



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**POSIBLE INFLUENCIA DE MIR-7 EN EL METABOLISMO DE  
CANCER DE MAMA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**DAVID SANCHEZ MARIN**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EDUARDO LOPEZ URRUTIA**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2019**





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.



Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer (L-11), en la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección del Dr. Eduardo López Urrutia.

Agradezco al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (Comecyt) por el apoyo económico otorgado con el objetivo de la culminación de tesis y el proceso de titulación.

Gracias a la Universidad y sus académicos por formarme en la licenciatura, así como por los apoyos y recursos que recibí durante el trascurso de mis estudios.

## 活到老，学到老

«La ciencia es una empresa cooperativa, que se extiende de generación en generación. Es el paso de la antorcha del maestro, al estudiante, al maestro. Una comunidad de mentes que se remonta a la antigüedad y hacia adelante a las estrellas.» Neil DeGrasse Tyson.

## **Dedicatoria**

A mi familia, quienes, con su trabajo, apoyo y confianza incondicional me impulsaron a cumplir esta meta.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Eduardo, por sus enseñanzas, tiempo y dedicación a ayudar a formar la base de mi vida profesional. Por motivarme a desarrollar una carrera en la ciencia y el ser un ejemplo para seguir.

Al Dr. Carlos, por haberme dado la oportunidad de estar en su grupo de investigación y enseñarme la importancia de liderazgo y trabajo en equipo.

A la Dra. Vero, por sus consejos y recordarme que la disciplina y organización son fundamentales para un profesionista.

A la Dra. Marta, la Dra. Montserrat y la Dra. Alma, por sus observaciones y aportaciones al desarrollo y revisión de este trabajo.

A Sareni, por su apoyo incondicional, valiosos consejos y enseñarme de perseverancia. Por permanecer siempre a mi lado y motivarme a ser una mejor persona.

A mis amigos del L-11

David, Sam, John, Mical, Xochitl, Rebe, Izamary, Carlos, Héctor y la Dra. Gaby. A Misael, por darme su ayuda durante el desarrollo del proyecto. A Jossimar, por sus conocimientos brindados, trabajo en equipo y risas en el laboratorio. A Luis por sus buenos consejos y conversaciones en la FES. A Toño, por su aportación a este trabajo.

A Leslie, por enseñarme a ilustrar.

**Índice**

**Índice de figuras**

**Índice de tablas**

<b>Resumen</b> .....	13
<b>Introducción</b> .....	14
<b>Cáncer</b> .....	14
<b>Cáncer de mama</b> .....	15
<b>Reprogramación metabólica</b> .....	17
Consumo desregulado de glucosa y aminoácidos.....	19
Uso de intermediarios de la glucólisis y ciclo de TCA para la biosíntesis y producción de NADPH.....	21
Incremento en la demanda de nitrógeno .....	23
Uso de modos oportunistas para la adquisición de nutrientes .....	23
Interacciones metabólicas con el microambiente.....	24
Alteraciones de la regulación de genes por metabolitos.....	24
<b>MicroRNAs</b> .....	25
<b>Biogénesis</b> .....	26
<b>Función</b> .....	29
<b>Regulación</b> .....	31
<b>MicroRNAs en cáncer</b> .....	33
<b>MicroRNAs en cáncer de mama</b> .....	34
<b>Perfiles de expresión de microRNAs</b> .....	35



MiR-7.....	39
ACADL, CSRNP3 y PDK4 .....	40
Hipótesis .....	42
Objetivos .....	43
Materiales y métodos .....	44
<b>Análisis bioinformático .....</b>	<b>44</b>
Análisis de complementariedad <i>in silico</i> de miR-7-3p y miR-7-5p con sus posibles genes blanco. ....	44
Predicción de la expresión de miR-7 y sus posibles genes blanco en cáncer de mama .....	44
Cultivo celular.....	44
Extracción de RNA de líneas celulares y cuantificación .....	45
Síntesis de cDNA .....	45
Cuantificación de los mRNA por PCR en punto final y tiempo real .....	45
Stem loop RT-PCR.....	47
Análisis estadísticos.....	49
Resultados.....	50
Expresión <i>in silico</i> de miR-7 .....	50
Expresión <i>in silico</i> de los posibles genes blancos: ACADL, PDK4 y CSRNP3. ....	50
Expresión <i>in vitro</i> de miR-7-3p y 5p.....	51
Expresión <i>in vitro</i> de los posibles genes blancos: ACADL, PDK4 y CSRNP3. ....	52
ACADL .....	52
CSRNP3 .....	53

PDK4.....	54
Discusión.....	57
Conclusiones.....	64
Perspectivas.....	64
Bibliografía.....	65

## Índice de figuras

### Introducción

Figura 1. Incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en hombres y mujeres. ....	16
Figura 2. Hallmarks de la reprogramación metabólica .....	18
Figura 3. Consumo desregulado de glucosa.....	21
Figura 4. Uso de intermediarios de la glucosa y ciclo de TCA para la biosíntesis y producción de NADPH.....	23
Figura 5. Estructura de microRNAs.....	25
Figura 6. Localización genómica de los microRNAs.....	26
Figura 7. Biogénesis de microRNAs. ....	29
Figura 8. Mapas de redes de interacción de microRNAs con sus posibles genes blancos.....	38
Figura 9. Redes de interacción de hsa-miR-7-3p y hsa-miR-7-5p con sus posibles genes blanco. ....	39

### Materiales y métodos

Figura 10. Condiciones de RT-PCR.....	45
Figura 11. Esquema de la pulsed RT y Stem loop qPCR para cuantificación de miRNAs. ....	48
Figura 12. Condiciones de pulsed RT.....	49
Figura 13. Condiciones de Stem loop PCR para cuantificación de microRNAs. ....	49

### Resultados

Figura 14. Expresión <i>in silico</i> de miR-7 en pacientes con cáncer de mama y sanos. .	50
Figura 15. Expresión <i>in silico</i> de los posibles genes blancos de miR-7; en pacientes con cáncer de mama y sanos .....	51
Figura 16. Expresión de miR-7 en la línea celular no tumoral; MCF10A, y triple negativo; BT20, MDA MB-231 y MDA-MB-468.....	52
Figura 17. Amplificación del fragmento de mRNA de ACADL en líneas celulares.....	53

Figura 18. Amplificación del fragmento de mRNA de CSRNP3 .....	53
Figura 19. Amplificación del fragmento de mRNA de PDK4.....	54
Figura 20. Amplificación del fragmento de mRNA de PDK4.....	55
Figura 21. Expresión de miR-211-5p en las líneas celulares MCF10, MDA-MB-231 y MDA-MB-468.....	56

## **Discusión**

Figura 22. Regulación indirecta de miR-7 sobre PDK4 a través de su interacción con múltiples blancos de las vías de señalización ERK/MAPK y PI3K/AKT.....	59
---	----

## Índice de tablas

### Introducción

Tabla 1. Perfil de expresión de los receptores por tipo de cáncer de mama..... 16

### Materiales y métodos

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de mRNA..... 46

Tabla 3. Secuencias de primers, T<sub>m</sub> y tamaño del amplicón de los mRNA..... 46

Tabla 4. Secuencias de primers para la cuantificación por Stem loop RT-PCR de U6, miR-7-3p, miR-7-5p y miR-211-5p..... 48

## Resumen

El cáncer de mama es la primera neoplasia en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. Una de las características del cáncer es la reprogramación del metabolismo que proporciona a la célula más nutrientes para satisfacer la alta demanda de energía que altera vías de señalización y enzimas claves. Algunas de estas enzimas son ACADL, CSRNP3 y PDK4, implicadas en la  $\beta$ -oxidación, el síndrome metabólico y el metabolismo de la glucosa, respectivamente. Estas enzimas son blanco de diferentes elementos reguladores como microRNAs. Los microRNAs llevan a cabo regulación a la baja de mRNAs por represión traduccional o degradación, lo cual permite el control de diversos procesos celulares. En cáncer, la expresión de los miRNAs se ha reportado desregulada lo que conlleva a la alteración de sus mRNAs blanco. En un análisis bioinformático de nuestro grupo de trabajo orientado a identificar redes de interacción microRNA-mRNA, se identificó que miR-7 está desregulado en cáncer de mama y que las enzimas mencionadas anteriormente son sus posibles genes blancos. El objetivo de este trabajo fue identificar una relación inversa entre la expresión de miR-7 con la de la de ACADL, CSRNP3 y PDK4. Lo cual nos permitió hipotetizar una posible influencia de miR-7 en el metabolismo de cáncer de mama a través de la regulación negativa de sus blancos. Para ello, se evaluó la expresión de miR-7 y los posibles genes blanco por PCR en tiempo real en un modelo de líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados mostraron que tanto miR-7 como ACADL, CSRNP3 y PDK4 están subexpresados, por lo que se concluyó que la regulación de ACADL, CSRNP3 y PDK4 es independiente de miR-7 en cáncer de mama.

## Introducción

### Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la división alterada y descontrolada de las células que pueden formar tumores e invadir otros tejidos. A diferencia de otras enfermedades en las que hay deficiencia o nula actividad de la célula, el cáncer se caracteriza por un incremento en el crecimiento celular y diferenciación como consecuencia de pérdida de funciones (US National Cancer Institute, 2015).

La carcinogénesis es un proceso secuencial y acumulativo con cambios en genes claves para la célula denominados oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes tienen funciones de promoción del crecimiento y desarrollo celular; en cáncer suelen estar sobreexpresados, por lo que su función proliferativa se exagera (Croce, 2008). Los supresores de tumores fueron identificados por Kinzler & Vogelstein (1997) y son aquellos que tienen función de control y regulación del ciclo celular verificando que se lleve a cabo correctamente, o de reparación de daño; su expresión se encuentra disminuida o es nula en cáncer, por lo que se pierde su función.

El proceso de carcinogénesis descrito por Scott, R. & Wille, J. (2008), comienza con la exposición de un factor iniciador que en conjunto con la desregulación en oncogenes y supresores de tumores al heredarse de una célula a otra se generan clones diferentes y transformadas contribuyendo así a la heterogeneidad del cáncer. No obstante, para que la célula sea maligna, debe exponerse por un tiempo prolongado a un factor promotor, pudiendo ser el mismo u otro lo que permite expresar el fenotipo transformado. Tales factores se han clasificado en ambientales, epigenéticos y genéticos. Dentro de los primeros, los más comunes son el tabaco, alcohol, infecciones, hormonas, obesidad, dieta, exposición a radiaciones ionizantes y sustancias denominadas como carcinogénicas (US National Cancer Institute, 2015). Entre los factores epigenéticos están cambios en el posicionamiento de nucleosomas, cambios de los patrones de metilación de DNA, así como desregulación en modificaciones de las histonas. Por otra parte, los factores genéticos involucran mutaciones puntuales, pérdida de heterocigocidad, translocaciones, polimorfismos y aberraciones cromosómicas (Takeshima, H. & Ushijima, T., 2019).

Las alteraciones genéticas y epigenéticas conducen a desarrollar la enfermedad hasta causar invasión de otros tejidos, proceso denominado metástasis. Progresivamente aparecen características las cuales van a definir a las células tumorales, estas características son denominadas sellos o características distintivas del cáncer o por su nombre en inglés; *hallmarks of cancer*, y son: sostenimiento de la señal proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular, inestabilidad genómica, evasión de la respuesta inmune, reprogramación metabólica e inflamación (Hanahan, D. & Weinberg, R. A., 2011).

A nivel mundial el cáncer es la segunda causa de muerte, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). En 2018 se estimaron 9, 555, 027 muertes y se diagnosticaron 18, 078, 957 nuevos casos de cáncer a nivel mundial. En México la mortalidad e incidencia de cáncer en 2018 fue de 83, 746 y 190, 677, respectivamente (Engholm G. et. al 2016). El cáncer es 25 % más frecuente en hombres a comparación de mujeres (INEGI, 2018). La incidencia varía significativamente entre diferentes regiones del mundo, no obstante, la tasa mortalidad presenta una variación de solo 15 % entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Ferlay, J. et. al. 2019).

El cáncer se clasifica en subtipos por el tipo de célula o tejido de origen. Los cinco tipos que más afectan a la población son pulmón, hígado, colon rectal, estómago y mama (US National Cancer Institute, 2015).

### **Cáncer de mama**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente y la primera causa de muertes, en mujeres, a nivel mundial. En 2018 se estimó que, del total de pacientes diagnosticados con cáncer, 11 % correspondía a cáncer de mama con 2, 088, 849 casos nuevos en el mundo (figura 1) (Ferlay, J. et. al. 2019). En México, para 2018 se estimaron 27, 283 nuevos casos de cáncer de mama en México y 6884 muertes (Siegel, R. L. et. al. 2018).



Número estimado por casos de incidencia y mortalidad a nivel mundial, en mujeres, de todas las edades.

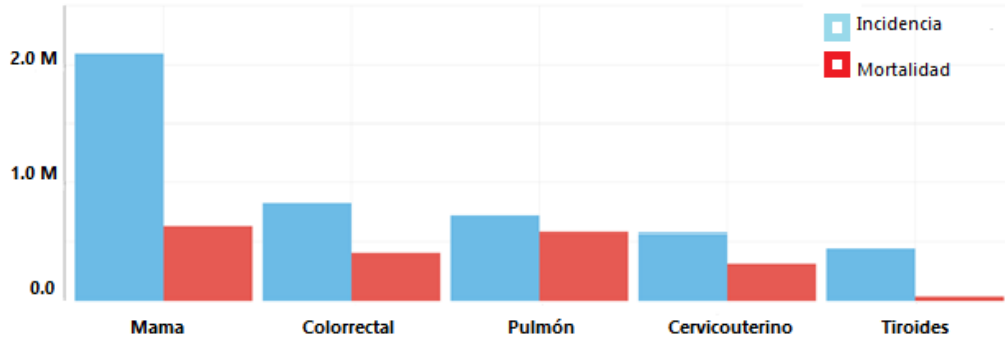


Figura 1. Incidencia y mortalidad mundial por tipo de cáncer en hombres y mujeres (Ferlay, J. et. al. 2019).

El cáncer de mama se clasifica de acuerdo con la histología de las células tomando como criterio la parte de tejido donde se originó y donde se concentra, en el epitelio o si ha avanzado al estroma, es decir si es *in situ* o invasivo. Considerando lo anterior, los tipos de cáncer de mama son: carcinoma ductal, tubular, medular, mucinoso, papilar, cribiforme y lobular. Respecto a la incidencia, a pesar de haber variaciones por edad y raza, el cáncer invasivo es el que predomina con una tasa de 350 casos por cada 100,000 personas. Mientras que el cáncer *in situ* tiene una tasa de 80 casos por cada 100,000 personas (American Cancer Society, 2017).

El cáncer de mama también se puede clasificar molecularmente acorde a la sobreexpresión de los siguientes receptores; receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2. Los tipos son Luminal A, Luminal B, HER 2 enriquecido y triple negativo (tabla 1) (Alcalá, C. S. A. et. al. 2017).

Tabla 1. Perfil de expresión de los receptores por tipo de cáncer de mama (Alcalá, C. S. A. et. al. 2017).

	ER	PR	HER 2
Receptor Tipo			

<b>Luminal A</b>	(+)	(+ / -)	(-)
<b>Luminal B</b>	(+)	(+ / -)	(-)
<b>HER 2</b>	(-)	(-)	(+)
<b>Triple negativo</b>	(-)	(-)	(-)

El tipo luminal A es el más frecuente en la población con cáncer de mama con 71 % de incidencia, seguido de triple negativo y luminal B con 12 % cada uno. El tipo HER 2 enriquecido es el de menor incidencia con 5 %. Los tipos luminal A y B tienen mejor pronóstico a diferencia del triple negativo, el cual tiene la pronóstico más baja y se caracteriza por ser más agresivo. La sobreexpresión diferencial de los receptores representa una ventaja para el desarrollo de terapias dirigidas que los utilizan como blanco. Sin embargo, el tipo triple negativo requiere de estrategias alternativas al no presentar sobreexpresión de ningún receptor (American Cancer Society, 2017).

Una de las estrategias terapéuticas exploradas recientemente es utilizar como blanco vías metabólicas de las células de cáncer por tener un fenotipo diferente a las células sanas. Por lo que los metabolitos específicos resultantes de la transformación del metaboloma son de interés como biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Batra, S. et. al. 2013).

### **Reprogramación metabólica**

El metabolismo en la célula tumoral es diferente a la de la célula normal, habiendo diferencias entre tumores del mismo subtipo o incluso entre células del mismo tumor. Las diferencias se deben a la expresión diferencial de oncogenes y supresores de tumores, los cuales pueden tener un papel directo en el metabolismo o generar alteraciones de las vías de señalización que lo regulan (Iurlaro, R. et. al. 2014). Sin embargo, el metabolismo también es activo e influye directamente en la expresión de genes, diferenciación celular y el microambiente tumoral por medio de sus productos o metabolitos dando lugar a una retroalimentación positiva (Hanahan, D. & Coussens, L. M. 2012).

La célula tumoral está rodeada de un microambiente compuesto por un grupo dinámico y heterogéneo de células con cáncer y sanas, que a la vez son de diferente origen como fibroblastos y células de sistema inmunológico. La interacción entre células del microambiente tumoral influye en el estadio de la enfermedad (Hanahan, D. & Coussens, L. M. 2012). Este microambiente se caracteriza por ser hipóxico y deficiente de nutrientes, debido al incremento de la proliferación que demanda mayor cantidad de nutrientes para la biogénesis de macromoléculas y el crecimiento celular (Frantz, C. et. al. 2010).

