



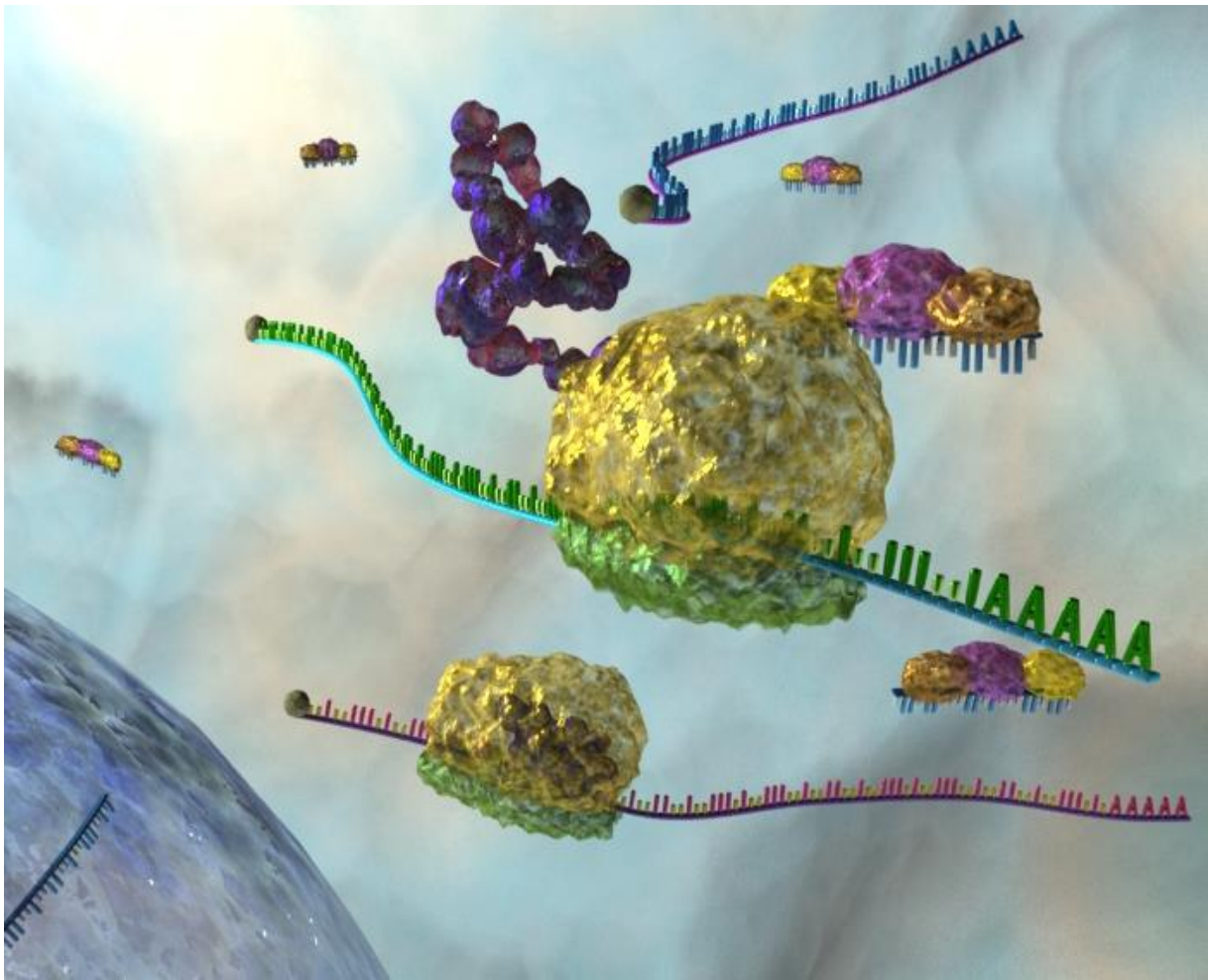
Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# Identificación y caracterización funcional de microRNAs en cáncer de mama



Tesis Doctoral  
Andrea Feliciano Aguirre

Septiembre 2017





# Identificación y caracterización funcional de microRNAs en cáncer de mama

Memoria presentada por

**Andrea Feliciano Aguirre**

para optar al grado de

**Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)**

Tesis doctoral realizada en el Grupo de Investigación Biomédica con Células Madre de Cáncer del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron, bajo la dirección de la **Dra. Matilde Leonart Pajarín**.

Tesis doctoral adscrita al departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Facultad de Medicina de la UAB, en el programa de doctorado de Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina, bajo la tutoría de la **Dra. Anna Mesequer**

**Universidad Autónoma de Barcelona, Septiembre de 2017.**

Andrea Feliciano  
(Doctoranda)

Matilde Leonart  
(Director)

Anna Mesequer  
(Tutor)



A mi madre y hermanos,  
en especial a mi hermana Alexandra





“No hay que temer a nada en la vida,  
sólo hay que comprender”

-Marie Curie





# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
I.1. CÁNCER.....	21
I.1.1. GENERALIDADES.....	21
I.1.2. CARCINOGENESIS Y PROGRESIÓN TUMORAL.....	27
I.1.3. GENÉTICA DEL CÁNCER.....	32
I.1.3.1 PROTO-ONCOGENES.....	33
I.1.3.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	35
I.1.4. EPIGENÉTICA DEL CÁNCER.....	38
I.2. CÁNCER DE MAMA.....	44
I.2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	44
I.2.2. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA.....	45
I.2.3. HETEROGENEIDAD Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.....	50
I.2.3.1. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.....	50
I.2.3.2. CLASIFICACIÓN POR GRADO HISTOLÓGICO.....	51
I.2.3.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN ESTADÍO.....	52
I.2.3.4. CLASIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA SEGÚN RECEPTORES DE MEMBRANA.....	54
I.2.3.5. CLASIFICACIÓN POR SUBTIPOS MOLECULARES.....	55
I.2.3.6. ENSAYOS MULTIGÉNICOS PREDICTORES DE RESULTADO CLÍNICO EN CÁNCER DE MAMA.....	58
I.2.3.7. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ADOPTADAS EN BASE A LOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA.....	60
I.3. microRNAs COMO REGULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	64
I.3.1. BIOGÉNESIS DE <i>microRNAs</i> Y MECANISMOS DE ACCIÓN.....	64
I.3.2. <i>microRNAs</i> EN CÁNCER.....	67
I.3.3. DESREGULACIÓN DE <i>microRNAs</i> EN CÁNCER DE MAMA.....	71
I.3.3.1. IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	71
I.3.3.2. PAPEL DE LOS <i>microRNAs</i> EN TUMORIGÉNESIS DE MAMA.....	73
I.3.4. IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS DE LOS <i>microRNAs</i> .....	76
I.3.4.1. ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS DIRECTAS.....	76
I.3.4.2. ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS INDIRECTAS.....	78
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>82</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
III.1. PACIENTES Y MUESTRAS.....	87

III.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO.....	87
III.1.2. PACIENTES.....	87
III.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA Y CUANTIFICACIÓN.....	90
III.2.2. MICROARRAY DE <i>microRNAs</i> .....	91
III.2.3. SÍNTESIS DE <i>cDNA</i> Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL ( <i>qRT-PCR</i> ).....	92
III.3. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y CLONAJE.....	93
III.3.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	93
III.3.2. MUTAGÉNESIS DE SITIO DIRIGIDO.....	94
III.4. CULTIVOS CELULARES Y ENSAYOS FUNCIONALES.....	97
III.4.1. LÍNEAS CELULARES, MANTENIMIENTO Y SUBCULTIVO DE CÉLULAS.....	97
III.4.2. GENERACIÓN DE RETROVIRUS E INFECCIÓN.....	98
III.4.3. TRANSFECCIÓN.....	100
III.4.3.1. TRANSFECCIÓN CON MOLÉCULAS PRE- <i>miRNAs</i> Y ANTI- <i>miRNAs</i> .....	100
III.4.3.2. TRANSFECCIÓN CON <i>siRNAs</i> .....	101
III.4.4. CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR.....	101
III.4.5. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	102
III.4.6. ENSAYO CLONOGÉNICO.....	102
III.4.7. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO.....	103
III.4.8. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	103
III.4.9. ANÁLISIS DE APOPTOSIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	104
III.4.10. ANÁLISIS DE SENESCENCIA.....	105
III.4.11. ENSAYOS REPORTEROS DE LUCIFERASA.....	105
III.4.12. ENSAYOS DE INVASIÓN CELULAR.....	107
III.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	107
III.5.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	107
III.5.2. WESTERN BLOT.....	108
III.5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	110
III.6. PREDICCIÓN IN SILICO DE LAS DIANAS DE LOS <i>microRNAs</i> .....	111
III.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	111
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>115</b>
IV.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>microRNAs</i> EN TUMORES DE MAMA.....	115
IV.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE <i>miR-125b</i> EN CÁNCER DE MAMA.....	120
IV.2.1. <i>miR-125b</i> DISMINUYÓ LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EL CRECIMIENTO CELULAR INDEPENDIENTE DE ANCLAJE EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA.....	120
IV.2.2. ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 SON DIANAS DIRECTAS DE <i>miR-125b</i> .....	127
IV.2.3. LA INHIBICIÓN DE <i>miR-125b</i> AUMENTÓ LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9.....	132

IV.2.4. LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 RECAPITULÓ LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE miR-125b. ....	133
IV.2.5. EXPRESIÓN DE ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 EN TUMORES DE MAMA. ....	138
IV.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a EN CÁNCER DE MAMA. ....	140
IV.3.1. EXPRESIÓN DE miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a EN TUMORES DE MAMA. ....	140
IV.3.2. miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a AUMENTARON LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA. ....	145
IV.3.3. miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a CAUSARON UN AUMENTO DE LA DE LA INVASIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA. ....	152
IV.3.4. miR-1274a Y miR-1274b REGULARON LA EXPRESIÓN DE FOXO4. ....	154
<b>V. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>159</b>
V.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN CÁNCER DE MAMA. ....	159
V.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-125b EN CÁNCER DE MAMA. ....	160
V.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a EN CÁNCER DE MAMA. ....	168
<b>VI. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>177</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO. ....</b>	<b>225</b>
<b>AGRADECIMIENTOS. ....</b>	<b>229</b>







# ÍNDICE DE FIGURAS



# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Incidencia global de cáncer por tipo de tumor en España en el año 2012 .....	21
<b>Figura 2.</b> Mortalidad global por tipo de tumor en España en el año 2012.....	22
<b>Figura 3.</b> Características generales de las células tumorales adquiridas durante el proceso de carcinogénesis .....	27
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del proceso multifásico de carcinogénesis. ....	29
<b>Figura 5.</b> Modelos básicos de heterogeneidad tumoral .....	32
<b>Figura 6.</b> Clasificación epigenética de los genes y su contribución a la malignidad. ....	43
<b>Figura 7.</b> Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad de cáncer de mama en 2012 .....	45
<b>Figura 8.</b> Subtipos moleculares de cáncer de mama.....	56
<b>Figura 9.</b> Características clínico-patológicas y transcripcionales de los 6 principales subtipos moleculares.....	61
<b>Figura 10.</b> Supervivencia libre de enfermedad en base a los subtipos moleculares de cáncer de mama.....	62
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de la biogénesis de miRNAs. ....	66
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de la desregulación de miRNAs en cáncer.....	68
<b>Figura 13.</b> Alteraciones que provocan la desregulación de miRNAs en cáncer... ..	71
<b>Figura 14.</b> Principales miRNAs implicados en la regulación de las características intrínsecas del cáncer de mama .....	74
<b>Figura 15.</b> Regulación de los genes y las vías de señalización por la familia de miRNAs miR-200 para el mantenimiento de las características de células madre .....	75
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de las posibles terapias contra el cáncer basadas en miRNAs.. ..	80

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Figura 17.</b> Esquema representativo de la agrupación de las muestras en cohortes y la finalidad de las mismas. ....	90
<b>Figura 18.</b> Mapa del vector miR-Vec. ....	93
<b>Figura 19.</b> Alineamiento de las regiones 3'-UTRs de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 y los potenciales sitios de unión de miR-125b .....	95

## RESULTADOS

<b>Figura 20.</b> Perfil de expresión de miRNAs en pacientes con cáncer de mama .....	116
<b>Figura 21.</b> Niveles de expresión de miR-125b en diferentes líneas celulares .....	120
<b>Figura 22.</b> Validación mediante qRT-PCR de la expresión ectópica de miR-125b en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 .....	121
<b>Figura 23.</b> Expresión de proteínas en líneas celulares de mama que expresan de forma estable miRVec-125b o el control miRVec-GFP. ....	122
<b>Figura 24.</b> La sobreexpresión de miR-125b causó una reducción de la proliferación en líneas celulares de mama. ....	123
<b>Figura 25.</b> Detección de actividad $\beta$ -Galactosidasa en células HMEC y MCF7 con expresión estable de miRVec-125b y miRVec-GFP .....	124
<b>Figura 26.</b> Perfiles de ciclo celular de células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP o miRVec-125b .....	125
<b>Figura 27.</b> Análisis de apoptosis en células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP o miRVec-125b. ....	126
<b>Figura 28.</b> miR-125b redujo el crecimiento independiente de anclaje en células MCF7 y MDA-MB-231 .....	127
<b>Figura 29.</b> miR-125b redujo la expresión de MEGF9, ENPEP, CCNJ, y CK2- $\alpha$ en células MCF7, MDA-MB-231 Y HMEC .....	128
<b>Figura 30.</b> Validación de las dianas de miR-125b mediante ensayos luciferasa usando constructos WT.....	130
<b>Figura 31.</b> Validación de las dianas de miR-125b mediante ensayos luciferasa usando constructos mutantes.....	131
<b>Figura 32.</b> La inhibición funcional de miR-125b provocó un aumento de la proliferación celular y de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 .....	133
<b>Figura 33.</b> Expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, Y MEGF9 tras la transfección de los siRNAs específicos indicados en células MCF7 .....	134
<b>Figura 34.</b> La inhibición de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 causó una reducción de la proliferación celular.....	135
<b>Figura 35.</b> Perfiles de ciclo celular de células MCF7 transfectadas con los siRNAs específicos de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 .....	136
<b>Figura 36.</b> Análisis de apoptosis en células MCF7 transfectadas con los siRNAs específicos de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 .....	137
<b>Figura 38.</b> Asociación de la expresión de miR-125b y sus dianas en tumores de mama. Correlación de la expresión de CK2- $\alpha$ y el número de nódulos linfáticos metastáticos..	140
<b>Figura 39.</b> Expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en los 25 pacientes de cáncer de mama de la cohorte 3 .....	142

<b>Figura 40.</b> Correlación de la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a entre sí en tumores de mama .....	143
<b>Figura 41.</b> La expresión de miR-1260a correlaciona con la presencia y número de nódulos linfáticos metastáticos .....	145
<b>Figura 42.</b> Expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en diferentes líneas celulares de mama.....	146
<b>Figura 43.</b> Validación de la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 .....	147
<b>Figura 44.</b> La sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a causó un aumento de la proliferación celular .....	148
<b>Figura 45.</b> La sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a causó un aumento de la clonogenicidad. ....	149
<b>Figura 46.</b> La transfección transitoria de pre-1260a y anti-1260a causó un aumento y disminución de la proliferación celular respectivamente.....	150
<b>Figura 47.</b> Validación de la efectividad de pre-1260a y anti-1260a en las células MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-231 y T47D .....	151
<b>Figura 48.</b> La sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a incrementó la invasividad de células MCF7 y MDA-MB-231 .....	153
<b>Figura 49.</b> La transfección transitoria de pre-1260a y anti-1260a provocó un aumento y disminución de la invasión celular respectivamente .....	154
<b>Figura 50.</b> Alineamiento de los potenciales sitios de unión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en las regiones 3'-UTRs del mRNA de FOXO4.....	155
<b>Figura 51.</b> Análisis de la expresión de FOXO4 en células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 que expresan de forma estable miRVec-1274a, miRVec-1274b o el control miRVec-GFP.....	156

## DISCUSIÓN

<b>Figura 52.</b> Esquema de cómo miR-125b modula sus proteínas diana y sus posibles interacciones .....	168
<b>Figura 53.</b> Esquema de la funcionalidad de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en cáncer de mama.....	173





# ÍNDICE DE TABLAS





# ÍNDICE DE TABLAS

## INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Definición clínico-patológica equivalente (basado en IHC) de los subtipos moleculares de cáncer de mama. ....	55
<b>Tabla 2.</b> Recomendaciones de tratamientos sistémicos en base a la clasificación equivalente de los subtipos moleculares de cáncer de mama .....	63
<b>Tabla 3.</b> miRNAs que communmente están alterados en cáncer .....	69

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 4.</b> Características clínico-patológicas de los pacientes de la cohorte 3.....	89
<b>Tabla 5.</b> Cebadores utilizados para el clonaje de miR-125b, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a y de las regiones WT 3'-UTR de de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 .....	94
<b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados para la inserción de mutaciones puntuales en las regiones 3'-UTR del mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9.....	96
<b>Tabla 7.</b> Densidad celular previa a la infección y concentración de Blastidina para la selección de las líneas celulares de mama infectadas.. .....	100
<b>Tabla 8.</b> Componentes y cantidades utilizadas para preparar el gel concentrador. ....	109
<b>Tabla 9.</b> Componentes y cantidades utilizadas para preparar el gel separador. ....	109
<b>Tabla 10.</b> Anticuerpos utilizados para Western blot. ....	110

## RESULTADOS

<b>Tabla 11.</b> miRNAs diferencialmente expresados entre el tejido tumoral y tejido normal adyacente en pacientes con cáncer de mama (cohorte 2) .....	119
<b>Tabla 12.</b> Asociación de la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a con los marcadores inmunohistoquímicos de pacientes con cáncer de mama .....	144





# ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

**3'-UTR:** Region 3' no traducida

**5'-UTR:** Region 5' no traducida

**A:** Adenina

**Ago:** Proteínas Argonauta

**AMOs:** Oligonucleótidos anti-miR (anti-miR Oligonucleotides)

**AngII:** Angiotensina II

**AngIII:** Angiotensina III

**AngIV:** Angiotensina IV

**ASCO:** Asociación Americana de Oncología Médica (American Society of Clinical Oncology)

**ATP:** Adenosin trifosfato

**Bcl-X:** B-cell lymphoma-extra large

**BER:** Vía de reparación de escisión de base

**BL1 y BL2:** Subtipo basal 1 y 2 de tumores de mama triple negativo

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**C:** Citosina

**Cap:** Guanosina trifosfato metilada

**CDKs:** Quinasas dependientes de ciclina

**circRNA:** RNA circular

**CSC:** Células madre del cáncer

**Ct:** Ciclo umbral (cycle threshold)

**DMSO:** Dimetilsulfòxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNMT:** DNA metiltransferasa

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato

**DO:** Densidad óptica

**DR:** Vía de reversión directa

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EMT:** Transición epitelio-mesénquima

**FBS:** Suero fetal bovino

**FGFR:** Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor Receptors)

**FGFs:** factores de crecimiento de fibroblastos

**FL:** Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*)

**G:** Guanina

**GFP:** Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

**HAT:** Histona acetiltransferasa

**HCL:** Ácido clorhídrico

**HDAC:** Histona deacetilasa

**HDM:** Histona desmetilasa

**HEPES:** Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico

**HER2:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

**HIF-1:** Factor inducible por hipoxia

**HMT:** Histona metiltransferasa

**HR:** Vía de recombinación homóloga

**IHC:** Inmunohistoquímica

**IM:** Subtipo inmunomodulador de tumores de mama triple negativo

**IMC:** Índice de masa corporal

**IP:** Ioduro de Propidio

**kDa:** Kilodalton

**LAR:** Subtipo luminal de receptor de andrógenos de tumores de mama triple negativo

**LNA:** ácidos nucleicos bloqueados (locked nucleic acids)

**lncRNA:** RNA no codificante de tamaño grande

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

**MCE:** Matriz extracelular

**MCS:** sitio múltiple de clonaje

**miRNA mimic:** miRNA imitador

**miRNAs:** microRNAs

**mRNA:** RNA mensajero

**MSL:** Subtipo mesenquimal *stem-like* de tumores de mama triple negativo

**mTOR:** Mammalian target of rapamycin

**Myc:** Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar V-myc

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Ortovanadato de sodio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NaF:** Fluoruro de sodio

**NaPPi:** Pirofosfato tetrasódico

**ncRNA:** RNA no codificante

**NER:** Vía de reparación de escisión de nucleótidos

**ng:** Nanogramos

**NGS:** Secuenciación de alto rendimiento (Next Generation Sequencing)

**NHEJ:** Vía de unión final no homóloga

**OCT:** Medio de congelación (Optimal Cutting Temperatur)

**OHT:** Tamoxifeno

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ORF:** Marco abierto de lectura

**PARP-1:** Poli-ADP-Ribosa-Polimerasa 1

**PBS:** Tampon de fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PI3K:** 3 quinasa fosfatidilinositol

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa (phosphatidylinositol 3-kinase)

**Pol II:** RNA Polimerasa II

**Pol III:** RNA Polimerasa III

**pRb:** proteína retinoblastoma

**pre-miRNA:** miRNA precursor

**pri-miRNAs:** miRNAs primarios

**PS:** Fosfatidilserina

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa en tiempo real.

