	hsa-miR-26*	hsa-miR-454*	hsa-miR-505*	hsa-miR-221*	Mamm US	Mamm US	hsa-miR-422*	hsa-miR-223*	hsa-miR-138*	hsa-miR-165*	hsa-miR-196*	hsa-miR-195*	hsa-miR-300-1*	hsa-miR-300-2*	hsa-miR-98*	hsa-miR-100*	hsa-miR-25a-2*	hsa-miR-7g*	
C	hsa-miR-302d*	hsa-miR-302d*	hsa-miR-367*	hsa-miR-374a*	hsa-miR-236*	hsa-miR-375a*	hsa-miR-307*	hsa-miR-308*	hsa-miR-130a*	hsa-miR-130a*	RNU48	RNU48	hsa-miR-132*	hsa-miR-379*	hsa-miR-148a*	hsa-miR-35a*	hsa-miR-92a-1*	hsa-miR-92a-2*	hsa-miR-92*	hsa-miR-96*	hsa-miR-90a*	hsa-miR-101*	hsa-miR-138-2*	3	
D	hsa-miR-141*	hsa-miR-143*	hsa-miR-144*	hsa-miR-145*	hsa-miR-125b-2*	hsa-miR-195a*	hsa-miR-149a*	hsa-miR-138-1*	hsa-miR-146a*	hsa-miR-149*	RNU48	RNU48	hsa-miR-296-1*	hsa-miR-298a-2*	hsa-miR-105*	hsa-miR-106a*	hsa-miR-16-2*	hsa-miR-7*	hsa-miR-150*	hsa-miR-27*	hsa-miR-335*	hsa-miR-90b*	hsa-miR-124*		hsa-miR-541*
E	hsa-miR-488*	hsa-miR-9*	hsa-miR-135a*	hsa-miR-411*	hsa-miR-340*	hsa-miR-545*	hsa-miR-183*	hsa-miR-192*	hsa-miR-200b*	hsa-miR-200c*	RNU44	RNU44	hsa-miR-155*	hsa-miR-10a*	hsa-miR-214*	hsa-miR-218-2*	hsa-miR-22*	hsa-miR-425*	hsa-miR-26*	hsa-miR-7a*	hsa-miR-424*	hsa-miR-180*	hsa-miR-203*	hsa-miR-431*	5
F	hsa-miR-7-2*	hsa-miR-109*	hsa-miR-34a*	hsa-miR-181a-2*	hsa-miR-744*	hsa-miR-452*	hsa-miR-181c*	hsa-miR-708*	hsa-miR-92b*	hsa-miR-551b*	RNU44	RNU44	hsa-miR-200*	hsa-miR-192b*	hsa-miR-487*	hsa-miR-518a*	hsa-miR-125b-1*	hsa-miR-194*	hsa-miR-106b*	hsa-miR-302a*	hsa-miR-529a*	hsa-miR-518f*	hsa-miR-374b*	hsa-miR-7b*	
G	hsa-miR-7e*	hsa-let-7f-1*	hsa-let-7f-2*	hsa-miR-15a*	hsa-miR-16-1*	hsa-miR-17*	hsa-miR-16a*	hsa-miR-19a*	hsa-miR-19b-1*	hsa-miR-19b-2*	RNU24	RNU24	hsa-miR-625*	hsa-miR-20a*	hsa-miR-21*	hsa-miR-53a*	hsa-miR-24-1*	hsa-miR-25*	hsa-miR-26a-1*	hsa-miR-26a*	hsa-miR-28a*	hsa-miR-27a*	hsa-miR-29a*	hsa-miR-944	7
H	hsa-miR-942	hsa-miR-941	hsa-miR-939	hsa-miR-938	hsa-miR-937	hsa-miR-936	hsa-let-7f-2*	hsa-miR-877	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-770-5p	RNU24	RNU24	hsa-miR-780	hsa-miR-681	hsa-miR-659	hsa-miR-643	hsa-miR-638	hsa-miR-632	hsa-miR-630	hsa-miR-610	hsa-miR-617	hsa-miR-612	hsa-miR-610	hsa-miR-603	
I	hsa-miR-601	hsa-miR-595	hsa-miR-595	hsa-miR-582	hsa-miR-587	hsa-miR-586	hsa-miR-585	hsa-miR-583	hsa-miR-575	hsa-miR-573	RNU43	RNU43	RNU68	RNU68	hsa-miR-669	hsa-miR-667	hsa-miR-665	hsa-miR-664	hsa-miR-663	hsa-miR-659	hsa-miR-657	hsa-miR-655	hsa-miR-654	hsa-miR-652	9
J	hsa-miR-552	hsa-miR-551a	hsa-miR-550	hsa-miR-549	hsa-miR-543	hsa-miR-520b	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-516a-3p	hsa-miR-513-3p	hsa-miR-509-3p	RNU43	RNU43	RNU68	RNU68	hsa-miR-158a	hsa-miR-496	hsa-miR-370	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-30a	hsa-miR-26a	hsa-miR-296	hsa-miR-190b	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-151-3p	
K	hsa-miR-495	hsa-miR-494	hsa-miR-493	hsa-miR-492	hsa-miR-492	hsa-miR-491	hsa-miR-490	hsa-miR-491	hsa-miR-789-5p	hsa-miR-789-3p	hsa-miR-789-3p	hsa-miR-787-5p	hsa-miR-787-3p	hsa-miR-786	hsa-miR-7	hsa-miR-675	hsa-miR-666	hsa-miR-661	hsa-miR-659	hsa-miR-657	hsa-miR-656	hsa-miR-650	hsa-miR-649	hsa-miR-649	11
L	hsa-miR-495	hsa-miR-494	hsa-miR-933	hsa-miR-921	hsa-miR-923	hsa-miR-922	hsa-miR-921	hsa-miR-920	hsa-miR-491	hsa-miR-789-5p	hsa-miR-789-3p	hsa-miR-787-5p	hsa-miR-787-3p	hsa-miR-786	hsa-miR-7	hsa-miR-675	hsa-miR-668	hsa-miR-661	hsa-miR-659	hsa-miR-657	hsa-miR-656	hsa-miR-650	hsa-miR-649	hsa-miR-649	
M	hsa-miR-648	hsa-miR-647	hsa-miR-646	hsa-miR-645	hsa-miR-644	hsa-miR-641	hsa-miR-640	hsa-miR-639	hsa-miR-637	hsa-miR-635	hsa-miR-634	hsa-miR-633	hsa-miR-631	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-628	hsa-miR-623	hsa-miR-622	hsa-miR-621	hsa-miR-614	hsa-miR-613	hsa-miR-609	hsa-miR-606	hsa-miR-607	hsa-miR-606	13
N	hsa-miR-605	hsa-miR-604	hsa-miR-600	hsa-miR-599	hsa-miR-598	hsa-miR-591	hsa-miR-588	hsa-miR-584	hsa-miR-581	hsa-miR-580	hsa-miR-579	hsa-miR-572	hsa-miR-571	hsa-miR-565	hsa-miR-562	hsa-miR-559	hsa-miR-524-3p	hsa-miR-519a-3p	hsa-miR-497	hsa-miR-432	hsa-miR-428-3p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-350	hsa-miR-300d	
O	hsa-miR-648	hsa-miR-647	hsa-miR-646	hsa-miR-645	hsa-miR-644	hsa-miR-641	hsa-miR-640	hsa-miR-639	hsa-miR-637	hsa-miR-635	hsa-miR-634	hsa-miR-633	hsa-miR-631	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-628	hsa-miR-623	hsa-miR-622	hsa-miR-621	hsa-miR-614	hsa-miR-613	hsa-miR-609	hsa-miR-606	hsa-miR-607	hsa-miR-606	15
P	hsa-miR-605	hsa-miR-604	hsa-miR-600	hsa-miR-599	hsa-miR-598	hsa-miR-591	hsa-miR-588	hsa-miR-584	hsa-miR-581	hsa-miR-580	hsa-miR-579	hsa-miR-572	hsa-miR-571	hsa-miR-565	hsa-miR-562	hsa-miR-559	hsa-miR-524-3p	hsa-miR-519a-3p	hsa-miR-497	hsa-miR-432	hsa-miR-428-3p				