Como resultado de las condiciones del microambiente y con el fin de satisfacer los requerimientos energéticos la célula reconfigura sus vías a través de adaptaciones metabólicas comunes entre los diferentes tipos de cáncer: cambio en el flujo de los metabolitos, la manera en que se incorporan los nutrientes a las diferentes vías metabólicas y los efectos sobre el destino de la célula. Estas alteraciones convergen en 6 *hallmarks* de la reprogramación metabólica (figura 2) (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016).

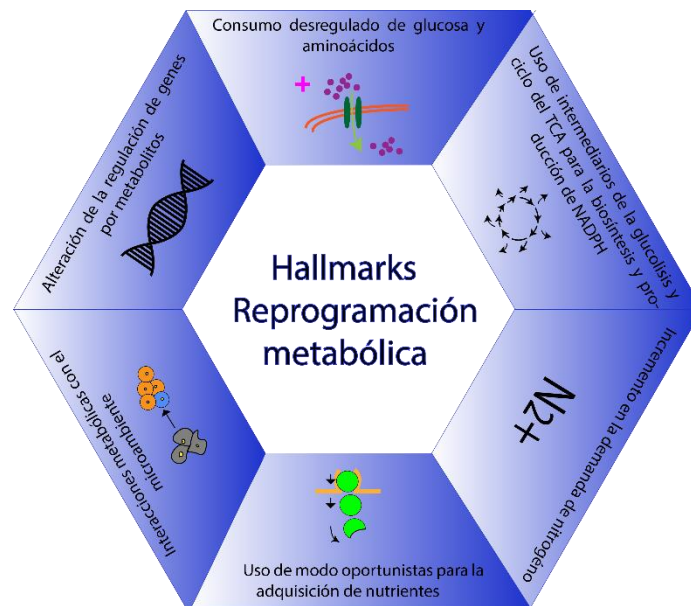


Figura 2. *Hallmarks de la reprogramación metabólica* (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016).

## Consumo desregulado de glucosa y aminoácidos

En condiciones normales, la importación de nutrientes y su aprovechamiento están altamente regulados por factores como señales de crecimiento, receptores y matriz extracelular. En cáncer el consumo de nutrientes tales como glucosa y glutamina –que son las fuentes principales de energía– está incrementado (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016). Los mecanismos por los cuales se logra obtener más nutrientes son la desregulación de vías como PI3K/AKT y la sobreexpresión de oncogenes como RAS, c-myc y E2F que promueven la expresión de los transportadores de glucosa y glutamina (Eberhardy, S. R. & Farnham, P. J. 2001; Murakami, T. et al. 1992). Además, enzimas clave de la glucólisis como la hexocinasa (HK) y fosfofructocinasa (PFK) son potenciadas para que la glucosa no sea exportada al medio y se formen los derivados de fosfato (figura 3) (Deprez, J. et al. 1997; Gottlob, K. et al. 2001).

La primera alteración metabólica que se identificó en cáncer es el metabolismo de la glucosa (Warburg, O. et al. 1956). En presencia de oxígeno y en condiciones normales, la glucosa es catabolizada a piruvato que posteriormente ingresa a la cadena respiratoria para ser oxidado y generar energía en forma de ATP. En ausencia de oxígeno, como es el caso de los músculos, el piruvato se metaboliza a través de su reducción a lactato y la oxidación de NAD (Cox, M. M. & Nelson, D. L. 2008) En cáncer, las células transforman su metabolismo y utilizan la glucólisis como principal mecanismo de obtención de energía, independiente de la presencia de oxígeno. Este fenómeno se le denomina glucólisis anaerobia o efecto Warburg (figura 3) (Warburg, O. et al. 1956).

Las células tumorales optan por metabolizar el piruvato convirtiéndolo en lactato, con un menor rendimiento energético generando solo 4 moléculas de ATP, a diferencia de la cadena respiratoria con un rendimiento aproximado de 30 moléculas de ATP (Alberts, B. et al. 2002). Esta preferencia por la glucólisis se atribuyó inicialmente a una incapacidad de la cadena respiratoria en la mitocondria, pero después se demostró que no se debe a fallas en el sistemas OXPHOS, sino a factores como hipoxia, desregulación de oncogenes y supresores de tumores, así como mutaciones en el DNA mitocondrial

(mtDNA) que en conjunto confieren a la célula tumoral ventajas metabólicas para su proliferación (Zheng, J. 2012).

El hecho de que el sistema OXPHOS es funcional en células de cáncer y que algunas células tumorales continúan obteniendo del 50 % de su energía de la cadena respiratoria resulta benéfico para las células que realizan glucólisis aerobia. Estas últimas, al excretar el lactato al medio extracelular, este es aprovechado por células que realizan fosforilación oxidativa mediante su transformación a piruvato e ingreso a la cadena respiratoria para producir más ATP. Como consecuencia se crea una relación simbiótica entre células que metabolizan la glucosa de diferente manera (Bonuccelli, G. et al. 2010).

En condiciones de hipoxia se favorece que la glucólisis aerobia sea el mecanismo prioritario de obtención de energía en cáncer, así como la inducción de la expresión de enzimas que propician y participan en la glucólisis aerobia, por ejemplo, PDK1 y LDH-A (Semenza, G. L. 2011). Adicionalmente, las células obtienen energía más rápido y las especies reactivas de oxígeno (ROS) disminuyen en comparación con la cadena respiratoria que requiere más tiempo para generar energía y produce más ROS (Nogueira, V. et al. 2008; Pfeiffer, 2001).

Las reacciones de biogénesis de moléculas como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas requieren de reducción para llevarse a cabo, por lo que la glucólisis proporciona la molécula reductiva NADPH a partir de NADP gracias a la oxidación de los sustratos de carbono y esto es posible al evitar que este se transforme en NADH para que la cadena transportadora de electrones funcione y genere ATP. La célula tumoral no se beneficia de mucho ATP ya que una alta concentración inhibe a la enzima PFK regulando negativamente la glucólisis (Sharma, B. 2011). A la vez esto asegura que la mayor parte de la energía circule a nivel de glucólisis estando siempre activa y permite desviar intermediarios de la glucólisis a otras vías como precursores de nuevas moléculas (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016)

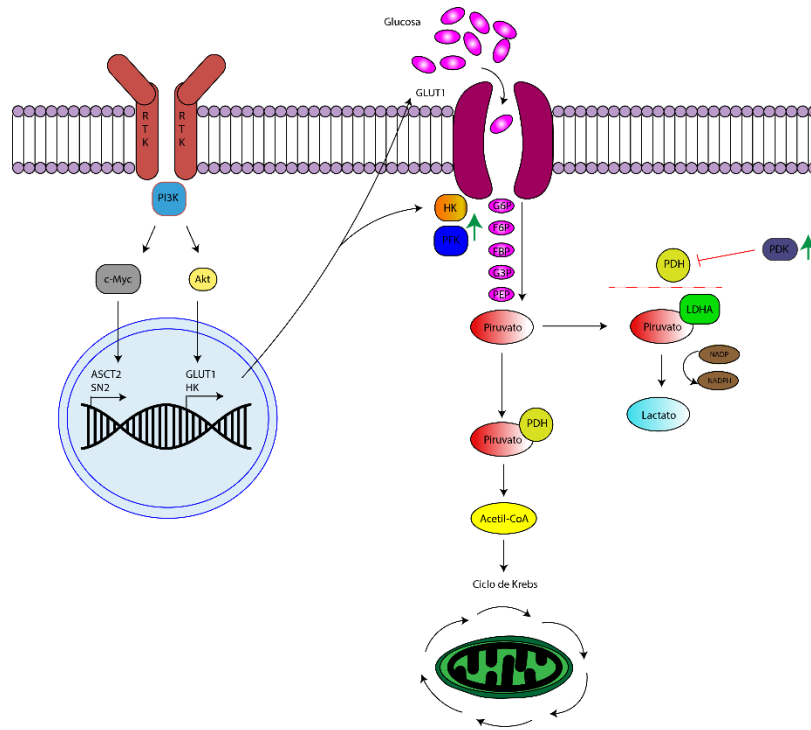


Figura 3. Consumo desregulado de glucosa (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016).

### Uso de intermediarios de la glucolisis y ciclo de TCA para la biosíntesis y producción de NADPH

En cáncer no solamente está desregulado el consumo de nutrientes, sino también la manera en como son aprovechados e incorporados a las vías metabólicas. Debido al incremento en la proliferación celular, se requiere de síntesis constante de moléculas como lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, aminoácidos, etc.; esto además implica reducción de moléculas, proporcionada por NADPH. Una estrategia para obtenerlo es mediante el aprovechamiento de intermediarios de diferentes vías metabólicas, que sirven como precursores de las moléculas que se sintetizan (figura 4) (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016).

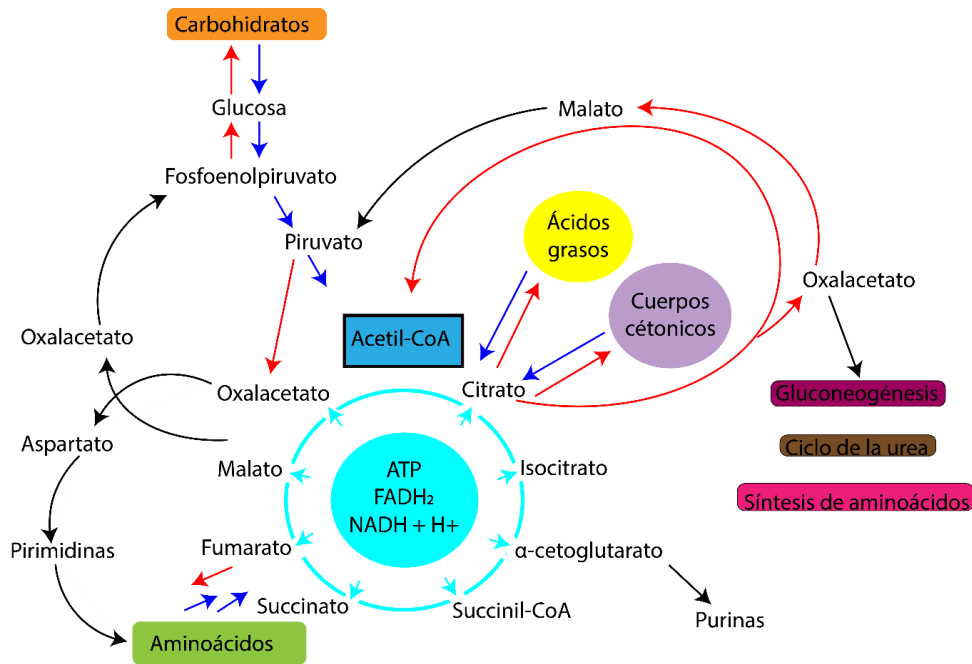
El aprovechamiento de intermediarios conlleva a que el metabolismo de la célula transformada se caracterice por ser predominantemente anaplerótico, es decir, lleva a cabo reacciones que producen intermediarios de vías. Por ejemplo, el ciclo de Krebs es una vía catabólica y anabólica a la vez ya que cada uno de sus intermediarios son

precursores de moléculas en otras vías como síntesis de aminoácidos y ácidos grasos, y el acetil Co-A es oxidado para generar energía que es almacenada en coenzimas. En el caso de acetil Co-A, tiene diferentes precursores como el piruvato originado en la glucólisis o a partir ácidos grasos degradados en la  $\beta$ -oxidación. A la vez, los ácidos grasos se pueden obtener de citrato producido en el ciclo de Krebs, el cual es exportado al citoplasma donde se descompone en acetil Co-A y oxalacetato (Bauer, D. E. et. al. 2005). El oxalacetato se puede integrar al ciclo de Krebs a través de su conversión a piruvato con el fin de mantener el estado anaplerótico, además de mantener activo el ciclo y seguir produciendo ATP suficiente para la función celular. El oxalacetato producido en el ciclo puede ingresar a otras vías como la gluconeogénesis, ciclo de la urea, síntesis de aminoácidos y ácidos grasos, las cuales están sobreactivadas en cáncer (figura 4) (Nuutinen, E. M. et. al. 1981).

Respecto a la glucólisis, los intermediarios como la glucosa 6-fosfato sirven para generar ribosa 5-fosfato, elemento esencial en la síntesis de nucleótidos por la ruta pentosa fosfato, cuyas enzimas están sobre expresadas y la vía activa en cáncer. La dihidroxiacetona fosfato (DHA), uno de los productos fosfatados de la degradación de la fructosa-1, 6-bifosfato, es convertido en glicerol-3-fosfato para ser utilizado en la síntesis de fosfolípidos, componentes de la membrana lipídica. El ácido 3-fosfoglicerato es un precursor de glicina y serina. El metabolismo de este último utiliza alrededor del 50 % de la energía proveniente del carbono de la glucosa y es de importancia ya que sus productos son sustratos para generar purinas y timidinas. Además, el metabolismo de la serina puede regular la glucólisis mediante una de sus enzimas, piruvato cinasa (PK), la cual, en el último paso de la vía, convierte el fosfoenolpiruvato en piruvato. De esta manera cuando hay saturación de serina, la variante de PK (PK2) expresada en cáncer, es activada y la glucólisis produce piruvato, creando un circuito de retroalimentación negativa (Locasale, J. W. et al. 2011; Possemato, R. et al. 2011).

Las vías que siguen los metabolitos están sujetas a regulación por supresores de tumores y oncogenes como RAS y C-myc, los cuales son responsables de enviar intermediarios del ciclo de Krebs y glucólisis, así como a otras vías como síntesis de aminoácidos y ácidos grasos. Supresores de tumores como p53 inhiben vías de

biosíntesis de moléculas y por tanto en cáncer están activas, al estar subexpresados (Jiang, P. et. al. 2011).



*Figura 4. Uso de intermediarios de la glucosa y ciclo de TCA para la biosíntesis y producción de NADPH (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016).*

### Incremento en la demanda de nitrógeno

La alta tasa de proliferación requiere que se sinteticen moléculas con nitrógeno como nucleótidos, aminoácidos no esenciales y poliamidas. La expresión de oncogenes como c-myc y mutantes de p53 conducen a la sobreexpresión de enzimas participes en la biosíntesis de nucleótidos. Respecto a la producción de aminoácidos, la glutamina sirve como fuente una vez que es desaminada (Kollareddy, M. et. al. 2015; Mannava, S. et. al. 2008).

### Uso de modos oportunistas para la adquisición de nutrientes

La células tumorales al estar desprovistas de nutrientes encienden mecanismos que les permite adquirirlos en mayor concentración como; macropinocitosis, entosis, fagocitosis o autofagia. Los nutrientes provienen de la degradación de proteínas y



lípidos que pueden ser del medio, otras células, cuerpos apoptóticos o de la degradación de organelos de la misma célula (Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016).

### **Interacciones metabólicas con el microambiente**

Los productos del metabolismo de la célula tumoral tienen influencia sobre la matriz extracelular, su composición y la interacción con otras células que la rodean como fibroblastos, endoteliales y células del sistema inmunológico. Uno de los principales productos del metabolismo de células de cáncer es el lactato, el cual se acumula en el medio extracelular lo que causa que las células T, dendríticas y monocitos sean atenuados creando un ambiente inhibitorio del sistema inmunológico (Fischer, K. et. al. 2007). El ambiente ácido estabiliza el factor HIF1- $\alpha$  y activa las vías de NF-KB y PI3K, que en conjunto promueven angiogénesis (Vegran, F. et. al. 2011).

### **Alteraciones de la regulación de genes por metabolitos**

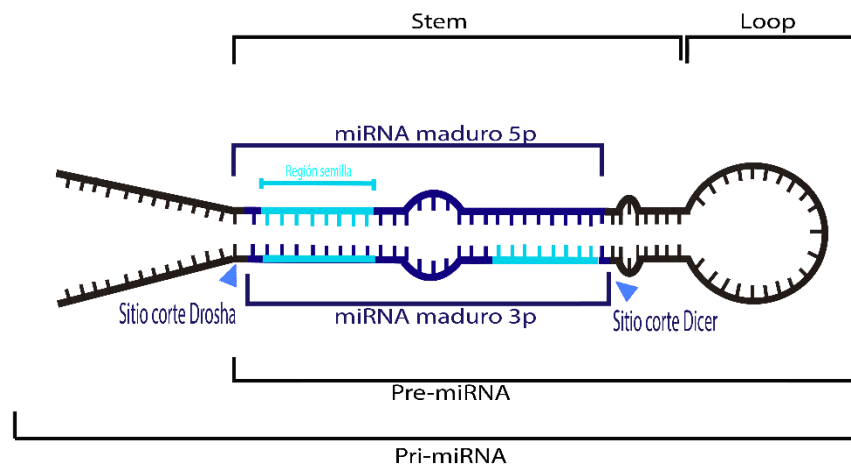
Las señales de crecimiento determinan las vías metabólicas, sin embargo, los metabolitos resultantes ejercen un papel activo en la expresión de genes mediante su interacción con proteínas reguladoras como es el caso de las acetilasas de histonas cuyo sustrato es acetil-CoA, producido en gran cantidad en células tumorales (Cai, L. et. al. 2011). Otro ejemplo son las proteínas SAM, la cuales son encargadas de depositar marcas de metilación en citosinas, adenosinas y colas de histonas, son sensibles al metabolismo de la serina que esta incrementado en cáncer (Chiang, E. P. I. et. al. 2009).

Las vías de señalización y las rutas metabólicas están reguladas por factores genéticos. Su desregulación conlleva a una reconfiguración de las vías generando un metabolismo aberrante con las características ya explicadas. Entre los factores genéticos se encuentran mutaciones en genes de enzimas claves que participan en el metabolismo o bien, orquestan su funcionamiento. Tal es el caso de enzimas como PK, PDK, HK y LDH-A u oncogenes como C-myc, cuyas mutaciones conducen a la producción de isoformas que alteran o lleva a la pérdida de su función. Además, la sobreexpresión y subexpresión de genes, así como un aumento o disminución a nivel de proteína afectan igualmente diversos procesos celulares. Una de las causas de esta desregulación es la

regulación ejercida por micro RNAs (miRNAs) sobre múltiples vías a través de la represión y modulación a nivel postranscripcional (Dumortier, O. et. al. 2013; Kim, V. N. et. al. 2009a).

## MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas endógenas de 18 a 22 nucleótidos de RNA monocatenario, no codificante para proteínas, cuya principal función es la regulación de la expresión génica mediante la represión de un mRNA blanco por silenciamiento de RNA (RNAi) (Lee, R. C. et. al. 1993). Las diferencias de los miRNAs de otros pequeños RNAs no codificantes como piRNAs o siRNAs, son: su longitud media de 22 nucleótidos, su transcripción como estructura de asa horquilla llamado pri-miRNA, su procesamiento dependiente de dos ribonucleasas, Drosha en el núcleo para generar el pre-miRNA y Dicer en el citoplasma para generar el miRNA maduro, y su asociación a la familia de proteínas Argonata para poder llevar a cabo su función y biogénesis (figura 5) (Bartel, D. P. 2004).



*Figura 5. Estructura de microRNAs (Bartel, D. P. 2004)*

Los microRNAs pueden estar codificados en regiones intergénicas o estar dentro de un gen que codifica para una proteína. Aproximadamente 50 % de los miRNAs están en proximidad uno de otro formando clústeres, los cuales son transcritos a partir de una promotor en común, llamado unidad de transcripción policistrónica (TU). Otros miRNAs

pueden encontrarse de manera individual en una región y pueden tener un promotor específico para su transcripción. Dentro de estas dos posibilidades de ubicación pueden encontrarse a su vez en regiones intrónicas o exónicas de genes que codifiquen o no para proteínas, de los cuales el 40 % de loci de miRNAs total del genoma están ubicados en regiones intrónicas de mRNA y muy pocos en regiones exónicas de mRNA, solo el 10 % (figura 6). Los miRNAs pueden ser transcritos por la polimerasa II y III. La polimerasa principal en la transcripción de microRNAs es la pol II, sin embargo, la pol III también está implicada pero específicamente en la transcripción de miRNAs asociados a la regulación del ciclo celular y crecimiento. Además, la pol III se ha visto asociada a transcripción de miRNAs entre secuencias ALU, característica de esta polimerasa (Kim, V. N. 2009b)

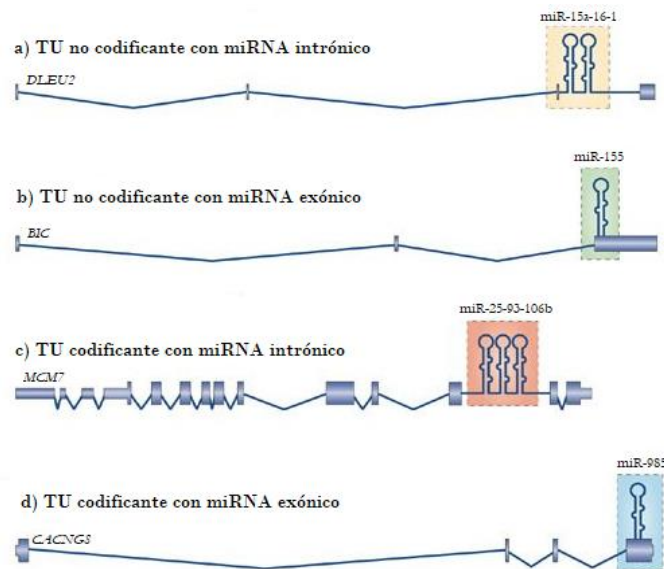


Figura 6. Localización genómica de los microRNAs (Kim, V. N. 2009).

## Biogénesis

Los microRNAs requieren de un proceso de maduración para poder desempeñar su función. Este proceso se lleva a cabo en dos regiones celulares, el núcleo y el citoplasma. El transcrito inmediato se conoce como pri-miRNA y estructuralmente es una asa horquilla (*stem loop*) que consiste en la asa de 33 pares de bases (pb) en promedio, una horquilla terminal y regiones flanqueantes de RNA de una sola cadena. Posteriormente sufre una escisión por la endonucleasa Drosha, liberando un producto

de aproximadamente entre 60 y 70 nucleótidos llamado pre-miRNA. Para que el corte se realice Drosha requiere de un cofactor llamado gen 8 de la región crítica del síndrome DiGeorge (DGCR8). DGCR8 interactúa con el primario mediante la región del asa y del RNA de una sola cadena. De esa manera asiste en colocar a Drosha 11 pb adyacentes a la región monocatenaria, donde realiza la escisión (figura 7). El complejo Drosha y DGCR8 se le conoce como microprocesador (Bartel, D. P. 2004).

El proceso en el cual se requiere del corte de Drosha para la biogénesis de un microRNA es el VÍA canónica de procesamiento de un microRNA, sin embargo, existen formas no canónicas dependiendo de su localización genómica. Por ejemplo, la biogénesis de los mirtrons, miRNAs embebidos en intrones que son independientes del procesamiento por el microprocesador y es sustituido por la maquinaria de *splicing* donde el *lariat* conforma al miRNA y a través de enzimas *debranching* adopta la estructura de pre-miRNA. Si el microRNA tiene una extensión mayor entonces el *lariat* sufre corte por endonucleasas en sus extremos 5' y 3' (Ruby, J. G. et. al. 2007). Además, existen casos particulares de microRNAs llamados simtron, como miR-1225 y miR-1228 cuya biogénesis difiere de las antes mencionadas, ya que su procesamiento es independiente de Drosha y DGCR8, así como del *splicing* (figura 7) (Havens, M. A. et. al. 2012).

Una vez generados los pre-miRNAs, independientemente de la vía de origen, continúan bajo una sola vía para completar su maduración y desarrollar su función. El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma mediante el reconocimiento de aproximadamente 14 pb del asa del microRNA por Exportina 5 (EXP5) y su cofactor RAS. Una vez translocado al citoplasma, el miRNA es liberado por hidrólisis de GTP entre el complejo de EXP5 y RAS para seguir la segunda etapa de su maduración (figura 7) (Wu, K. et. al. 2018).

El pre-miRNA tiene un extremo 5' fosforilado y un *overhang* en el extremo 3', los cuales son afines a Dicer, la endonucleasa que realiza el segundo corte del microRNA. Dicer tiene 6 dominios; N-terminal ATPasa / helicasa, DUF283, PAZ (Piwi, Argonata, Zwilli), dos dominios nucleasa RNAasa III (RNAasa IIIa y IIIb) y DSRBD. El dominio PAZ reconoce dos nucleótidos del *overhang* en el extremo 3' y se une a él en la región de doble

cadena, la región entre el dominio PAZ y los dominios nucleasa sirven para delimitar el sitio de corte. Además, el dominio helicasa es útil para llevar cabo giros necesarios para la escisión de la horquilla (*loop*). El resultado, es un dúplex monocatenario de RNA de 22 nucleótidos. El microRNA se une a un complejo efector conocido como Complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Este complejo multiproteico se conforma principalmente por proteínas de la familia Argonauta, de las cuales en humanos existen cuatro tipos y la Argonauta 2 es la más activa en la maduración de los miRNAs. Las otras proteínas que forman RISC son Dicer, TRBP y PACT (figura 7) (Kim, V. N. et. al. 2009a).

Respecto al dúplex de RNA, solamente un brazo llamada cadena guía se une a RISC y la otra, llamada cadena pasajera, se degrada. Lo que determina cual es la cadena guía y cual pasajera es su estabilidad termodinámica. La cadena que tenga menor estabilidad en su extremo 5' será la que se unirá al complejo RISC., esta cadena es detectada por la proteína R2D2. No obstante, existen casos en los cuales las dos cadenas del microRNA son funcionales y cada uno se asocia al complejo RISC (Khvorova, A. et. al. 2003). A cada cadena resultante del pre-miRNA se le conocen como miRNA 3p y 5p dependiendo de su sentido (figura 7).

Para que la cadena guía se monte al complejo RISC, primero se tiene que disociar el dúplex de RNA, el mecanismo exacto del desdoblamiento y separación del dúplex se desconoce. No obstante, esta función se atribuye a una helicasa RNA Helicasa A (RHA) debido a su capacidad para reconocer 3' *overhangs* de RNA. Este proceso es independiente de ATP. Posteriormente, el extremo menos estable se asocia a la proteína Argonauta mientras el más estable se une a la proteína TRBP (Kim, V. N. et. al. 2009b).

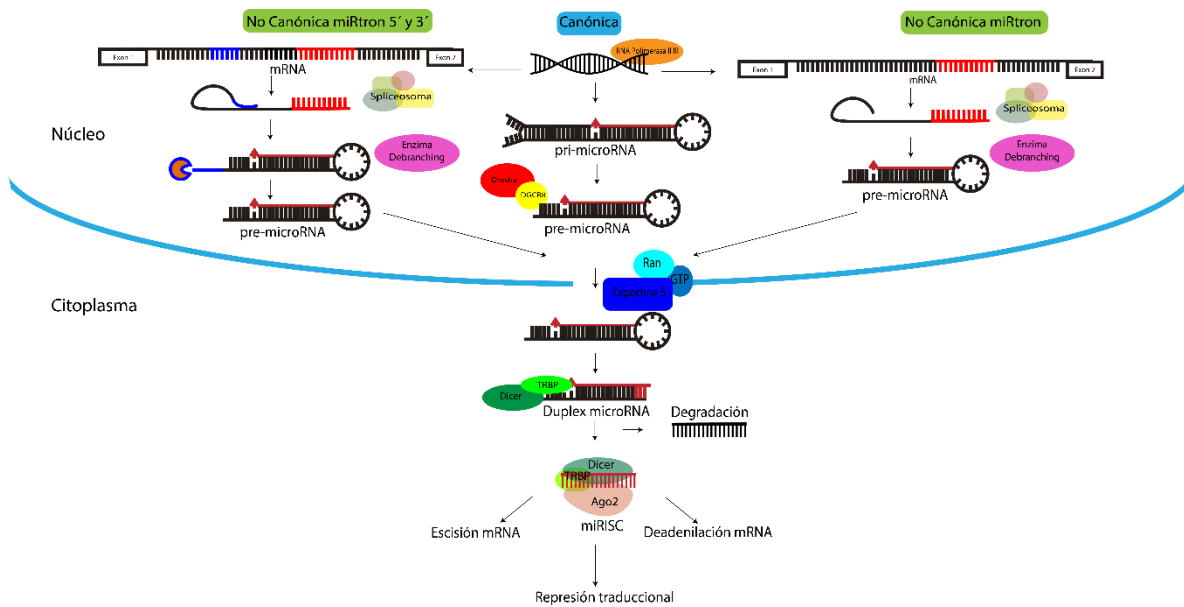


Figura 7. Biogénesis de microRNAs (Kim, V. N. et. al. 2009)

## Función

Una vez que el microRNA está ensamblado en el complejo efector RISC, se le denomina miRISC. El microRNA guía al complejo para efectuar en conjunto la regulación postranscripcional de mRNAs. Para ello, existen dos mecanismos; escisión o corte del mensajero y represión traduccional. El cual de ambos se lleve a cabo depende de la complementariedad de bases entre la secuencia del microRNA con la del mensajero, si es alta se realiza un corte, pero si es parcialmente complementaria se reprime la traducción. A la vez la represión de la traducción puede ser mediante el estancamiento de los ribosomas o una disminución en la tasa de producción el ribosoma o bien, la degradación de los polipéptidos recién sintetizados (Gu, S. & Kay, M. A. 2010).

Dentro de la secuencia complementaria se ha identificado una secuencia “núcleo” denominada región semilla, la cual es la principal región de unión entre miRISC y el mRNA para llevar a cabo su función. La región semilla se ubica en el extremo 5' del microRNA y la región 3' no traducible (3' UTR) del mRNA y comprende normalmente del nucleótido 2 a 8 en su extremo 5' de miRNA con variaciones frecuentes en su posición pudiendo ser una secuencia hexámera (1-6, 2-7, 3-8), heptámetra (2-8, 1-7)

y octaméram (1-8) siendo interacción mediante apareamiento de bases Watson y Crick (Seok, H. et. al. 2016).

La importancia de la región semilla radica en factores como la estabilidad termodinámica de la reacción y la alta complementariedad de las secuencias heptámetras con la región 3' UTR del mRNA. Dado lo anterior, si la secuencia no es complementaria en toda su secuencia puede generar bucles que interfieran con la interacción, sin embargo, esto puede ser compensado por sitios adyacentes que poseen parcial complementariedad que hacen no estrictamente necesaria la total o perfecta complementariedad de la región semilla. A estos sitios se le conocen como no canónicos. Entre los más comunes se encuentran sitios que forman bucles y tienen interacciones *wooble* entre bases (G:U), los cuales son reconocidos como parte de la región semilla. Otros sitios son interacciones *wooble* y bucles funcionales dentro de la región semilla, secuencias complementarias de hasta 12 nucleótidos en el centro del microRNA conocidas como regiones semilla centrales y regiones compensadoras en el sitio 3' del microRNA en lugar del 5'. Como consecuencia el miRISC no degrada el mensajero, sin embargo, no deja de ser funcional y lleva a cabo represión traduccional en vez de realizar el corte por la endonucleasa, siendo así como la mayoría de los microRNAs en mamíferos ejercen su función (Seok, H. et. al. 2016).

La región canónica de interacción con microRNAs, en el mensajero, es la 3' UTR, sin embargo, en el proceso de RNAi otros ncRNAs también se unen a esta región para llevar a cabo su función. La preferencia por esta región en particular se atribuye en parte, a que las secuencias de la 3' UTR están más conservadas en comparación con la de los marcos abiertos de lectura de los genes debido a su diversidad. Además, la posición del complejo RISC sobre la región 3' UTR le confiere una ventaja impidiendo la formación de polisomas y por consiguiente que no se lleve a cabo la traducción (Lai, E. C. 2002; Lytle, J. R. et. al. 2007). Al igual que existen interacciones no canónicas de los miRNAs también hay interacciones no canónicas de los mensajeros, como lo es la región 5' UTR y el marco abierto de lectura (Xu, W. et. al. 2014).

Las secuencias de interacción entre miRNAs y mRNAs como la región semilla, la 3' UTR y regiones no canónicas están sujetas a sufrir variaciones afectando el mecanismo de RNAi. Por una parte, los microRNAs pueden presentar cambios con respecto a la longitud de su secuencia y la estructura per se, denominados IsomiR (Morin, R. D. et al. 2008). Se han observado cuatro diferentes cambios que sufre la secuencia, sustitución de un nucleótido por otro, adición de nucleótidos en el extremo 3' y modificaciones en el sitio de corte por Dicer que causan cortes reduciendo su tamaño pudiendo ser tanto en el extremo 3' y 5' (*3' trimming* y *5' trimming*) (Ebhardt, H. A. et al., 2009; Wyman, S. K. et al. 2011). Las variaciones en la secuencias de los microRNAs no impiden que sean funcionales, por el contrario, tienen genes blancos diferentes con respecto a las secuencias canónicas teniendo repercusión en diferentes funciones celulares. Además, los isomiR presentan diferentes perfiles de expresión acorde al tejido, patogenicidad e incluso por población, género y raza (Loher, P. et al. 2014).

Se han identificado mutaciones en mRNAs ubicadas en las regiones de interacción con el microRNA, teniendo como consecuencia pérdida completa de sitios de unión con el microRNA obtenido ganancia de funciones. Por el contrario, mutaciones en esta región también pueden crear sitios de interacción con microRNAs desregulando el gen a la baja causando pérdida de alguna función por ausencia o disminución de la proteína, tal es el caso de una transversión en el gen GFPT1 que crea un sitio complementario con miR-206 (Dusl, M. et al. 2015).

Con relación a su función, los microRNAs tienen maneras de llevar a cabo la represión traduccional mediante maneras no canónicas como lo es la remoción de la cola de poli A de los mRNAs (Beilharz, T. H. et al. 2009). Adicionalmente se estudia su posible implicación en otras funciones asociadas a patrones de metilación y como potenciadores de traducción de genes, es decir, una función opuesta a la canónica de regulación negativa (Vasudevan, S. et al. 2007).

## **Regulación**

Los miRNAs son regulados a nivel transcripcional y post transcripcional. Transcripcionalmente, si son miRNAs intergénicos son regulados a través de sus



propios promotores y factores de transcripción, por el contrario, si son intragénicos están sujetos a ser regulados por los promotores y factores de transcripción de los genes hospederos (Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. 2016). En el caso particular de microRNAs intragénicos se ha descrito una posible coregulación, entre el microRNA y los genes hospederos donde cambios en la expresión de los mRNAs modifican la expresión del microRNA mediante circuitos de retroalimentación positiva y negativa, estímulos del sistema inmunológico e interacción entre miRNAs embebidos en genes hospederos y factores de transcripción de los mismos genes. Un ejemplo es miR-34 que tienen como blanco a la proteína HDM4, regulador negativo del supresor de tumores p53, al inhibir a HDM4, regula positivamente e indirectamente la expresión de p53 creando un circuito de retroalimentación positiva (Okada, N. et. al. 2014). Por el contrario, proteínas involucradas en la maduración de microRNAs, están sujetas a la vez a regulación por microRNAs, tal es el caso SF2/ASF, proteína que promueve la maduración de miR-7 facilitando el corte por Drosha y en cambio, miR-7 tiene como blanco a SF2/ASF disminuyendo sus niveles de expresión y por tanto los del mismo microRNA, formando así un circuito de retroalimentación negativa (Wu, H. et. al. 2010).