**RBPs:** Proteínas de unión al RNA (*RNA binding proteins*)

**RE:** Receptores de estrógenos

**Rho:** Coeficiente de correlación de Spearman

**RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*)

**RL:** Luciferasa de Renilla reniformis

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RP:** Receptores de progesterona

**Rpm:** Revoluciones por minuto

**RS:** Puntuación de recurrencia (recurrence score)

**SA-gal:** Actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SHBG:** Globulina fijadora de hormonas sexuales

**siRNA:** RNA de interferencia pequeño con conformación lineal (Small interference RNA)

**snoRNAs:** ncRNA nucleolar de pequeño tamaño

**T:** Timina

**TBS:** Tris Buffer Saline

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$



**TMA:** Microarrays de tejidos

**tRFs:** Fragmentos derivados de tRNA

**Tris (Trizma):** tris(hidroximetil)aminometano

**tRNA:** RNA de transferencia

**TSP-1:** Trombospondina 1

**T-TBS:** Tween 20 en TBS

**U:** Uracilo

**VEGF-A:** Factor de crecimiento endotelial vascular-A

**WT:** Wild type

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**$\mu$ g:** Microgramos

**$\mu$ l:** Microtro





# INTRODUCCIÓN

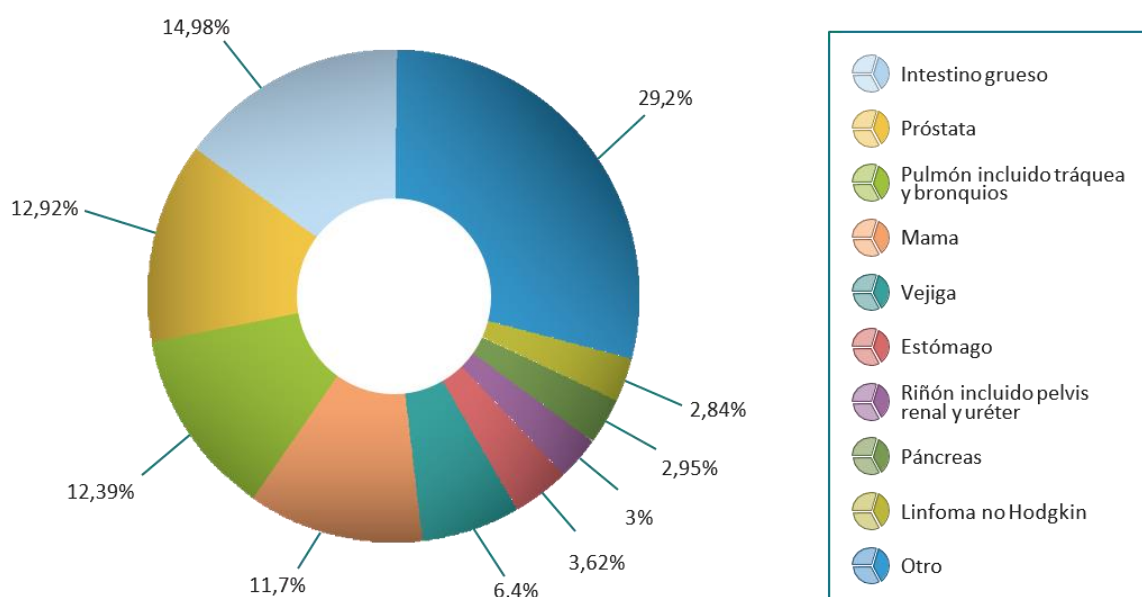


## I. INTRODUCCIÓN.

### I.1. CÁNCER.

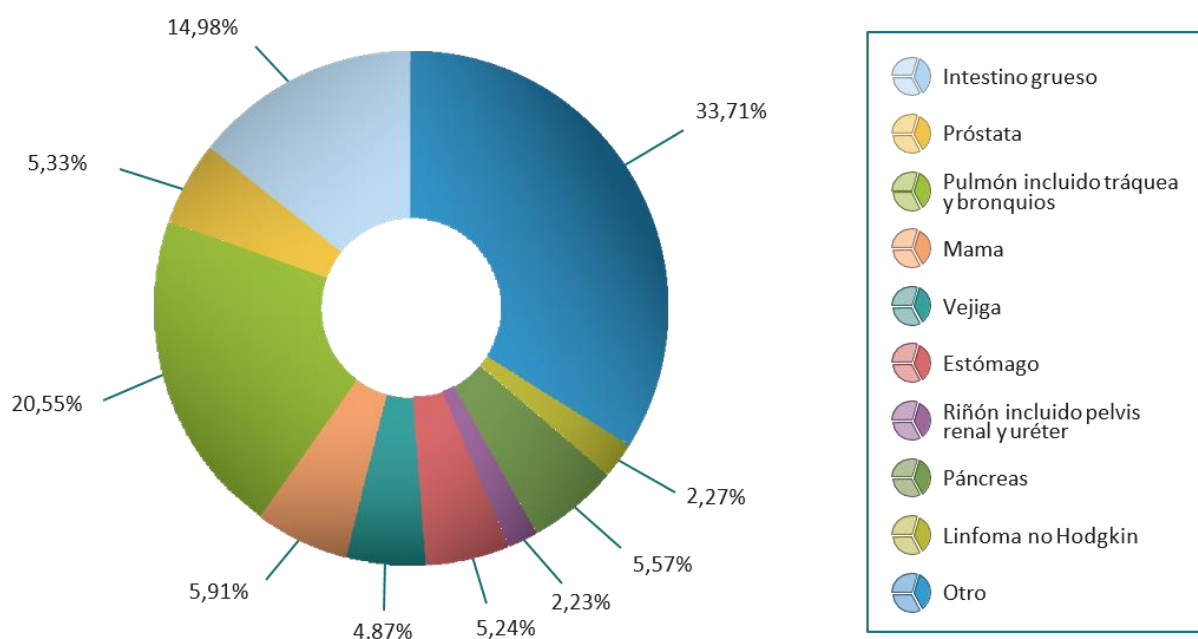
#### I.1.1. GENERALIDADES.

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad siendo la segunda principal causa de muerte, detrás de las enfermedades cardíacas. De acuerdo a datos de la International Agency for Research on Cancer (IARC: <http://www.iarc.fr>) y del National Cancer Institute (<https://www.cancer.gov>), aproximadamente uno de cada tres varones y una de cada cuatro mujeres serán diagnosticados de cáncer a lo largo de su vida, incrementándose el número de casos nuevos a 22 millones en las siguientes dos décadas. Cada año la incidencia del cáncer aumenta, pero también disminuye su mortalidad, lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento. Además, el envejecimiento de la población y el incremento de la supervivencia de los enfermos de cáncer ha supuesto un aumento de la prevalencia del cáncer. Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM: <http://www.seom.org>) la incidencia global de cáncer en España en el año 2012 se situó en 215.534 casos y se prevé una incidencia para el año 2020 de 246.713 nuevos casos. Los tipos de tumores más frecuentes que se diagnosticaron en varones y mujeres en España en el año 2012 fueron el cáncer de colon, seguido del cáncer de próstata, pulmón, mama y vejiga (Figura 1)



**Figura 1.** Incidencia global de cáncer por tipo de tumor en España en el año 2012. (Fuente: Sociedad Española de Oncología Médica)

Además, los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en 2012 en España fueron el cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas y cáncer de próstata (Figura 2).



**Figura 2.** Mortalidad global por tipo de tumor en España en el año 2012. (Fuente: Sociedad Española de Oncología Médica).

El cáncer engloba a un grupo heterogéneo de enfermedades en la que existen más de cien subtipos que se originan de distintos tipos celulares, en diferentes órganos. De hecho, cada subtipo puede tener características diferentes al resto de los tumores malignos, pudiendo considerarse enfermedades independientes con causa, evolución y tratamiento específicos <sup>1</sup>. El cáncer está formado por células que proliferan de manera excesiva e incontrolada capaces de invadir o difundirse a otros tejidos del cuerpo a través del sistema vascular sanguíneo y linfático para proliferar en la nueva localización. Las células cancerígenas han adquirido durante el proceso multietapa de carcinogénesis ocho capacidades biológicas que las caracterizan y que son resumidas en la Figura 3. Entre estas capacidades se incluyen la autonomía en la producción de señales de crecimiento, la evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis, reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune <sup>2,3</sup>.

**Autonomía en la producción de señales de crecimiento:** Las células normales dependen de señales de crecimiento mitógenas incluyendo factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión que participan en la comunicación intercelular para mantener un estado proliferativo activo, mientras que las

células tumorales no dependen de esta estimulación exógena por parte de microambiente tisular normal ya que generan sus propias señales de crecimiento para estimular la proliferación de forma autocrina y paracrina. Además, las células tumorales frecuentemente tienen desregulados o presentan alteraciones estructurales de los receptores de membrana que transducen las señales de crecimiento al interior celular haciendo que sean hipersensibles a los factores de crecimiento, además de que pueden tener alteradas las vías de señalización de crecimiento por expresión constitutiva de alguno de los transductores intracelulares permitiendo una autonomía del crecimiento celular.

**Evasión de los supresores del crecimiento:** Las señales antiproliferativas en el tejido normal incluyendo factores solubles inhibidores del crecimiento y de factores inhibidores embebidos en la matriz extracelular (MEC) y en la superficie celular de células vecinas se unen a receptores transmembrana acoplados a circuitos de señalización intracelular que son responsables del mantenimiento del estado quiescente y de la homeostasis tisular. Muchas de las señales antiproliferativas son canalizadas a través de la proteína retinoblastoma (pRb) que cuando se encuentra en un estado hipofosforilado bloquea la proliferación por secuestro y alteración de la función de los factores de transcripción E2F que controlan la expresión de genes implicados en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Entre los factores solubles anti-crecimiento encontramos el factor de crecimiento transformante TGF- $\beta$  que actúa de muchas maneras para prevenir la fosforilación que inactiva a pRb. Uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden estas señales antiproliferativas es la alteración de la vía pRb-TGF- $\beta$  a través de una reducción expresión de receptores de TGF- $\beta$  en la superficie celular o de la alteración de la función de los mismos debido a mutaciones o a través de la alteración funcional de transductores intracelulares de la vía como por ejemplo Smad4 entre otros y por último a través de mutaciones en el mismo pRb que llevan a la pérdida de su función. De cualquier manera, la alteración de la vía pRb produce la liberación de los factores de transcripción E2F permitiendo la proliferación y haciendo a las células insensibles a los factores anticrecimiento que operan para bloquear el avance de la fase G1 a la fase S del ciclo celular.

**Evasión de la apoptosis:** La capacidad que tienen las células de expandirse está determinada por la tasa de proliferación celular y por la tasa de muerte celular. La disminución del número de células por apoptosis contribuye al mantenimiento de la homeostasis tisular. Sin embargo, las células tumorales evaden la apoptosis a través de la alteración del balance de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, disminución de la actividad de las caspasas, y alteración de la señalización de los receptores de muerte <sup>4</sup>.

**Permitir la inmortalidad replicativa:** La mayoría de las células tienen un número limitado de ciclos de replicación tras los cuales las células entran en senescencia y muerte celular por apoptosis. Los telómeros que consisten en secuencias múltiples cortas de 6 pb en tándem

localizadas en los extremos de los cromosomas, se van acortando progresivamente con cada ciclo de replicación hasta llegado al punto que el DNA cromosómico queda desprotegido comprometiendo la estabilidad de la célula. Llegado a este punto, las células detienen de forma irreversible su crecimiento por senescencia seguido de muerte celular. Únicamente, las células germinales son capaces de dividirse de forma indefinida, sin embargo, las células tumorales se immortalizan gracias a que sobreexpresan la proteína telomerasa que adiciona segmentos repetitivos en los telómeros evitando su acortamiento. De hecho, el 85-90% de las células tumorales expresan telomerasa <sup>3</sup>.

**Inducción de angiogénesis:** La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso es activo durante el desarrollo para nutrir y oxigenar a los tejidos en formación y en condiciones fisiológicas durante el ciclo reproductivo de la mujer y la cicatrización de las heridas <sup>5</sup>. En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre las vías reguladas por moléculas pro-angiogénicas y anti-angiogénicas mientras que las células tumorales han perdido este equilibrio para contribuir al crecimiento tumoral mediante el suministro de nutrientes, oxígeno y la eliminación de residuos y CO<sub>2</sub>; además de contribuir a su invasión (metástasis). Algunos de los reguladores angiogénicos son proteínas que se unen a receptores estimulantes o inhibitorios de la superficie de las células endoteliales. Entre los inductores e inhibidores de la angiogénesis mejor conocidos se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) y la Trombospondina 1 (TSP-1) respectivamente. El microambiente hipóxico generado durante el crecimiento tumoral activa la expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1, que a su vez induce la transcripción de VEGF entre otros. Distintos estímulos activan al sistema HIF, incluyendo factores de crecimiento como insulina, IGF-1, EGF y oncogenes como Ras y Myc. Además, mutaciones de genes supresores de tumores como p53 y pVHL llevan a la inducción de HIF-1. Más de 200 genes son activados por HIF-1 durante la hipoxia para generar una adaptación a ese microambiente tumoral, incluyendo VEGF, eritropoyetina y diversas enzimas implicadas en el metabolismo de glucosa <sup>6</sup>. Además, otros factores pro-angiogénicos como los factores de crecimiento de fibroblastos FGFs están altamente expresados en los tumores para el mantenimiento de la angiogénesis tumoral. Es más, VEGF y FGF actúan sinérgicamente promoviendo la neovascularización, ya que FGF<sub>2</sub> induce la expresión de VEGF y sus receptores en células endoteliales y viceversa, es decir, VEGF induce la expresión de FGF<sub>2</sub> <sup>7</sup>. En cambio, el factor anti-angiogénico TSP-1 se une a los receptores transmembrana de las células endoteliales dando lugar a señales supresoras para contrarrestar el estímulo pro-angiogénico. Otros inhibidores de angiogénesis incluyen a las angioestatinas y las endostatinas.

**Activación de la invasión y la metástasis:** La cascada invasión y la metástasis es un proceso biológico que consta de varias etapas secuenciales que conducen a la formación de



tumores secundarios en órganos distantes, y es en gran medida, responsable de la mortalidad y morbilidad del cáncer. Una vez que ciertas células tumorales adquieren la capacidad de penetrar en los tejidos circundantes gracias a cambios en la adhesión intercelular que permiten a las células tumorales disociarse de la masa tumoral primaria, y a cambios en la adhesión con la MEC para invadir el estroma circundante promoviendo la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, se produce seguidamente la intravasación de las células en la circulación linfática o vascular. Una vez en circulación, se produce el proceso de extravasación al tejido circundante a través de la degradación de la membrana basal vascular y la MEC. En última instancia, estas células se adhieren a una nueva ubicación y proliferan para producir el tumor secundario. Para que este proceso finalice con éxito, además de la secreción de sustancias para degradar la membrana basal y la MEC es fundamental la expresión y/o supresión de proteínas implicadas en el control de la motilidad y la migración celular. La alteración mejor caracterizada relacionada con el potencial invasivo y metastático de las células tumorales es la pérdida de E-Cadherina mediante inactivación genética funcional o silenciamiento epigénético <sup>8,9</sup>. E-Cadherina es una molécula de adhesión intercelular calcio dependiente en las que los dominios extracelulares en la superficie celular establecen interacciones laterales en cis, y luego entre las células adyacentes para formar enlaces adhesivos en trans <sup>10</sup>. Adicionalmente, se produce una interacción del dominio de citoplasmático de la E-Cadherina con las moléculas cateninas  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\alpha$ - y p120-catenina. La estabilidad del complejo E-cadherina-catenina, y su interacción con el citoesqueleto de actina, forma el *core* o núcleo de las uniones adherentes, que son esenciales para la adhesión célula-célula y para impedir la motilidad de las células epiteliales, contribuyendo a la homeostasis de la arquitectura tisular normal <sup>11,12</sup>. Varios estudios han demostrado que la reconstitución funcional de E-cadherina suprime el fenotipo invasivo de muchos tipos diferentes de células tumorales <sup>13,14</sup>. Además, la expresión de genes que codifican otras moléculas implicadas en la adhesión célula-célula y célula-MEC es alterada en diversos carcinomas altamente agresivos, así como de moléculas de adhesión relacionadas con la motilidad y migración celular cuya expresión es regulada positivamente <sup>15</sup>. A este respecto, diversos estudios han demostrado la implicación de la desregulación de los desmosomas, esenciales en las uniones intercelulares, con la invasión y progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión de algunas proteínas desmosómicas, incluyendo DSG2, DSG3 y PKP3, está aumentada en comparación con el tejido normal en ciertos cánceres de piel, cabeza y cuello, próstata y pulmón. Por el contrario, se observa la pérdida o reducción de uno o más componentes de desmosomas, incluyendo DSG1-3, DSC2, DSC3, JUP, PKP1-3 y DSP, en cánceres de piel, cabeza y cuello, gástrico, colorrectal, mama, próstata, y endometrio, correlacionando a menudo con grado avanzado del tumor, aumento de metástasis y/o mal pronóstico <sup>16</sup>. Otras moléculas que contribuyen al desarrollo de la capacidad invasiva y metastática de las células tumorales son las integrinas y

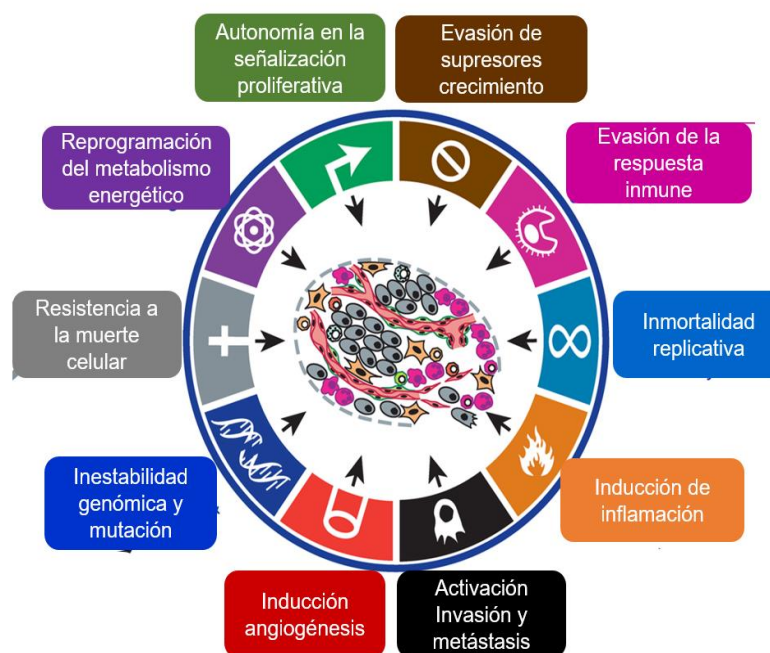
las selectinas que median el anclaje de las células con la MEC y la unión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular durante la respuesta inflamatoria, respectivamente. Concretamente, las selectinas están directamente implicadas en el proceso de extravasación de las células tumorales para favorecer la colonización y formación de metástasis, y es sabido que la capacidad de extravasación de las células y por tanto su potencial metastático está correlacionado con los niveles de expresión de los ligandos de selectinas en las células tumorales<sup>17-19</sup>. Por último, destacar la relevancia de la molécula de adhesión CD44, implicada en la adhesión intercelular y con la MEC, en la invasión tumoral y metástasis. Diversos estudios han reportado que CD44 es sobreexpresada en tumores metastáticos en comparación con los tumores primarios, y que la supresión de su expresión reduce la proliferación, la migración y la invasión celular en cáncer de ovario y de mama entre otros<sup>20,21</sup>.