miRNAs subexpresados							
Placa A				Placa B			
miRNA	Locí	Localización	Clusters	miRNA	Locus	Localización	Clusters
<i>miR-411</i>	14q32.2	intergénica	miR-410, miR-654, miR-381	<i>miR-337-5p</i>	14q32.2	Intergénica	
<i>miR-874</i>	5q31.2	intrónica		<i>miR-192*</i>	11q13.1		
<i>miR-125b</i>	11q23.24	intergénica		<i>miR-136*</i>	14q32.2		
<i>miR-488</i>	1q25.1	Intrónica		<i>miR-132*</i>	17p13.3		
<i>miR-29c</i>	1q32.2	Intergénica		<i>miR-744*</i>	17p12		
<i>miR-205</i>	1q32.2	Intrónica		<i>miR-770-5p</i>	4q32.2		
<i>miR-129-3p</i>	11p11.2			<i>miR-768-3p</i>	16q22.3		
<i>miR-140-3p</i>	16q22.1			<i>miR-206</i>	6p12.2		
<i>miR-101</i>	1p31.3	intergénica		<i>miR-566</i>	3p21.31		
<i>miR-130a</i>	11q12.1	Intergénica		<i>miR-380*</i>	14q32.31		
<i>miR-216b</i>	2p16.1	Intergénica		<i>miR-944</i>	3q28		
<i>let7c</i>	21q21.1	Intrónico	Mir-99*	<i>miR-9*</i>	7p15.2		
<i>miR-132</i>	17p13.3	intergénico	Mir-212	<i>miR-34b*</i>	11q23.1		
<i>miR-410</i>	14q32.31	Intergénico	miR-411, miR-654, miR-381	<i>miR-650</i>	22q11.22		
<i>miR-212</i>	17p13.3	intergénico	Mir-132	<i>miR-100*</i>	11q24.1		
<i>miR-199b-5p</i>	19p13.2			<i>miR-145*</i>	5q33.1		
<i>miR-9</i>	1q22			<i>miR-505*</i>	Xq27.1		
<i>miR-139-5p</i>	11q13.4			<i>miR-125b-2*</i>	21q21.1		
<i>miR-424</i>	Xq26.3	Intergénica		<i>miR-99a*</i>	21q21.1		
<i>miR-195</i>	17p13.1	Intergénico		<i>miR-551b*</i>	3q26.2		
<i>miR-486-5p</i>	8p11.21			<i>miR-221*</i>	Xp11.3		
<i>miR-483-5p</i>	11p15.5	Intrónica		<i>miR-130a*</i>	11q12.1		
<i>miR-199a-5p</i>	19p13.2	Intrónica		<i>miR-378*</i>	5q33.1		
<i>miR-204</i>	9q21.12	Intrónica		<i>miR-378</i>	5q32		
<i>miR-654-5p</i>	14q32.31	Integénica	miR4-10, miR-411, miR-381	<i>miR-138-2*</i>	16q13		
<i>miR-34a</i>	1p36.22	Intergénica		<i>miR-604</i>	10p11.23		
<i>miR-381</i>	14q32.31	intergénica	miR-410, miR-654, miR-411				
miRNAs sobreexpresados							
miRNA	Locí	Localización		miRNA	Locus	Localización	
<i>miR-326</i>	11q13.4	intrónica		<i>miR-592</i>	7q31.33	Intrónica	
<i>miR-431</i>	14q32.2	Intrónica		<i>miR-454*</i>	17q23.2		
<i>miR-548d-3p</i>				<i>miR-610</i>	11p14.1	Intrónica	
<i>miR-96</i>	7q32.2	Intergénica		<i>miR-25*</i>	7q22.1		
<i>miR-210</i>	11p15.5	intergénica		<i>miR-149*</i>	2q37.3		
				<i>miR-190b</i>	1q21.3	Intergénica	
				<i>miR-935</i>	19q13.42	Intrónica	

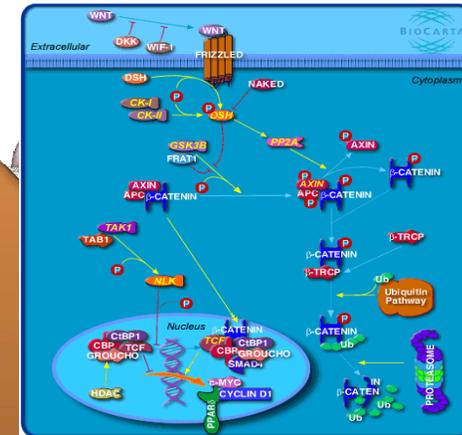
Anexo E



Map quinasas

miR-125b, miR-205, miR-29c, miR-96,

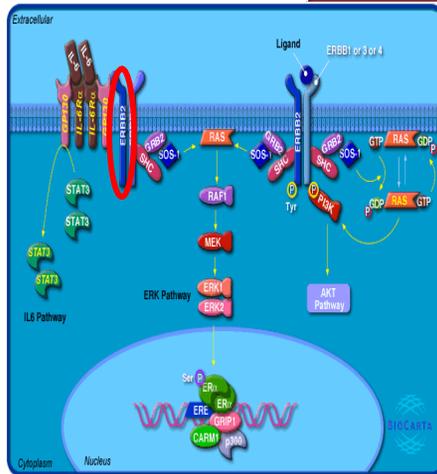
MAP quinasas (mitogen-activated protein kinase) es una ruta que consiste en cuatro grupos de genes (Erk, JNK o SAPK, p38 y MAPK o ERK5) que son señales traducciónales que actúan como activadores en cascadas estimulando el crecimiento celular y la inflamación. Su relación con el cáncer está determinada por su acción sobre vías como Ras y Rac al amplificar las señales de traducción y generar una regulación anormal (Biocarta de Croston G. y Anderson R).



WTN

miR. 125b

La familia de Wnt secreta glicoproteínas que se unen a los receptores de la superficie celular como Frizzled. Los miembros de podrían jugar un papel fundamental en la expresión de muchos genes que participan en muy diversas rutas biológicas.

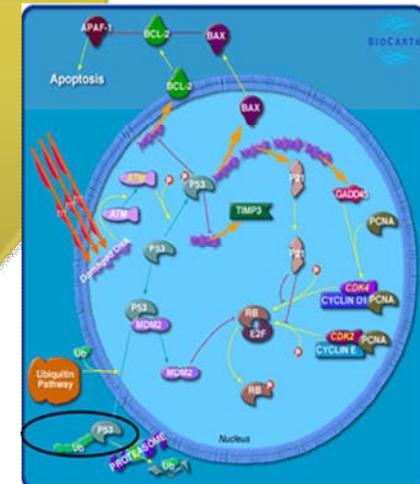


HER2 y oncogénesis

miR-125b, miR-96,

Her2 o ERBB2 pertenece a una clase de proteínas que tiene gran homología con los receptores de crecimiento EGFR o ERBB1. Este gen tiene gran importancia clínica, sobretodo en el desarrollo de cáncer de mama el cual es tratado con el anticuerpo monoclonal Herceptin que compete con los factores de crecimiento por los receptores. Este tratamiento ha mostrado gran efectividad en los cánceres mamarios Her2+, en los que se sobreexpresa esta proteína.

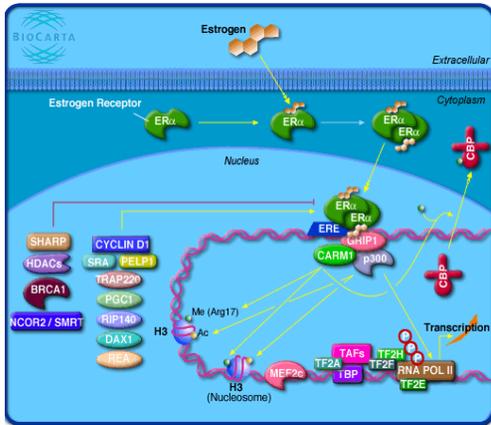
Es un factor de transcripción que regula la fosforilación. La función biológica de esta ruta es la de detener el progreso a través del ciclo celular si es que existe daño irreparable en el DNA. Esta función la realiza básicamente mediante la revisión celular en los puntos de escrutinio de la célula, cuando los daños no son reparables la célula entra en apoptosis. La importante función de esta vía se evidencia con el hecho de que en muchas de las patologías se encuentra alterada, incluyendo muchos de los tumores humanos.



P53

miR-205

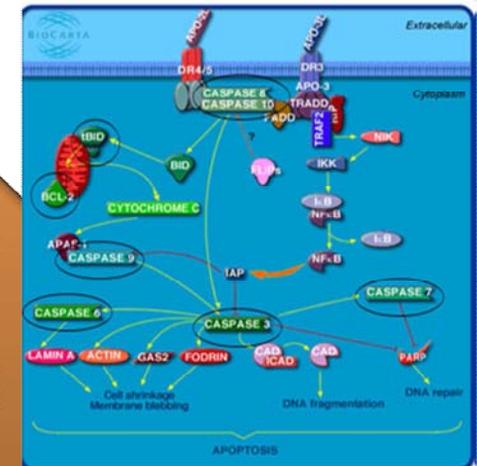
Biocarta, 2009. www.biocarta.com/Default.aspx



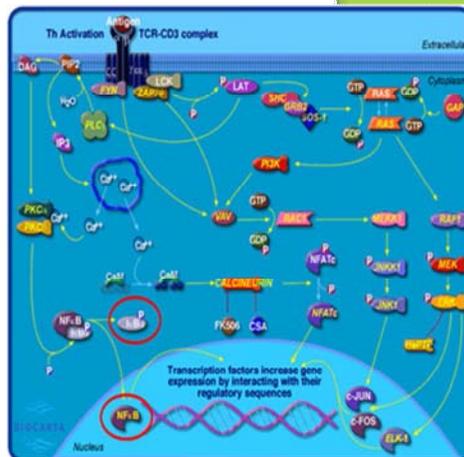
Receptores estrogénicos
miR-205,

Vía metabólica involucrada en la regulación transcripcional, por ejemplo la regulación de la actividad de receptores a hormonas esteroideas por CARM1-p300. También activa genes mediante factores transcripcionales (CEBP). El Tamoxifen (Medicamento común en el Ca mama) actúa en esta ruta.