Posterior a su transcripción, los miRNAs están sujetos a regulación en cada paso del proceso de maduración por cada una de las proteínas participantes, por lo que el cambio en su expresión, así como mutaciones pueden afectar la producción de microRNAs. Otros factores de regulación que influyen es la regulación de los microRNAs la estabilidad y modificación de su secuencia (Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. 2016).

Entre los factores post transcripcionales de regulación se encuentran otros RNAs denominados ceRNAs los cuales son RNAs endógenos como mRNAs, RNAs largos no codificantes, RNAs circulares y pseudogenes, que compiten entre sí por sitios de interacción en común de microRNAs llamados MREs (elementos de respuesta microRNAs). De esta manera la modificación en la expresión de RNAs que actúan como ceRNAs altera la disponibilidad de un *pool* de microRNAs, modificando a la vez la regulación ejercida por los miRNAs, como sucede en enfermedades como el cáncer (Su, X. et. al. 2013).

## MicroRNAs en cáncer

Los primeros microRNAs asociados a cáncer fueron miR-15 y miR-16 en leucemia linfocítica crónica, donde observaron una relación inversa entre la expresión de los microRNAs y de la proteína de la célula de linfoma B (Bcl2), proteína reguladora del proceso de apoptosis. Los microRNAs se encontraban subexpresados mientras que Bcl2 estaba sobreexpresada y la subexpresión de los microRNAs se atribuye a su localización genómica en el cromosoma 13q14 frecuentemente deletada en cáncer (Calin, G. A. et. al. 2002). A partir de esto se realizaron han realizados numerosos estudios en identificar microRNAs desregulados en diferentes tipos de cáncer, los mRNAs que tienen como blanco, así como los procesos celulares que a través de estos regulan.

El estudio individual de la interacción de un microRNA con su blanco de regulación ha permitido identificar un patrón en la expresión de microRNAs en cáncer. Por una parte, microRNAs subexpresados que tienen como blancos oncogenes, a este grupo de miRNAs se les denominó microRNAs supresores de tumores, tal es el caso de C-myc, un oncogén regulado por miR-34a (Yamamura, S. et. al. 2012). Por el contrario, microRNAs cuyos mRNAs blanco son genes supresores de tumores se les denominó oncomirs. Un ejemplo de oncomir es miR-214 que al estar sobreexpresado en cáncer regula negativamente la expresión del gen supresor de tumores p53 y por consiguiente promueve la proliferación celular (Xu, C. et. al. 2012). En conjunto, la sobreexpresión y subexpresión de oncomirs y miRNAs supresores de tumores respectivamente contribuyen al desarrollo de la célula tumoral y la progresión de la enfermedad (Zhang, B. et. al. 2007).

Se ha identificado la expresión diferencial de oncomirs y miRNAs supresores de tumores en distintos tipos de cáncer. También se ha evaluado su participación en los procesos celulares característicos de cada uno de los *hallmarks* del cáncer. Un ejemplo en metástasis es la proteína E-cadherina involucrada en el proceso de adhesión celular, la cual está subexpresada en cáncer y consta de varios sitios de unión con miR-9, un oncomir (Ma, L. et. al. 2010). En angiogénesis, VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) es una de las proteínas claves en el proceso al promover la formación de

vasos sanguíneos y al activar otros oncogenes como HIF1- $\alpha$ . Se ha descrito que VEGF tiene sitios de unión para miR-125, sin embargo, este último está subexpresado (Bi, Q. et. al. 2012). Se han identificado también microRNAs que participan en la evasión del sistema inmunológico mediante miRNAs extracelulares embebidos en exosomas que afectan el reconocimiento de células T, NK, TAMs y MDSCs y modifican el microambiente tumoral. Un ejemplo de esto es la proteína MICA/MICB, que sirve de reconocimiento de las células NK para su degradación, que está desregulada por los siguientes oncomiRs; miR-10b, miR-17-5p, miR-20a, miR-25, miR-93, miR-106b, y miR-433 (Eichmüller, S. B. et. al. 2017).

En cuanto al metabolismo, se han observado múltiples microRNAs desregulados que facilitan la reprogramación de las vías de señalización que conlleva a desarrollar metabolismo aberrante característico de la célula tumoral. La repercusión de la desregulación de miRNAs en el metabolismo puede ser en pasos y enzimas clave de las vías metabólicas. Un ejemplo es en el paso irreversible de la glucólisis donde miR-143 modula la glucólisis vía su interacción con la proteína HK2 (Peschiaroli, A. et. al. 2013). Otro ejemplo es miR-210, el cual disminuye la actividad del ciclo de Krebs mediante la inhibición de las proteínas ISCU1/2 (Chan, S. Y. et. al. 2009).

### **MicroRNAs en cáncer de mama**

El cáncer de mama, a pesar de haberse identificado perfiles de expresión diferencial de receptores que permitieron clasificarlo molecularmente, continúa siendo un tipo de cáncer heterogéneo entre células de un mismo tumor y entre el tumor y el microambiente tumoral debido a una pobre diferenciación en la expresión de proteínas y sus mensajeros, como es el caso del cáncer de mama triple negativo (Fan, C. et. al. 2006). Por lo que una alternativa es identificar posibles redes de interacción que participen en la desregulación de diferentes procesos celulares en cáncer de mama y utilizarlos como blancos terapéuticos.

A través de análisis bioinformáticos y funcionales se han identificado microRNAs sobreexpresados o subexpresados en determinados tipos de cáncer como colón y glioblastoma (Babae, N. et. al. 2014; Coronel, H. et. al. 2019). En el caso del desarrollo

de cáncer de mama, ya sea como oncomirs o microRNAs supresores de tumores, se asoció a hsa-miR-503, hsa-miR-1307, hsa-miR-212 y hsa-miR-592 como microRNAs claves en la prognosis y supervivencia de pacientes con cáncer de mama (Yerukala Sathipati, Y. S. & Ho, S. Y. 2018). De igual manera, se han identificado miRNAs desregulados en cáncer de mama triple negativo, como es el caso de miR-200c-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-192-5p y miR-146a, involucrados en procesos como la activación de la vía de WNT y metástasis (Chen, J. et. al. 2017)

### **Perfiles de expresión de microRNAs**

Los microRNAs están sujetos a múltiples puntos de control y regulación y la alteración de estos procesos conlleva a desarrollar enfermedades como cáncer, debido a que un solo microRNA tiene varios mRNA blancos involucrados en diferentes procesos celulares. A la vez, un mRNA tiene múltiples sitios de interacción con varios microRNAs. Considerando que actualmente la base de datos miRBase contiene 1917 secuencias de miRNAs humanos registrados (Kozomara, A. et. al. 2019), se estima que un tercio de RNAs codificante para proteínas está regulado negativamente por microRNAs se obtienen como resultado múltiples combinaciones posibles de interacción, constituyendo un importante grupo de ncRNAs que pueden regular casi cualquier función celular a través de RNAi.

Se ha visto diferente expresión de microRNAs en las diferentes etapas del desarrollo de un organismos, órganos, tejidos y tipos celulares. De igual manera existen diferentes patrones en el nivel de expresión de miRNAs, habiendo miles de copias más de alguno respecto a otros, así como miles menos. Por lo tanto, diferentes perfiles de expresión son indicadores de una función en particular de un microRNA en diferentes contextos celulares, para ello es necesario conocer el tipo celular y de tejido en cual se expresa cada microRNA, factores de transcripción y ubicación genómica respecto a otros microRNAs. Un ejemplo de esto son estudios como el de (Liang, Y. et. al. 2007) donde llevaron a cabo la caracterización de 345 microRNAs en 40 diferentes tipos de tejido humano sanos con el fin de obtener el perfil de expresión y distribución de los miRNAs acorde a su localización cromosómica. También determinaron que microRNAs ausentes

o sub expresados en ciertos tejidos, como el cerebro, fueron necesarios durante el desarrollo embrionario de ese mismo tejido.

En un estudio en el que se analizó la expresión de 175 microRNAs mediante un microarreglo en 20 tejidos, se observó que microRNAs que se localizan a 50 kb entre sí suelen coexpresarse (Baskerville, S. & Bartel, D. P. 2005). Dichos microRNAs codificados en clúster pueden tener una función particular, es decir, regular mRNA que participen en un proceso celular específico, o en su defecto que contribuyan a la desregulación de mRNA en una patología. Un ejemplo de ello es el clúster miR-17~92, el cual se caracterizó como oncogénico debido a que favorece la reprogramación metabólica de un tumor y su pérdida conlleva a la disminución de la actividad metabólica de la célula tumoral afectando la glucólisis y el metabolismo mitocondrial (Izreig, S. et. al. 2016).

La obtención de secuencias de microRNAs y la identificación de sus perfiles de expresión representan información de primera mano que ha sido útil para generar repositorios de datos. Por ejemplo; miRBase es el primer repositorio de información sobre la secuencia y estructura de más de 18, 000 pre-miRNAs y sus respectivos microRNAs maduros pertenecientes a 168 especies de animales, plantas, algas y virus (Kozomara, A. et. al. 2019). Por otra parte, bases de datos como *Gene Expression Omnibus* (GEO) y *ArrayExpress* almacenan datos de secuenciación y microarreglos que permiten analizar perfiles de expresión bajo diferentes condiciones experimentales (Schmitz, U. & Wolkenhauer, O. 2013).

La finalidad de generar estos repositorios es posibilitar la minería de datos para así obtener más información acerca del contexto genómico, función y conservación de microRNAs. Para ello, se utilizan herramientas bioinformáticas que toman como base de datos la información almacenada en los repertorios y posteriormente la integran y analizan con algoritmos basados en características como la complementariedad entre la secuencia del microRNA y la de su posible blanco de regulación, la energía que requiere la hibridación del dúplex mRNA/microRNA y la conservación evolutiva de los sitios de unión del microRNA. Dichos análisis bioinformáticos generan como productos

la predicción de los genes blanco de microRNAs, los procesos celulares en los que participan, la identificación de redes de interacción y los posibles microRNAs desregulados en enfermedades. Algunas de las herramientas que permiten realizar estos análisis son TargetScan, miRanda, miRTarBase y miR2Disease (Schmitz, U. & Wolkenhauer, O. 2013).

En un estudio de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (Koboldt, D. C. et. al. 2012), se llevó a cabo la evaluación de tumores de 825 pacientes con cáncer de mama en diferentes estadios y diferente subtipo molecular. Estas fueron analizadas mediante cinco plataformas con el objetivo particular de identificar patrones de metilación, detección de polimorfismos, análisis mediante secuenciación del exosoma y análisis de la expresión de mRNAs y microRNAs. De este análisis, nuestro grupo de investigación tomo los datos de la secuenciación de microRNAs para llevar a cabo un análisis bioinformático con el fin de identificar posibles microRNAs y sus posibles mRNAs blancos desregulados en cáncer de mama.

El análisis mostró diferentes microRNAs desregulados en cáncer de mama y sus posibles genes blancos de regulación (figura 8). Dentro de ellos destacan miR-7, el cual está subexpresado en cáncer de mama, y tres posibles mRNAs blanco sobreexpresados, codificantes para las proteínas ACADL, CSRNP3 y PDK4 (Datos no publicados, figura 9).

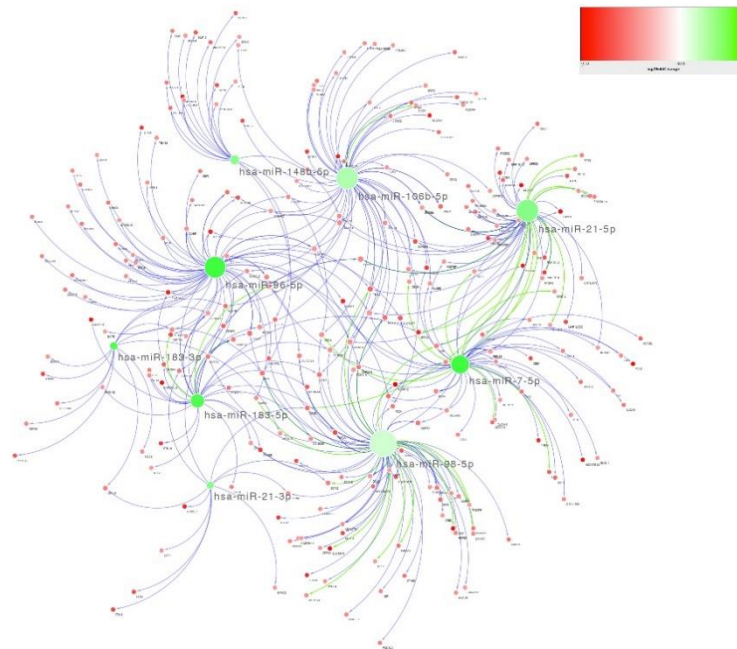
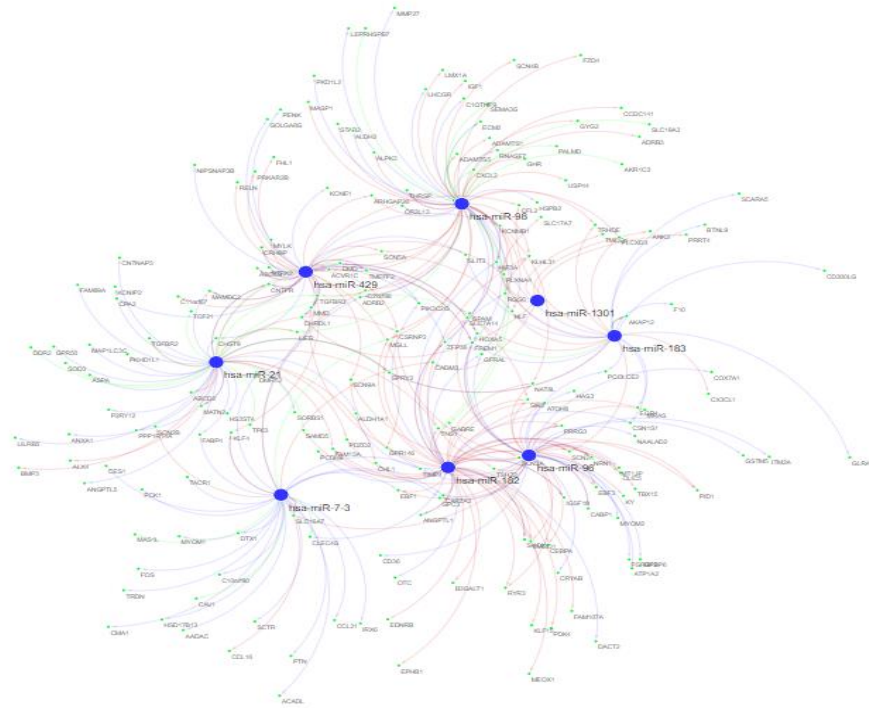


Figura 8. Mapas de redes de interacción de microRNAs con sus posibles genes blancos. A) Interacciones de *hsa-miR-7-3*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-96*, *hsa-miR-98*, *hsa-miR-182*, *hsa-miR-183*, *hsa-miR-429* y *hsa-miR-1301*. B) Interacciones de *hsa-miR-7-5p*, *hsa-miR-21*

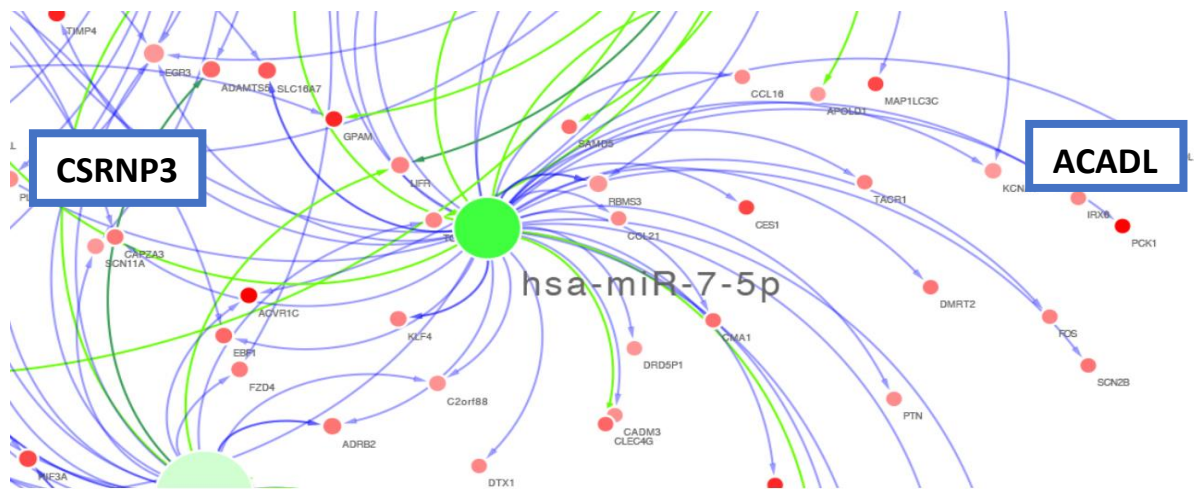
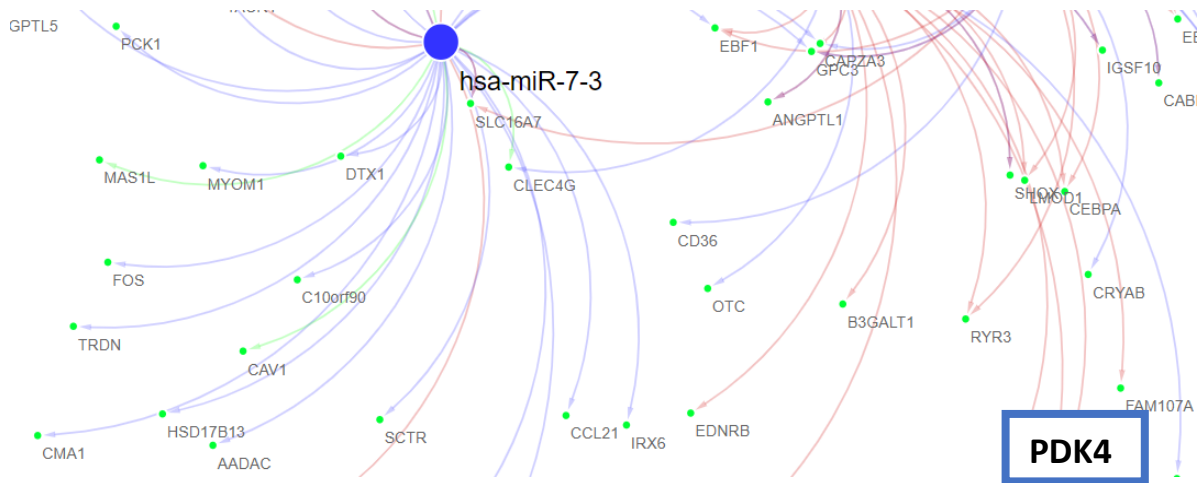


Figura 9. Redes de interacción de hsa-miR-7-3p y hsa-miR-7-5p con sus posibles genes blanco.