**Reprogramación del metabolismo energético:** La incontrolada e ilimitada proliferación celular de los tumores implica el ajuste del metabolismo energético con el fin de impulsar el crecimiento y la división celular. Las células tumorales tienen requerimientos energéticos diferentes a las células normales y utilizan diferentes vías metabólicas independientemente de la disponibilidad de oxígeno como la glucólisis anaeróbica para suplir de energía a las células tumorales. Entre las adaptaciones metabólicas se encuentran la sobreexpresión de receptores de glucosa GLUT1 con el fin de internalizar mayor cantidad de glucosa y utilizarla como fuente energética. A este respecto el sistema de respuesta a hipoxia en el cual se incrementan los niveles de HIF-1 en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno o a oncoproteínas como RAS, provoca una regulación positiva de los transportadores de glucosa y de enzimas de la glucólisis para enfrentarse a las altas necesidades energéticas de las células malignas<sup>22,23</sup>.

**Evasión de la respuesta inmune:** El sistema inmune es responsable de reconocer y eliminar la mayoría de las células cancerígenas incipientes y por tanto los tumores, sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para evitar su reconocimiento por parte del sistema inmune. Debido a la inestabilidad genómica, las células tumorales cambian constantemente su perfil antigénico y sobreexpresan ciertas moléculas (citoquinas y quimioquinas) que actúan como inmunomoduladores regulando su microambiente y favoreciendo el reclutamiento de monocitos, macrófagos y células inflamatorias altamente supresoras, suprimiendo la actividad del sistema inmune y regulando la neovascularización<sup>3</sup>.

La adquisición de estas capacidades biológicas por parte de las células tumorales es posible gracias a dos propiedades intrínsecas que poseen estas células, que son la inestabilidad genómica y la capacidad de inducir respuestas inflamatorias. La primera propiedad es la inestabilidad genómica que lleva a una alta tasa de alteraciones en el genoma

que sufren estas células. La segunda propiedad es la capacidad de inducir respuestas inflamatorias. Se ha demostrado que algunos tumores están densamente infiltrados de células del sistema inmune innato y adaptativo, y estas células inflamatorias suministran moléculas bioactivas al microambiente tumoral incluyendo factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos y enzimas modificadoras de la MEC que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis. Además, las células inflamatorias pueden liberar sustancias químicas como especies reactivas de oxígeno que son altamente mutagénicas para las células tumorales cercanas, pudiendo provocar que estas células evolucionen hacia estados de mayor malignidad <sup>3,24-26</sup>.

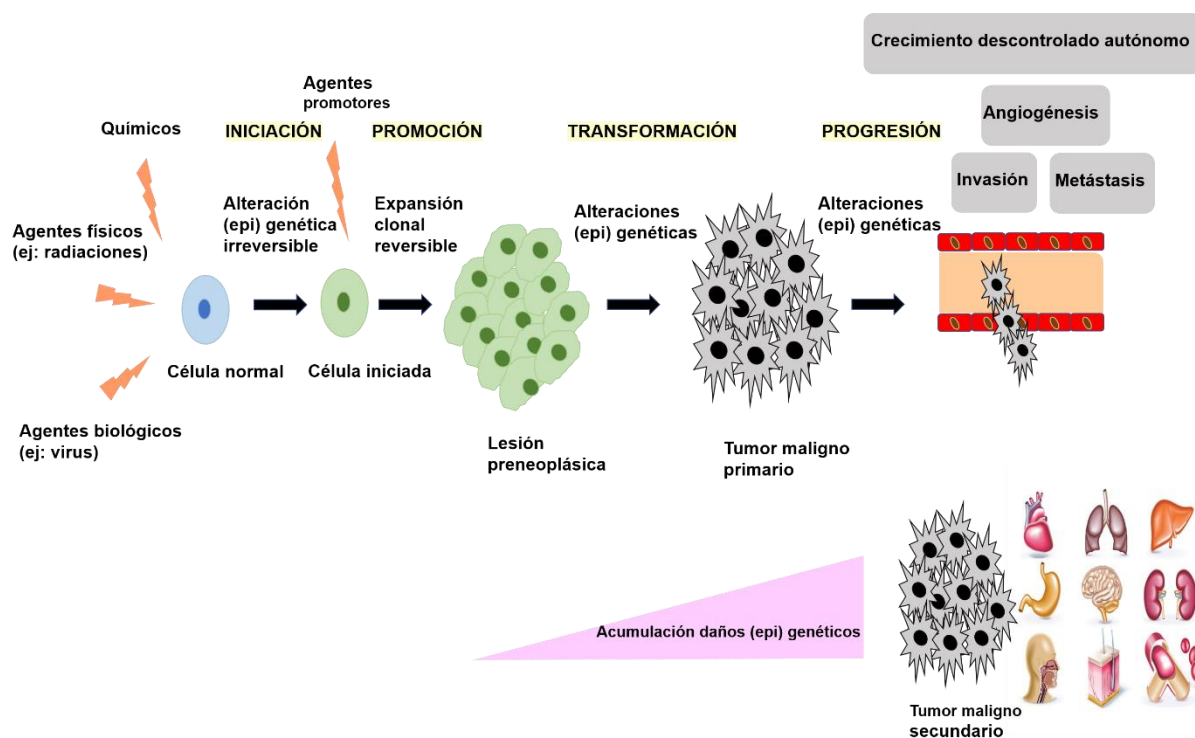


**Figura 3.** Características generales de las células tumorales adquiridas durante el proceso de carcinogénesis (Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011 <sup>3</sup>).

### I.1.2. CARCINOGENÉISIS Y PROGRESIÓN TUMORAL.

La carcinogénesis es un proceso multifásico secuencial en el cual las células normales sufren cambios genotípicos y fenotípicos y se transforman en células malignas que proliferan de manera incontrolada y que última instancia, invadirán y formarán metástasis en órganos

distantes. La carcinogénesis puede dividirse en 4 fases: iniciación tumoral, promoción tumoral, transformación maligna y progresión tumoral (Figura 4). Durante la iniciación del tumor los agentes carcinogénicos iniciadores (agentes químicos, agentes físicos o biológicos) provocan alteraciones genéticas o epigenéticas irreversibles en las células normales que conducen a la activación de protooncogenes o inactivación de genes supresores de tumores, dando lugar a células con el potencial de desarrollarse en un clon de células malignas <sup>27</sup>. La promoción consiste en la expansión clonal de las células iniciadas. Los agentes promotores generalmente son agentes no mutagénicos y sólo pueden inducir neoplasias en las células ya iniciadas, pero, por si solos no inducen tumores ya que no provocan un daño permanente en el DNA. Generalmente, los promotores se unen a receptores de la superficie de las células iniciadas que lleva a la afectación de vías de señalización que aumentan la proliferación celular, aunque existen otros promotores que alteran la expresión génica sin implicar la interacción con receptores. Estos agentes aumentan la tasa de proliferación celular facilitando la aparición de tumores benignos o lesiones premalignas que serían reversibles en ausencia de nuevos promotores, pero pueden generar un tumor si su efecto se prolonga en el tiempo <sup>28-30</sup>. La transformación maligna consiste en la conversión de las células preneoplásicas en células malignas y requiere de alteraciones genéticas adicionales. Las alteraciones genéticas adicionales pueden resultar además de infidelidad en el proceso de síntesis de DNA <sup>31</sup>. La progresión tumoral consiste en la expresión del fenotipo maligno y en la tendencia de las células malignas a adquirir un fenotipo más agresivo a lo largo del tiempo. Durante este proceso pueden ocurrir alteraciones genéticas y epigenéticas adicionales que pueden resultar en la activación de protooncogenes o inactivación de genes supresores de tumores confirmando una autonomía en el crecimiento celular (independiente del carcinógeno o promotor) y promoviendo la invasión y la metástasis <sup>32-34</sup>. El factor clave de la carcinogénesis es la acumulación de mutaciones a lo largo del proceso que en parte puede ser favorecida por la inestabilidad genómica que adquieren las células malignas durante el proceso <sup>35</sup>. Existen varios mecanismos en las células normales que protegen contra el daño cromosómico y nucleotídico al impedir la replicación del DNA hasta que se reparen los daños asegurando que las tasas de mutación espontánea son muy bajas en cada generación celular; sin embargo, los genes que controlan estos puntos críticos de control (por ejemplo, p53) frecuentemente están alterados en las células malignas <sup>36</sup>. Es más, se han reportado defectos en diversos componentes de la maquinaria de mantenimiento del DNA frecuentemente denominados “cuidadores del genoma”, incluyendo defectos en genes involucrados en detectar daños en el DNA, en genes implicados en la reparación del DNA dañado, y en la inactivación de moléculas mutagénicas antes de dañar el DNA <sup>3</sup>



**Figura 4.** Representación esquemática del proceso multifásico de carcinogénesis. La exposición a agentes carcinogénicos puede provocar en una célula normal una alteración genética o epigenética irreversible dando lugar a una célula iniciada. Los agentes promotores que no son mutagénicos provocan la expansión clonal de la célula iniciada para dar lugar a tumores benignos. Las alteraciones genéticas y epigenéticas adicionales derivadas de la exposición al carcinógeno o de la reducción de la fidelidad de síntesis del DNA (fallos en la replicación y reparación del DNA dañado) inducirán la transformación a células malignas dando lugar el tumor maligno primario. La inestabilidad genética provocará la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas adicionales que a su vez provocarán la progresión del tumor hacia un fenotipo más agresivo con un crecimiento autónomo descontrolado, activación del programa de angiogénesis y adquisición del potencial invasivo y metastático para formar tumores secundarios en otras regiones del cuerpo.

Prácticamente todos los tumores presentan heterogeneidad intratumoral en relación al genotipo, expresión génica, morfología celular, actividad metabólica, motilidad, tasa de proliferación celular, expresión de antígenos, respuesta a fármacos y potencial metastático<sup>37,38</sup>. Por tanto, esta heterogeneidad tiene implicaciones clínicas en la clasificación y pronóstico del tumor, así como en la eficacia del tratamiento y la identificación de dianas de fármacos. Existen dos hipótesis principales que han coexistido durante muchos años que explican el origen y la heterogeneidad intratumoral y son el modelo estocástico o de evolución clonal y el modelo de las células madre tumorales (CSC) (Figura 5). Algunos cánceres humanos se ajustan al modelo de las CSC mientras que otros se ajustan más al modelo de evolución clonal

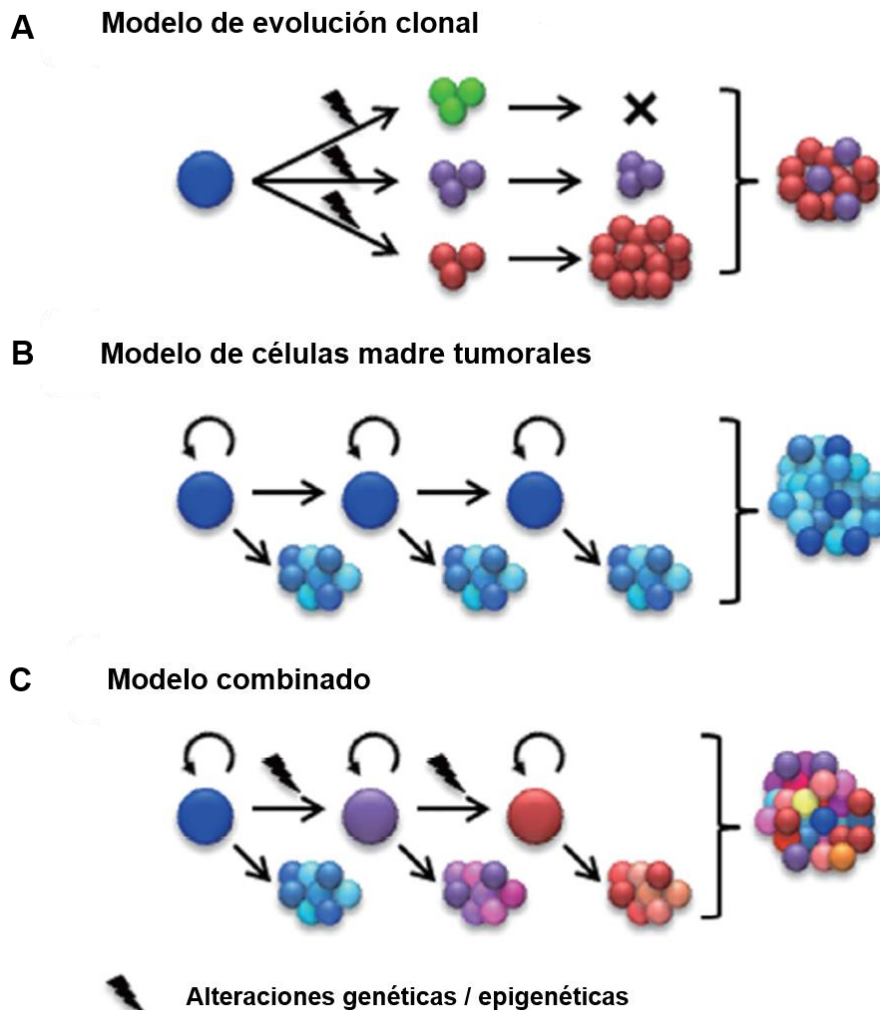
**Modelo de evolución clonal:** El modelo de evolución clonal o modelo estocástico fue propuesto por primera vez por Nowel en 1976<sup>39</sup> y postula la tumorigénesis como un proceso consecutivo de adquisición de mutaciones que promueve la expansión clonal y la diversificación. Por tanto, los tumores se forman a partir de una célula que sufre mutaciones que les proporcionan una ventaja selectiva frente a las células adyacentes, y a medida que

los nuevos clones emergen de linajes de células tumorales previamente establecidas, surge la competencia entre clones tumorales genéticamente diferentes (subclones) seguida de la selección de los subclones más aptos favoreciendo su crecimiento en función de las presiones selectivas intrínsecas y extrínsecas (microambiente). Según este modelo todas las células tienen el mismo potencial de generar el tumor, y la aparición de estas subpoblaciones clonales son las responsables de la heterogeneidad intratumoral y de la progresión tumoral <sup>40</sup>. Los avances tecnológicos modernos como la secuenciación de alto rendimiento NGS (Next Generation Sequencing) han mejorado drásticamente el estudio de la heterogeneidad genética intratumoral permitiendo la detección y cuantificación de mutaciones de las distintas poblaciones de células que conforman la masa tumoral y por tanto determinar la presencia y frecuencia de los subclones. <sup>41,42</sup>. Por ejemplo, Nik-Zainal y colaboradores llevaron a cabo la secuenciación del genoma completo en 21 tumores primarios de mama revelando la existencia de mutaciones puntuales, incluyendo inserciones y deleciones, así como reordenamientos genómicos y aberraciones en el número de copias que fueron agrupados y asignados a las distintas subpoblaciones de células dentro de cada tumor individual. Las frecuencias alélicas para cada aberración permitieron determinar la proporción de todos los subclones identificados en el tumor. Además, la identificación de aberraciones compartidas entre grupos de subclones permitió la reconstrucción de las relaciones evolutivas remontándose a un clon fundador ancestral que portaba el patrón base de mutaciones somáticas comunes entre todos los subclones descendientes <sup>43</sup>. La existencia de un clon ancestral común sugiere la emergencia de terapias dirigidas a las alteraciones genéticas comunes a este linaje que podrían afectar a los subclones descendientes que portan el mismo patrón básico de mutaciones. Por tanto, el desarrollo de terapias dirigidas a las mutaciones claves podría conllevar un mejor manejo clínico de la enfermedad a través de la erradicación global de las células tumorales, incluyendo los subclones que subyacen a la recurrencia del tumor y a la quimioresistencia. Además, la teoría de evolución clonal puede explicar la progresión tumoral ya que se han identificado subpoblaciones minoritarias de subclones metastáticos derivados del tumor primario que a su vez adquieren aberraciones genómicas adicionales para establecer lesiones secundarias <sup>44,45</sup>. De igual manera, la recurrencia de un tumor puede explicarse a través de dos vías evolutivas clonales. En este sentido, un estudio por secuenciación de genoma completo en leucemia mieloide aguda reveló en unos tumores la presencia de un subclon dominante presente en el tumor primario que adquirió mutaciones adicionales tras la quimioterapia y evolucionó para establecer la recaída, mientras que en otros tumores, identificó un subclon minoritario presente en el tumor primario que sobrevivió a la quimioterapia y acumuló mutaciones adicionales para expandirse como clon dominante en la recurrencia del tumor <sup>46</sup>.

**Modelo de las células madre tumorales:** El modelo de las células madre tumorales o modelo jerárquico postula una organización jerárquica de las células en el cual una pequeña proporción de células en el tumor denominadas células madre tumorales son las responsables de la iniciación y el mantenimiento del tumor. Estas células muestran características de células madre como son la capacidad de autorenovarse indefinidamente y de diferenciarse en los diferentes tipos que conforman el tumor contribuyendo a la heterogeneidad intratumoral y, además, estas células no necesariamente se originan a partir de la transformación de células madre del tejido normal. Este modelo además de explicar la heterogeneidad intratumoral explica resistencia tanto a la radioterapia y la quimioterapia como la recurrencia del tumor en el que las CSCs quiescentes o de ciclo lento pueden sobrevivir a la intervención terapéutica causando su recurrencia <sup>47</sup>.

Las CSCs fueron descritas por primera vez en leucemia mieloide aguda. Los investigadores aislaron las CSCs de leucemia basándose en la expresión de marcadores de superficie celular y demostraron que la fracción CD34+/CD38-, pero no las fracciones restantes, establecieron la formación de tumores cuando se implantaron en ratones inmunocomprometidos. Los xenoinjertos recapitularon la heterogeneidad celular observada en las muestras de leucemia mieloide aguda humanas originales, sugiriendo que las fracciones de CSC aisladas poseían un potencial de diferenciación y también retenían la capacidad iniciadora de tumores tras el trasplante de CSC en los ratones inmunocomprometidos <sup>48,49</sup>. Desde el descubrimiento de CSCs en la leucemia, otros grupos de investigación han identificado CSCs en numerosos tumores humanos sólidos, incluyendo cánceres de mama <sup>50</sup>, cerebro <sup>51</sup>, próstata <sup>52</sup>, colon <sup>53</sup>, cabeza y cuello <sup>54</sup>, páncreas <sup>55</sup> y pulmón <sup>56</sup>. Además, se ha demostrado que puede producirse una conversión desde células transformadas a células con propiedades de CSC <sup>57</sup>. Este proceso de dediferenciación puede ocurrir de forma estocástica o a través de señales específicas procedentes del microambiente. En este sentido se ha demostrado que la inducción de HIF2- $\alpha$  en respuesta a hipoxia está implicada en la conversión de células CD133- a células con propiedades de CSC en glioblastoma <sup>58</sup>.