Es inducida por "receptores de muerte" como Fas, TNFR, DR3, -4 y -5. Los ligandos inician la vía de señalización al reclutar proteínas adaptadoras y al activar la cascada de caspasas a través del reclutamiento de la caspasa 8 a través de Apo3L mediante el adaptador FADD. Una vez activada estimula el proceso de apoptosis



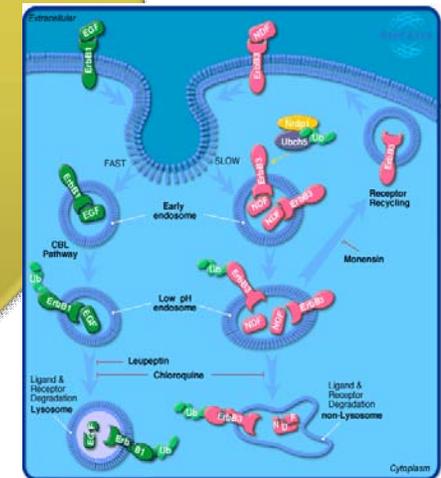
Receptores de muerte celular
miR-205



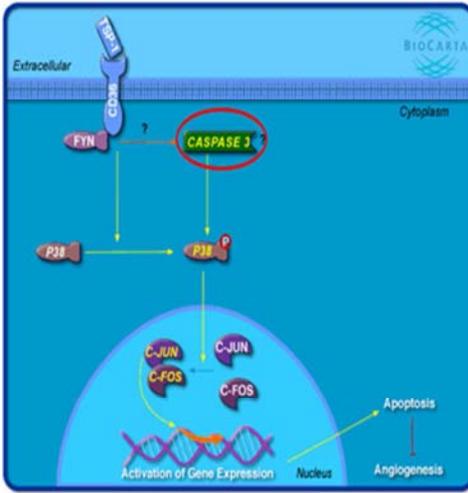
Ruta de señalización de los receptores de células T

Las células T juegan un papel muy importante en el sistema inmune. La especificidad de los receptores está gobernada por los sitios de unión a las cadenas alfa o beta. La habilidad para unirse a complejos ajenos a la célula está dada por la activación de las células T. Una vez activadas las células T pueden asistir a la activación de otras células.

Las neuregulinas interaccionan con 4 factores de crecimiento epidérmico participando en diversos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, migración, sobrevivencia y muerte. Las neuregulinas se unen a ErbB3 o ErbB4 pudiendo activar el receptor a ErbB2. Los niveles controlados de la señalización de ErbB mantienen limitados los receptores membranales. Su sobreexpresión puede generar diversas patologías tumorales.



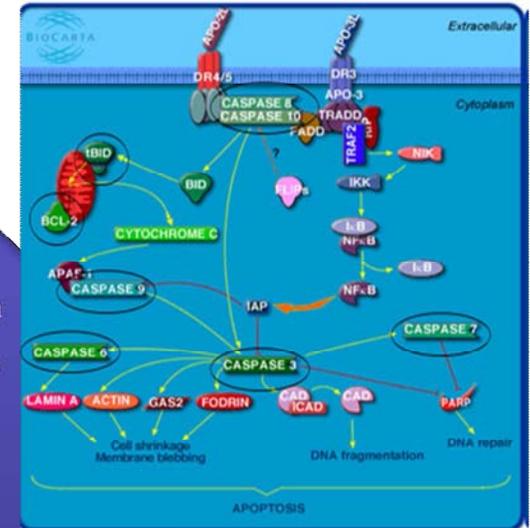
Control de receptores
miR-205



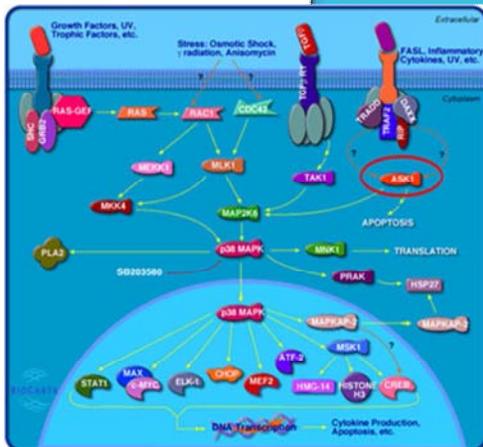
Inducción de apoptosis por TSP-1 en las células endoteliales.
miR-29c,

Los tejidos en crecimiento requieren que la angiogénesis ocurra para ser dotados de vasos sanguíneos para sobrevivir. Los tratamientos que inhiben la angiogénesis son una de las opciones para el tratamiento del cáncer. Un ejemplo es la proteína Trombospondina-1 (TSP-1) que inhibe la angiogénesis y disminuye el crecimiento tumoral, aparentemente al inducir la apoptosis microvascular de las células endoteliales TSP-1.

Estudios recientes han revelado que la estructura de la cromatina puede ser alterada por modificaciones covalentes del nucleosoma, en particular por acetilación y metilación de las colas de histonas. Las histonas hiperacetiladas se caracterizan por tener una activación en la cromatina, mientras que la deacetilación se correlaciona con la represión de la transcripción.



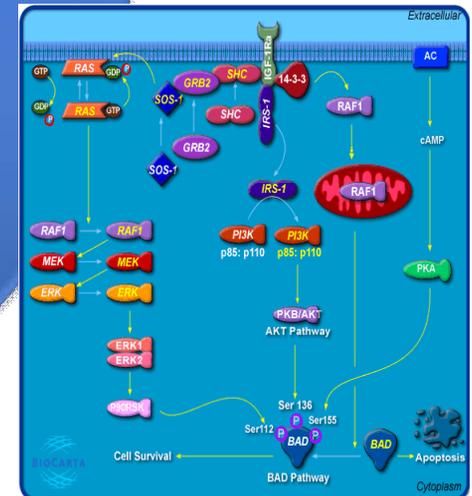
Modificación de las colas de histonas
miR-29c



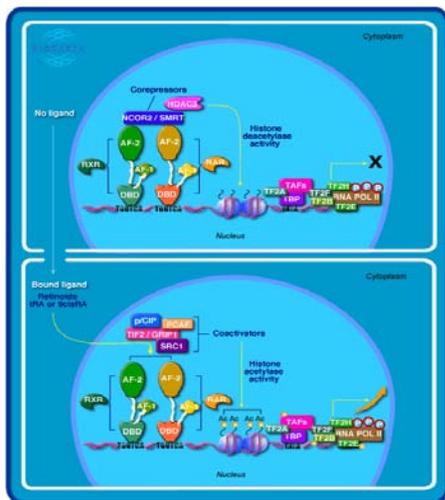
P38: vía de señalización de MAPK
miR-29c

p38 MAPK es un miembro de las Map cinasas que son activadas por estrés ambiental e inflamatorio promoviendo mecanismos como la apoptosis celular. Este tipo de señales son frecuentes en la condición tumoral.

IGF-1R, es un receptor tipo 1 para el factor de crecimiento insulínico. Esta ruta es mediadora de la supervivencia celular y el crecimiento en respuesta de los ligandos IGF-1 y IGF-2. Estos receptores de tirosinas están expresados en muchos tejidos y tienen una importante función en el crecimiento celular. La sobreexpresión de IGF-1R está involucrada en la proliferación de las células transformadas.