## MiR-7

MiR-7 fue identificado por primera vez por (Lagos-Quintana, et. al. 2001) . Se encuentra codificado en tres diferentes loci; 9q21, 15q26 y 19q13, de los cuales cada uno codifica para la misma secuencia madura de 23 nucleótidos; miR-7-1, miR7-2 y miR-7-3 respectivamente (Kalinowski, F. C. et. al. 2014).

Respecto a su regulación, factores de transcripción como HOX10 están implicados directamente en la expresión de miR-7 (Reddy, S. D. N. et. al. 2008). En el caso particular de miR-7-1, este se encuentra dentro de la secuencia intrónica del gen



HNRNPk, por consiguiente, está sujeto a la regulación de los factores de transcripción de este gen. También se ha visto regulación tejido-específica para este miRNA. Por ejemplo, en páncreas, miR-7 es regulado por el factor de transcripción como NeuroD/Beta2 (Kredo-Russo, S. et. al. 2012).

Su expresión esta enriquecida en condiciones normales en tejidos como los del sistema nervioso (Choudhury, N. R. et. al. 2013). Por otra parte, miR-7 está involucrado en el desarrollo de enfermedades como cáncer, ya sea actuando como oncomir o microRNA supresor de tumores, a través de la regulación de múltiples genes blancos involucrados en procesos como proliferación, angiogénesis y migración. Algunos de estos genes blancos son VEGF, PAK1, EGFR, E-cadherina, MAPK, KLF4, entre otros (Zhao, J. et. al. 2015).

#### **ACADL, CSRNP3 y PDK4**

Los tres posibles genes blancos de miR-7 identificados en nuestro análisis tienen en común que tienen una función en una vía metabólica o su expresión está asociada al metabolismo.

ACADL es una oxidorreductasa que participa en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, específicamente en el primer paso en el cual cataliza la formación de un doble enlace entre el carbono  $\alpha$  y el carbono  $\beta$  a partir de FAD (Chegary, M. et. al. 2009). La expresión de ACADL se encuentra modificada en algunos tipos de cáncer, como es el caso de carcinoma de células escamosas de esófago esta sobreexpresado (Yu, D. et. al. 2018). De igual manera, la expresión de ACADL está asociada a desarrollo del fenotipo tumoral en cáncer colorrectal (Xie, B.-X. et. al., 2011).

CSRNP3 es un gen cuya proteína se ha descrito como posible factor de transcripción y, polimorfismos en su locus son candidatos determinantes para el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico (Yamada, Y. et. al. 2017).

PDK4 forma parte de la familia de proteínas cinasas PDK/BCKDK, localizadas en la matriz mitocondrial. Su función consiste en la inhibición del complejo piruvato

deshidrogenasa mediante la fosforilación en una de sus subunidades, de manera que al llevar a cabo su función reduce la formación de acetil Co-A y el piruvato, producto de la glucólisis, y es transformado a lactato en la vía de la glucólisis anaerobia (Rowles, J. et. al. 1996).

La regulación de PDK4 está mediada por glucocorticoides, ácido retinoico e insulina (Kwon, H. S. et al., 2006; Kwon, H. S. et. al. 2004). Modificaciones en la expresión de PDK4 están asociadas al desarrollo de enfermedades como diabetes y cáncer (Wynn, R. M. et. al., 2008).

PDK4 se encuentra sobreexpresado en cáncer de colorrectal, mama, pulmón, ovario y vejiga actuando como oncogén (Guda, M. R. et. al. 2018; Leclerc, D. et. al. 2017; Li, G. et. al. 2017; Wang, Q. et. al. 2018; Woolbright, B. L. et. al. 2018). Los mecanismos de PDK4 mediante los cuales contribuye a la tumorigénesis son: su interacción con vías de señalización como CREB-RHEB-mTOC1 (Liu, Z. et. al. 2014). Por otra parte, RNAs que actúan como ceRNAs también afectan la expresión de PDK4, como es el caso del lncRNA PCAT19 el cual al estar sobreexpresado en cáncer inhibe a miR-182 por lo que este ya no puede inhibir a su blanco, PDK4 y, por consiguiente, se promueve la degradación de glucosa a lactato favoreciendo a la célula tumoral (Xu,S.et. al. 2019).

Tomando en cuenta los resultados del análisis bioinformático que predice que ACADL, CSRNP3 y PDK4 son blancos de miR-7, la función molecular de ACADL, CSRNP3 y PDK4 en el metabolismo y los antecedentes de miR-7 desregulado en cáncer, es de nuestro interés conocer la posible influencia de miR-7 como un regulador del metabolismo de cáncer de mama a través de sus genes blancos.

## **Hipótesis**

MiR-7 tendrá influencia en el metabolismo de cáncer de mama a través de la posible regulación de tres genes: ACADL, CSRNP3 y PDK4.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar la posible interacción de miR-7 con de sus potenciales genes blanco, ACADL, CSRNP3 y PDK4 en un modelo de líneas celulares de cáncer de mama.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar la expresión de miR-7-3 p y miR-7-5p en líneas celulares de cáncer de mama.
- Evaluar la expresión de ACADL, CSRNP3 y PDK4 en líneas celulares de cáncer de mama.
- Obtener la correlación entre la expresión de miR-7 y sus posibles genes blanco.

## **Materiales y métodos**

### **Análisis bioinformático**

#### **Análisis de complementariedad *in silico* de miR-7-3p y miR-7-5p con sus posibles genes blanco.**

Se obtuvieron las secuencias de miR-7-3p y miR-7-5p maduras de miRBase y se determinó la complementariedad de bases en miRtarBase con los genes blancos; ACADL, CSRNP3 y PDK4. El resultado fue que ACADL y CSRNP3 son complementarios con miR-7-5p mientras que PDK4 es complementarios con miR-7-3p.

#### **Predicción de la expresión de miR-7 y sus posibles genes blanco en cáncer de mama**

A partir de un estudio de secuenciación del TCGA se tomaron los datos de expresión de microRNAs y mRNAs de 1096 y 1103, respectivamente, de pacientes con cáncer de mama. Como control se tomaron datos de personas sanas, 104 para microRNAs y 113 para mRNAs. Se normalizaron los datos de expresión de miR-7, ACADL, CSRNP3 y PDK4 en cáncer con los datos de personas sanas y se comparó la expresión con el objetivo de encontrar una expresión diferencial en cáncer y una correlación negativa entre la expresión de miR-7 y sus posible genes blanco.

### **Cultivo celular**

Para conocer la expresión de miR-7 y sus posibles genes blancos se seleccionaron las siguientes líneas celulares cáncer de mama:

MCF 10A: Células epiteliales de mama humana, proveniente de tejido con enfermedad fibroquística, no tumorigénicas (American Type Culture Collection; ATCC, número CRL-10317).

BT20: Células epiteliales de mama humana aisladas de tejido de carcinoma, triple negativo (American Type Culture Collection; ATCC, número HTB-19).

MDA-MB-231: Células epiteliales aisladas de tejido de adenocarcinoma, triple negativo (American Type Culture Collection; ATCC, número CRM-HTB-26).

MDA-MB-468: Células de adenocarcinoma derivadas de sitio metastásico, triple negativo (American Type Culture Collection; ATCC, número HTB-132).

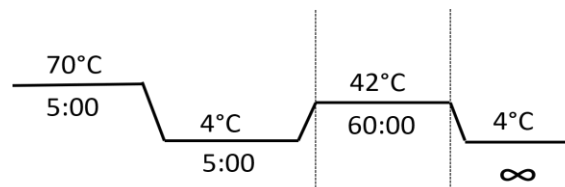
Las células se cultivaron en medio DMEM/F-12 (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco). Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad.

### Extracción de RNA de líneas celulares y cuantificación

La extracción de RNA a partir de las cuatro líneas celulares se realizó conforme al protocolo establecido por los fabricantes del reactivo TRIzol (Invitrogen) basado en el método ácido de tiocinato de guanidina-fenol-cloroformo. La concentración de RNA se cuantificó en Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) usando 2 µl de muestra. La integridad se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

### Síntesis de cDNA

La reacción de retro transcriptasa se realizó con el kit del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MLV RT, Promega) acorde a las instrucciones del fabricante. Cada reacción se elaboró a partir de 2 µg de RNA. Las condiciones de reacción fueron: Buffer 5x, Random Primers 10 mM, dNTPs 10 mM y 1 U enzima. Las condiciones de la RT-PCR fueron las siguientes:



*Figura 10. Condiciones de RT-PCR.*

### Cuantificación de los mRNA por PCR en punto final y tiempo real

Se evaluaron los niveles de expresión de mRNA por PCR. Para ello, primero se estandarizaron las condiciones por punto final. El kit utilizado fue Go Taq de Promega. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: Buffer 5x, Primer Forward y

Reverse 10 Mm, dNTPs 10 mM, MgCl 2 mM y 1.25 U enzima en las condiciones de PCR detalladas en la Tabla 2. Como control de carga, se amplificó el gen constitutivo  $\beta$  actina. Las secuencias de primers, la temperatura *melting* ( $T_m$ ) y el tamaño del amplicón se muestran en la Tabla 3.

*Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de mRNA.*

Gen	Condiciones PCR
$\beta$ actina	
ACADL	
CSRNP3	
PDK4	

*Tabla 3. Secuencias de primers,  $T_m$  y tamaño del amplicón de los mRNA.*

Gen	Secuencias de primers	$T_M$ (°C)	Tamaño (pb)
$\beta$ Actina	FW: CTCACCCTGAAGTACCCCATC RV: GATAGCACAGCCTGGATAGCAA	55	230
ACADL	FW: TGGGGATACATGTGGGAGTA	54	210

	RV: TCCTCGCTTTCCAAGTTACA		
CSRNP3	FW: CAGGAAAATACTGGAGTTCCTGAGA RV: TGAGAATGGAGGAAGGGGTAA	57	218
PDK4	FW: GCTGATGAACCAGCACATTCT RV: CTG TTG CCC GCA TTG CAT TC	56	278

Una vez estandarizadas las condiciones de PCR por punto final se cuantifico por tiempo real los mensajeros de los genes blancos. Se utilizo  $\beta$  actina como gen constitutivo para normalizar los datos. El kit utilizado fue TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) de Takara. Las condiciones de reacción se establecieron conforme al fabricante. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para los genes blancos (tabla 3) y se adiono una fase de curva *melting* de 65° a 90 °C para identificar que las unidades de fluorescencia emitidas corresponden a la síntesis del transcrito de interés.

### **Stem loop RT-PCR**

La cuantificación de miR-7 se llevó a cabo en dos pasos: una pulsed RT, la cual consiste en una retrotranscripción con un gradiente de temperatura que permite mayor eficiencia en la hibridación de las secuencias y, PCR en tiempo real acorde al método de Varkonyi-Gasic, E. et. al. (2007). Para llevar a cabo la Pulsed RT se utiliza un primer reverso específico para el microRNA que se va a amplificar. Su especificidad se debe a que el primer tiene 6 nucleótidos complementarios con el extremo 3' y el resto es una secuencia de 44 nucleótidos que forma una estructura de asa horquilla que protege al microRNA de unión a otras moléculas. Posteriormente se amplifica el microRNA de interés por PCR a partir del producto de la pulsed RT, con un primer forward que tiene 6 nucleótidos complementarios con los primeros 6 del extremo 5' del microRNA, y un primer reverso universal que tiene complementariedad con la secuencia del asa horquilla (figura 11).



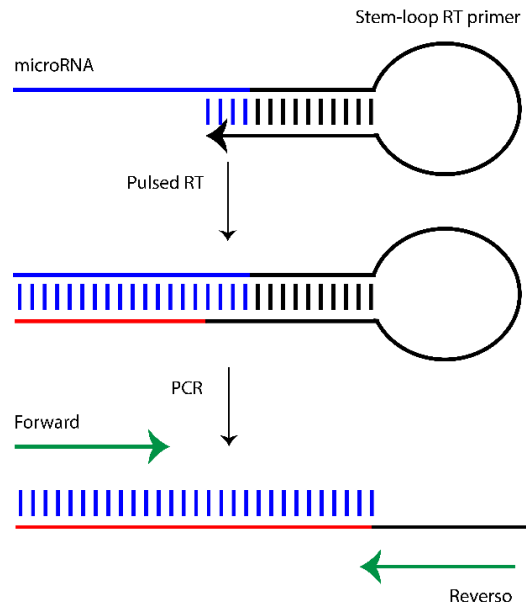


Figura 11. Esquema de la pulsed RT y Stem loop qPCR para cuantificación de miRNAs.

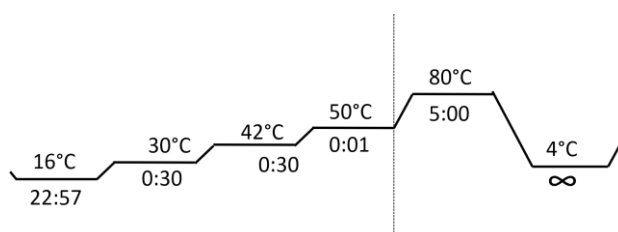
Con base en la metodología descrita anteriormente, se diseñaron los primers para cuantificar U6 miR-7 y miR-211-5p (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de primers para la cuantificación por Stem loop RT-PCR de U6, miR-7-3p, miR-7-5p y miR-211-5p.

Primer	Secuencia
Universal Reverso	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC
RNU6	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATATGG FW: GTGCTCGCTTCGGCAGCACAT
miR-7-3p	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTATGGC FW: GCGGCGGCAACAAATCACAGTCT
miR-7-5p	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACA FW: GCGGCGGTGGAAGACTAGTGATTT

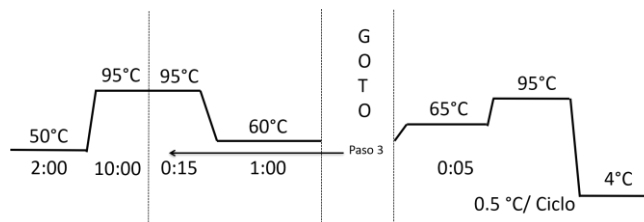
<b>miR-211-5p</b>	<b>RT:</b> GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGGCGA <b>FW:</b> GCGGCGGTTCCCTTTGTCATCCT
-------------------	--

Para la pulsed RT se utilizó el kit del Virus de la Leucemia Murina Moloney (M-MLV RT) (Promega) acorde a las instrucciones del fabricante. Cada reacción se elaboró a partir de 2 µg de RNA. Las condiciones de la reacción fueron: Buffer 5x, Primer RT miRNA [10 mM], dNTPs [10 mM] y 1 U enzima. Las condiciones de la RT-PCR fueron las representadas en la figura 12.



*Figura 12. Condiciones de pulsed RT*

Respecto a la stem loop PCR en tiempo real se utilizó TB Green *Premix Ex Taq II* (TII RNaseH Plus) de Takara. Las condiciones de reacción se establecieron conforme al fabricante. Se utilizó como gen constitutivo a RNU6. Las condiciones para cuantificar miRNAs utilizando SYBR Green fueron las siguientes:



*Figura 13. Condiciones de Stem loop PCR para cuantificación de microRNAs.*

### **Análisis estadísticos**

Los datos de la expresión de PDK4, miR-7-5p, miR-7-3p y miR-211-5p fueron analizados mediante ANOVA y prueba de Tukey en el programa GraphPad Prism 7.

## Resultados

### Expresión *in silico* de miR-7

Mediante análisis bioinformático se normalizaron los datos obtenidos del TCGA de la expresión de miR-7 y sus posibles genes blancos en un grupo de pacientes con cáncer de mama y, como control, un grupo de pacientes sanos. En la figura 14 se muestra que hay una sobreexpresión de miR-7 en los pacientes con cáncer de mama (TP) (n=1096) en comparación con el grupo control (n=104).

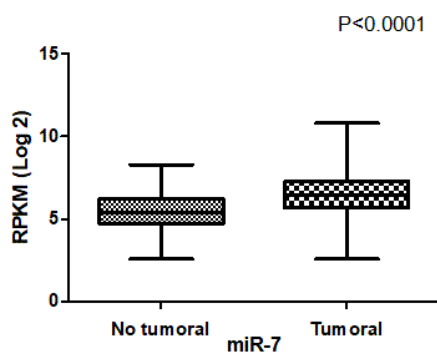


Figura 14. Expresión *in silico* de miR-7 en pacientes con cáncer de mama y sanos.