Por otro lado, los modelos de evolución clonal y de CSC no son necesariamente excluyentes entre sí, y es probable la coexistencia de ambos en algunos tumores, de forma que las CSC podrían estar sometidas a un proceso de evolución clonal, por lo que existe diversidad genética entre las CSC y esta diversidad dicta propiedades clonales únicas como ha podido demostrarse en leucemia <sup>59</sup> y en glioblastoma <sup>60</sup>.



**Figura 5.** Modelos básicos de heterogeneidad tumoral. **A)** Modelo de evolución clonal. La alta proliferación y la inestabilidad genómica resultan en un gran número de células que difieren en el genotipo y, por tanto, en el fenotipo. Las células mejor adaptadas son seleccionadas por los procesos darwinianos para generar variantes clonales del tumor. **B)** Modelo de células madre tumorales. La población de CSC tiene la capacidad de autorenovación ilimitada y tienen la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares contribuyendo a la heterogeneidad intratumoral. **C)** Modelo combinado. La población de CSC puede experimentar una evolución clonal. La heterogeneidad tumoral resulta de la diferenciación de las CSC y de la existencia de variantes clonales (Modificada de J. Wang, Ma, & Cooper, 2013 <sup>61</sup>).

### I.1.3. GENÉTICA DEL CÁNCER.

En tumores sólidos comunes como los derivados del colon, mama, cerebro o páncreas, un promedio de 33 a 66 genes presenta mutaciones somáticas. Alrededor del 95% de estas mutaciones son sustituciones de una sola base, mientras que el resto son deleciones o inserciones de una o varias bases. De las sustituciones de una sola base, el 90,7% da lugar a cambios de sentido erróneo, el 7,6% produce cambios sin sentido y el 1,7% provoca alteraciones de los sitios de empalme o regiones no traducidas inmediatamente adyacentes a los codones de inicio y de parada. Sin embargo, el número de mutaciones puede variar en otros tumores como por ejemplo en los tumores pulmonares y melanomas que contienen



aproximadamente 200 mutaciones por tumor debido a la participación de potentes mutágenos como la luz ultravioleta y el humo de tabaco, respectivamente. De forma importante, la mayoría de los tumores sólidos muestran cambios generalizados en el número de cromosomas (aneuploidía), así como deleciones, inversiones, translocaciones y otras anomalías genéticas.

<sup>62</sup>.

Existen dos clases de genes que juegan un papel fundamental en el inicio y progresión del tumor cuando están alterados genéticamente: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores.

#### I.1.3.1 PROTO-ONCOGENES.

Las células poseen un gran número de genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de la proliferación celular, ciclo celular y apoptosis que contribuyen al funcionamiento homeostático de las células y los tejidos. Sin embargo, cambios estructurales y/o funcionales en los proto-oncogenes contribuyen a la malignización, convirtiéndose en oncogenes. Estos oncogenes generarán proteínas con una mayor expresión o actividad que favorecerán el crecimiento descontrolado y la adquisición de las propiedades de las células cancerígenas. Estas mutaciones son dominantes, es decir, que sólo es necesario que un alelo esté mutado para que la mutación se exprese. La activación de un proto-oncogén a oncogen puede realizarse mediante mutaciones puntuales, amplificaciones génicas o translocaciones cromosómicas. Los productos de los oncogenes pueden clasificarse en seis grandes grupos: factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, transductores de señal y reguladores de la apoptosis. Los factores de transcripción son a menudo miembros de familias multigénicas que comparten dominios estructurales comunes y que generalmente, interaccionan con otras proteínas. En algunos tumores, por ejemplo, la proteína de transcripción Fos dimeriza con el factor de transcripción Jun para formar el factor de transcripción AP1, y este complejo aumenta la expresión de varios genes que controlan la división celular <sup>63</sup>. Las translocaciones cromosómicas a menudo activan los genes que codifican factores de transcripción en los cánceres linfoides y a veces lo hacen en tumores sólidos como por ejemplo próstata <sup>64</sup>. Otro proto-oncogen relevante que codifica factores de transcripción es MYC, el cual está sobreexpresado y/o activado por amplificación en distintos tipos de cáncer incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y cáncer de cabeza y cuello. La activación de MYC contribuye a la proliferación y crecimiento autónomo, al aumento de la biogénesis de las proteínas, a los cambios globales en el metabolismo celular, a la activación del programa angiogénico, a la supresión de los programas autocrinos y paracrinos y a una restricción de las respuestas inmunitarias del huésped. Aunque MYC sea

uno de los oncogenes más potentes, la activación de MYC por sí sola no desencadena la tumorigénesis, sino que se necesitan cambios genéticos adicionales que activen otro oncogén o inactiven a un gen supresor de tumores y que sinérgicamente anulen los puntos críticos de control de ciclo celular para regular la detención de la proliferación celular, apoptosis y/o senescencia <sup>65</sup>.

Por otra parte, otros oncogenes relevantes en la iniciación y mantenimiento del tumor son los receptores con actividad tirosina quinasa de la familia de ErbB: EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4). En los cuatro miembros de la familia el dominio extracelular está bastante conservado, como ocurre con el dominio proteína quinasa, salvo en el caso de HER3 que no posee actividad tirosina quinasa específica aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia. La unión de ligandos al dominio extracelular de EGFR, HER3 y HER4 induce la formación de hetero-oligómeros activos mientras que HER2 no se une a ninguno de los ligandos directamente, pero está en una conformación que se asemeja a un estado activado por el ligando favoreciendo la dimerización. La activación de HER2 y EGFR induce la transfosforilación de la pareja de dímero ERBB y estimula las vías señalización intracelulares implicadas en proliferación celular y supervivencia, RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR, quinasas Src y factores de transcripción STAT <sup>66</sup>. En muchos tumores, se produce una delección del dominio de unión al ligando del receptor EGFR provocando la activación constitutiva del receptor en ausencia de unión al ligando. El receptor activado fosforila las tirosinas en el dominio intracelular, proporcionando sitios de interacción para proteínas citoplasmáticas que contienen el dominio de homología SRC y otros dominios de unión. Estas interacciones desregulan la señalización en las vías mencionadas para promover el crecimiento descontrolado y contribuir al proceso de tumorigénesis. Además, otras alteraciones de EGFR se producen por amplificación en glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, esófago <sup>64</sup>. En cambio, HER2 es amplificado en aproximadamente el 20% de cánceres de mama. Además, se han reportado mutaciones somáticas en HER2 en varios cánceres incluyendo mama, pulmón, gástrico, vejiga y endometrio. La mayoría son mutaciones con cambio de sentido en los dominios tirosina quinasa y dominios extracelulares o duplicaciones / inserciones en un pequeño tramo dentro del exón 20. Las mutaciones de HER2 se observan casi exclusivamente en cánceres sin la amplificación del gen HER2 <sup>66</sup>.

Otra familia de oncogenes que juega un papel importante en la carcinogénesis son los miembros de la familia de proteínas RAS (KRAS, HRAS y NRAS), que codifican proteínas con actividad GTPasas que regulan la transducción de señales que subyacen a diversas actividades celulares, incluyendo proliferación, supervivencia, crecimiento, migración,

diferenciación o dinamismo citoesquelético. Las proteínas Ras ligadas a GTP convierten los estímulos extracelulares en cascadas intracelulares de señalización, que eventualmente evocan cambios en las actividades celulares; Esta señalización cesa cuando el GTP ligado a Ras se hidroliza a GDP. Por lo tanto, en las células normales, las proteínas RAS funcionan como conmutadores moleculares para cambios críticos en las actividades celulares, como la proliferación y supervivencia celular, y su correcta y estricta regulación es indispensable para mantener la homeostasis de las células<sup>67</sup>. Aproximadamente el 30% de los tumores humanos tienen mutaciones activadoras en una de las tres isoformas de RAS: KRAS, NRAS y HRAS. KRAS está mutada en un 25-30% de los tumores incluyendo al carcinoma colorrectal y el cáncer de pulmón de células no pequeña. Por el contrario, las mutaciones activadoras de NRAS y HRAS son menos frecuentes (8% y 3%, respectivamente). Las mutaciones activadoras ocurren con más frecuencia en los codones 12, 13 y 61, en los dominios catalíticos de la GTPasa, provocando que las proteínas Ras sean resistentes a la hidrólisis de GTP y por tanto a la inactivación de Ras. Esta activación constitutiva mantiene activas las vías de señalización intracelular sin la entrada de estímulos extracelulares, dando como resultado una proliferación celular incontrolada y una supervivencia celular anormal<sup>67,68</sup>.

#### I.1.3.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES.

Los genes supresores de tumores son genes que codifican proteínas implicadas en la proliferación y control del ciclo celular y que generalmente limitan la proliferación celular o frenan la progresión del ciclo celular en condiciones normales. Las alteraciones genéticas y funcionales de estos genes contribuyen a la carcinogénesis mediante su inactivación. Ambos alelos deben ser inactivados para que una célula pierda completamente la función de un gen supresor de tumores, por lo que las mutaciones son de carácter recesivo<sup>69</sup>.

Uno de los genes supresores más relevantes y estudiados conocido como el “guardián del genoma” es TP53 que codifica para la proteína p53 que es clave en el control de la expresión génica, la regulación del ciclo celular, la reparación del daño del DNA, el envejecimiento, la inhibición de la migración celular y la apoptosis<sup>70</sup>. En condiciones fisiológicas los niveles de p53 son bajos gracias al regulador negativo MDM2 que bloquea el dominio de transactivación de p53 y/o induce su degradación proteosomal mediante ubiquitinación<sup>71</sup>. Sin embargo, en respuesta a diferentes tipos de estrés que pueden afectar a la integridad del genoma (daño en el DNA, activación de oncogenes, hipoxia, replicación viral...) p53 se escinde de MDM2 y se desplaza desde el citoplasma hasta el núcleo donde va a regular la transcripción de genes implicados en el control de la proliferación celular, la reparación del daño al DNA y la inducción de la apoptosis y senescencia<sup>70</sup>. En particular, p53 induce la transcripción de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> y 14-3-3 $\sigma$  entre otros, para inhibir los complejos CDK/Ciclina, resultando en el detenimiento de

la proliferación mediante parada en la fase G1 y G2/M del ciclo celular, seguido de la activación de los mecanismos de reparación de DNA <sup>72,73</sup>. Si la reparación del daño no es viable, p53 promueve la inducción de apoptosis mediante activación y represión transcripcional de genes pro-apoptóticos y antiapoptóticos respectivamente, y mediante su translocación a la mitocondria donde va a promover la permeabilización de la membrana mitocondrial <sup>70,74</sup>.

Las mutaciones en TP53 son las alteraciones más frecuentes en tumores humanos con una prevalencia particularmente alta (mayor del 50%) en distintos tipos de cáncer incluyendo cáncer de ovario, pulmón, colorrectal, cabeza y cuello, páncreas, útero, mama y vejiga. Es interesante observar que p53 ejerce actividad dominante negativa cuando está mutada <sup>69</sup>. En algunos casos, se producen mutaciones sin sentido que resultan en la pérdida de la expresión de la proteína p53, no obstante, más frecuentemente se producen mutaciones de sentido erróneo, dando lugar a la sustitución de un solo aminoácido en la proteína p53 que se puede expresar de forma estable en la célula tumoral. Estas sustituciones se producen a lo largo de la proteína p53, pero con más frecuencia se agrupan dentro de la región de unión al DNA de p53, con seis aminoácidos "hotspot" que son más frecuentemente sustituidos. Por tanto, la mayoría de las proteínas p53 mutantes no reconocen el consenso canónico sobre la secuencia de DNA de los genes diana de p53 de tipo salvaje. Además, y debido a que p53 actúa normalmente como un tetrámero, estas proteínas mutantes también pueden funcionar como inhibidores negativos dominantes de cualquier p53 de tipo salvaje. Estas mutaciones generalmente conducen a una pérdida o disminución de la actividad de p53 <sup>75</sup>. Sin embargo, las proteínas mutantes p53 también pueden adquirir nuevas funciones oncogénicas a través de mutaciones de ganancia de función que promueven la transformación celular, la progresión tumoral, la metástasis y la quimiorresistencia <sup>76</sup>.

Por otra parte, otro de los genes supresores de gran importancia es el gen de Retinoblastoma (Rb) que codifica una proteína que interacciona con factores de transcripción mediando la activación o represión transcripcional. Su función más conocida es la de reprimir la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular a través de la interacción de pRb en estado hipofosforilado con la familia de factores de transcripción E2F. Durante la transición G1/S del ciclo celular, las señales mitogénicas conducen a la inducción de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) que promueven la hiperfosforilación de pRb para limitar su unión a los factores de transcripción E2F, resultando en la activación transcripcional de los genes de progresión celular <sup>77</sup>. El gen Rb está mutado en la mayoría de los retinoblastomas, osteosarcomas y cánceres de pulmón de células pequeñas, y con una menor frecuencia en otros tipos de cáncer. Sin embargo, la vía de la cual pRb forma parte (la vía

INK4A / Cyclin D1 / pRB / E2F) es inactiva en la mayoría de los cánceres por mutaciones en componentes de esta vía, como por ejemplo la amplificación de ciclina D1 en cáncer mama <sup>78</sup>.

Existen dos clases de genes supresores de tumores: los guardianes y los cuidadores. Los genes guardianes son los genes implicados en la regulación del crecimiento celular a través del control del ciclo celular y de mecanismos de supervivencia celular, mientras que los genes cuidadores están implicados en la reparación de daños producidos en el DNA <sup>79</sup>. Defectos de los mecanismos de reparación del DNA pueden resultar en la adquisición de un fenotipo mutador, contribuyendo a la inestabilidad genómica y a la adquisición de las propiedades de las células tumorales durante la tumorigénesis <sup>31,35</sup>. Se calcula que las células experimentan más de 20.000 eventos dañinos en el DNA y más de 10000 errores de replicación cada día que normalmente se reparan por vías específicas de reparación del DNA. La vía de reparación de escisión de base (BER) es responsable de detectar y reparar las rupturas de una sola hebra en el ADN, mientras que las vías de recombinación homóloga (HR) y de unión final no homóloga (NHEJ) reparan roturas de doble cadena. La ruta de reparación de desajuste (MMR) corrige las inserciones inadecuadas de nucleótidos, las supresiones y las incorporaciones de un solo nucleótido no coincidentes. La vía de reparación de escisión de nucleótidos (NER) corrige dímeros de pirimidina inducidos por radiación ultravioleta y otras lesiones que causan distorsión de hélice, y la vía de reversión directa (DR) elimina las metilaciones de DNA dañinas a través de O6-methylguanine DNA metiltransferasa (MGMT) <sup>80,81</sup>. Las alteraciones genéticas y funcionales de los genes implicados en estas vías (genes mutadores) como por ejemplo en DNA polimerasas, aumentan la probabilidad de que ocurran mutaciones conductoras en oncogenes y genes supresores de tumores que confieran una ventaja de crecimiento a las células promoviendo el desarrollo de un tumor maligno. De igual manera se ven favorecidos los ciclos repetitivos de mutagénesis que contribuirán a la aparición de otros subclones mutados y que junto con las mutaciones aleatorias son responsables de la heterogeneidad de los tumores y de la progresión tumoral y variabilidad de la respuesta a la terapia <sup>82-84</sup>. Recientemente, un estudio ha analizado las mutaciones y las alteraciones en el número de copias en cáncer de páncreas. Este estudio ha identificado nuevos genes candidatos conductores de tumorigénesis y ha revelado una fuerte asociación entre la inestabilidad genómica y la inactivación de los genes de reparación del DNA <sup>85</sup>. Otro estudio reciente ha analizado una lista exhaustiva de genes de reparación del DNA en una gran variedad de tipos de cáncer. El gen más frecuentemente mutado en todos los tipos de cáncer evaluados fue TP53 (27,6% de todos los cánceres) Además otros genes mutados fueron MLL3, ATM, BAP1 y BCRA2, entre otros con una frecuencia de mutación de 5,2%, 4,8%, 2,5% y 2,5%, de todos los cánceres, respectivamente <sup>81</sup>.

#### I.1.4. EPIGENÉTICA DEL CÁNCER.

La epigenética puede definirse como los mecanismos que inician y mantienen patrones heredables de función y regulación genética sin alterar la secuencia del genoma. Estos mecanismos explican cómo dos genotipos idénticos pueden dar lugar a diferentes fenotipos en respuesta al mismo estímulo ambiental. Los cuatro tipos principales de mecanismos epigenéticos son: modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas, metilación del DNA, remodelado de la cromatina y RNAs no codificantes. En los últimos años la epigenética ha cobrado una mayor relevancia en el proceso de iniciación y progresión del cáncer ya que la secuenciación completa del exoma de miles de tumores ha revelado multitud de mutaciones inactivadoras en genes que controlan el epigenoma. Estas mutaciones tienen el potencial de alterar los patrones de metilación del DNA, las modificaciones de las histonas y el posicionamiento de los nucleosomas y, por lo tanto, la expresión génica. Por tanto, la alteración genética del epigenoma contribuye al cáncer, así como el proceso epigenético puede contribuir a causar mutaciones puntuales y desactivar las funciones de reparación del DNA, poniéndose de manifiesto la alteración de la interacción epigenética-genética en cáncer <sup>86</sup>.

**Metilación del DNA:** La alteración de los patrones normales de metilación del DNA fue la primera marca epigenética asociada al cáncer que causa una alteración de la expresión génica. Estas alteraciones son de tres tipos: hipermetilación, hipometilación y pérdida de *imprinting*. La hipermetilación consiste en la metilación de sitios que normalmente no están metilados, principalmente en las islas CpG de las regiones promotoras de genes supresores de tumores, conduciendo a la represión transcripcional de estos genes y por consiguiente a la pérdida de su función <sup>87</sup>. La mayoría de las islas CpG de los promotores en las células normales somáticas, permanecen en su mayor parte no metiladas mientras que se han descrito que genes implicados en el control del ciclo celular y en la reparación del DNA incluyendo RB, BRCA1/2, PTEN, MGMT, CDKN2B y RASSF1A son hipermetilados en cáncer <sup>86</sup>. La metilación del DNA en células está regulada por una familia de DNA metiltransferasas (DNMT) que catalizan la transferencia de grupos metilo de S-adenosil-L-metionina a la posición 5' de las bases de citosina en el dinucleótido CpG. La hipometilación consiste en pérdidas de metilación en regiones del genoma pobres en genes con elementos repetitivos, retrotransposones e intrones, favoreciendo la inestabilidad genómica. Durante la progresión del tumor, el grado de hipometilación del DNA genómico aumenta a medida que la lesión progresa desde lesiones preneoplásicas a un cáncer invasivo <sup>87</sup>. Varios estudios han descrito hipometilación del DNA en varios tumores, incluyendo cáncer colorrectal <sup>88</sup>, cáncer de mama <sup>89</sup>, carcinoma hepatoceular <sup>90</sup>, osteosarcoma <sup>91</sup> y pulmón <sup>92</sup> entre otros.