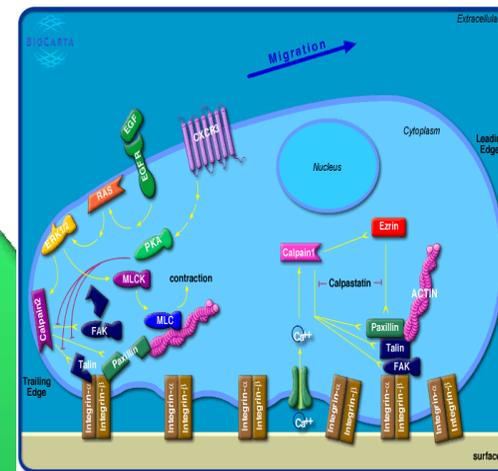
Señalización de IGF-1R
miR-96



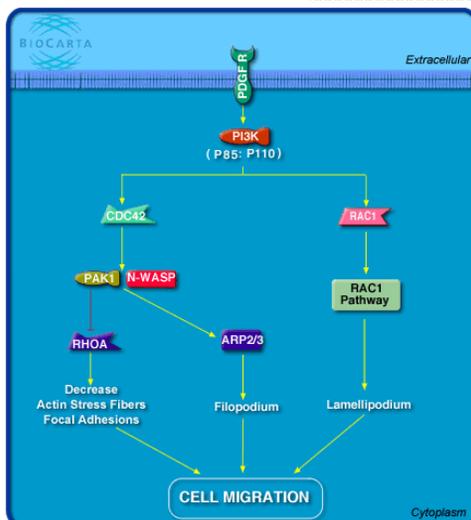
Receptores nucleares que coordinan la remodelación de la cromatina facilitando al transcripción en células cancerígenas. miR-29c

RXR y RAR son receptores nucleares. Cuando los corepresores de ligandos con actividad de deacetilación de histonas, se unen a este homodimero RXR/RAR se suprime la transcripción. Cuando los represores se disocian y se unen los coactivadores con acción de acetilación de histonas se promueve la transcripción.

Una de las principales funciones de la calpaina es la de mediar la migración celular. Esta molécula digiera la unión entre el citoesqueleto y complejos de proteínas de adhesión lo que facilita la migración. El inhibidor natural de este proceso es el Calpestatin. Durante la migración celular se inicia la actividad de la calpaina 1 y la calpaina 2 que es el director del movimiento celular en respuesta a los receptores de factores de crecimiento.



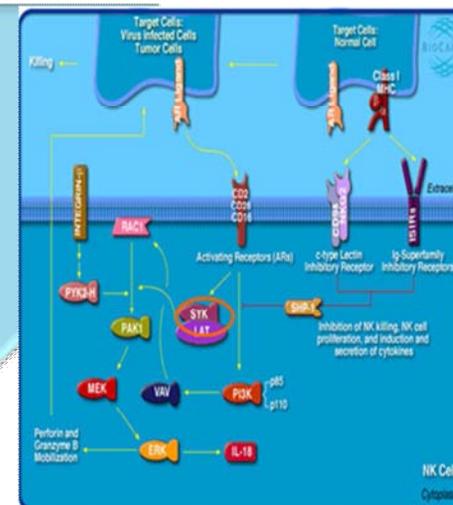
Calpaina en la motilidad celular miR-96



Migración celular miR-96,

La migración celular es un mecanismo esencial en funciones como el desarrollo, la invasión de las células cancerosas y respuesta de fibroblastos. La células pueden migrar en respuesta a señales extracelulares particularmente a actina. Su activación esta mediada por varias moléculas como cinasa, P13, p85, cdc 42, entre otros. La regulación y activación de esta ruta se genera por vías coordinadas que relacionan los estímulos extracelulares con la migración celular.

Las células asesinas naturales (NK-natural killer) son linfocitos especializados que inducen la lisis celular de las células tumorales o las infectadas viralmente. Estas células se activan por glicoproteína y son inhibidas, en las células sanas, por MHC-1. La sobreexpresión de este regulador provoca que las células tumorales no sean destruidas. La inhibición de algunas MAP cinasas también pueden inhibir de forma independiente a RAS.



Ruta independiente de RAS en células NK miR-96

Referencias

1. Abba M. C., Hu., Sun H., Drake J. A., Gaddis S., Baggerly K., Sahin A. y Aldaz M., 2005. Gene expression signature of estrogen receptor α status in breast cancer. *BMC Genomics* 6: 37
2. Adams B. D., Claffey K. P. y White B. A., 2009. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology* 150:14-23.
3. Adams B. D., Furneaux H. y White B. A., 2009. The micro-Ribonucleic Acid (miRNA) *miR-206* targets the human Estrogen receptor- α (ER α) and Represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Molecular Endocrinology* 21 (5): 1132-1147.
4. Ahmed F., Ansari H. R. y Raghava G. P. S., 2009. Prediction of guide strand of microRNAs from its sequence and secondary structure. *BMC Bioinformatics* 10: 105-116.
5. Aigner K., Dampier B., Descovich L., Mikula M., Sultan A., Schreiber M., Mikulits W., Brabletz T., Strand D., Obrist P., Sommergruber W., Schweifer N., Wernitznig A, Beug H., Foisner R. y Eger A., 2007. The transcription factor ZEB1 (E1F1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26: 6979–6988
6. Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Brownstein M. J., Tuschl T. y Margalit H., 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 33: 2697-2706.
7. Ambros V. y Horvitz H. R., 1984. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 226: 409-416.
8. American Cancer Society, 2007. Cancer Facts & Figures 2007. Tomado de http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Cancer_Facts_and_Figures_2007_rev.pdf>.
9. Ann Cirillo L. y Craig Barton M., 2008. Many forkheads in the road to regulation. Symposium on Forkhead Transcription Factor Networks in Development, Signalling and Disease. *European Molecular Biology Organization* 9 (8): 721-724.
10. Ariazi E. A., Clark G. M. y Mertz J. E., 2002. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res.* 62 (22): 6510-6518.
11. Arraztoa J., 2004. La mama diagnóstico y tratamiento. 2ed Santiago, Editorial Mediterráneo, Chile, pp 1-14.

12. Bagadi A. A. R., Prasad C. P., Anurag S., Rajinder P., Gupta S. D., Ranju R., 2007. Frequent loss of Dab2 protein and infrequent promoter hypermethylation in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* Volume 104 (3): 277-286.
13. Bartel D. P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116: 281-297.
14. Baylin S. B. y Ohm J. E., 2006. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer* 6:107–116.
15. Begon D. Y. , Delacroix L., Vernimmen D. Jackers P. y Winkler R., 2005. Yin Yang 1 Cooperates with Activator Protein 2 to Stimulate *ERBB2* Gene Expression in Mammary Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24428-24434.
16. Belguise K., Shangqin G. y Sonenshein G. E., 2007. Activation of FOXO3a by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate induces estrogen receptor α expression reversing invasive phenotype of breast cancer cells. *Cancer research* 67 (12): 5763-5770
17. Beneš P., Jurajda M., Žaloudík J., Izakovičová-Hollá L. y Vácha J., 2003. 766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (*LRP1*) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003, 5: R77-R81.
18. Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Ňoz P., Gonzalez S., Schoeftner S., Murchison E., Andi T., Chen T., Klatt P., Li E., Serrano M., Millar S., Hannon G., Blasco M. A., 2008. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat. Struct. Mol. Biol.*15:268–279.
19. Bertram J.S., 2002. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 21(6):167-223.
20. Bindels S., Mestdagt M., Vandewalle C., Jacobs N., Volders L., Noël A., van Roy F., Berx G., J-M Foidart y Gilles C., 2006. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 25: 4975–4985.
21. Biocarta. Tomado de: <http://www.biocarta.com/Default.aspx>
22. Bland, K. I. y Copeland, E. M., 2007. La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 3 ed., Imprenta Médica Panamericana, Buenos Aires, pp: 900.
23. Blenkiron C. y Miska E. A., 2007. miRNAs in cancer: aproches, aetiology, diagnostics and therapy. *Human Molecular Genetics* 16 (1): R106-R113.
24. Blenkiron C., Goldstein L. D., Thorne N. P., Spiteri I., Chin S. F., Dunning M. J., Barbosa-Morais N. L., Teschendorff A. E., Green A. R., Ellis I. O., Tavare S., Caldas C. y Miska E. A., 2007. MicroRNA expression profiling of human

breast cancer identifies new markers of tumour subtype. *Genome Biol* 8: R214.

25. Bochar D. A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W. S., Wang W., Kashanchi F. y Shiekhattar R., 2000. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102 (2): 257-265.
26. Bohnsack M. T., Czaplinski K. y Gorlich D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10: 185-191.
27. Boyd, S., 2008. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory investigation* 88: 569-578.
28. Brengues M., Teixeira D. y Parker R., 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486–489.
29. Brown, M. L., S. J. Goldie, 2006. Health service interventions for cancer control in developing countries. *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2^o ed.D.
30. Cai X., Hagedorn C. H. y Cullen B. R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10 (12): 1957-1966.
31. Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966.
32. Calin G. A. y Croce C. M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews, Cancer* 6: 857-866.
33. Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D. Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M. y Croce C. M., 2004. Human microRNA genes frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Science* 101: 2999-3004.
34. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K. Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M., et al., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 15524–15529.
35. Camps C., Buffa F. M., Colella S., Moore J., Sotiriou C., Sheldon H., Harris A. L., Gleadle J. M. y Ragoussis, 2008. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *J. Clinical Cancer Research* 14(5): 1340-1348.