### Expresión *in silico* de los posibles genes blancos: ACADL, PDK4 y CSRNP3.

Respecto a la expresión de los posibles genes blanco de miR-7; ACADL, CSRNP3 y PDK4, el análisis mostró que se encuentran subexpresados (n=1102) en cáncer de mama en comparación con el grupo control (n=113) (figura 15). La expresión de ACADL, CSRNP3 y PDK4 relaciona inversamente en cáncer de mama donde los mRNAs de los genes están subexpresados y miR-7 sobreexpresado.

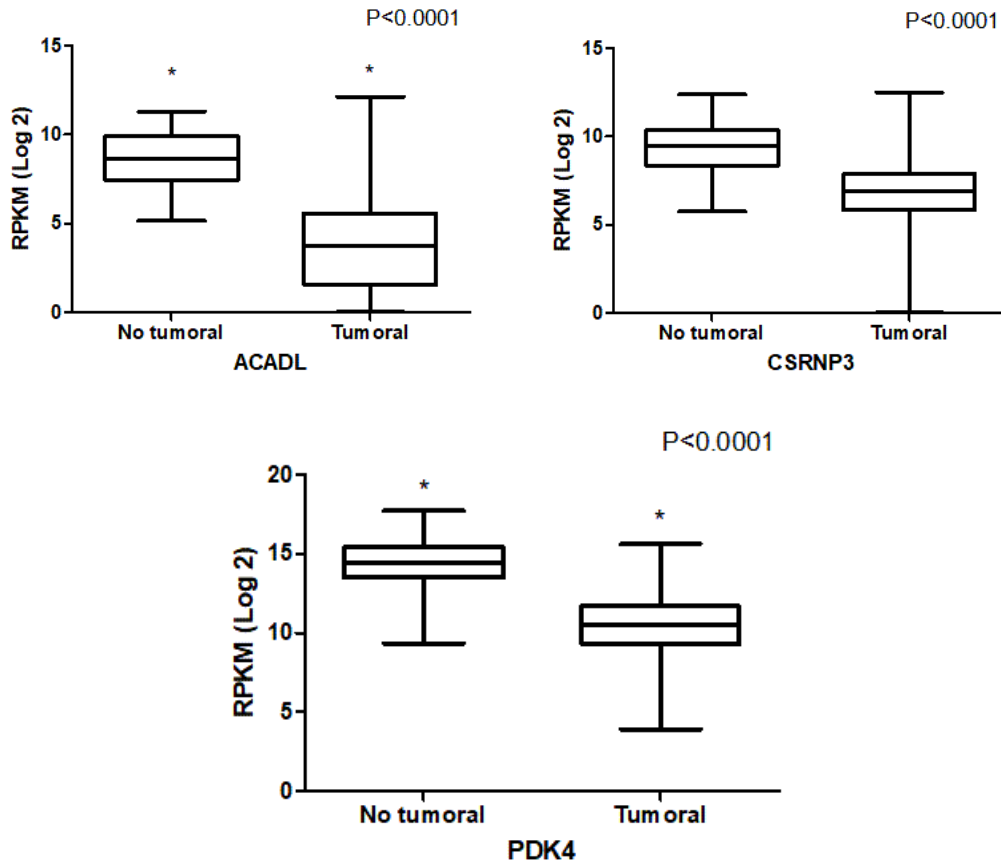


Figura 15. Expresión *in silico* de los posibles genes blancos de miR-7; en pacientes con cáncer de mama y sanos. A) Expresión ACADL B) Expresión de CSRNP3 C) Expresión de PDK4

### Expresión *in vitro* de miR-7-3p y 5p

Con el objetivo de evaluar la expresión de miR-7-3p y miR-7-5p, se llevó a cabo Stem loop RT-PCR en tiempo real. La evaluación de la expresión fue en cuatro líneas celulares para miR-7-3p (MCF10A, BT20, MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y en tres para miR-7-5p (MCF10A, BT20 y MDA-MB-231). La línea celular no tumoral MCF10A se utilizó como control negativo. La línea celular que presentó mayor expresión fue BT20 para ambos microRNAs. Respecto a la expresión de miR-7-3p, la línea celular MDA-MB-231 fue la que presentó menor expresión y la línea celular MDA-MB-468 presentó mayor expresión con respecto a la no tumoral (figura 16). Por otra parte, la expresión de miR-7-5p fue mayor en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con el control,

contrario a miR-7-3p. Sin embargo, la expresión no fue significativamente diferente, entre todas las líneas celulares ni en las líneas celulares tumorales con respecto a la no tumoral. El resultado no significativo se puede atribuir a la desviación estándar alta y a una tendencia a el mismo resultado en todas las repeticiones.

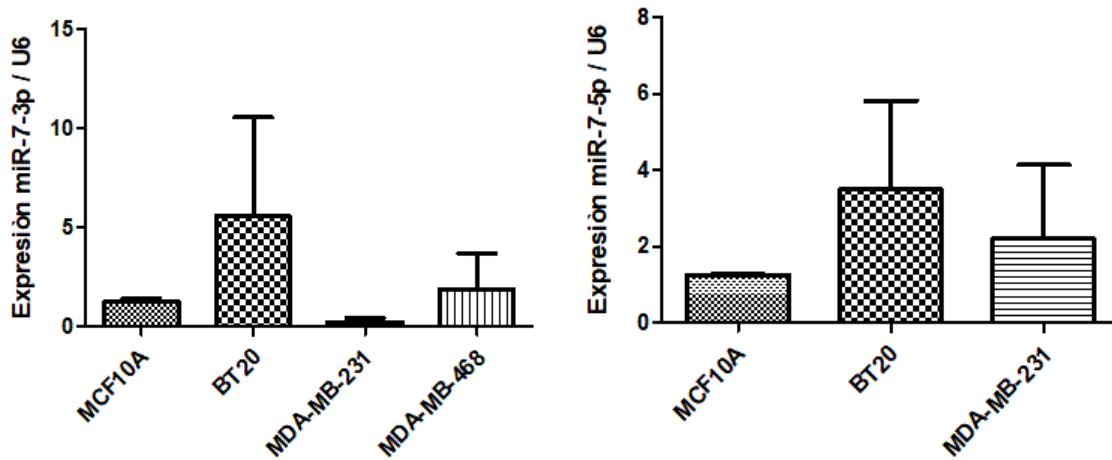


Figura 16. Expresión de miR-7 en la línea celular no tumoral; MCF10A, y triple negativo; BT20, MDA MB-231 y MDA-MB-468. A) Expresión de miR-7-3p B) Expresión de miR-7-5p.

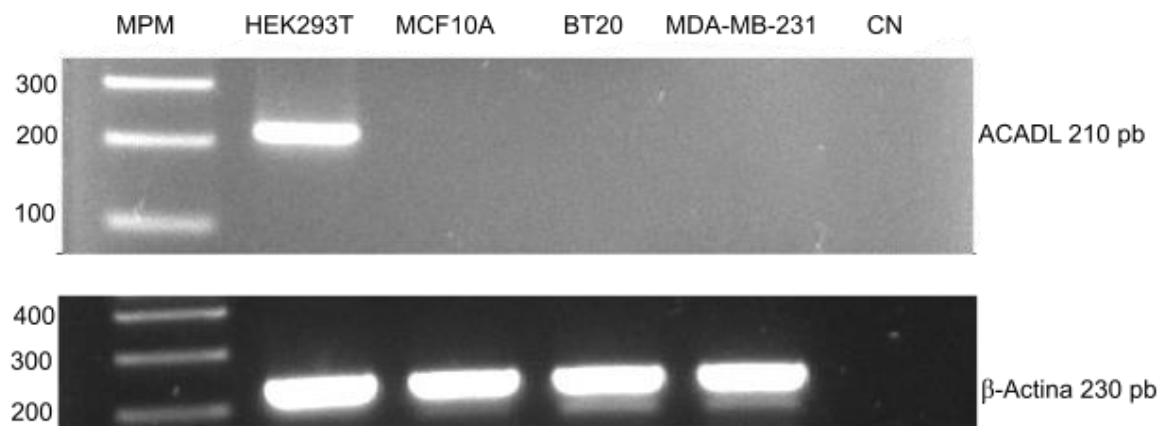
### Expresión *in vitro* de los posibles genes blancos: ACADL, PDK4 y CSRNP3.

Para evaluar la expresión de los posibles genes blancos de mir-7, se planteó como primer paso estandarizar las condiciones de amplificación mediante PCRpf y posteriormente determinar su expresión por medio de qPCR.

#### ACADL

Se diseñaron los primers para amplificar un fragmento de 210 pb del mRNA, sin embargo, no hubo amplificación del transcrito esperado ni de ningún otro tamaño tanto en la célula no tumoral como en las tumorales, por lo que se optó por amplificar el mismo fragmento de ACADL a partir de cDNA obtenido de una línea celular diferente a cáncer de mama. A partir de la línea celular HEK293 de riñón embrionario se amplificó el fragmento de ACADL esperado, por lo que se infiere que no hay expresión de ACADL

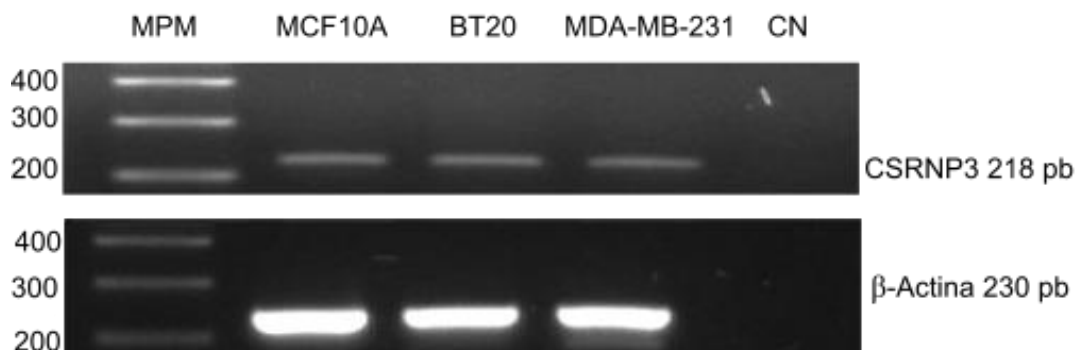
en cáncer de mama, o que está por debajo del umbral de detección experimental; por tanto, no se procedió a evaluar su expresión (figura 17).



*Figura 17. Amplificación del fragmento de mRNA de ACADL en líneas celulares.*

### CSRNP3

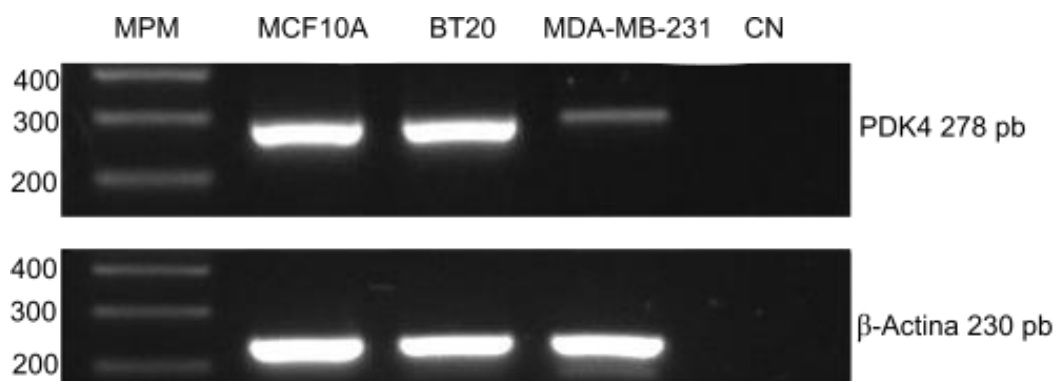
Se amplificó la banda correspondiente al fragmento del mensajero de 218 pb en todas las líneas celulares. Sin embargo, no se observó expresión diferencial en la PCR en punto final entre la línea celular no tumoral y tumorales por lo que al no estar desregulado en cáncer se descartó su análisis por qPCR (figura 18).



*Figura 18. Amplificación del fragmento de mRNA de CSRNP3.*

## PDK4

Finalmente, se realizó la amplificación del fragmento de mRNA de PDK4 con un tamaño de 278 pb. En todas las líneas celulares se observa la banda correspondiente de PDK4. Es notable una menor expresión de PDK4 en la línea celular MDA-MB-261 (figura 19).



*Figura 19. Amplificación del fragmento de mRNA de PDK4.*

Una vez amplificado PDK4 se cuantificó su expresión. La expresión de PDK4 fue mayor en la línea celular de BT20 con respecto a las demás incluyendo la no tumoral. Las líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-261 presentaron menor expresión en comparación con la línea celular MCF10A (figura 19). Los resultados no fueron estadísticamente significativos.

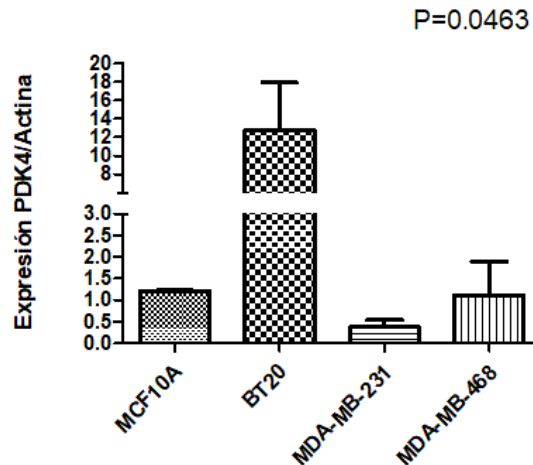
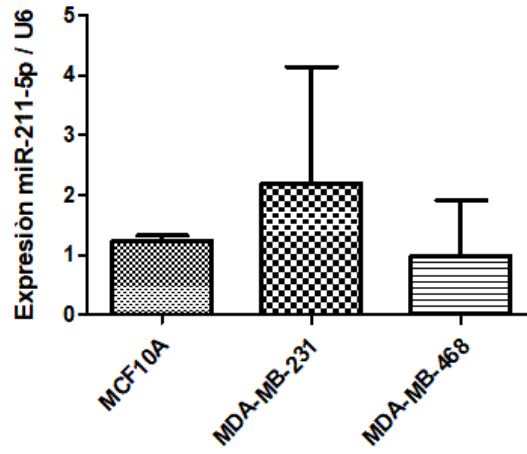


Figura 20. Amplificación del fragmento de mRNA de PDK4.

El análisis *in silico* mostro que PDK4 puede estar sujeto a regulación negativa por miR-7-3p por lo que a partir de su expresión se buscó determinar una relación inversa. Sin embargo, la expresión de PDK4 y miR-7 muestran el mismo patrón en su expresión: sobreexpresión en la línea BT20 y subexpresión en las líneas MDA-MB-231 y 468 (figura 16A y 20).

Para descartar error experimental respecto a la regulación de PDK4 por miR-7 en cáncer de mama se evaluó la expresión de un microRNA que previamente haya sido validado como regulador negativo de PDK4 en cáncer de mama. Se midió por qPCR la expresión de miR-211-5p, el cual está subexpresado en cáncer de mama y cuya interacción con PDK4 se ha validado su interacción en melanoma y cáncer de mama (Guda, M. R. et. al. 2018; Mazar, J. et. al. 2016). La expresión de miR-211-5p en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468 presento mayor y menor expresión respectivamente respecto a MCF10A. Se encontró una relación inversa entre la expresión de PDK4 y miR-211, subexpresado en MDA-MB-231 y sobreexpresado en MDA-MB-231 en comparación con el control no tumoral, MCF10A (figuras 20 y 21).





*Figura 21. Expresión de miR-211-5p en las líneas celulares MCF10, MDA-MB-231 y MDA-MB-468.*

## Discusión

A partir de los resultados del análisis bioinformático orientado a identificar microRNAs desregulados en cáncer de mama y sus genes blancos, se propuso evaluar la expresión de miR-7 y tres posibles genes blanco; ACADL, CSRNP3 y PDK4. Esto con el objetivo de identificar una relación inversa en su expresión que sugiriera una posible interacción. Esto con el fin de proponer a miR-7 como un potencial regulador del metabolismo de cáncer de mama. El análisis *in silico* mostró dicha correlación, en la que miR-7 está sobreexpresado en cáncer respecto al grupo control (figura 14). Los posibles genes blanco ACADL, CSRNP3 y PDK4 se observaron subexpresados en cáncer en comparación con los datos de tejidos sanos (figura 15). Sin embargo, al evaluar su expresión de manera experimental usando diferentes líneas celulares, no se encontró una relación inversa entre la expresión de miR-7 y sus genes blancos.