**Modificaciones post-traduccionales de las histonas:** Las histonas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales conduciendo a la activación o represión de la expresión, en función de los aminoácidos modificados, y el tipo y número de modificaciones <sup>93</sup>. Estas señales actuarían como un código que indicarían si la cromatina está activa, es decir nucleosoma relajado y gen con capacidad de expresarse, o inactiva, es decir nucleosoma condensado y gen silenciado. Este código no sólo contemplaría la secuencia nucleotídica del DNA (código genético), sino también las modificaciones de su entorno <sup>94</sup>. Estudios han revelado que el perfil general de las modificaciones de las histonas está alterado en las células cancerosas pudiendo afectar al reclutamiento de factores de transcripción y componentes de la maquinaria de transcripción, y por consiguiente la alteración de la expresión génica <sup>95</sup>. Estos patrones de modificación de histonas están regulados por las enzimas histona acetiltransferasas (HAT) y deacetilasas (HDAC), que introducen y eliminan grupos acetilo, respectivamente; mientras que las enzimas histona metiltransferasas (HMT) y las desmetilasas (HDM) introducen y eliminan los grupos metilo, respectivamente. Frecuentemente las enzimas HDACs están sobreexpresadas en varios tipos de cáncer, aunque hay evidencias que también puede funcionar como supresores de tumores manteniendo la estructura de la cromatina y estabilizando el genoma <sup>96</sup>. Respecto a las HMTs, cabe destacar la frecuente desregulación en cáncer de las proteínas del grupo Polycomb (PcG), que controlan la accesibilidad de los elementos reguladores de los genes a la maquinaria de transcripción. En este sentido, un master regulador epigenético es la proteína EZH2, que junto con SUZ12 y EED, forman el complejo represivo Polycomb 2 para catalizar la trimetilación de la histona H3 en la Lys 27 (H3K27), y hay evidencias que EZH2 se sobreexpresa en varios tipos de cánceres incluyendo próstata, mama, pulmón y vejiga <sup>97</sup>.

**Remodelado de la cromatina:** En la célula existen varios complejos proteicos con la capacidad de desplazar los nucleosomas para dar accesibilidad a la maquinaria transcripcional, y que ésta pueda regular la transcripción de los genes. Para debilitar el contacto nucleosoma-DNA y permitir el reposicionamiento de los nucleosomas es necesaria energía que procede de la hidrólisis del ATP, de forma que los complejos proteicos remodeladores son ATP-dependientes. Igualmente, estos complejos remodeladores pueden ocultar regiones de DNA previamente expuestas para facilitar el silenciamiento de genes, por lo que, los complejos remodeladores pueden regular la expresión de los genes positiva y negativamente <sup>98</sup>. Estudios han revelado la importancia de la maquinaria de remodelación de la cromatina en el inicio y progresión tumoral ya que muchos de ellos están desregulados por diferentes mecanismos en varios tipos de cánceres <sup>99-101</sup>.

**RNAs no codificantes (ncRNAs):** Los proyectos de secuenciación del genoma a gran escala han revelado que hasta el 70% del genoma humano se transcribe, del cual, menos del 2% se traducen en proteínas, mientras que la mayoría del transcriptoma está constituido por RNA no codificante <sup>102</sup>. Los ncRNAs son muy diversos en su estructura y en su función biológica entre las cuales se encuentran el control de la diferenciación celular, proliferación, apoptosis, respuesta al estrés y la estabilidad del genoma, por lo que defectos epigenéticos y genéticos en ncRNAs y su maquinaria de procesamiento se asocian con el inicio y la progresión del cáncer. En los últimos años, gracias al desarrollo de la secuenciación del RNA (RNA-seq), de la bioinformática y al interés creciente por caracterizar funcionalmente los ncRNAs se han descubierto una gran variedad de ncRNAs incluyendo a ncRNA de tamaño grande (lncRNA), microRNAs (miRNAs), RNAs circulares (circRNAs), y diversos RNAs de transferencia (tRNAs).

**miRNAs:** Los miRNAs son pequeñas moléculas endógenas de RNA no codificante de cadena sencilla que generalmente regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional por interacción directa con las regiones 3' no traducidas (3'-UTR, por sus siglas en inglés, 3' untranslated region) de los RNA mensajeros diana, causando su degradación o represión de la expresión. Los miRNAs y sus dianas constituyen una red regulatoria extraordinariamente compleja ya que un único miRNA puede regular la expresión de muchos genes diferentes, y por el contrario, diferentes miRNAs pueden regular de forma cooperativa la expresión de una diana <sup>103</sup>. Diversos estudios han revelado la desregulación de miRNAs en prácticamente todos los tipos de cáncer y la implicación de éstos en el inicio y la progresión tumoral <sup>104</sup>.

**lncRNA:** Los lncRNA son moléculas largas de RNA no codificante (mayor de 200 nucleótidos) con características estructurales similares a los mRNA ya que contienen el extremo cap 5', exones, intrones y una cola de poli(A), pero carecen del potencial de codificación de proteínas <sup>105</sup>. Estas moléculas desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético, transcripcional y post-transcripcional <sup>106</sup>. Una de las funciones más importantes de lncRNAs es la regulación epigenética de la expresión ya que son capaces de actuar a modo de andamios para afectar el ensamblaje de los complejos proteicos, repercutiendo en la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas <sup>107</sup>. Otra relevante función atribuida a los lncRNAs, es la de actuar como esponjas de miRNAs (miRNA sponges) ya que presentan sitios de unión de miRNAs para regular negativamente la expresión de los mismos <sup>108</sup>. Recientes estudios han mostrado la alteración de los perfiles de expresión de estas moléculas en diversos tumores respecto del tejido normal, y se ha demostrado que la desregulación de lncRNAs puede contribuir a la tumorigénesis a través de la regulación anormal de los procesos celulares relacionados con el cáncer, como



son la proliferación, la invasión, la metástasis, la apoptosis y la resistencia a múltiples fármacos <sup>107,109–111</sup>. Además, los lncRNAs podrían actuar como marcadores pronóstico de distintos tumores <sup>112,113</sup>

circRNAs: Los circRNAs son moléculas largas de RNA no codificante, que se caracterizan por sus estructuras en bucle cerrado covalentemente, que resultan del empalme no canónico de los pre-mRNA lineales. Estudios apuntan a que los circRNAs son moléculas abundantes, estables, conservadas y que no se trata de productos producidos de forma aleatoria durante el proceso de corte y empalme por el espliceosoma. Recientes estudios han mostrado la desregulación de estas moléculas en cáncer, sugiriendo que estas moléculas tienen un papel relevante en el inicio y desarrollo de tumores, así como se sugiere que pueden funcionar como biomarcadores diagnóstico de algunos tipos de cáncer, incluyendo mama <sup>114</sup> colorrectal <sup>115</sup>, hepatocelular <sup>116</sup>, gástrico <sup>117</sup> y carcinoma oral de célula escamosa <sup>118</sup> entre otros. Su principal función es la de actuar como esponjas de miRNAs ya que frecuentemente poseen varios sitios de unión de miRNAs para regular negativamente su expresión <sup>119</sup>. Otras de las funciones que se atribuyen a estas moléculas son la de interactuar con proteínas de unión a RNA y regular la transcripción de genes mediante diversos mecanismos <sup>120</sup>.

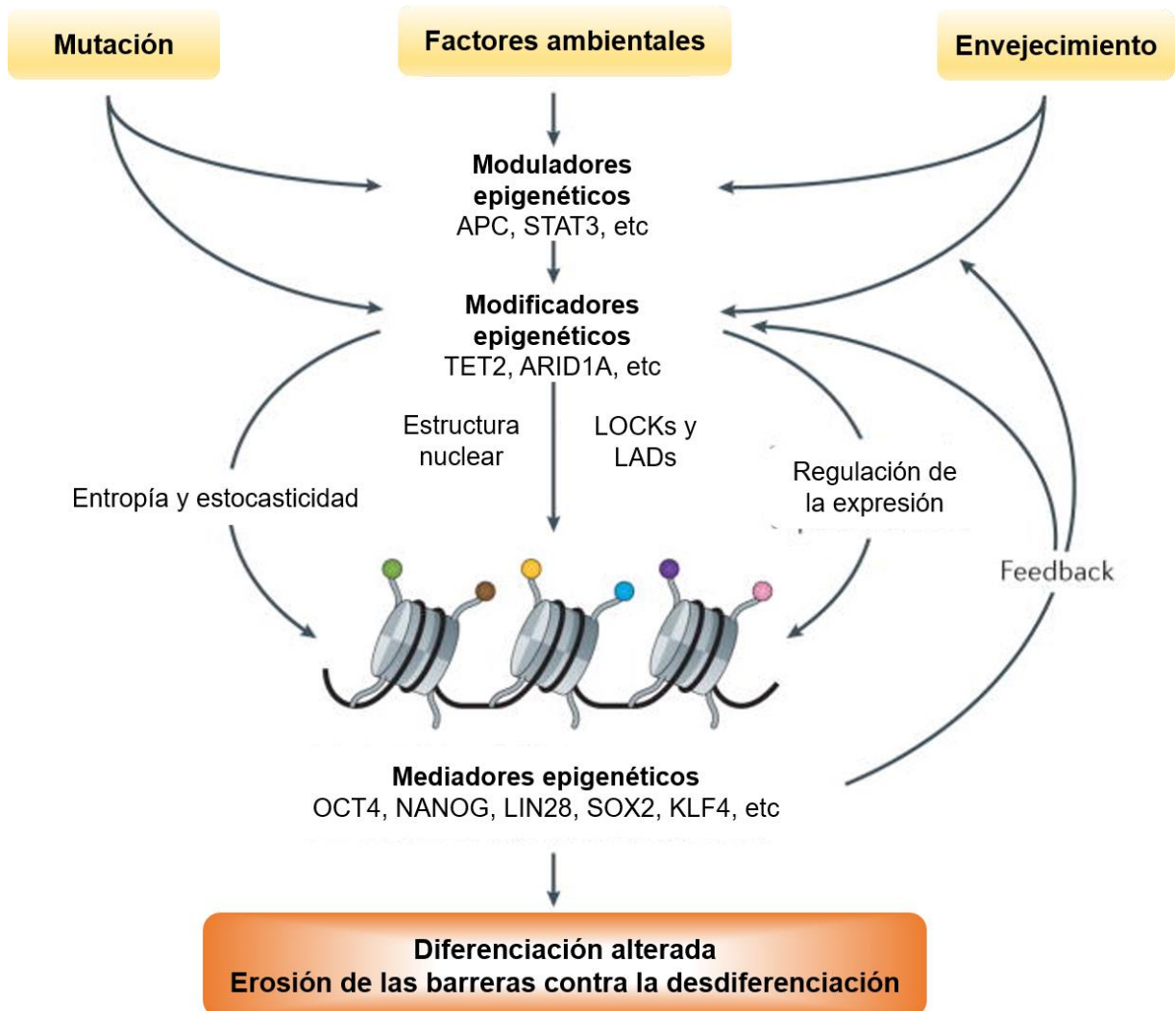
tRNAs: Durante muchos años se han considerado a los tRNAs únicamente como transportadores de los aminoácidos a los ribosomas durante la traducción del mRNA con poca o nula función regulatoria. Sin embargo, en los últimos años varios estudios independientes empleando la secuenciación de alto rendimiento NGS, han demostrado la existencia de pequeñas especies de RNA procedentes de tRNAs llamados fragmentos derivados de tRNA (tRFs) <sup>121–123</sup>. En experimentos diseñados originalmente para perfilar la expresión de miRNAs, las lecturas derivadas de ncRNA nucleolar de pequeño tamaño (snoRNAs) y tRNAs constituyen sólo el 1,5-10% de la biblioteca total, por lo que, con frecuencia los tRFs se pasan por alto como artefactos de secuenciación o productos de degradación de los tRNAs maduros. Sin embargo, el análisis comparativo de estas pequeñas poblaciones de RNA y el reanálisis de los datos de secuenciación existentes demostraron que los tRFs se conservan evolutivamente a lo largo de las especies <sup>124</sup>. Estudios recientes han mostrado que los tRFs están involucrados en la inhibición de la traducción dependiente e independiente de complementariedad de secuencia en células humanas así como en el silenciamiento genes de forma similar a los miRNAs a través de la unión a proteínas Argonata <sup>125,126</sup> Además, varias investigaciones han demostrado que estas moléculas están reguladas por condiciones de estrés promoviendo el ensamblaje de gránulos de estrés que desempeñan un papel importante de señalización de la hipoxia y la inanición inducida por el estrés en las células tumorales. Curiosamente, también hay evidencia de que los tRNAs pueden inhibir la apoptosis

a través de la asociación con el citocromo-C citosólico, evitando su interacción con Apaf-1 y bloqueando la posterior activación de la caspasa-9<sup>125</sup>. De forma importante, varios estudios han revelado la desregulación de tRFs en varios tipos de cáncer y la implicación de los mismos en la regulación de la proliferación celular y la progresión tumoral<sup>123,127-129</sup>.

Toda la maquinaria epigenética actúa en conjunto para asegurar una correcta conformación de la cromatina y la homeostasis de todos los mecanismos epigenéticos. Sin embargo, la homeostasis entre los distintos mecanismos epigenéticos se altera durante el cáncer. Por ejemplo, varios estudios han demostrado que durante el cáncer los genes que codifican para las proteínas del grupo Polycomb son propensos a estar hipermetilados en el cáncer, sugiriendo un vínculo funcional entre estos dos sistemas de represión<sup>93,130</sup>. Otro ejemplo de interacción del sistema epigenético que se altera durante la tumorigénesis son los componentes de la maquinaria epigenética, DNMTs y modificadores de histonas que pueden ser regulados por miRNAs y viceversa. En este sentido, estudios han puesto de manifiesto que los miRNAs son capaces de regular la expresión de los modificadores epigenéticos DNMTs, HDACs y Polycomb, y de forma contraria, los genes de los miRNAs pueden estar regulados epigenéticamente a través de la metilación de los dinucleótidos CpG y cambios en la modificación de histonas<sup>93,131-133</sup>. Por otro lado, la interacción bidireccional genoma-epigenoma se ve afectada durante la tumorigénesis, ya que estudios han revelado que la metilación de los dinucleótidos CpG induce la generación de puntos calientes de mutación en los tejidos somáticos durante el cáncer. Además, se han descrito múltiples mutaciones de la maquinaria epigenética incluyendo DNMTs, enzimas modificadoras de histonas y miRNAs entre otros<sup>134-136</sup>.

Recientemente se ha propuesto un sistema de clasificación funcional epigenético de los genes implicados en cáncer en tres categorías: genes modificadores epigenéticos, genes mediadores y genes moduladores (Figura 6). Los genes modificadores son los genes cuyos productos modifican el epigenoma de forma directa a través de la metilación del DNA, la modificación postraducciona de la cromatina o la alteración de la estructura de la cromatina. Frecuentemente estos genes sufren alteraciones genéticas y epigenéticas. Los mediadores epigenéticos son aquellos genes regulados por modificadores epigenéticos y con frecuencia se superponen con los genes implicados en la reprogramación de células madre, y parecen ser responsables de la aparición de CSCs. Estos genes raramente están mutados y se encuentran frecuentemente bajo control epigenético. Por último, los moduladores epigenéticos son los genes situados por encima de los de los genes modificadores y mediadores, encargados de transducir las señales procedentes del microambiente, las lesiones, la inflamación, envejecimiento y otras formas de estrés a los modificadores epigenéticos para

alterar los estados de cromatina en oncogenes y genes supresores de tumores y, para promover la adquisición temprana de características *stem* durante el desarrollo del cáncer. Por tanto, estos genes que pueden estar mutados o no, son responsables de la activación o represión de la maquinaria epigenética en cáncer. Los genes moduladores epigenéticos incluyen muchos genes con papeles clave en la señalización oncogénica convencional <sup>137</sup>.



**Figura 6.** Clasificación epigenética de los genes y su contribución a la malignidad. El envejecimiento, la inflamación y la exposición crónica a carcinógenos inciden sobre los moduladores epigenéticos que ajustan y regulan la función de los modificadores epigenéticos para producir cambios en la expresión de mediadores epigenéticos cuyos productos genéticos regulan el potencial de desarrollo. La exposición crónica a un entorno fluctuante y predisponente al cáncer y al envejecimiento promueven la selección de la heterogeneidad epigenética en poblaciones vulnerables de células madre somáticas. Frecuentemente, se seleccionan mutaciones en moduladores y modificadores epigenéticos durante el desarrollo del cáncer, lo que conduce no sólo a un aumento de la proliferación celular, sino también a la expresión no programada de mediadores que, a su vez, inhiben la diferenciación y promueven la plasticidad epigenética al afectar a los moduladores epigenéticos y modificadores en un circuito de retroalimentación. El mecanismo de la inestabilidad epigenética implica la erosión de las barreras contra la dediferenciación y la aparición de bloques hipometilados que contienen los dominios más variables expresados del genoma tumoral (Modificada de Feinberg y colaboradores, 2016 <sup>137</sup>).

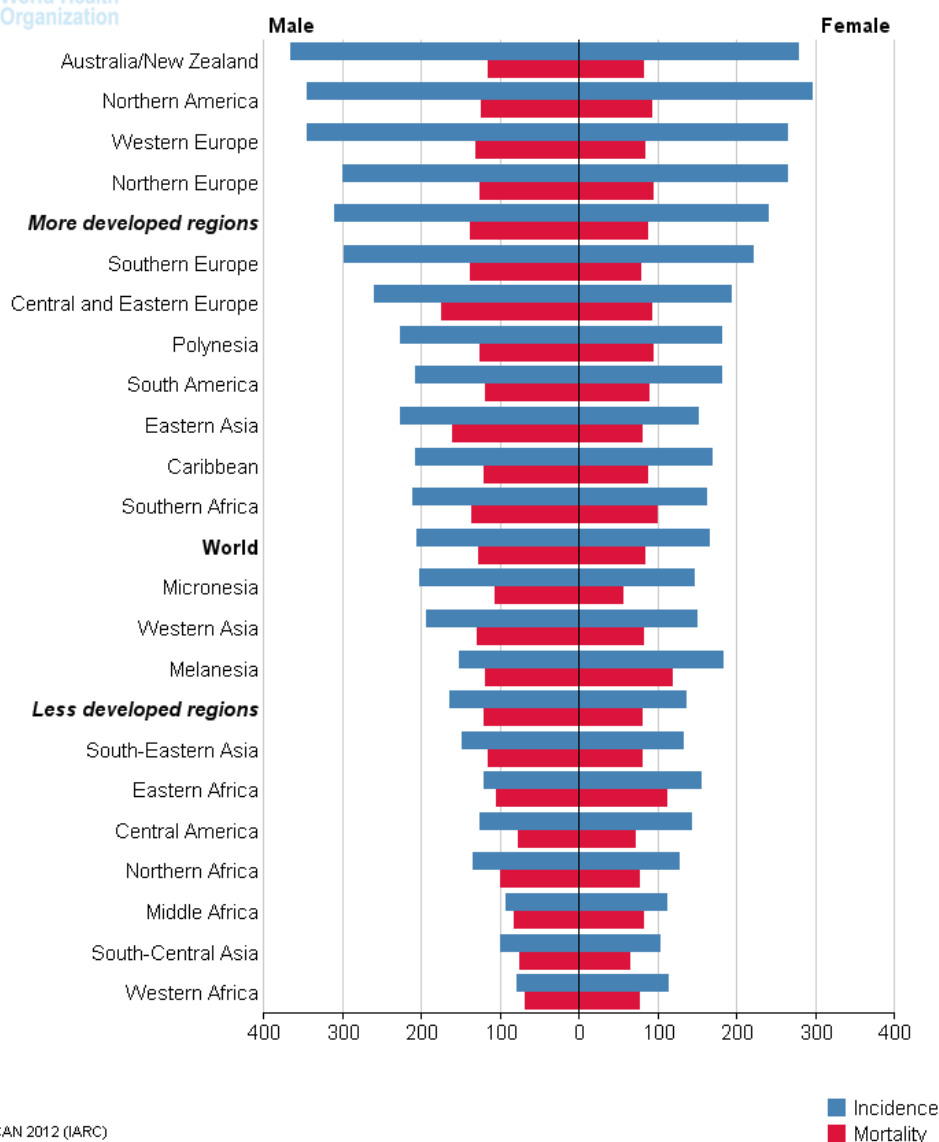
## I.2. CÁNCER DE MAMA.