36. Carlenton M., Claery M. A. y Linsley P. S., 2007. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 6 (17): 2127- 2132.
37. Carpenter B., Mac Kay C., Alnabuslsi A., MacKay M., Telfer C., Malvin W. T. y Murray G I., 2006. The roles of heterogeneous ribonucleoproteins in tumor development and progression. *Biochimica Biophysica Acta* 42: 295-309.:
38. Carthew R. W., 2002. RNA interference: the fragile X syndrome connection. *Current Biology* 12: R852-R854.
39. Chai Y., Chipitsyna G, Cui J., Liao B., Liu S., Aysola K., Yezdani M., Reddy E. S. P. y Ra V. N., 2001., c-Fos oncogene regulator Elk-1 interacts with BRCA1 splice variants BRCA1a/1b and enhances BRCA1a/1b-mediated growth suppression in breast cancer cells. *Oncogene* 20: 1357-1367.
40. Chalife M., Horvitz H. R. y Sulston J. E., 1981. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. Elegans*. *Cell* 57: 49-57.
41. Chalk A. M., Warfinge R. E., Georgii-Hemming P. y Sonhammer E. L., 2005. siRNA db: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Research* 33: D131-D134.
42. Chan J. A., Krichevsky A. M. y Kosik K. S., 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research* 65: 6029-6033.
43. Chang-Zheng C., 2005. MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors. *New England Journal of Medicine* 353 (17): 1768-1771
44. Chariot A., Castronovo V., Le P., Gillet C., Sobel M. E. y Gielen J., 1996. Cloning and expression of a new HOXC6 transcript encoding a repressing protein. *Biochemistry* 319 (Pt 1): 91-97.
45. Chemindra T. P., Finn K., Ji X., Baillat D., Gregory R. I., Liebhaber S. A., Pasquinelli A. E. y Shikhattar R. 2006. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447: 823-828.
46. Cheng A. M., Byrom M. W., Shelton J. y Ford L. P., 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Research* 33 (4):1290-1297.
47. Chin, K., DeVries S., Fridlyand J., Spellman P., Roydasgupta R., Kuo, W., Lapuk A., Neve R., Qian Z. y Ryde T., 2006. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 10: 529-541.
48. Chin, S.F., Wang Y., Thorne N.P., Teschendorff A. E., Pinder S. E., Vias M., Naderi A., Roberts I., Barbosa-Morais N. L., Garcia M. J., Iyer N. G., Kranjac T., Robertson J. F. R., Aparicio S., Tavaré S., Ellis I., Brenton J. D. y Caldas C., 2007. Using array-comparative genomic hybridization to define molecular portraits of primary breast cancers. *Oncogene* 26: 1959-70.

49. Chiu Y. L., Dinesh C. U., Ch C. Y., Ali A., Brown K.M., Cao H. y Rana T. M., 2005. Dissecting RNA-interference pathway with small molecules. *Chemistry and Biology* 12: 643-648.
50. Chung C. H., Bernard P.S. y Perou C.M., 2001. Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nature Genetics* Suppl:533-540.
51. Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J-M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C. y Georges M., 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics* 33: 813-818.
52. Cobb M.H., 1999. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 71(3-4): 479-500.
53. Colicelli J., 2004. Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases. *Science's STKE* 250: re13.
54. Costa J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22 (5): 299-305.
55. Daniels S. M., Melendez-Peña C. E., Scarborough R. J., Daher A., Christensen H. S., El Far M., Purcell D. F.J., Lainé S. y Gagnon A., 2009. Characterization on the TRBP domain required for Dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Molecular Biology*, 10: 38
56. Dendale R., Vincent-Salomon A., Mouret-Fourme E., Savignoni A., Medioni J., Campana F., Vilcoq J. R., de la Rochefordiere A., Soussi T., Asselain B., de Cremeoux P. y Fourquet A., 2003. Medullary breast carcinoma: prognostic implications of p53 expression. *International Journal of Biological Markers* 18: 99-110
57. Denli A. M., Tops B. B. J., Plasterk R. H. A., Ketting R. F. y Hannon G. J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231-240.
58. Doench J. G., Petersen C. P. y Sharp P. A., 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes and Development* 17: 438-442.
59. Eckert L. B., Repasky G. A., Ülkü A. S., McFall A., Zhou H., Sartor C. I. y Der C. J. Involvement of Ras Activation in Human Breast Cancer Cell Signaling, Invasion, and Anoikis *Cancer Research* 64, 4585-4592, July 1, 2004.
60. Eldering E., Spek C. A., Aberson H. L., Grummels A., Derks I. A., de Vos A. F., McElgunn C. J. y Schouten J. P., 2003. Expression profiling via novel multiplex assays allows rapid assessment of gene regulation in defined signaling pathways. *Nucleic Acids Res* 31: e151.
61. Ensler M., Buschbeck M., y Ullrich A., 2004. Negative regulation of HER2 signaling by the PEST-type protein-tyrosine phosphatase BDP1. *Journal of Biological Chemistry* 279: 12110-12116.

62. Esteller M., 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics* 8: 286–298.
- Jones P. A. y Baylin S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3:415–428.
63. Ezquela-Kerscher A. y Slack F. J., 2006. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature* 6: 259-269.
64. Farth K. K., Grimson A., Jan C., Lewis B. P., Johnston W. K., Lim L. P., Burge C. B. y Bartel D. P., 2005. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310: 1817-1821.
65. Filippov V., Solovyev V., Filippova M. y Gill S. S., 2000. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245: 213-221.
66. Finnegan E. J. y Matzke M. A., 2003. The small RNA world. *Journal of Cell Structure* 116: 4689-4693.
67. Foekens J. A., Sieuwerts A. M., Smid M., Look M. P., de Weerd V, Boersma AW, Klijn J. G. M., Wiemer E. A. C. y Martens J. W. M. , 2008. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proceedings or the National Academy of Science USA* 105:13021–1326.
68. Freiss G. y Vignon F., 2004. Protein tyrosine phosphatases and breast cancer. *Critical Reviews Oncology Hematology* 52(1):9-17.
69. Gregory P. A., Bert A. G., Paterson E. L., Barry S. C., Tsykin A., Farshid G. Vadas M. A., Khew-Goodall Y. y Goodall G. J., 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Bioogyl* 10:593–601.
70. Gregory R. I. y Shiekhattar R., 2005. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Research* 65:3509–3512.
71. Gregory R. I., Chendrimada T. P., Cooch N. y Shiekhattar R., 2005. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 123: 631-640.
72. Gregory R. I., Yan K. P., Amuthan G. Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N. y Shiekhattar R., 2004. The microprocessor complex mediates the génesis of microRNAs. *Nature* 432: 235-240.
73. Griffiths-Jones S., Grocock R. J., van Dongen S., Bateman A. y Enright A. J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids* 34: D140-144.
74. Guttilla I. K. y White B. A., 2009. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *Journal of Biology and Chemistry* 284 (35): 23204-23216.
75. Han J., Lee Y., Yeom K-H., Kim Y-K., Jin H. y Kim V. N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development* 18: 3016-3027.

76. Han, W., Mi-Ryung H., Jongho K. J., Ji-Yeon B., Lee, Hyun J., Young B., Eon J., Hyuk-Jae S., Hwang K. T., Sung-Eun, , Sung-Won K., Dong-Young N., 2006. Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 6, 92.
77. Hankinson, 1998. Study Finds Link Between Hormone. Breast Cancer Tomado de <http://www.ejnet.org/bgh/igf-1.html#breast>.
78. He L. y Hannon J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature* 5: 522- 531.
79. Henegha H. M., Miller N., Lowery A. J., Sweeney K. J. y Kerin M. J., 2009. MicroRNAs as novel biomarkers for breast cancer. Tomado de: <http://www.hindawi.com/RecentlyAcceptedArticlePDF.aspx?journal=jo&number=950201>.
80. Hossain A., Kuo M.T., y Saunders G. F. 2006. *MiR-17-5p* Regulates Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Translation of AIB1 mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (21): 8191-8201.
81. Hu Z., Fan C., Oh D. S., Marron J. S., He X., Qaqish B. F., Livasy C., Carey L. A., Reynolds E., Dressler L., Nobel A., Parker J., Ewend M. G., Sawyer L.R., Wu J., Liu Y., Nanda R., Tretiakova M., Ruiz Orrico A., Dreher D., Palazzo J.P., Perreard L., Nelson E., Mone M, Hansen H., Mullins M., Quackenbush J.F., Ellis M. J., Olopade O. I., Bernard P. S. y Perou C. M., 2006. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7: 96.
82. Huang Q., Gumireddy K., Schrier M., le Sage C., Nagel R., Nair S., Egan D. A., Li A., Huang G., Klein-Szanto A. J., Gimotty P. A., Katsaros D., Coukos G., Zhang L., Puré E. y Agami R., 2008. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nature Cell Biology* 10:202–210.
83. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2008. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. INEGI.
84. Iorio M., Casalini P., Tagliabue E., Ménard S. y Croce C., 2008. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *European Journal of Cancer* 44 (18): 2753-2759
85. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G, Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S., Palazzo J.P., Rosenberg A, Musiani P., Volinia S, Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M. y Croce C.M., 2005. A microRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research* 65: 7065-7070.
86. Israel A., Sharan R., Ruppin E. y Galun E., 2009. Increased MicroRNA Activity in human cancer. *Plos ONE* 4 (6): 1-10.