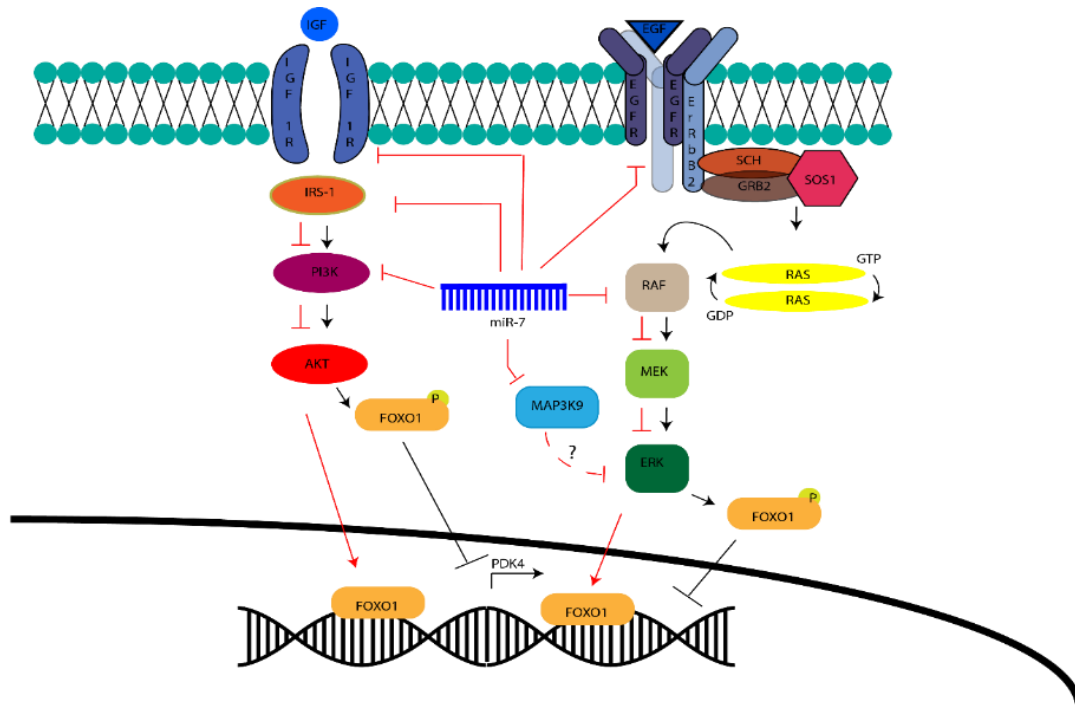
En el caso particular de ACADL, no se detectó su expresión en las líneas celulares de cáncer de mama ni en la no tumoral. Motivo por el que se descartó que este resultado fuera consecuencia de las condiciones experimentales ya que, bajo estas mismas, la línea celular HEK293 de riñón si presentó expresión de ACADL. Estos resultados concuerdan con datos del *human protein atlas*, en el cual reportan baja expresión de mRNA y proteína de ACADL tanto en tejido sano y cáncer de mama. Específicamente en adipocitos no se ha detectado ACADL y en células glandulares y epiteliales se detecta muy baja expresión (Uhlén, M. et. al. 2015). Además, se detectó una firma de expresión compuesta por 19 genes cuyas proteínas son componentes claves en la vía de la  $\beta$ -oxidación. La firma es característica porque estos genes, entre ellos ACADL, están subexpresados en cáncer y, por consiguiente, la actividad de la vía está disminuida (Aiderus, A. et. al. 2018). La baja expresión de ACADL se puede deber a que ACADL se encuentra hiper metilado en tejido basal y sus niveles de metilación aumentan aún más en cáncer, lo que en consecuencia genera el silenciamiento del gen (Li, Z. et. al., 2015).

Respecto a la expresión de PDK4, no se observó una correlación inversa con la expresión de miR-7-3p, sin embargo, los resultados mostraron una correlación positiva

tanto de PDK4 como miR-7-3p en cada una de las cuatro líneas celulares (figura 16 y 20). Esta relación positiva sugiere la posibilidad de una regulación indirecta, la cual se puede explicar mediante la vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT. Ambas vías comienzan con la activación de receptores en común como lo es EGFR, que conlleva a una cascada de cinasas que terminan en la activación o represión de factores de transcripción relacionados con múltiples procesos celulares, entre ellos el metabolismo. Uno de estos factores de transcripción es FOXO1 para PDK4, el cual es regulado negativamente por las dos vías.

En la vía ERK/MAPK, dicha regulación es dependiente de ERK y el heterodímero EGFR/ErRbB2 (Grassian, A. R. et. al. 2011). La vía PI3K/AKT regula a FOXO1 mediante su represión por AKT (Hay, N. 2011). Se han identificado y validado experimentalmente varios blancos de miR-7 en las dos vías. En la vía de MAPK/ERK, regula a RAF-1 y EGFR (Kefas, B. et. al., 2008; Liu, Z. et. al. 2014). De esta manera, una alta expresión de miR-7 podría disminuir la actividad de la vía mediante la regulación de esos dos blancos, y, en consecuencia, no se lleva a cabo la represión de FOXO1 por lo que PDK4 es transcrito. Por el contrario, si los niveles de miR-7 disminuyen, entonces sus blancos no se alteran y, por consiguiente, disminuye la transcripción de PDK4. Adicionalmente, miR7 tiene como blanco a MAP3K9, la cual participa en la vía MAPK/ERK, por lo que representa otro posible punto de regulación de PDK4 por miR-7 (Xia, J. et. al. 2018).

En la vía PI3K/AKT, miR-7 también tiene varios blancos, como IGF 1R, IRS-1 y PI3K por lo que un aumento en la expresión de miR-7 ocasiona una disminución en la actividad de la vía y en la transcripción de PDK4, al no ser retenido FOXO1 por AKT (Cao, Y. L. et. al. 2018; L. Jiang, L. et. al. 2010; Liu, Z. et. al. 2014). Y la disminución de miR-7 provocaría la disminución de PDK4. Lo anterior, sugiere una posible regulación indirecta de PDK4 por miR-7, a pesar de que éste último no tenga como blanco directo a PDK4 (Figura 22).



*Figura 22. Regulación indirecta de miR-7 sobre PDK4 a través de su interacción con múltiples blancos de las vías de señalización ERK/MAPK y PI3K/AKT.*

Se han identificado otras regulaciones indirectas similares a la posible regulación indirecta de miR-7 sobre PDK4. Tal es el caso de STAT3 en cáncer de mama. MiR-7 tiene como blanco a SETDB1, el cual a su vez induce la expresión de STAT3 (Zhang, H. et. al. 2014). De esta manera al aumentar la expresión de miR-7, disminuye la expresión de STAT3, regulando invasión celular y metástasis.

La regulación indirecta de un microRNA puede afectar, incluso al mismo microRNA, formando circuitos de retroalimentación positiva o negativa, como es el caso de EGFR y miR-7. EGFR, promueve la activación de la vía de PI3K que conlleva a la activación del factor de transcripción, c-myc, el cual promueve la expresión de miR-7, el cual a su vez tiene como blanco de regulación a EGFR (Chou, Y. T. et. al. 2010).

Debido a que la interacción de un microRNA con su mRNA puede afectar no solamente la expresión del mRNA blanco sino toda una vía de señalización, es necesario realizar análisis integrativos que consideren las vías de señalización en las que participan los posibles blancos como un factor primordial y que así se identifiquen correlaciones entre

la expresión de un microRNA, la de los genes blanco de la vía y la de proteínas que se encuentren después del blanco en una cadena de señalización. Un ejemplo de este tipo de análisis es el realizado por (Elhefnawi, M. et. al. 2013), el cual a través del uso de varias herramientas bioinformáticas identifican un “interactoma” que consiste en 26 microRNAs como oncomirs y miRNAs supresores de tumores en hepatocarcinoma cuya desregulación altera vías de señalización como WNT, MAPK, TGβ y ciclo celular.

CSRNP3 no mostró cambios en su expresión en líneas celulares tumorales respecto al control, sin embargo, se ha identificado CSRNP3 es un factor de transcripción, pero no se conoce su papel biológico o los genes que regula. Una alternativa es que dado que polimorfismos en su secuencia son un factor de susceptibilidad de desarrollo de síndrome metabólico y dado que miR-7 también está asociado a enfermedades metabólicas mediante la regulación negativa de la producción de células β a través de mTOR, la regulación de CSRNP3 por miR-7 podría llevarse a cabo en otros tejidos y estar desregulada en enfermedades metabólicas (Latreille, M. et. al. 2014; Yamada, Y. et al., 2017).

Por otra parte, si miR-7 no está regulando a ACADL, CSRNP3 y PDK4 en cáncer de mama, otros microRNAs lo pueden llevar a cabo, de esta manera se podría explicar porque se encontró una baja expresión de los tres mRNAs. Se han identificado y validado funcionalmente distintos microRNAs para cada uno, por ejemplo, para ACADL; miR-124-3p y miR-204-5p, CSRNP3; miR-190a-3p y miR-5011-5p y PDK4 es regulado por miR-9-5p, miR-122-5p y miR-211-5p (Chou, C. H. et al., 2018; Guda et. al., 2018).

Otra posibilidad de explicar los resultados obtenidos es que si bien, las herramientas bioinformáticas ayudan a identificar y predecir la desregulación de microRNAs en estado patológico y su interacción con genes blanco, estos tienen un grado de error, en parte debido a que más del 90% de genes tiene sitios conservados para microRNAs la posibilidad estadística de detectar falsos positivos es alta (Pinzón, N. et. al. 2017a). Por otra parte, debido a que las herramientas bioinformáticas para análisis de microRNAs difieren en los factores que determinan la regulación de un mRNA por un microRNA como sitio y tipo de interacción, algunas herramientas, al considerar solo la

región 3' UTR como *TargetScan*, son más restrictivos y, por ende, detectan más falsos negativos al contrario de herramientas más permisivas como miRanda, que incluyen el análisis de la región 5' UTR y ORF, detectan más falsos positivos (Riffo-Campos, A. L. et. al. 2016).

Debido al grado de error existente en los análisis bioinformáticos, lo ideal es utilizar más de una de estas herramientas que integren diferentes factores en sus algoritmos ya que no se conocen en su totalidad los mecanismos de interacción y degradación de todos los mRNAs por regulación de microRNAs ni el contexto celular de cada interacción. Por ejemplo, la existencia de una interacción microRNA-mRNA no garantiza la regulación del mRNA blanco en un determinado proceso biológico, ya que la regulación puede ser específica de un tejido al no expresarse un determinado gen o un mecanismo diferente a microRNAs que regule la expresión del microRNA o su gen blanco (Zhu, W. Y. et. al. 2011).

Otro factor dependiente del contexto celular es que la regulación de genes por microRNAs es dependiente de la concentración de microRNAs y mRNAs blanco. Se ha observado que la expresión basal de un microRNA puede ser o no suficiente para regular un gen. Por ejemplo, let-7 tiene como genes blanco a Dicer y C-myc, sin embargo, una concentración baja de let-7 disminuye significativamente la expresión de Dicer, pero se requiere de una concentración mayor del microRNA para regular significativamente la expresión de C-myc (Shu, J. et. al. 2012). De esta manera la concentración de moléculas disponibles resulta ser un factor selectivo en su regulación por microRNAs, en donde si el número de mRNAs excede el de los microRNAs, la represión será a un menor número de moléculas del blanco y, por el contrario, si son pocas las moléculas del mRNA blanco la expresión basal del microRNA puede atenuar su expresión (Pinzón, N. et. al. 2017a).

El efecto de la concentración de mRNAs en la regulación por microRNAs también afecta la competencia por ceRNAs. Los microRNAs y sus respectivos blancos con mayor tasa en su expresión son más susceptibles a regulación por ceRNAs y, aquellos con menor expresión son más susceptibles a ser secuestrados por ceRNAs. (Bosson, A. D. et. al.

2014). Particularmente, se ha identificado en cáncer a ciRS-7 (CDR1as) como ceRNA de miR-7 (Hansen, T. B. et. al. 2013). De esta manera se puede explicar por qué no hubo correlación en los resultados obtenidos: la expresión de CSSRNP3 y PDK4 puede ser mayor de la que la expresión de miR-7 puede regular y, a la vez, la baja expresión puede hacer a miR-7 susceptible de regulación por ceRNAs. Esto no excluye la posibilidad de que el miRNA tenga interacción con el mRNA, sino que la cantidad no es suficiente para abatir la expresión del blanco.

Debido a los factores anteriores que no contemplan los análisis bioinformáticos y estimaciones que indican una probabilidad del 50% de generar falsos positivos y negativos en sitios altamente conservados, continúa siendo necesaria la validación funcional de predicciones de los fenómenos biológicos. Sin embargo, solamente el 25 % de las predicciones en la desregulación e interacción de microRNAs llegan a ser validadas funcionalmente y los datos de falsos negativos y positivos no suelen publicarse (Pinzón, N. et. al. 2017b). Esto genera un sesgo estadístico en la información, el cual favorece resultados positivos y estadísticamente significativos sobre resultados negativos que conduce al incremento en la diferencia entre lo que se espera o concluye de un fenómeno y los valores aproximados a lo que realmente es. Este fenómeno es conocido como *publication bias*. Existen métodos denominados metaanálisis para contemplarlo en sus estadísticos con el objetivo de obtener conclusiones más certeras (Song, F. et. al. 2013). Un ejemplo de su aplicación son las redes de interacción de microRNAs, donde existen casos contradictorios en la literatura sobre el papel de un determinado y con el empleo metaanálisis reducen el efecto de *publication bias*. Por lo tanto, a pesar de que estudios de predicciones de interacciones de microRNAs poseen un margen de error, hay que considerar que no se conoce la influencia del *publication bias* sobre estos, lo que favorecería los resultados positivos, de ahí la importancia de publicar este tipo de resultados.

A pesar de no haberse detectado una regulación de miR-7 sobre ACADL, CSRNP3 y PDK4 es necesario continuar su estudio de manera independiente, así como otros microRNAs y las redes de interacciones que conforman con sus blancos y otros ncRNAs que puedan ser determinantes para el metabolismo y su desregulación en cáncer.

Además, Se requiere que al determinar una de las posibles redes de interacción se valide funcionalmente con estrategias experimentales más estrictas como ensayos de luciferasa, western blot e inmunoprecipitaciones.



## Conclusiones

- La expresión de miR-7 no presentó una relación inversa con la expresión de ACADL, CSRNP3 y PDK4 en líneas celulares de cáncer de mama.
- ACADL, CSRNP3 y PDK4 son independientes de la regulación miR-7.

## Perspectivas

- Estudiar a CSRNP3 como posible factor de transcripción y que genes regula.
- Evaluar la posible regulación indirecta de PDK4 por miR-7 en la vía PI3K/AKT y ERK/Merk
- Evaluar la expresión de otros posibles genes blancos de miR-7 a partir del análisis bioinformático.

## Bibliografía

- Aiderus, A., Black, M. A. & Dunbier, A. K. (2018). Fatty acid oxidation is associated with proliferation and prognosis in breast and other cancers. *BMC Cancer*, *18* (1), 805.
- Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Alcalá, C. S. A., de Anda, J., G., E.E., J. & Hernández, L. E. (2017). Network Modularity in Breast Cancer Molecular Subtypes. *Frontiers in Physiology*, *8*, 915.
- Babae, N., Bourajjaj, M., Liu, Y., Van Beijnum, J. R., Cerisoli, F., Scaria, P. V. & Schiffelers, R. M. (2014). Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma. *Oncotarget*, *5* (16), 6687–6700.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116* (2), 281–297.
- Baskerville, S. & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA (New York, N.Y.)*, *11* (3), 241–247.
- Batra, S., Adekola, K. U. A., Rosen, S. T. & Shanmugam, M. (2013). Cancer metabolism as a therapeutic target. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, *27* (5), 460–467.
- Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C. & Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, *24* (41), 6314–6322.
- Beilharz, T. H., Humphreys, D. T., Clancy, J. L., Thermann, R., Martin, D. I. K., Hentze, M. W. & Preiss, T. (2009). microRNA-Mediated Messenger RNA Deadenylation Contributes to Translational Repression in Mammalian Cells. *PLoS ONE*, *4* (8), e6783.
- Bi, Q., Tang, S., Xia, L., Du, R., Fan, R., Gao, L. & Fan, D. (2012). Ectopic Expression of

MiR-125a Inhibits the Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Targeting MMP11 and VEGF. *PLoS ONE*, 7(6), e40169.

Bonuccelli, G., Tsirigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R. G., Chiavarina, B. & Lisanti, M. P. (2010). Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis. *Cell Cycle*, 9(17), 3506–3514.

Bosson, A. D., Zamudio, J. R. & Sharp, P. A. (2014). Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Molecular Cell*, 56(3), 347–359.

Cai, L., Sutter, B. M., Li, B. & Tu, B. P. (2011). Acetyl-CoA Induces Cell Growth and Proliferation by Promoting the Acetylation of Histones at Growth Genes. *Molecular Cell*, 42(4), 426–437.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E. & Croce, C. M. (2002). Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524–15529.

Cao, Y. L., Liu, D. J. & Zhang, H. G. (2018). MiR-7 regulates the PI3K/AKT/VEGF pathway of retinal capillary endothelial cell and retinal pericytes in diabetic rat model through IRS-1 and inhibits cell proliferation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(14), 4427–4430.

Chan, S. Y., Zhang, Y. Y., Hemann, C., Mahoney, C. E., Zweier, J. L. & Loscalzo, J. (2009). MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. *Cell Metabolism*, 10(4), 273–284.

Chegary, M., Brinke, H. te, Ruiten, J. P. N., Wijburg, F. A., Stoll, M. S. K., Minkler, P. E. & Houten, S. M. (2009). Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(8), 806–815.

Chen, J., Chen, Z., Huang, J., Chen, F., Ye, W., Ding, G., & Wang, X. (2017).