### I.2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado en mujeres de la gran mayoría de los países del mundo, con 1,7 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012, lo que supone un 25% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres <sup>138</sup>. A pesar de que el cáncer de mama es el cáncer más frecuente a nivel global existen diferencias en la tasa de incidencia en función de la región, siendo mayor en las regiones desarrolladas económicamente con respecto a las regiones en vías de desarrollo (Figura 7). Las mayores tasas de incidencia se observaron en Estados Unidos, Canadá, Europa occidental y del norte, Australia y Nueva Zelanda, mientras que las menores correspondieron a África central y oriental, Asia oriental y meridional y Centroamérica. Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias en los factores de riesgo (factores hormonales, reproductivos) y a la disponibilidad o accesibilidad a servicios de detección temprana <sup>138,139</sup>. De todos modos, durante los últimos años, la incidencia de cáncer de mama está incrementándose tanto en los países desarrollados económicamente como en los países en desarrollo. En los países desarrollados, el incremento de la detección temprana mediante mamografía y del uso de terapia hormonal post-menopáusica así como el aumento de los índices de obesidad han contribuido al aumento de la incidencia de cáncer de mama, mientras que en los países en vías de desarrollo el incremento de la incidencia es debido al incremento de la esperanza de vida, la adaptación a la dieta occidental y al acceso a anticonceptivos que disminuyen la tasa de fecundidad y retrasan la edad del parto <sup>140</sup>.

Por otro lado, la tasa de mortalidad a nivel global se situó en 521.900 muertes por cáncer de mama en 2012, siendo este cáncer la primera causa de muerte en mujeres de países en desarrollo y la segunda en países desarrollados <sup>140</sup>. La alta tasa de mortalidad de los países menos desarrollados es debida fundamentalmente a la detección tardía de la enfermedad y al acceso limitado a un tratamiento asequible y de calidad. En cambio, las tasas de mortalidad moderadas de los países desarrollados a pesar de las altas tasas de incidencia reflejan una mayor supervivencia gracias a la detección temprana durante el diagnóstico y a un mayor acceso a tratamientos eficaces <sup>138</sup>.

Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM: <http://www.seom.org>) en España la tasa de incidencia y de mortalidad de cáncer de mama se situó en 25.215 (29%) y 6.075 (15,5%) casos, respectivamente en el año 2012, siendo el cáncer más frecuente y que más muertes provoca en la población femenina española. La supervivencia en los últimos años se ha incrementado situándose por encima de la media europea con un 83% frente al 78%.



GLOBOCAN 2012 (IARC)

Figura 7. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad de cáncer de mama por 100000 hombres y mujeres en 2012 (Fuente: International Agency for Research on Cancer (IARC: <http://www.iarc.fr>)).

## I.2.2. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial en la cual están implicados tanto factores inherentes como factores extrínsecos. Entre estos factores, se encuentran la edad, el sexo, la raza, factores reproductivos y hormonales, factores relacionados con los hábitos de vida, densidad del tejido mamario, lesiones precancerosas, antecedentes personales de cáncer de mama, antecedentes familiares y mutaciones en genes de susceptibilidad genética de cáncer de mama. La identificación de factores extrínsecos o modificables podría contribuir al desarrollo de estrategias de prevención que disminuyan la incidencia del cáncer de mama.

**Edad y sexo:** La edad y el sexo son dos factores de riesgo inherentes que no se pueden modificar. El riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa con la edad, probablemente, debido a un mayor número de ciclos menstruales acumulados a lo largo de la vida. A partir de los 40 años el riesgo va aumentando hasta alcanzar la edad de comienzo de la menopausia, tras la cual sigue aumentando pero a un ritmo menor. Un 77% de los cánceres de mama son diagnosticados en mujeres mayores de 50 años, mientras que un 7% son diagnosticados en mujeres menores de 40 años <sup>141,142</sup>. A pesar de que el riesgo de padecer cáncer de mama aumente con la edad, las mujeres jóvenes menores de 40 años tienen un peor pronóstico de la enfermedad debido a que es más probable que presenten tumores más agresivos, menos diferenciados y más propensos a ser receptores hormonales negativos <sup>143,144</sup>.

Por otra parte, otro factor de riesgo importante es el sexo, siendo el sexo femenino el grupo más afectado por la enfermedad mientras que el cáncer de mama es diagnosticado esporádicamente a los hombres constituyendo menos del 1% de los cánceres de mama. Sin embargo, el cáncer de mama en hombres tiene un peor pronóstico que en mujeres <sup>145</sup>.

**Raza u origen étnico:** Las mujeres de raza negra y del sur de Asia tienen una menor incidencia de cáncer de mama que las mujeres de raza blanca según un estudio realizado en Inglaterra <sup>146</sup>. Además, otro estudio reveló una menor incidencia de cáncer de mama en las mujeres latinas, mujeres nativas americanas, mujeres nativas de Alaska y mujeres asiáticas en comparación con las mujeres blancas en Estados Unidos. Estas diferencias son en gran medida, debidas a diferencias en otros factores de riesgo conocidos como son los factores reproductivos y factores relacionados con el estilo de vida. Probablemente, los cambios en las exposiciones a los factores de riesgo de cáncer de mama por las generaciones más jóvenes pueden alterar las diferencias étnicas en la incidencia del cáncer de mama en el futuro <sup>146,147</sup>. También es conocido que los cánceres de mama en las mujeres afroamericanas tienen más características de mal pronóstico (alto grado del tumor y ausencia de receptores hormonales), lo que puede contribuir a su mayor mortalidad después del diagnóstico <sup>147</sup>.

**Susceptibilidad genética:** Aproximadamente entre el 10% y el 30% de los casos de cáncer de mama se atribuyen a factores hereditarios, y sólo un 5%-10% de los casos de cáncer de mama se identifican con un fuerte componente hereditario. La incidencia de cáncer de mama es aproximadamente dos veces mayor en familiares de primer grado de pacientes con cáncer de mama. Este riesgo aumenta con el número de parientes afectados y es mucho mayor para las mujeres con parientes afectados a una edad temprana. Los alelos de susceptibilidad genética tienen frecuencias muy diferentes, y confieren diferentes riesgos de enfermedad. Las variantes genéticas para el cáncer de mama pueden clasificarse en alelos de alta, moderada y baja penetrancia. Los genes de alta penetrancia están asociados con un

riesgo relativo de cáncer superior a 5. Los genes de baja penetrancia se presentan con un riesgo relativo de alrededor de 1,5, mientras que los genes de penetrancia intermedia confieren riesgos de cáncer relativos de 1,5 a 5 <sup>148,149</sup>.

Los genes de alta penetrancia más conocidos son BRCA1 y BRCA2 que son dos genes supresores de tumores implicados en la reparación del DNA y, por tanto, en el mantenimiento de la estabilidad genómica. BRCA1 codifica una fosfoproteína nuclear que se combina con otros supresores de tumores, sensores de daño del DNA y transductores de señales para formar el complejo de vigilancia del genoma asociado a BRCA1. Las mutaciones hereditarias en BRCA1 predisponen a un alto riesgo de cáncer de mama y de ovario en un 71% y 40%, respectivamente. Los cánceres relacionados con BRCA1 tienen características patológicas distintas y generalmente se caracterizan por ser cánceres de mama triples negativos <sup>150-152</sup>. Por otra parte, BRCA2 está implicado en la vía de recombinación homóloga que repara las rupturas del DNA de doble cadena. Las mujeres portadoras de mutaciones en BRCA2 presentan un riesgo de desarrollo de cáncer de mama alrededor del 26%-84%, y un riesgo de desarrollo de cáncer de ovario del 20%. Los tumores de mama relacionados con BRCA2 suelen expresar receptores de estrógeno y progesterona y tienden a tener características similares a los cánceres de mama esporádicos, a diferencia de los cánceres relacionados con BRCA1 <sup>153-155</sup>.

Otros genes de susceptibilidad genética de alta penetrancia son TP53, PTEN, STK11/LKB1, y CDH1, cuyas mutaciones aumentan el riesgo de cáncer de mama en más de un 90%, hasta un 50%, hasta un 85% y alrededor de 40-54%, respectivamente <sup>156</sup>.

Entre los genes de penetrancia intermedia se encuentran CHEK2, PALB2, ATM y BRIP1, entre otros. El gen CHEK2 codifica para una serina treonina quinasa implicada en la regulación del ciclo celular y en la transducción de señales de daño del ADN a las proteínas de reparación. Ciertas mutaciones en CHEK2 se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama femenino <sup>157</sup>. PALB2 es un gen que codifica para una proteína que interactúa con BRCA2 durante la recombinación homóloga y la reparación de la rotura de la doble cadena de DNA. El riesgo relativo de cáncer de mama asociado con las mutaciones de PALB2 es de aproximadamente 2,3 <sup>148</sup>. El gen ATM codifica para una proteína quinasa serina treonina cuyos dominios catalíticos están estructuralmente relacionados con el dominio catalítico 3 quinasa fosfatidilinositol (PI3K), y desempeña importantes funciones en la regulación de los puntos de control del ciclo celular y en la reparación del DNA. Los portadores de mutaciones en heterocigosis o en homocigosis pueden presentar el síndrome de ataxia telangiectasia con riesgo aumentado de neoplasias malignas incluyendo el cáncer de mama <sup>158,159</sup>. El gen BRIP1

codifica para una proteína que interactúa con BRCA1, cuyas mutaciones aumentan el riesgo relativo de cáncer de mama dos veces <sup>148</sup>

Por último, gracias a los estudios de asociación genética (GWAS) se han descubierto una serie de locis de susceptibilidad de cáncer de mama asociados a un ligero aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer de mama, entre los que se incluyen MAP3K1, FGFR2, LSP1, TNRC19, H19 y CASP8 <sup>148</sup>.

**Tumores benignos de mama:** Las lesiones proliferativas sin atipia incluyendo la hiperplasia ductal de tipo habitual, los papilomas intraductales, la adenosis esclerosante y los fibroadenomas pueden aumentar el riesgo de desarrollo de cáncer de mama hasta dos veces en comparación con las mujeres que no presentan estas lesiones. Sin embargo, la hiperplasia atípica confiere un riesgo de desarrollo de cáncer de mama en torno a 4-5 veces más que la población general <sup>160</sup>.

**Factores reproductivos y hormonales:** Los ovarios producen hormonas esteroides que afectan directamente el desarrollo y la función de la mama. Además, es conocido que las hormonas femeninas tienen un papel importante en la etiología del cáncer de mama. En este sentido, los niveles elevados de hormonas sexuales endógenas aumentan el riesgo de cáncer de mama tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas. De hecho, los altos niveles circulantes de testosterona, estradiol, estrona, estrona-sulfato y androstendiona en las mujeres postmenopáusicas se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama <sup>161,162</sup>. Por tanto, la administración de hormonas exógenas podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama. En este sentido, el uso de terapia de remplazo hormonal postmenopáusica, especialmente los combinados estrógeno-progestina y estrógeno-testosterona, se asocian con un aumento en el riesgo de cáncer de mama, siendo este aumento proporcional a la duración del tratamiento. Algunos estudios han sugerido que el uso de anticonceptivos orales hormonales aumenta el riesgo de cáncer de mama, siendo mayor durante la utilización de la anticoncepción. También se ha descrito que el riesgo de cáncer de mama disminuye significativamente 10 años después de suspender la terapia hormonal independientemente de la duración de su uso <sup>163,164</sup>

Además, factores reproductivos como la edad temprana en la menarquia (< 12 años) y la edad tardía en la menopausia (> 55 años) se han asociado a un mayor riesgo de cáncer de mama a través de mecanismos hormonales. Cada año de retraso en la edad de menarquia aumenta el riesgo de cáncer de mama en un 5%, mientras que cada año de retraso en el inicio de la menopausia confiere un aumento del 3% en el riesgo <sup>165-167</sup>.



Otros factores como la nuliparidad y la edad tardía del primer parto están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama. La incidencia de cáncer de mama en las mujeres que tuvieron su primer parto a los 20, 25 y 35 años fue un 20% menor, 10% menor y 5% superior, respectivamente, en comparación con las mujeres nulíparas <sup>168</sup>. El embarazo es un factor protector ya que induce una disminución en el número de células luminales sensibles a las hormonas y una disminución de la regulación de la vía de señalización de Wnt en las células progenitoras, haciendo que el tejido mamario sea menos susceptible a carcinógenos. Además, induce cambios hormonales a largo plazo, como la reducción de los niveles de prolactina y estrógeno y el aumento de los niveles de globulina vinculante a las hormonas sexuales, proporcionando una mayor protección contra el cáncer de mama <sup>165</sup>.

La lactancia materna tiene un efecto protector contra el desarrollo del cáncer de mama, probablemente por el retraso en el retorno de los ciclos ovulatorios regulares y la disminución de los niveles endógenos de hormonas sexuales. Se ha estimado que hay una reducción del 4,3% por cada año de lactancia materna <sup>168</sup>.

**Factores relacionados con los hábitos de vida:** Los factores relacionados con los hábitos de vida son factores extrínsecos que modifican el riesgo de ocurrencia de cáncer de mama. Entre estos factores, encontramos los hábitos dietéticos que pueden conducir a la obesidad. Varios estudios han demostrado que la obesidad, definida como índice de masa corporal (IMC) > 30 kg/m<sup>2</sup>, aumenta el riesgo de cáncer de mama postmenopáusico, atribuido fundamentalmente a un aumento de los niveles circulantes de estrógenos sintetizados en el tejido adiposo de las mujeres obesas y a un aumento de la secreción de adipocinas proinflamatorias que favorece un microambiente óptimo para el inicio y desarrollo tumoral. Al mismo tiempo, se ha demostrado una asociación inversa entre la obesidad y los niveles sanguíneos de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), lo que a su vez contribuye a mayores concentraciones de estradiol libre en la circulación <sup>162,169</sup>. Por otra parte, no hay evidencias consistentes de que una dieta rica en grasas saturadas y colesterol incremente el riesgo de cáncer de mama por la diversidad de resultados a favor y en contra de los estudios <sup>170-172</sup>. Así mismo, varios estudios han revelado que una mayor ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente mayor proporción de omega 3 respecto de omega 6, está asociada a un menor riesgo de cáncer de mama <sup>173,174</sup>.

El consumo de alcohol incluyendo una ingesta baja y moderada, se ha asociado de forma consistente con un aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas, a través del aumento de los niveles circulantes de estrógenos, la producción de carcinógenos como el acetaldehído y el estrés oxidativo generado <sup>175,176</sup>.

Por último, la actividad física regular actúa como un factor protector contra el cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas, ya que múltiples estudios han demostrado que la práctica de actividad física durante siete horas o más por semana reduce en un 20% el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Entre los mecanismos que median el efecto protector de la actividad física se encuentran la disminución de los niveles circulantes de hormonas sexuales y el aumento de SHGB, que *per se* contribuye a disminuir el estradiol libre en circulación, la generación de un microambiente antiinflamatorio y la mejora del sistema inmune y de los mecanismos antioxidantes para aumentar la resistencia al estrés oxidativo <sup>177</sup>.

### **I.2.3. HETEROGENEIDAD Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.**

La coexistencia de subpoblaciones de células cancerosas que difieren en sus características genéticas, fenotípicas o de comportamiento dentro de un tumor primario y entre un tumor primario y su metástasis ponen de manifiesto la heterogeneidad espacial y temporal existente en el cáncer de mama, lo que conduce a su vez a diferencias en los patrones de respuesta a diversas modalidades de tratamiento y resultados clínicos. Esta heterogeneidad puede atribuirse a factores genéticos y epigenéticos, y a mecanismos hereditarios como las respuestas adaptativas o la fluctuación en las vías de señalización. Por tanto, las biopsias de una pequeña región tumoral podrían no proporcionar una caracterización representativa de las alteraciones genéticas, epigenéticas y / o fenotípicas que se encuentran en el tumor en su conjunto. Por ejemplo, el estado de HER2 puede variar entre los tumores primarios y sus respectivas metástasis o células tumorales circulantes. Por lo tanto, heterogeneidad intra-tumoral plantea un enorme desafío para la caracterización de biomarcadores y mejorar las terapias existentes <sup>178</sup>.

Una caracterización exhaustiva de la heterogeneidad permite la categorización o clasificación de los pacientes en subgrupos clínicamente relevantes, con diferente pronóstico y aproximación terapéutica. La clasificación del cáncer de mama ha sido abordada atendiendo a diferentes aspectos entre los que se incluyen la procedencia histopatológica, el grado del tumor, el estadio, la presencia o ausencia de receptores de membrana entre otros, y más recientemente la clasificación por subtipos moleculares. Para una mejora en la evaluación pronóstica y predictiva del cáncer de mama y en la toma de decisiones terapéuticas, la combinación de varios de estos sistemas de clasificación son implementados en la práctica clínica <sup>179,180</sup>.

#### **I.2.3.1. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.**

El cáncer de mama es clasificado por patólogos basado en su aspecto histológico junto con factores clínicos y patológicos. En la última edición de la clasificación de tumores de mama

de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se han descrito muchos tipos histológicos diferentes como son los carcinomas invasores de mama, lesiones precursoras, lesiones de bajo potencial maligno, proliferaciones epiteliales benignas, neoplasias fibroepiteliales, mioepiteliales y mesenquimales, entre otras <sup>181</sup>. La mayoría de los cánceres de mama se originan principalmente en la unidad ducto-lobulillar terminal, y pueden clasificarse como *in situ* cuando la proliferación de las células malignas ocurre en el interior del conducto mamario sin traspasar la membrana basal, es decir sin invadir o infiltrar el tejido o estroma que lo rodea, o como invasivos o infiltrantes cuando la proliferación de las células malignas atraviesa la membrana basal del ducto o lobulillo invadiendo el tejido circundante. Aproximadamente el 70-80% de los carcinomas de mama se describen como carcinomas invasivos de tipo no especial (anteriormente denominado carcinoma ductal invasivo no especificado de otro modo) que es un grupo heterogéneo de tumores invasivos que no presentan las características suficientes para clasificarse como un tipo histológico específico. El resto, alrededor del 25% se definen como subtipos histológicos especiales como son el carcinoma invasivo lobular, micropapilar, papilar, tubular, medular, metaplástico e inflamatorio. Estos subtipos se definen por su morfología, pero también están relacionados con características específicas clínicas, epidemiológicas y moleculares <sup>180,181</sup>.

#### I.2.3.2. CLASIFICACIÓN POR GRADO HISTOLÓGICO.

El grado tumoral es una valoración de la diferenciación (formación de túbulos y pleomorfismo nuclear) y la actividad proliferativa (índice mitótico) del tumor proporcionando información sobre el crecimiento tumoral, la agresividad tumoral y el pronóstico. El sistema de clasificación de Bloom-Richardson-Elston modificado (es decir, el sistema de Nottingham) clasifica a los carcinomas de mama en base a la formación de los túbulos, el pleomorfismo nuclear y el recuento mitótico, de modo que a cada uno se le asigna una puntuación del 1 a 3. La puntuación final se obtiene de la suma de los puntos de cada uno de los criterios, y en función de la puntuación obtenida, los tumores de mama se clasifican en tres grupos <sup>180,182</sup>:

**Grado I:** Corresponden a tumores que obtienen una puntuación de 3 a 5. Son tumores bien diferenciados y con mejor pronóstico.

**Grado II:** Corresponden a tumores que obtienen una puntuación de 6 a 7. Son tumores moderadamente diferenciados y con pronóstico intermedio.