87. Jackson J. G., Zhang X., Toshiyuki Y. y Yee D., 2001. Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene* 20: 73187325
88. Jackson R. J. y Standart N., 2007. How do MicroRNAs Regulate gene expression?. Tomado de: *Science stke* www.stke.org/content/full/2007/367/re1. mnj
89. Jiang Q., Wang Y., Hao Y., Juan L., Teng M., Zhang X., Li M., Wang G. y Liu Y., 2009. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Research* 37:D98-104.
90. Johnson S. M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K.L., Brown D. y Slack F. J., 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120: 635-647.
91. Johnson, N., Speirs V., Curtin N.J. y Hall A.G., 2008. A comparative study of genome-wide SNP, CGH microarray and protein expression analysis to explore genotypic and phenotypic mechanisms of acquired antiestrogen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research Treat* 111: 55-63.
92. Kaartinen V., TGF-B3 and small GTPases in Invasive Breast Cancer. Tomado de http://www.cbcrp.org/RESEARCH/PageGrant.asp?grant_id=1831
93. Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatematsu Y., Yanagisawa K., Yatabe Y., Takamizawa J., Miyoshi S., Mitsudomi T. y Takahashi T., 2005. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Science*. 96 (2):111–115.
94. Khosravi S. y Pérez G. 2007. Subtipos clínicos y genéticos de cáncer de mama: individualización del tratamiento. *Anales de medicina interna* 24 (12): 560-570.
95. Kim V. N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature. Reviews Molecular Cell Biology* 6:376–385.
96. Klinge, C. M., 2009. Estrogen Regulation of MicroRNA Expression. *Current Genomics* 10 (3): 169-183.
97. Kloosterman W. P., Wienholds E., Ketting R.F., Plasterk R. H., 2004. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res* 32: 6284-6291
98. Knaul F. M., Nigenda G., Lozano R., Arreola-Ornelas H., Langer A. y Frenk J., 2008. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reproductive Health Matters* 16 (32): 113-123.
99. Knight S. W. y Bass B. L., 2001. A role for the Rnase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269-2271.

100. Kolb F. A., Zhang H., Jaronezyk K., Tahbaz N., Hobman T. C. y Ilipowicz W., 2005. Human dicer: purification, properties and interaction with PA PIW domain proteins. *Methods Enzymology* 392: 316-336.
101. Kondo N., Toyama T., Sugiura H., Fujii Y. y Yamashita H., 2008. miR-206 expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Research*: 5004–5008.
102. Krenke B., 2007. Real-Time PCR and Post-PCR Melt Analysis. Tomado de: <http://www.btc.org/courses/introductory/Real%20Time%20PCR%20PDFs/BTCI%20real%20time%20PCR%20lecture%20no%20multiplex.pdf> el 01/10/09.
103. Kreppel M., Aryee D. N. T., Schaefer K.L., Amann G., Kofler R., Poremba C., Kovar H., 2006. Suppression of KCMF1 by constitutive high CD99 expression is involved in the migratory ability of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* 25: 2795-280.
104. Kucab J. E., Lee C., Ching-Shih C., Zhu J., Gilks C.B., Cheang M., Huntsman D., Yorida E., Emerman J., PollaK M. y Dunn S. E., 2005. Celecoxib analogues disrupt Akt signaling, which is commonly activated in primary breast tumours. *Breast Cancer Research*, 7: R796-R807
105. Kulshreshtha R., Ferracin M., Negrini M., Calin G. A., Davuluri R. V. e Ivan M., 2007. Regulation of microRNA Expression. *Cell Cycle* 6 (12): 1426-1431.
106. Landthaler M., Yalcin A. y Tuschl T., 2004. The human DiGeorger syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Current Biology* 14 (23): 2162-2167.
107. Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C. C. y Croce C. M., 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of National Academy of Science USA* 103: 2257-2261.
108. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S. y Kim V. N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425 (6956): 415-419.
109. Lee Y., Jeon K., Lee J-T. y Kim V. N., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal* 21 (17): 4663-4670.
110. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K-H., Lee S., Baek S. H. y Kim V. N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal* 23 (20): 4051-4060.
111. Lee, R. C., Feinbau, R. L. y Ambras V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.

112. Lehmann U., Hasemeier B., Christgen M., Müller M., Römermann D., Länger F y Kreipe H., 2008. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *Journal of Pathol* 214:17–24
113. Lehmann U., Hasemeier B., Romermann D., Muller M., Langer F., Kreipe H. 2007. Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 91: 214-220.
114. LeVea C.M., McGary C.T., Symons J.R. y Mooney R.A., 2000. PTP LAR Expression Compared to Prognostic Indices in Metastatic and Non-Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 64 (2): 221-228
115. Lewis B. P., Burge C. B. y Bartel D. P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
116. Li H., Rauch T., Zhao-Xia Chen, Szabó P. E., Riggs A. D. y Pfeifer G. P., 2006. The Histone Methyltransferase SETDB1 and the DNA Methyltransferase DNMT3A Interact Directly and Localize to Promoters Silenced in Cancer Cells. *Journal of Biology and Chemistry* 281: 19489-19500.
117. Lin Shi-Lung, Chang D. y Ying Shao-Yao, 2005. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene* 356, pp. 32-38,
118. Lingel A., Simon B., Izarralde E. y Sattler M, 2003. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426: 465-469.
119. Linsley P. S., Schelter J., Burchard J., Kibukawa M., Martin M. M., Bartz S. R., Johnson J. M., Cummins J. M., Raymond C. K., Dai H., Chau N., Cleary M., Jackson A. L., Carleton M. y Lim L., 2007. Transcripts Targeted by the MicroRNA-16 Family Cooperatively Regulate Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (6): 2240-2252.
120. Liu J., Valencia-Sanchez M. A., Hannon G. J. y Parker R., 2005. Micro-RNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology* 7 (7):719–723.
121. Li-Xu Y., Xiu-Fang H., Shao Q., Ma- Yan H., Deng L., Qiu-Liang W., Yi-Xing Z. y Jian-Yong S, 2008. MicroRNA mir-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14: 2348-2360.
122. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H. y Matsudaira P., 2008. Molecular cell biology. 6^o ed. W.H. Freeman and company. Estados Unidos: 347-353.

123. Lowery A. J., Miller N., McNeil R. E. y Kerin M. J., 2008. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. *Clinical Cancer Res* 14 (2): 360-365.
124. Lowery A., Miller N., Devaney A., McNeill R. E., Daveron P. A., Lemetre C., Benes V., Schimdt S., Blake J., Ball G. y Kerin M. J., 2009. MicroRNA signatures predict estrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 11: R27.
125. Lu J., Getz G., Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B. L., Mak R. H., Ferrando A. A., Downing J. R., Jacks T., Horvitz H. R. y Golub T. R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.
126. Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J. E., y Kutay U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.
127. Ma J-B., Yuan Y-R., Meister G., Pei Y., Tuschl T. y Patel D. J., 2005. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 434 (7033):666–670.
128. Ma L., Teruya-Feldstein J. y Weinberg R. A., 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449:682-688
129. Malkin D., Li F. P., Strong L. C., Fraumeni J. F., Jr, Nelson C. E, Kim D. H., Kassel J., Gryka M. A., Bischoff F. Z., Tainsky M. A. y Friend S.H., 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*.250:1233–1238
130. Marie K., 2008. Cáncer de mama: prioridad apremiante. Seminario Internacional: “Cáncer de mama Retos y respuestas”. Tomado de: <http://www.tomateloapecho.org.mx/divulgacion.html>
131. Mattie M. D., Benz C. C., Bowers J., Sensinger K., Wong L., Scott G. K., Fedele V., Ginzinger D., Getts R. y Haqq C., 2006. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer* 5: 24.
132. Maziere P. y Enright, A. J., 2007. Prediction of microRNA targets. *Drug Discovery Today* 12: 452 – 458.
133. McCafferty M. P. J., McNeill E. R., Miller N. y Kevin M. J., 2009. Interactions between the estrogen receptor, its factor and microRNAs in breast cancer. *Breast Cancer Research Treat* 116: 425-432.
134. Mertens-Talcott S. U., Chintharlapalli S., Li X. y Safe S., 2007. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Research* 67(22):11001-11011.