- Bioinformatics identification of dysregulated microRNAs in triple negative breast cancer based on microRNA expression profiling. *Oncology Letters*, 15 (3), 3017–3023.
- Chiang, E. P. I., Wang, Y. C., Chen, W. W. & Tang, F. Y. (2009). Effects of Insulin and Glucose on Cellular Metabolic Fluxes in Homocysteine Transsulfuration, Remethylation, *S*-Adenosylmethionine Synthesis, and Global Deoxyribonucleic Acid Methylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94 (3), 1017–1025.
- Chou, C. H., Shrestha, S., Yang, C.-D., Chang, N. W., Lin, Y. L., Liao, K. W. & Huang, H. D. (2018). miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 46 (D1), D296–D302.
- Chou, Y. T., Lin, H. H., Lien, Y. C., Wang, Y. H., Hong, C. F., Kao, Y. R. & Wu, C. W. (2010). EGFR Promotes Lung Tumorigenesis by Activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc Pathway That Targets the Ets2 Transcriptional Repressor ERF. *Cancer Research*, 70 (21), 8822–8831.
- Choudhury, N. R., de Lima Alves, F., de Andrés-Aguayo, L., Graf, T., Cáceres, J. F., Rappsilber, J. & Michlewski, G. (2013). Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes & Development*, 27 (1), 24–38.
- Coronel, H. J., López, U. E., Contreras, R. C., Delgado, W. I., Figueroa, G. G., Campos, P. A. D. & Pérez, P. C. (2019). Cell migration and proliferation are regulated by miR-26a in colorectal cancer via the PTEN–AKT axis. *Cancer Cell International*, 19 (1), 80.
- Cox M. M. & Nelson, D. L. (2008). "Chapter 14: Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway". *Lehninger Principles of Biochemistry* (5 ed.). W H Freeman & Co. pp. 527–568
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358 (5), 502–511.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L. & Rider, M. H. (1997).

- Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (28), 17269–17275.
- Dumortier, O., Hinault, C. & Van Obberghen, E. (2013). MicroRNAs and Metabolism Crosstalk in Energy Homeostasis. *Cell Metabolism*, 18 (3), 312–324.
- Dusl, M., Senderek, J., Muller, J. S., Vogel, J. G., Pertl, A., Stucka, R. & Abicht, A. (2015). A 3'-UTR mutation creates a microRNA target site in the GFPT1 gene of patients with congenital myasthenic syndrome. *Human Molecular Genetics*, 24 (12), 3418–3426.
- Eberhardy, S. R., & Farnham, P. J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (51), 48562–48571.
- Ebhardt, H. A., Tsang, H. H., Dai, D. C., Liu, Y., Bostan, B. & Fahlman, R. P. (2009). Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications. *Nucleic Acids Research*, 37 (8), 2461–2470.
- Eichmüller, S. B., Osen, W., Mandelboim, O. & Seliger, B. (2017). Immune Modulatory microRNAs Involved in Tumor Attack and Tumor Immune Escape. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109 (10).
- ElHefnawi, M., Soliman, B., Abu-Shahba, N. & Amer, M. (2013). An Integrative Meta-analysis of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(6), 354-367.
- Engholm, G., Ferlay, J., Christensen, N., Kejs, AMT., Hertzum-Larsen, R., Johannesen, T. B., Khan, S., Leinonen, M. K., Ólafsdóttir, E., Petersen, T., Schmidt, L. K. H., Trykker, H. & Storm H. H. NORDCAN: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in the Nordic Countries, Version 7.3 (08.07.2016). Association of the Nordic Cancer Registries. Danish Cancer Society.
- Fan, C., Oh, D. S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D. S. A., Nobel, A. B. & Perou, C. M.

- (2006). Concordance among Gene-Expression–Based Predictors for Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 355 (6), 560–569.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 144 (8):1941–1953.
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., & Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109 (9), 3812–3819.
- Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123 (Pt 24), 4195–4200.
- Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R. B., & Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & Development*, 15 (11), 1406–1418.
- Grassian, A. R., Metallo, C. M., Coloff, J. L., Stephanopoulos, G., & Brugge, J. S. (2011). Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes & Development*, 25 (16), 1716–1733.
- Gu, S., & Kay, M. A. (2010). How do miRNAs mediate translational repression? *Silence*, 1 (1), 11.
- Guda, M. R., Asuthkar, S., Labak, C. M., Tsung, A. J., Alexandrov, I., Mackenzie, M. J. & Velpula, K. K. (2018). Targeting PDK4 inhibits breast cancer metabolism. *American Journal of Cancer Research*, 8 (9), 1725–1738.
- Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine*, 14 (1), 143.
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21 (3), 309–322.

- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5), 646–674.
- Hansen, T. B., Kjems, J. & Damgaard, C. K. (2013). Circular RNA and miR-7 in Cancer. *Cancer Research*, 73 (18), 5609–5612.
- Havens, M. A., Reich, A. A., Duelli, D. M. & Hastings, M. L. (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Research*, 40 (10), 4626–4640.
- Hay, N. (2011). Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813 (11), 1965–1970.
- Iurlaro, R., León, A. C. L. & Muñoz, P. C. (2014). Regulation of Cancer Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors. In *Methods in enzymology* (Vol. 542, pp. 59–80).
- Izreig, S., Samborska, B., Johnson, R. M., Sergushichev, A., Ma, E. H., Lussier, C. & Jones, R. G. (2016). The miR-17~92 microRNA Cluster Is a Global Regulator of Tumor Metabolism. *Cell Reports*, 16 (7), 1915–1928.
- Jiang, L., Liu, X., Chen, Z., Jin, Y., Heidbreder, C. E., Kolokythas, A. & Zhou, X. (2010). MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells. *The Biochemical Journal*, 432 (1), 199–205.
- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M. & Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature Cell Biology*, 13 (3), 310–316.
- Kalinowski, F. C., Brown, R. A. M., Ganda, C., Giles, K. M., Epis, M. R., Horsham, J. & Leedman, P. J. (2014). microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 54, 312–317.
- Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M. & Purow, B. (2008). microRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is Down-regulated in Glioblastoma. *Cancer Research*, 68 (10),

3566–3572.

- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115* (2), 209–216.
- Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. (2009a). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10* (2), 126–139.
- Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10* (2), 126–139.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1997). Gatekeepers and caretakers. *Nature*, *386* (6627), 761–763.
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F. & Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490* (7418), 61–70.
- Kollareddy, M., Dimitrova, E., Vallabhaneni, K. C., Chan, A., Le, T., Chauhan, K. M. & Martinez, L. A. (2015). Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nature Communications*, *6* (1), 7389.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47* (D1), D155–D162.
- Kredo-Russo, S., Ness, A., Mandelbaum, A. D., Walker, M. D. & Hornstein, E. (2012). Regulation of Pancreatic microRNA-7 Expression. *Experimental Diabetes Research*, *2012*, 1–7.
- Kwon, H. S., Huang, B., Ho Jeung, N., Wu, P., Steussy, C. N. & Harris, R. A. (2006). Retinoic acids and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, induce human pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1759* (3–4), 141–151.
- Kwon, H.-S., Huang, B., Unterman, T. G. & Harris, R. A. (2004). Protein kinase B-alpha inhibits human pyruvate dehydrogenase kinase-4 gene induction by dexamethasone through inactivation of FOXO transcription factors. *Diabetes*, *53*



(4), 899–910.

- Lagos, Q. M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, *294* (5543), 853–858.
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, *30* (4), 363–364.
- Latreille, M., Hausser, J., Stützer, I., Zhang, Q., Hastoy, B., Gargani, S. & Stoffel, M. (2014). MicroRNA-7a regulates pancreatic  $\beta$  cell function. *The Journal of Clinical Investigation*, *124* (6), 2722–2735.
- Leclerc, D., Pham, D. N. T., Lévesque, N., Truongcao, M., Foulkes, W. D., Sapienza, C. & Rozen, R. (2017). Oncogenic role of PDK4 in human colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, *116* (7), 930–936.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75* (5), 843–854.
- Li, G., Li, M., Hu, J., Lei, R., Xiong, H., Ji, H. & Hu, G. (2017). The microRNA-182-PDK4 axis regulates lung tumorigenesis by modulating pyruvate dehydrogenase and lipogenesis. *Oncogene*, *36* (7), 989–998.
- Li, Z., Guo, X., Wu, Y., Li, S., Yan, J., Peng, L. & Wang, J. (2015). Methylation profiling of 48 candidate genes in tumor and matched normal tissues from breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, *149* (3), 767–779.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L. & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, *8* (1), 166.
- Liu, Z., Chen, X., Wang, Y., Peng, H., Wang, Y., Jing, Y. & Zhang, H. (2014). PDK4 protein promotes tumorigenesis through activation of cAMP-response element-binding protein (CREB)-Ras homolog enriched in brain (RHEB)-mTORC1 signaling cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, *289* (43), 29739–29749.

- Liu, Z., Jiang, Z., Huang, J., Huang, S., Li, Y., Yu, S. & Liu, X. (2014). miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. *International Journal of Oncology*, *44* (5), 1571–1580.
- Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J. & Vander Heiden, M. G. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature Genetics*, *43* (9), 869–874.
- Loher, P., Londin, E. R. & Rigoutsos, I. (2014). IsomiR expression profiles in human lymphoblastoid cell lines exhibit population and gender dependencies. *Oncotarget*, *5* (18), 8790–8802.
- Lytle, J. R., Yario, T. A. & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104* (23), 9667–9672.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D. & Weinberg, R. A. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, *12* (3), 247–256.
- Mannava, S., Grachtchouk, V., Wheeler, L. J., Im, M., Zhuang, D., Slavina, E. G. & Nikiforov, M. A. (2008). Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle*, *7* (15), 2392–2400.
- Mazar, J., Qi, F., Lee, B., Marchica, J., Govindarajan, S., Shelley, J. & Perera, R. J. (2016). MicroRNA 211 Functions as a Metabolic Switch in Human Melanoma Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *36* (7), 1090–1108.
- Morin, R. D., O'Connor, M. D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A. L. & Marra, M. A. (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Research*, *18* (4), 610–621.
- Murakami, T., Nishiyama, T., Shirotani, T., Shinohara, Y., Kan, M., Ishii, K. & Ebina, Y. (1992). Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1

glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (13), 9300–9306.

Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.-C., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Tonic, I. & Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*, 14 (6), 458–470.

Nuutinen, E. M., Peuhkurinen, K. J., Pietiläinen, E. P., Hiltunen, J. K. & Hassinen, I. E. (1981). Elimination and replenishment of tricarboxylic acid-cycle intermediates in myocardium. *The Biochemical Journal*, 194 (3), 867–875.

Okada, N., Lin, C.-P., Ribeiro, M. C., Biton, A., Lai, G., He, X. & He, L. (2014). A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes & Development*, 28 (5), 438–450.

Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23 (1), 27–47.

Peschiaroli, A., Giacobbe, A., Formosa, A., Markert, E. K., Bongiorno-Borbone, L., Levine, A. J. & Melino, G. (2013). miR-143 regulates hexokinase 2 expression in cancer cells. *Oncogene*, 32 (6), 797–802.

Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science*, 292 (5516), 504–507.

Pinzón, N., Li, B., Martinez, L., Sergeeva, A., Presumey, J., Apparailly, F. & Seitz, H. (2017a). microRNA target prediction programs predict many false positives. *Genome Research*, 27 (2), 234.

Pinzón, N., Li, B., Martinez, L., Sergeeva, A., Presumey, J., Apparailly, F. & Seitz, H. (2017b). Pinzón, N., Li, B., Martinez, L., Sergeeva, A., Presumey, J., Apparailly, F., & Seitz, H. (2017). microRNA target prediction programs predict many false positives. *Genome Research*, 27 (2), 234–245.

- Possemato, R., Marks, K. M., Shaul, Y. D., Pacold, M. E., Kim, D., Birsoy, K. & Sabatini, D. M. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*, *476* (7360), 346–350.
- Reddy, S. D. N., Ohshiro, K., Rayala, S. K. & Kumar, R. (2008). MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Research*, *68* (20), 8195–8200.
- Riffo-Campos, Á. L., Riquelme, I. & Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *International Journal of Molecular Sciences*, *17* (12).
- Rowles, J., Scherer, S. W., Xi, T., Majer, M., Nickle, D. C., Rommens, J. M. & Prochazka, M. (1996). Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *The Journal of Biological Chemistry*, *271* (37), 22376–22382.
- Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, *448* (7149), 83–86.
- Schmitz, U. & Wolkenhauer, O. (2013). Web Resources for microRNA Research (pp. 225–250).
- Scott, R. & Wille, J. (1984). Research Review Mechanisms for the Initiation and Promotion of Carcinogenesis: A Review and a New Concept. *Mayo Clinic Proceedings*, *59*, 107-117.
- Semenza, G. L. (2011). Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *76*, 347–353.
- Seok, H., Ham, J., Jang, E. S. & Chi, S. W. (2016). MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions. *Molecules and Cells*, *39* (5), 375–381.
- Sharma, B. (2011). Kinetic Characterisation of Phosphofructokinase Purified from *Setaria cervi*: A Bovine Filarial Parasite. *Enzyme Research*, *2011*, 939472.

- Shu, J., Xia, Z., Li, L., Liang, E. T., Slipek, N., Shen, D. & Steer, C. J. (2012). Dose-dependent differential mRNA target selection and regulation by let-7a-7f and miR-17-92 cluster microRNAs. *RNA Biology*, *9* (10), 1275–1287.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68* (1), 7–30.
- Song, F., Hooper & Loke, Y. (2013). Publication bias: what is it? How do we measure it? How do we avoid it? *Open Access Journal of Clinical Trials*, 71.
- Su, X., Xing, J., Wang, Z., Chen, L., Cui, M., & Jiang, B. (2013). microRNAs and ceRNAs: RNA networks in pathogenesis of cancer. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, *25* (2), 235–239.
- Takeshima, H., & Ushijima, T. (2019). Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *Npj Precision Oncology*, *3* (1), 7.
- Uhlén, M. et. al. 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science*
- U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. (2015). Risk Factors for Cancer. Consultado el 15/01/2019 <<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk> >
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, *3* (1), 12.
- Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, *318* (5858), 1931–1934.
- Vegran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P. & Feron, O. (2011). Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF- B/IL-8 Pathway that Drives Tumor Angiogenesis. *Cancer Research*, *71* (7), 2550–2560.
- Wang, J., Qian, Y., & Gao, M. (2018). Overexpression of PDK4 is associated with cell

- proliferation, drug resistance and poor prognosis in ovarian cancer. *Cancer Management and Research, Volume 11*, 251–262.
- Warburg, O., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science, 123* (3191), 309–314.
- Woolbright, B. L., Choudhary, D., Mikhalyuk, A., Trammel, C., Shanmugam, S., Abbott, E. & Taylor, J. A. (2018). The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4 (PDK4) in Bladder Cancer and Chemoresistance. *Molecular Cancer Therapeutics, 17* (9), 2004–2012.
- Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A. R. & Zhu, J. (2010). A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Molecular Cell, 38* (1), 67–77.
- Wu, K., He, J., Pu, W. & Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 16* (2), 120–126.
- Wyman, S. K., Knouf, E. C., Parkin, R. K., Fritz, B. R., Lin, D. W., Dennis, L. M. & Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Research, 21* (9), 1450–1461.
- Wynn, R. M., Kato, M., Chuang, J. L., Tso, S. C., Li, J. & Chuang, D. T. (2008). Pyruvate dehydrogenase kinase-4 structures reveal a metastable open conformation fostering robust core-free basal activity. *The Journal of Biological Chemistry, 283* (37), 25305–25315.
- Xia, J., Cao, T., Ma, C., Shi, Y., Sun, Y., Wang, Z. P. & Ma, J. (2018). miR-7 Suppresses Tumor Progression by Directly Targeting MAP3K9 in Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy. Nucleic Acids, 13*, 121–132.
- Xie, B.X., Zhang, H., Wang, J., Pang, B., Wu, R. Q., Qian, X. L. & Zhou, J. G. (2011). Analysis of Differentially Expressed Genes in LNCaP Prostate Cancer Progression Model. *Journal of Andrology, 32* (2), 170–182.

- Xu, C. X., Xu, M., Tan, L., Yang, H., Permeth-Wey, J., Kruk, P. A. & Cheng, J. Q. (2012). MicroRNA MiR-214 Regulates Ovarian Cancer Cell Stemness by Targeting p53/Nanog. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(42), 34970–34978.
- Xu, S., Guo, J. & Zhang, W. (2019). lncRNA PCAT19 promotes the proliferation of laryngocarcinoma cells via modulation of the miR-182/PDK4 axis. *Journal of Cellular Biochemistry*, jcb.28552.
- Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z. & Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, *15 Suppl 7* (Suppl 7), S4.
- Yamada, Y., Sakuma, J., Takeuchi, I., Yasukochi, Y., Kato, K., Oguri, M. & Tanaka, M. (2017). Identification of rs7350481 at chromosome 11q23.3 as a novel susceptibility locus for metabolic syndrome in Japanese individuals by an exome-wide association study. *Oncotarget*, *8* (24), 39296–39308.
- Yamamura, S., Saini, S., Majid, S., Hirata, H., Ueno, K., Deng, G. & Dahiya, R. (2012). MicroRNA-34a Modulates c-Myc Transcriptional Complexes to Suppress Malignancy in Human Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, *7* (1), e29722.
- Yerukala Sathipati, S., & Ho, S. Y. (2018). Identifying a miRNA signature for predicting the stage of breast cancer. *Scientific Reports*, *8* (1), 16138.
- Yu, D., Li, H. W., Wang, Y., Li, C.-Q., You, D., Jiang, L. & Li, X. H. (2018). Acyl-CoA dehydrogenase long chain expression is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. *OncoTargets and Therapy*, *Volume 11*, 7643–7653.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, *302* (1), 1–12.
- Zhang, H., Cai, K., Wang, J., Wang, X., Cheng, K., Shi, F. & Dou, J. (2014). MiR-7, Inhibited Indirectly by LincRNA HOTAIR, Directly Inhibits SETDB1 and Reverses the EMT of Breast Cancer Stem Cells by Downregulating the STAT3 Pathway. *STEM CELLS*, *32* (11), 2858–2868.

- Zhao, J., Tao, Y., Zhou, Y., Qin, N., Chen, C., Tian, D. & Xu, L. (2015). MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer Cell International*, 15 (1), 103.
- Zheng, J. (2012). Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncology Letters*, 4 (6), 1151–1157.
- Zhu, W., Yang, L. & Du, Z. (2011). MicroRNA Regulation and Tissue-Specific Protein Interaction Network. *PLoS ONE*, 6 (9), e25394.