**Grado III:** Corresponden a tumores que obtienen una puntuación de 8 a 9. Son tumores poco diferenciados y con peor pronóstico. Estos tumores tienden a recurrir y a metastatizar más temprano que los tumores de inferior grado.

## I.2.3.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN ESTADÍO.

El estadio del cáncer de mama se determina mediante el sistema de estadificación TNM desarrollado por la AJCC (del inglés, American Joint Committee on Cancer) y la UICC (del inglés, Union for International Cancer Control) para evaluar la progresión o diseminación del cáncer de mama en el momento del diagnóstico, así como la predicción del resultado clínico y por consiguiente definir un tratamiento adecuado y evaluar la probabilidad de éxito del tratamiento. El sistema TNM tiene en cuenta el tamaño del tumor (T), la afectación de ganglios linfáticos (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). Una vez determinados los valores de T, N y M, se combinan y se asigna una etapa de 0, I, II, III y IV que a su vez pueden subdividirse. Según la octava edición de la clasificación TNM de la AJCC para el cáncer de mama desarrollada por un equipo multidisciplinar de expertos en cáncer de mama, es la siguiente <sup>183</sup>:

**Estadio 0:** Corresponde a carcinomas *in situ* (no invasivos) incluyendo al carcinoma ductal *in situ* y la enfermedad de Paget. El carcinoma lobular *in situ* ha sido eliminado de la clasificación con respecto a la séptima revisión por considerarse una entidad benigna.

**Estadio IA:** Corresponde a carcinomas infiltrantes (invasivos) con un tamaño de 2 cm o menos y con ganglios linfáticos negativos.

**Estadio IB:** Corresponde a carcinomas infiltrantes (invasivos) con un tamaño de 2 cm o menos (o sin evidencia de tumor primario) que presentan micrometástasis ganglionares (aproximadamente 200 células).

**Estadio IIA:** Corresponde a carcinomas infiltrantes con un tamaño menor o igual a 2 cm (o sin evidencia de tumor primario) y con metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales. También puede corresponder a carcinomas infiltrantes con un tamaño entre 2 y 5 cm sin afectación ganglionar.

**Estadio IIB:** Corresponde a carcinomas infiltrantes con un tamaño entre 2 y 5 cm con micrometástasis o con metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales. También puede corresponder a carcinomas infiltrantes con un tamaño mayor de 5 cm que no se ha propagado a los ganglios linfáticos.

**Estadio IIIA:** Corresponde a carcinomas infiltrantes con un tamaño menor o igual a 5 cm con metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o con ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales positivos clínicamente mediante imágenes en ausencia de metástasis de ganglios linfáticos axilares. También puede corresponder a carcinomas con un tamaño mayor a 5 cm

con metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales o bien con metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o con ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales positivos clínicamente mediante imágenes en ausencia de metástasis de ganglios linfáticos axilares

**Estadio IIIB:** Corresponde a tumores de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o la piel (ulceración o nódulos macroscópicos) que o bien no presentan metástasis ganglionares, o bien presentan metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales. También corresponden a tumores de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o la piel (ulceración o nódulos macroscópicos) con metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o con ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales clínicamente positivos mediante imágenes en ausencia de metástasis de ganglios linfáticos axilares. El cáncer de mama inflamatorio pertenece a este estadio.

**Estadio IIIC:** Corresponde a carcinomas de cualquier tamaño (o sin evidencia de tumor primario) con metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares, o en ganglios linfáticos infraclaviculares, o en ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales supraclaviculares positivos mediante imágenes en presencia de uno o más ganglios linfáticos axilares positivos, o en más de 3 ganglios linfáticos axilares y micrometástasis o macrometástasis por biopsia de ganglio linfático centinela en ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales clínicamente negativos.

**Estadio IV:** Corresponde a los carcinomas de cualquier tamaño con o sin evidencia de afectación ganglionar que presentan metástasis a distancia, siendo los lugares más frecuentes de diseminación los huesos, el hígado, el cerebro o los pulmones.

Por tanto, los tumores de mama con tamaños más grandes, extensión ganglionar y metástasis a distancia tienen un estadio mayor y, por consiguiente, un peor pronóstico. Además, se han desarrollado diferentes tipos de estadificación, incluyendo la estadificación clínica, la estadificación patológica y la estadificación post-terapia. La estadificación clínica está basada en el examen físico, las pruebas de imagen y las biopsias mientras que la estadificación patológica combina los resultados de la estadificación clínica con los resultados quirúrgicos. La estadificación post-terapia determina cuánto cáncer permanece una vez que el paciente es tratado primero con terapia sistémica (quimioterapia o terapia hormonal) y/o radioterapia antes de su cirugía <sup>180,183</sup>

#### I.2.3.4. CLASIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA SEGÚN RECEPTORES DE MEMBRANA.

La práctica clínica actual además del subtipo histológico, el grado de diferenciación del tumor, y del estadio, toma en consideración el estado de receptores de estrógenos (RE), de progesterona (RP) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) mediante el análisis de su expresión por inmunohistoquímica, con el fin de aportar un valor predictivo terapéutico adicional y evaluar de forma más precisa el pronóstico, la selección del tratamiento y el resultado clínico <sup>183</sup>. Aproximadamente el 70% de los carcinomas invasivos de mama expresan RE y la mayoría de los carcinomas RE<sup>+</sup> también expresan RP. Sin embargo, en algunos pacientes hay discrepancia en los patrones de expresión de RE y RP, de forma que algunos carcinomas son RE<sup>+</sup>/RP<sup>-</sup> y otros son RE<sup>-</sup>/RP<sup>+</sup>. De forma general, los carcinomas de mama positivos para RE y/o RP son clasificados como carcinomas de tipo luminal mientras que los carcinomas negativos para RE son sub-clasificados como HER2+ (RE<sup>-</sup>/RP<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>) y triple negativo (RE<sup>-</sup>/RP<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>) en base a la sobreexpresión o amplificación de HER2 <sup>184</sup>. En general, los pacientes con cáncer de mama luminal tienen mejor pronóstico, menor riesgo de recurrencia y menor mortalidad en comparación con los pacientes con cáncer de mama HER2<sup>+</sup> y triple negativo. A partir de los datos presentados en la 13th Conferencia Internacional sobre el Cáncer de Mama, celebrada en St Gallen en 2013, se ha modificado la clasificación inmunohistoquímica de los carcinomas de mama con el objetivo de aproximarse a la clasificación molecular de los tumores de mama <sup>185</sup> (Tabla 1). En este sentido, se ha hecho un esfuerzo para distinguir de forma más precisa los carcinomas hormono-sensibles de tipo Luminal A y Luminal B ya que estudios basados en perfiles de expresión génica han identificado a estos carcinomas como entidades clínica y biológicamente diferentes. Los carcinomas de mama más frecuentes son los de tipo Luminal A que tienen una mayor sensibilidad a la terapia endocrina y mejor pronóstico que los carcinomas de tipo Luminal B representados en aproximadamente el 20% de todos los carcinomas invasivos de mama. Los biomarcadores inmunohistoquímicos que se han considerado recientemente para distinguir y subclassificar los carcinomas luminales son la expresión de RE, la expresión de RP, la expresión de HER2 y la expresión del marcador pronóstico proliferativo Ki67 <sup>185</sup>. Las comparaciones clínico-patológicas entre los subtipos luminales A y B identificaron que los tumores de tipo Luminal A son positivos para RE, tienen un porcentaje de células positivas para RP mayor del 20%, son negativos para HER2, presentan un índice Ki67 menor de 14% y tienen tendencia a ser tumores bien diferenciados. En cambio, los tumores luminal B son positivos para RE y, o bien presentar sobreexpresión o amplificación de HER2 clasificándose como tumores Luminal B HER2 positivo o bien pueden ser negativos para HER2 clasificándose como tumores Luminal B HER2 negativo. Los tumores Luminal A se diferencian

de los Luminal B HER2 negativo en que estos últimos tienen un índice Ki67 alto (mayor del 14-20% en función de las variaciones inter-laboratorio) o bien son negativos para RP o presentan un porcentaje de células positivas para RP menor del 20% <sup>185-187</sup>.

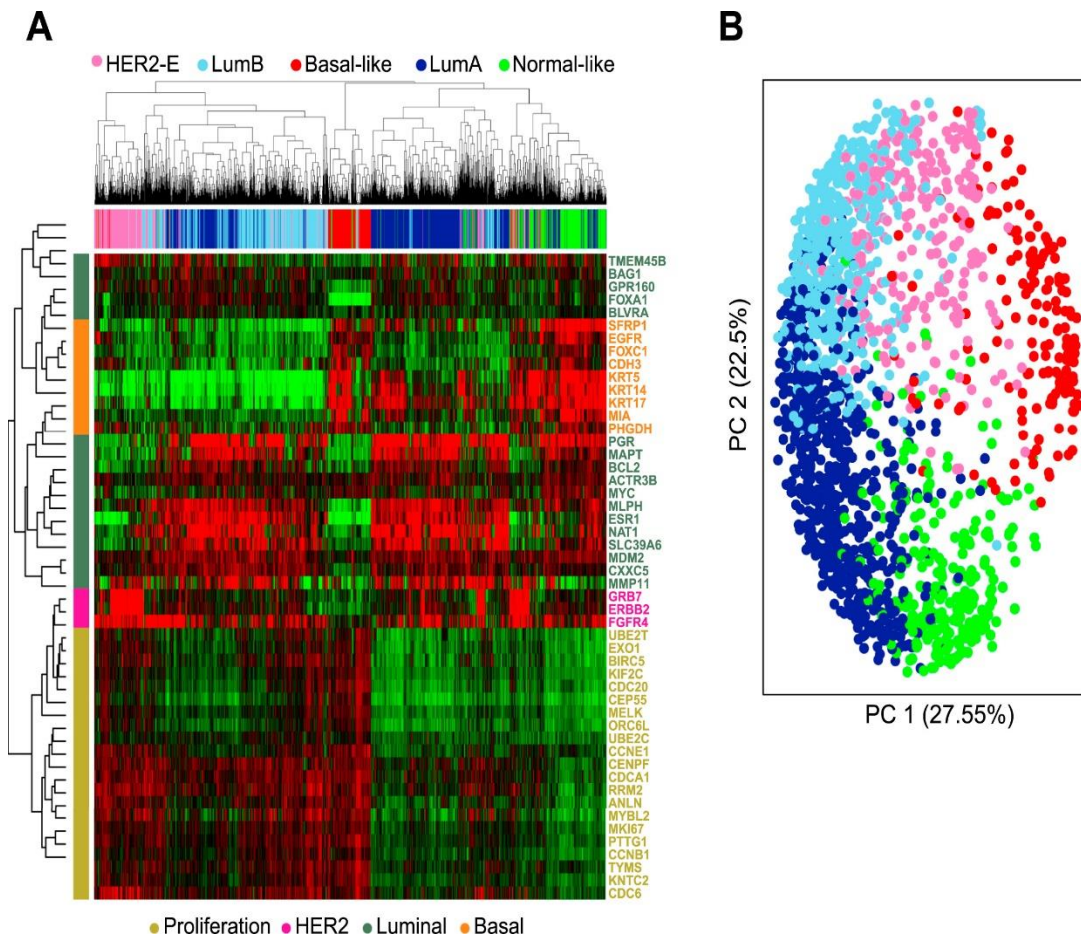
Subtipo basado en IHC	Definición clínico-patológica equivalente	Marcadores IHC
Luminal A	Luminal A	RE+, RP≥20%, HER2-, Ki67<14%
Luminal B	Luminal B (HER2 negativo)	RE+, HER2-, Ki67>14% y/o RP <20%
	Luminal B (HER2 positivo)	RE+, HER2+, Ki67 alto o bajo, RP alto o bajo
HER2-enriquecido	HER2 positivo	RE-, RP-, HER2+
Basal	Triple negativo*	RE-, RP-, HER2-

**Tabla 1.** Definición clínico-patológica equivalente (basado en IHC) de los subtipos moleculares de cáncer de mama acordados en la 13ª Conferencia Internacional del Cáncer de Mama de St. Gallen (2013). \* Hay un 80% de superposición entre "triple-negativo" y el subtipo molecular basal. Algunos casos con baja positividad de RE poco positivo pueden agruparse en los subtipos no luminales en los análisis de expresión génica. 'Triple negativo' también incluye algunos tipos histológicos especiales como el carcinoma adenoide quístico. RE: Receptor de estrógenos. RP: Receptor de progesterona. Ki67: Marcador de proliferación celular (Adaptada de Goldhirsch y colaboradores., 2013 <sup>185</sup>).

#### I.2.3.5. CLASIFICACIÓN POR SUBTIPOS MOLECULARES.

Los parámetros patológicos y clínicos implementados en la práctica clínica actual son usados como marcadores pronósticos y predictivos que guían a los oncólogos en la selección del tratamiento más óptimo, sin embargo, este enfoque es aplicable a grupos de pacientes y tiene limitaciones en la predicción de resultados clínicos individuales por lo que muchos pacientes no se benefician de un tratamiento personalizado. Pacientes con tumores que tienen características clínicas y patológicas similares pueden tener diferentes respuestas a la terapia y resultados clínicos. Estas limitaciones pueden resultar en que muchos pacientes pueden ser sobre-tratados con quimioterapia, particularmente pacientes con tumores positivos para RE y/o RP y negativos para HER2, o bien sub-tratados por recibir un pronóstico más favorable. Como resultado durante los últimos años se han llevado a cabo estudios basados en perfiles de expresión génica que se han centrado en definir con mayor profundidad las características biológicas de los tumores de mama para mejorar la estratificación del riesgo de recurrencia del paciente y asegurar de forma específica la selección de la modalidad de tratamiento que tenga la mayor probabilidad de beneficio y la menor toxicidad <sup>188,189</sup>. En el año 2000, Perou y colaboradores describieron por primera vez los subtipos moleculares intrínsecos de cáncer de mama basados en el análisis del perfil de expresión génica mediante *microarray* <sup>190</sup>. El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido la identificación de 6 subtipos moleculares intrínsecos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido, tipo basal, tipo bajo en Claudina y el tipo normal (Figura 8). Estos subtipos difieren en sus

características clínicas, patrones de expresión génica, pronóstico y respuesta al tratamiento  
191–194.



**Figura 8.** Subtipos moleculares de cáncer de mama identificados mediante microarray (predictor de subtipos PAM50). A) Heatmap de expresión génica no supervisada de 1834 muestras de cáncer de mama. B) Análisis de componentes principales de todas las muestras analizadas (Tomada de Prat y colaboradores., 2015 <sup>195</sup>).

**Subtipo Luminal A:** Los tumores luminales poseen un patrón inmunofenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Estos tumores representan el 50-60% de todos los cánceres de mama, y generalmente son tumores de bajo grado que se caracterizan por la expresión de ESR1 (RE), PGR (RP), GATA3, FOXA1, BCL2, genes relacionados con la proliferación celular / ciclo celular (por ejemplo, CCND1), citoqueratinas de bajo peso molecular (CK8, CK18, CK19, etc.), y una baja expresión de TP53 y HER2. A nivel del DNA, los tumores Luminal A muestran un menor número de mutaciones a lo largo del genoma, menor número de cambios en el número de copias cromosómicas (por ejemplo, menores tasas de amplificación de CCND1), menos mutaciones de TP53 (12% frente a 29%), y más mutaciones de PIK3CA (45% frente a 29%) y MAP3K1 (13% frente a 5%) en comparación con tumores Luminal B <sup>195</sup>



**Subtipo Luminal B:** Estos tumores representan el 10-20% de los cánceres de mama, generalmente comparten muchas características con los tumores Luminal A, no obstante, tienden a ser de mayor grado, y tienen una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación / ciclo celular y una menor expresión de varios genes luminales y receptores hormonales, como PGR (RP) y FOXA1 en comparación con los tumores Luminal A. Además, pueden sobreexpresar HER2 a diferencia de los tumores Luminal A.

**Subtipo HER2-enriquecido:** Los tumores de subtipo HER2-enriquecido representan el 10-15% de los cánceres de mama y se caracterizan por la sobreexpresión tanto de genes ubicados en el cromosoma 17q, entre los que se incluye ERBB2 (HER2) y GRB7, como de genes relacionados con la proliferación / ciclo celular. Además, suelen presentar una mayor expresión de otros genes que codifican para varios receptores tirosina quinasa como FGFR4 y EGFR (HER1), y una baja expresión tanto de genes asociados al fenotipo luminal entre los que se incluye ESR1 (RE) y PGR (RP), como de genes basales (por ejemplo, CK-5 y FOXC1). A nivel del DNA, el 72% y el 39% de los tumores HER2-enriquecido tienen mutaciones somáticas en TP53 y PIK3CA, respectivamente <sup>195-197</sup>.

**Subtipo basal:** Los tumores de subtipo basal representan el 10-20% de todos carcinomas de mama y se caracterizan por una elevada expresión de genes relacionados con la proliferación (por ejemplo, MKI67) y de genes expresados en células mioepiteliales y basales mamarias incluyendo a citoqueratinas basales (por ejemplo, CK-5/6, CK-14 y CK-17), o EGFR (HER1), o ambos. También se caracterizan por baja expresión de genes relacionados con el fenotipo luminal y de HER2. A nivel del DNA, estos tumores muestran un elevado número de mutaciones, y el 80% y el 9% de los tumores de tipo basal tienen mutaciones en TP53 y PIK3CA, respectivamente. Importantemente, mutaciones y alteraciones epigenéticas en BRCA1 están asociadas al subtipo basal de cáncer de mama <sup>195-198</sup>.

Durante años, ha sido controvertida la relación existente entre los tumores de tipo basal y los tumores triple negativo. Estas dos entidades no pueden ser consideradas sinónimas ya que ni todos los tumores de tipo basal son clínicamente tumores triple negativo (RE<sup>-</sup>/RP<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>) ni todos los tumores triple negativo se identifican como tumores de tipo basal en base a su expresión génica. De hecho, cerca del 70% de los carcinomas con subtipo basal son triple negativo y alrededor del 80% de los tumores triple negativo muestran un fenotipo de tipo basal <sup>199</sup>. En este sentido, Lehmann y colaboradores mediante análisis por microarray identificaron seis subtipos diferentes de tumores triple negativo: dos de tipo basal (BL1 y BL2), un subtipo inmunomodulador (IM), un subtipo mesenquimal (M), un subtipo mesenquimal *stem-like* (MSL) y un subtipo luminal de receptor de andrógenos (LAR). Los subtipos basales BL1 y BL2 expresan fuertemente genes relacionados con el ciclo celular y genes de respuesta

a daño del DNA (ATR / BRCA) <sup>200</sup>. Por tanto, la existencia de heterogeneidad dentro de los tumores triple negativo precisa de una exhaustiva caracterización molecular para identificar marcadores pronósticos y predictivos que mejoren subestratificación de estos pacientes en grupos que puedan ser manejados eficazmente con terapias específicas.

**Subtipo bajo en Claudina:** Recientemente se ha identificado un subtipo bajo en Claudina que es el menos caracterizado del resto de subtipos moleculares principales de cáncer de mama. Este subtipo que representa el 12-14% de los carcinomas de mama, se caracteriza por una baja expresión de genes relaciones con la adhesión celular (Claudina 3, 4, y 7) y de marcadores de diferenciación luminales, una alta expresión de marcadores epitelio-mesénquima como SNAL1, SNAL2, TWIST1, TWIST2, ZEB1 y ZEB2, activación de genes de respuesta inmune y características semejantes a las células madre tumorales <sup>199,201</sup>.

El análisis del perfil de expresión génica mediante microarray de los tumores bajos en Claudina muestra que la mayoría se solapan con los tumores de tipo basal y tipo normal, además de que aproximadamente la mitad muestran un fenotipo triple negativo. Los tumores bajos en Claudina son menos proliferativos, más indiferenciados y muestran una mayor expresión de ESR1, PGR, y de características de células madre que los tumores de subtipo basal <sup>201</sup>.