135. Michael M. Z., O' Connor S. M., van Holst Pellekaan N. G., Young G. P. y James R.J., 2003. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Molecular Cancer Research* 1:882-891.
136. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L. M. y Ding W., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266 (5182):66-71.
137. Miller T. E., Ghoshal K., Ramaswamy B., Roy S., Datta J., Shapiro C. L., Jacob S. y Majumder S., 2008. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27(Kip1). *Journal of Biology and Chemistry* 15:15.
138. Ming Shi y Ning Guo, 2009. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 35: 328-334.
139. MiRanda, 2008. Human MicroRNA targets. Tomado de <http://www.microrna.org/microrna/getMirnaForm.do>
140. Mitchell A., Dass C. R., Sun L.-Q. y Khachigian L. M., 2004. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Research* 32 (10): 3065-3069
141. Molina, J. R. y Adjei, A. A., 2006. The Ras /Raf/MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, 1 (1): 7-9.
142. Monilola A. O., 2001. Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 3: 385-389.
143. National Cancer Institute, 2008 Breast Cancer Trial Result. Tomado de <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/results/breast>
144. National Cancer Institute. Cancer., 2008. Tomado de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
145. Negrini M. y Calin G. A., 2008. Breast cancer metastasis. A microRNA story. *Breast Cancer Research* 10: 303- 306.
146. Neilson L. M., Zhu J., Xie J., M., Malabarba G., Sakamoto K., Wagner K. U., Kirken R. A. y Rui H., 2007. Coactivation of Jak1 Positively Modulates Prolactin-Jak2 Signaling in Breast Cancer: Recruitment of ERK and Stat3 and Enhancement of Akt and Stat5a/b Pathways. *Molecular Endocrinology*. Tomado de: <http://mend.endojournals.org/cgi/content/abstract/me.2007-0173v1?ck=nck>
147. Nicola M-H. A., Bizon R, Machado J. J.S., Sollero T., Rodarte R. S., Nobre J. S., Magalhães M. M., Takiya C. M., y Borojevic R., 2003. Breast cancer micrometastases: Different interactions of carcinoma cells with

- normal and cancer patients' bone marrow stromata. *Clinical & Experimental Metastasis* 20: 471–479.
148. Okamura K. y Ishizuka A., 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & development*, 14: 1655-1666
 149. Olayioye M. A., Badache A., Daly J. M., y Hynes N. E., 2001. An essential role for Src kinase in ErbB receptor signaling through the MAPK pathway. *Experimental cell research*, 267(1): 81-7.
 150. Olsen P. H. y Ambros V., 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*. 216: 671–680.
 151. OMS, 2002. Globocan 2002. Tomado de: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/database.htm>
 152. Organización Mundial de Salud, 2008. ¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo? Tomado de <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>
 153. Organización Mundial de Salud, 2009. Quick Cancer Facts Tomado de www.who.int
 154. Ouellet D., Perro M. P., Gobeil L-A., Plante P. y Provost P., 2006. MicroRNAs in Gene Regulation: When The Smallest Governs it All. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006: 1-20.
 155. Paik, S., Shak S., Tang G., Kim C., Baker J., Cronin M., Baehner F. L., Walker M. G., Watson D., Park T., Hiller W., Fisher E. R., Wickerham L., Bryant J., y Wolmark N., 2004. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine* 351: 2817-2826.
 156. Pang-Kuo L. y Sukumar S., 2008. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 9 (12): 1879-1902.
 157. Pantel K. y Otte M., 2001. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* 11(5):327-37.
 158. Patani N., Jiang W., Mansel R., Newbold R. y Mokbel K., 2009. The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer. *Cancer Cell International* 9:18.
 159. Pedersen I. S., Dervan P. A., Broderick D., Harrison M., Miller N., Delany E. O'Shea D., Costello P. McGoldrick A., Keating G., Tobin B., Gorey T. y McCann A., 1999. Frequent Loss of Imprinting of PEG1/MEST in Invasive Breast Cancer
Cancer Res 59: 5449-5451

160. Perez-Nadales E. y Lloyd A. C., 2004. Essential function for ErbB3 in breast cancer proliferation. *Breast Cancer Res*, 6:137-139.
161. Pérez-Tamayo, R., 2007. Principios de Patología, 4a edición. México, Editorial Médica Panamericana. México, pp: 253-309.
162. Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lønning P. E., Børresen-Dale A. L., Brown P. O. y Botstein D., 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 406: 747-752.
163. Petersen C. P., Bordeleau M.-E., Pelletier J. y Sharp P. A., 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell* 21: 533–542.
164. Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Artus C. G., Zoller T., Cougot N., Basyuk E., Bertrand E. y Filipowicz, 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 Micro RNA in human cells. *Science* 309: 1573-1576.
165. Pinkel D. y Albertson D. G., 2005. Array comparative genomic hybridization and its application in cáncer. *Nature Genetics* 37: S11-S17.
166. Pollack, J.R. Sørlie T., Perou C. M., Rees C. A., Jeffrey S. S., Lønning P. E., Tibshirani R., Botstein D., Børresen-Dale A. L. y Brown P. O., 2002. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 12963-12968.
167. Ramaswamy S., Tamayo P., Rifkin R., Mukherjee S., Yeang C. H., Angelo M., Ladd C., Reich M., Latulippe E., Mesirov J. P., Poggio T., Gerald W., Loda M., Lander E. S. y Golub T. R., Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proceedings National Academy of Science U S A* 98(26):15149-15154.
168. Rana T. M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews* 8: 23-36.
169. Rebbeck T. R., DeMichele A., Tran T. V., Panossian S., Bunin G. R., Troxel A. B. y Strom B. L., 2009. Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis* 30(2):269-274
170. Rebbeck T. R., DeMichele A., Tran T. V., Panossian S., Bunin G. R., Troxel A. B. y Strom B. L., 2009. Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis*, 30(2):269-274.
171. Reinhart, B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R. y Ruvkun G., 2000. The 21-nucleotide let-7

- RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.
172. Research Grants Awarded. Disruption Of Tgf-Beta/Smad Signaling Events For The Therapy Of Breast Cancer Metastasis. Tomado de: <http://ww5.komen.org/Abstracts.aspx?gn=KG081435&cycle=2007-2008>
173. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurts J. L. y Bradley A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcriptions units. *Genome Research* 14: 1902-1910.
174. Roses, D., 2005. Breast cancer. 2° ed, Elsevier/Churchill Livingstone. Estados Unidos, pp. 812.
175. Rossi J. J., 2005 RNAi and the P-body connection. *Nature Cell Biology* 7: 643-644.
176. Salter K. H., Acharya C. R., Walters K. S., Redman R., Anguiano A., Garman K. S., Anders C. K., Mukherjee S., Dressman H. K., Barry W. T., Marcom K. P., Olson J., Nevins J. R. y Potti A., 2008. Anintegrated approach to the prediction of chemotherapeutic response in patients with breast cancer. *PLoS ONE* 3:e1908.
177. Sanger Institute, 2009. MirBase. Tomado de: <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/search.shtml>
178. Santen R.J., Song R.X., McPherson R., Kumar R., Adam L., Jeng M.H., y Yue W., 2002. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer: *Journal Steroid Biochemical Molecular Biology* 80(2):239-56
179. Sassen S., Miska E. A. y Caldas C., 2008. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Archiv* 452: 1-10
180. Satio Y., Liang G., Egger G., Friedman J. M., Chuang J. C., Coetzee G. A. y Jones P. A., 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin modifying drug in human cancer cells. *Cancer cell* 9: 435-443.
181. Saunders M. A., Han Liang y Wen-Hsiung L., 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *PNAS* 104 (9): 3300-3305
182. Schenková K. y Rivero F., 2008. RHOBTB2 (Rho-related BTB domain containing 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. Tomado de <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/RHOBTB2ID42109ch8p21.html>
183. Schier A. F. y Giraldez A. J., 2006. MicroRNA function and mechanism, insights from zebrafish. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. Tomado de: http://www.yale.edu/giraldezlab/Papers_files/schier-CSHL-2006.pdf

184. **Schneider B. P. y Miller K. D.**, 2005. "Angiogenesis, the process of new blood vessel formation, plays a central role in both local tumor growth and distant metastasis in breast cancer." *J Clin Oncol* 23 (8): 1782-1790.
185. Sempere L. F., Christensen M., Silahatoglu A., Bak M., Heath C. V., Schwartz G., Wells W., Kauppinen S. y Cole C. N., 2007. Altered MicroRNA Expression Confined to Specific Epithelial Cell Subpopulations in Breast Cancer. *Cancer Research* 67 (24): 11612-11620.
186. Sheth U. y Parker R., 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805–808.
187. Shi M. y Gou N., 2009. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer *Cancer Treatment Rev.* 35 (4): 328-34.
188. Shu-rong S., Jun-yi S., Xian S., Guan-li H. y Xiang-yang X., 2009. Expression of Let-7c in invasive ductal carcinoma of breast cancer and its clinical significance. *Acad J Sec Mil Med Univ* 30 (4):400-403
189. Si M. L., Zhu S., Wu H., Lu Z., Wu F. y Mo Y. Y., 2006. *miR-21*-mediated tumor growth. *Oncogene* 26: 2799-280.
190. Sinkkonen L., Hugenschmidt T., Berninger P., Gaidatzis D., Mohn F., Artus-Revel C. G., Zavolan M., Svoboda P. y Filipowicz W., 2008. MicroRNAs control *de novo* DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nature Structural Molecular Biology* 15: 259–267.
191. Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., Wong S.G., Keith D. E., Levin W. J., Stuart S. G., Udove J. y Ullrich A., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244(4905):707-12.
192. Smid M., Wang Yixin, Klijn, Jan G.M., Sieuwerts, Anieta M., Zhang, Yi, Atkins, David, Martens, John W.M., Foekens y John A., 2006. Genes Associated With Breast Cancer Metastatic to Bone *J Clin Oncol* 24: 2261-2267.
193. Smith D. D., Saetrom P., Snøve O. Jr, Lundberg C., Rivas G. E., Glackin C. y Larson G. P., 2008. Meta-analysis of breast cancer microarray studies in conjunction with conserved cis-elements suggest patterns for coordinate regulation. *BMC Bioinformatics* 28, 9: 63.
194. Song J.-J., Smith S. K., Hannon G. J. y Joshua-Tor L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689):1434–1437.
195. Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quistl H., Matesec J. C., Brownm P. O., Botsteinc D., Lønning P.E. y Anne-Lise Børresen-Daleb, 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas

distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings National Academy of Science USA* 98: 10869-10874.

196. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J. S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C.M. Lønning P.E., Brown P.O., Anne-Lise Børresen-Dale y Botstein D., 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8418-8423.
197. Spiro C. y McMurray C.T., 2003. Nuclease-deficient FEN-1 blocks Rad51/BRCA1-mediated repair and causes trinucleotide repeat instability. *Molecular Cell Biology*. 23(17): 6063-6074.
198. Stratton M. R., Campbell P. J. y Futreal A., 2009. The cancer genome. *Nature Reviews* 458: 719-724.
199. Streit S., Ruhe J., Knyazev P., Knyazeva T., Lacobelli S., Peter S., Hoefler H. y Ullrich A., 2006. PTP-PEST phosphatase variations in human cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 170 (1): 48-53.
200. Stuelten C. H., Buck M. B., Dippon J., Roberts A. B., Fritz P. y Knabbe C., 2006. Smad4-expression is decreased in breast cancer tissues: a retrospective study. *BMC Cancer* 6: 25.
201. Sunters A., Madureira P. A., Pomeranz K. M., Muriel A., Jan J. B., Cook S. J., Boudewijn B. M. T., Coombes R. C. y Lam E. W. F., 2006. Paclitaxel-Induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH₂-terminal kinase and AKT. *Cancer research* 66 (1): 212-220.
202. Suzuki T., Miki Y., Moriya T., Shimada N., Ishida T., Hirakawa H., Ohuchi N. y Sasano H., 2004. Estrogen-related receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Research* 64(13): 4670-4676.
203. Tan E. Y., Campo L., Han C., Turley H., Pezzella F., Gatter K. C., Harris A. L. y Fox S.B., 2007. Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9(6):R89
204. Tavazoie S. F., Alarcon C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos P. D., Gerald W. L. y Massagué J., 2008. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147-152.
205. Teixeira D., Sheth U., Valencia-Sanchez M. A., Brengues M. y Parker R., 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11 (4):371-382.
206. The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Tomado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

207. Tijsterman M., Okihara K. L., Thijssen K., Plasterk R. H., 2002. PPW-1 a PAZ/PIWI protein required for efficient germline RNAi, is defective in a natural isolate of *C. elegans*. *Current Biology* 12: 1535-1540.
208. Ting A. H., McGarvey K. M. y Baylin S. B., 2006. The cancer epigenome— components and functional correlates. *Genes Development*. 20: 3215–3231.
209. Tomari Y. y Zamore P. D., 2005. Perspective: Machines for RNAi. *Genes and Development*. 19: 517–529.
210. Tsuchiya Y., Nakajima M., Takagi S., Taniya T. y Yokoi T., 2006. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 66: 9090–8.
211. van der Groep P., Bouter A., van der Zanden R., Menko F. H., Buerger H., Verheijen H.M., van der Wall E. y van Diest P. J., 2004. Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *Journal National Cancer Institute* 96: 712-713.
212. van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M. J., He Y. D., Hart A. A. M., Mao M., Peterse H. L., van der Kooy K., Marton M. J., Witteveen A. T., Schreiber G. J., Kerkhoven R. M., Roberts C., Linsley P. S., Bernards R. y Friend S. H., 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-6.
213. van Vliet M. H., Reyal F., Horlings H. M., van de Vijver M. J., Reinders M. J. T. y Wessels L. F. A., 2008. Pooling breast cancer datasets has a synergetic effect on classification performance and improves signature stability. *BMC Genomics* 9:375
214. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. y Speleman F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of mul bntiple internal control gene. *Genome biology* 3 (7):RESEARCH0034.
215. Vázquez-Ortiz G., Piña-Sánchez P. y Salcedo M., 2006. Grandes Alcances de los RNAs pequeños RNA de interferencia y microRNA. *Revista de Investigación Clínica* 4 (58): 335-349.
216. Vincent-Salomon A., Gruel N., Lucchesi C., MacGrogan G., Dendale R., Sigal-Zafrani B., Longy M., Raynal V., Pierron G., de Mascarel I., Taris C., Stoppa-Lyonnet D., Pierga J. Y., Salmon R., Sastre-Garau X., Fourquet A., Delattre O., de Cremoux P. y Aurias A., 2007. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* 9: R24.
217. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Voutsden K. H. y

- Prives C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137: 413- 431.
218. Volinia S., Calin G. A., Liu C. G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R. L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C. C. y Croce C. M., 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceeding National Academy of Science USA* 103: 2257-2261.
219. Vousden K. H. y Prives C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137(3):413-31.
220. Wagner E. F. y Nebreda A. R., 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer* 9: 537–549.
221. Walter, M.J. Payton J. E., Ries R. E., Shannon W. E., Deshmukh H., Zhao Y., Baty J., Heath S.:*et.al.*, 2009. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proceeding Nationall Academy of Science USA* 106: 12950-12955.
222. Wang V. y Wu W., 2007 MicroRNA: A New Player in Breast Cancer Development. *MedUnion Press*. Tomado de <http://www.mupnet.com>
223. Whitehead Institute for Biomedical Research, 2009. Target Scan Human Prediction of microRNA. Tomado de <http://www.targetscan.org/>.
224. Wightman B., Burglin T. R., Gatto J., Arasu P y Ruvkun G., 1991. Negative regulatory sequence in the *lin-14* 3' untranlated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes and Development* 5: 1813-1824.
225. Wightman B., Ha I. y Ruvkun G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.
226. Wirtenberger M., Tchatchou S., Hemminki K., Klaes R., Schmutzler R. K., Bermejo J. L., Chen B., Wappenschmidt B., Meindl A., Bartram C. R. y Burwinkel B., 2005. Association of genetic variants in the Rho guanine nucleotide exchange factor AKAP13 with familial breast cancer *Carcinogenesis Advance Access*. Tomado de: 10.1093/carcin/bgi245.
227. Wu H., Xu H., Miraglia L. J. y Crooke S. T., 2000. Human RNase III is a 160 k-Da protein involved in preribosomal RNA processing. *Journal of Biological Chemistry* 275 (47): 36957-36965.
228. Wu, L., Fan J. y Belsasco J. G., 2006. microRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings National Academy of Science* 103: 4034-4039.
229. Xiang Y.Y., Ladeda V. y Filmus J., 2001. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene* 20(50):7408-7412.

230. Yang J. y Weinberg R.A., 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell* 14:818–829.
231. Yi R., Qin Y., Macara I. G. y Cullen B. R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development* 17 (24): 3011-3016.
232. Ying S. Y. y Lin S. L., 2006. Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs). *Journal of Biomedicine Science* 13: 5-15.
233. Yu F., Yao H., Zhu P., Zhang X., Pan Q., Gong C., Huang Y., Hu X., Su F., Lieberman J. y Song E., 2007. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131 (6):1109-1123.
234. Yu J., Yu Jidan., Cordero K. E., Johnson M. D., Ghosh D., Rae J. M., Chinnaiyan A. M. y Lippman M. E., 2008. A Transcriptional Fingerprint of Estrogen in Human Breast Cancer Predicts Patient Survival. *Neoplasia Press* 10 (1): 79-88.
235. Zhang L., Huang J., Yang N. Greshock J., Megraw M. S., Giannakakis A., Liang S., Naylor T. L., Barchetti A., Ward M. R., Yao G., Medina A., O'Brien-Jenkins A., Katsaros D., Hatzigeorgiou A., Gimotty P. A., Weber B. L. y Coukos G., 2006. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceeding National Academy of Science* 103: 9136-9141.
236. Zhao J. J., Lin J., Yang H., Kong W., He L., Ma X., Coppola D. y Cheng J. Q., 2008. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 283:31079–1086.