**Subtipo normal:** Otro subtipo molecular poco caracterizado corresponde al subtipo normal que representa el 5-10% de los carcinomas de mama. Este subtipo comparte características con el tejido mamario normal mamario y se caracterizan por expresar genes característicos del tejido adiposo y la falta de expresión de RE, RP y HER2. A pesar de que estos tumores son clínicamente tumores triple negativo no son considerados tumores de tipo basal ya que no expresan EGFR y CK5. La significancia clínica de estos tumores aún está por determinar y debido a su rareza existen pocos estudios al respecto. Hay dudas sobre su existencia real y algunos investigadores creen que podría ser un artefacto técnico de contaminación con tejido normal durante el procedimiento de preparación de los microarrays. De hecho, en una gran serie de muestras donde las células neoplásicas fueron aisladas por microdissección no se encontraron casos de subtipo normal de mama, apoyando la hipótesis del artefacto técnico <sup>202</sup>.

#### I.2.3.6. ENSAYOS MULTIGÉNICOS PREDICTORES DE RESULTADO CLÍNICO EN CÁNCER DE MAMA.

Recientemente, se han desarrollado ensayos comerciales de gran relevancia clínica basados en el análisis de perfiles de expresión génica para identificar los subtipos moleculares de cáncer de mama, estratificar a los pacientes en base a riesgos de recurrencia, mejorar el

pronóstico y determinar el beneficio de la adición de quimioterapia adyuvante en subgrupos de pacientes. Entre los ensayos comercialmente disponibles más importantes se encuentran los ensayos *Oncotype DX*, *EndoPredict*, y *Breast Cancer Index* cuyo método de cuantificación de la expresión génica se basa en la PCR en tiempo real (qRT-PCR), y los ensayos *Prosigna* y *MammaPrint* basados en la tecnología de NanoString y microarray respectivamente <sup>189</sup>. *Oncotype DX* es un ensayo multigénico validado clínicamente que detecta y cuantifica la expresión relativa de 21 genes relacionados con proliferación, invasión, y las vías de señalización de RE y HER2. Los resultados se expresan como puntuación de recurrencia (RS: recurrence score) y cuyos valores se sitúan de 0 a 100 para clasificar a los pacientes en las categorías de bajo (RS < 18), intermedio (RS de 18 a 30) y alto (RS > 31) riesgo de recurrencia a los 10 años <sup>203-205</sup>. La estratificación de los pacientes según el riesgo de recurrencia tiene importantes implicaciones terapéuticas, de tal forma que los pacientes con alto riesgo de recurrencia se beneficiarían de tratamiento quimioterápico adyuvante además de la terapia con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa, mientras que para los pacientes con bajo riesgo de recurrencia esta estrategia no sería beneficiosa. En la actualidad, se está llevando a cabo una validación prospectiva en el ensayo clínico *Trial Assigning Individualized Options for Treatment* (TAILORx) para determinar el beneficio de quimioterapia además de terapia endocrina en los pacientes con riesgo de recurrencia intermedio <sup>189,203,206</sup>. El ensayo *Prosigna* (PAM50) cuantifica la expresión de 50 genes con el fin clasificar con un alto nivel de validez pronóstica a los pacientes de cáncer de mama en los subtipos Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y tipo basal. Además, este ensayo tiene la validez clínica para predecir el riesgo de recurrencia a 10 años en pacientes postmenopaúsicas con cáncer de mama en estadio I o II, ER positivo, con ganglios linfáticos positivos o negativos <sup>206,207</sup>. Por otro lado, *MammaPrint* es otro ensayo multigénico relevante que determina mediante microarray el nivel de expresión de 70 genes relacionados con proliferación / ciclo celular, invasión, metástasis y angiogénesis, con el fin de determinar el pronóstico de pacientes con cáncer de mama en estadio I o II con RE positivo o negativo y ausencia de ganglios positivos mediante la clasificación de los pacientes en las categorías de alto y bajo riesgo de recidiva a distancia a los 5 y 10 años. La utilidad clínica de *MammaPrint* ha sido evaluada recientemente en el ensayo clínico en fase III MINDACT en el que se ha concluido que no es beneficioso el uso de quimioterapia adyuvante en el grupo de pacientes clasificados como pacientes de bajo riesgo en base al ensayo multigénico pero de alto riesgo de recurrencia en base a las características clínico-patológicas convencionales <sup>189,208</sup>.

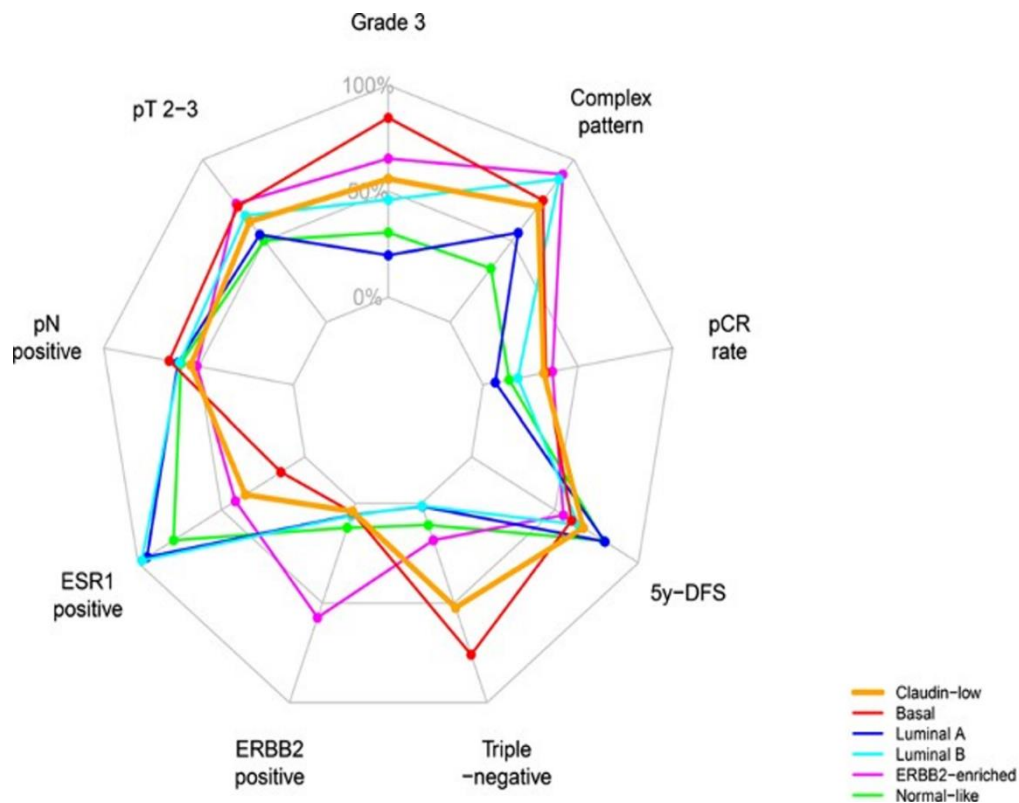
En 2016, el Grupo Asesor de las directrices sobre Cáncer de Mama de la ASCO (American Society of Clinical Oncology) y el Comité de directrices de Práctica Clínica publicaron guías actualizadas para el uso de biomarcadores, incluyendo ensayos de expresión

génica, para guiar las decisiones de tratamiento con respecto al uso de terapia sistémica adyuvante. Los expertos recomendaron el uso de *Oncotype DX* y *Prosigna*, y moderadamente de *Breast Cancer Index* y *EndoPredict* en pacientes con tumores RE/RP positivos, HER2-negativos sin afectación ganglionar. También aclararon que hasta la fecha no hay suficientes datos para recomendar el uso de los ensayos multigénicos disponibles en pacientes con cáncer de mama triple negativo y HER2 positivo <sup>209</sup>.

En conclusión, las firmas moleculares proporcionan una representación más exacta de las características biológicas del cáncer de mama, permitiendo una mayor exactitud y reproducibilidad en el pronóstico y predicción de los beneficios de la terapia adyuvante en comparación con la evaluación clínica e inmunohistoquímica. Sin embargo, a pesar de la eficacia demostrada de los ensayos multigénicos, existen grandes diferencias geográficas en la adopción de estas pruebas, debido probablemente a que el costo no es asumible en muchas instituciones de diferentes países, por lo que la evaluación clínica e inmunohistoquímica sigue siendo el método de referencia para la clasificación de cáncer de mama y toma de decisiones en relación a la terapia <sup>197</sup>.

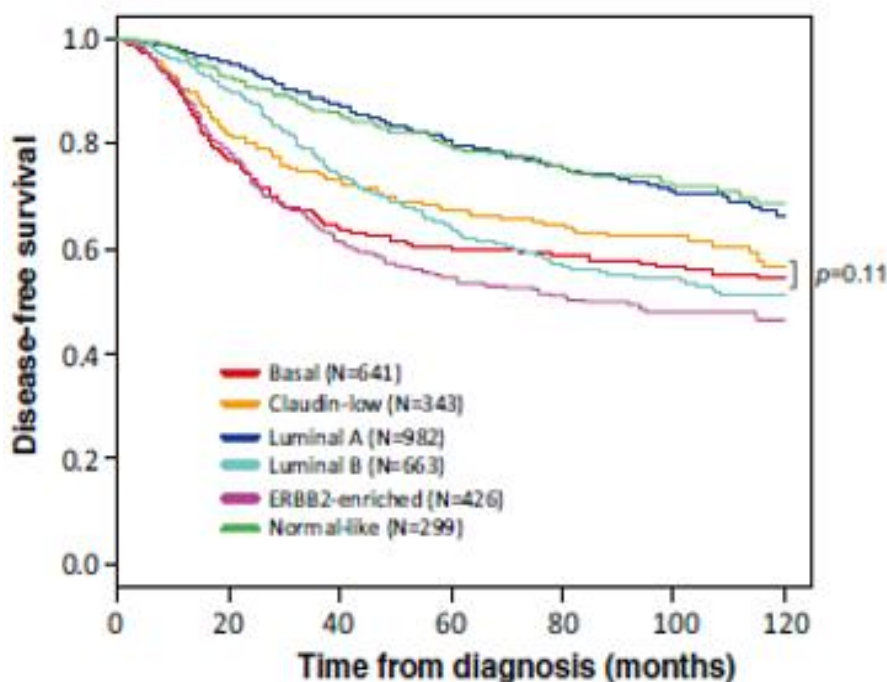
#### I.2.3.7. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ADOPTADAS EN BASE A LOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA.

Las características clínico-patológicas de los cánceres de mama invasivos de acuerdo a los subtipos moleculares de cáncer de mama se esquematizan en la Figura 9. Los subtipos de tumores que tienen una mayor incidencia en pacientes menores de 50 años corresponden a los tumores con subtipo basal y bajo en Claudina. De forma similar, la mayoría de pacientes afectados con cáncer de mama de alto grado corresponden a los subtipos Basal (85%), HER2 (65%), y bajo en Claudina (56%), mientras que los tumores de grado intermedio y bajo afectan principalmente a pacientes con cáncer de mama de subtipo Luminal A, Normal y Luminal B. El tamaño de los tumores con subtipo Basal, HER2 y Luminal B es mayor que el del resto de subtipos en el momento del diagnóstico. En cuanto a la afectación ganglionar positiva no hay grandes diferencias entre los subtipos, aunque tiende a ser mayor en los subtipos HER2-enriquecido y bajo en Claudina. Como es de esperar, la positividad de la expresión de RE es mayor en los subtipos Luminal A (98%) y B (95%), y menor en el subtipo basal (14%) y bajo en Claudina (36%). En cambio, la expresión de HER2 es positiva fundamentalmente en el subtipo HER2-enriquecido. Por último, prácticamente la mitad de los tumores bajos en Claudina y el 75% de los tumores de subtipo basal son clínicamente triple negativo mientras que el resto de subtipos no son triple negativos <sup>201</sup>.



**Figura 9.** Gráficos de radar que comparan las características clínico-patológicas y transcripcionales de los 6 principales subtipos moleculares. Cada eje del diagrama representa una escala de proporciones para una característica específica, que oscila entre 0% y 100%. La proporción de una característica dada en un subtipo molecular dado se indica en el eje correspondiente. pT2: tumor >2 y ≤ 5 cm; pT3: tumor > 5 cm. pN positivo: metástasis en ganglios regionales. 5y-DFS: supervivencia libre de enfermedad a los 5 años. pCR rate: tasa de respuesta patológica completa (Tomada de Sabatier y colaboradores., 2014 <sup>201</sup>).

La evolución clínica de cada uno de los subtipos moleculares, medida como tasa supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es mayor para los subtipos Luminal A (79%) y Normal (79%), intermedia para los subtipos bajo en Claudina (67%) y Luminal B (64%), y más baja para los subtipos Basal (60%) y HER2-enriquecido (55%) (Figura 10) <sup>201</sup>.



**Figura 10.** Curvas Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de enfermedad en base a los subtipos moleculares de cáncer de mama.  $p$ -valor = 0,11 entre los tumores bajos en Claudina y basales (Tomada de Sabatier y colaboradores., 2014 <sup>201</sup>).

Por otro lado, la quimiosensibilidad medida como respuesta patológica completa a la quimioterapia adyuvante es considerablemente mayor en los subtipos HER2-enriquecido (37%), Basal (33%) y bajo en Claudina (32%) que en los subtipos Luminal B (18%), Normal (14%) y Luminal A (7%) (Figura 9) <sup>201</sup>

De forma importante, estudios han mostrado que a pesar de que los tumores de subtipo basal tienen peor resultado clínico a los 5 años que los tumores con subtipo Luminal B, no ocurre lo mismo a los 10 años <sup>195</sup>. Por otro lado, en comparación con los tumores luminales, los tumores de subtipo basal tienen peor pronóstico y una mayor tasa de recidiva en los primeros 3 años a pesar de que tengan una alta respuesta a la quimioterapia. Por tanto, es fundamental identificar nuevas dianas terapéuticas y diseñar nuevas estrategias terapéuticas para los subtipos de tumores con peor pronóstico <sup>202</sup>.

En la 13ª Conferencia Internacional del Cáncer de Mama de St. Gallen (2013) se ha reconocido la utilidad de la clasificación molecular de los tumores de mama en el proceso de selección de las estrategias terapéuticas. Las estrategias terapéuticas adoptadas en la conferencia según la clasificación equivalente a los subtipos moleculares (basada en inmunohistoquímica) se resumen en la Tabla 2. Los pacientes con cáncer de mama luminales al ser subtipos con receptores hormonales positivos, pueden beneficiarse de la administración de terapia endocrina como por ejemplo, inhibidores de la aromatasa, moduladores selectivos

de receptores de estrógenos como el Tamoxifeno y reguladores selectivos puros de RE como Fulvestrant. Además, entre los dos subtipos luminales, el subtipo luminal A presenta una menor quimiosensibilidad a la quimioterapia adyuvante que el subtipo luminal B. Además, los pacientes con tumores de subtipo Luminal A suelen ser agrupados en la categoría de bajo riesgo del ensayo pronóstico multigénico *Oncotype DX* de forma que para estos pacientes no supone un beneficio sobre la supervivencia la administración de quimioterapia adyuvante a menos que sean catalogados por los ensayos multigénicos como pacientes de alto riesgo y el tamaño del tumor sea grande. Por tanto, la quimioterapia adyuvante está indicada para los pacientes con subtipo Luminal B, siendo frecuente el tratamiento con Antraciclinas y Taxanos. Además, si estos pacientes con subtipo luminal sobreexpresan HER2 deberán ser tratados también con terapia dirigida anti-HER2 <sup>185,210,211</sup>.

Subtipo basado en IHC	Marcadores IHC	Terapia adyuvante
Luminal A	RE+, RP+, HER2-, Ki67 bajo	Terapia endocrina sola *
Luminal B (HER2 negativo)	RE+, HER2-, Ki67 alto y/o RP bajo	Terapia endocrina + quimioterapia
Luminal B (HER2 positivo)	RE+, HER2+, Ki67 alto o bajo, RP alto o bajo	Terapia endocrina + quimioterapia + anti-HER2
HER2-positivo	RE-, RP-, HER2+	Quimioterapia + anti-HER2
Triple negativo	RE-, RP-, HER2-	Quimioterapia

**Tabla 2.** Recomendaciones de tratamientos sistémicos acordados en la 13ª Conferencia Internacional del Cáncer de Mama de St. Gallen (2013) en base a la clasificación equivalente de los subtipos moleculares de cáncer de mama. \* Quimioterapia debe ser administrada a pacientes de alto riesgo (alta puntuación de riesgo en ensayos multigénicos *Oncotype DX* o *MammaPrint*, tumor de grado 3, afectación de 4 o más ganglios linfáticos). RE: Receptor de estrógenos. RP: Receptor de progesterona. Ki67: Marcador de proliferación celular (Adaptada de Goldhirsch y colaboradores., 2013 <sup>185</sup>)

El tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo consiste en la administración de agentes específicos anti-HER2 como Trastuzumab. El tratamiento con Trastuzumab es más beneficioso en pacientes con cáncer de mama RE negativo / HER2 positivo que en pacientes con cáncer de mama RE positivo / HER2 positivo. Además, gran parte de estos pacientes pueden beneficiarse de quimioterapia adyuvante, principalmente Taxanos y Antraciclinas. De hecho, este subtipo junto con el subtipo basal tienen una alta quimiosensibilidad con tasas de respuesta más altas que los tumores con subtipo luminal A y B <sup>207</sup>.

Los pacientes con tumores de subtipo basal con altas tasas de proliferación generalmente son tratados con éxito con regímenes quimioterápicos que incluyen Taxanos y Antraciclinas. Sin embargo, dentro de este subtipo hay una serie de pacientes que son menos sensibles a estos agentes quimioterápicos que pueden ser tratados añadiendo al régimen quimioterápico convencional agentes de platino como el carboplatino, que provocan un aumento significativo

de la respuesta patológica completa en estos pacientes <sup>195</sup>. Otra estrategia terapéutica prometedora para tratar los tumores de subtipo basal, y más especialmente tumores triple negativo que portan mutaciones en BRCA 1/2, son los inhibidores de Poli-ADP-Ribosa-Polimerasa 1 (PARP-1). Estos inhibidores inducen de forma selectiva una citotoxicidad tumoral a través de la generación de roturas de una sola hebra de DNA en las células tumorales que tienen defectos en la reparación por recombinación homóloga, que causan propensión a acumular múltiples roturas de doble hebra de DNA que no pueden ser reparadas eficientemente provocando la muerte de las células cancerosas <sup>212</sup>.

### **I.3. microRNAs COMO REGULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.**

#### **I.3.1. BIOGÉNESIS DE microRNAs Y MECANISMOS DE ACCIÓN.**

Los miRNAs son pequeñas moléculas monocatenarias de RNA no codificantes de 18 a 25 nucleótidos que juegan un importante papel en la regulación de la expresión génica. Después del descubrimiento del primer miRNA lin-4 en *Caenorhabditis elegans* en 1993 <sup>213</sup>, se ha descubierto que estas pequeñas moléculas son una clase abundante de RNAs en plantas, animales y virus <sup>214,215</sup>. Hasta la fecha se han descrito 2588 miRNAs humanos (miRBase 21.0 release, Junio de 2014) y cada miRNA puede regular la expresión de múltiples genes diferentes, y por el contrario, diferentes miRNAs pueden regular de forma cooperativa la expresión de un gen diana. Este hecho pone de manifiesto la elevada complejidad de la red regulatoria constituida por los miRNAs y sus dianas <sup>103</sup>. Los miRNAs desempeñan importantes papeles en múltiples procesos celulares como la diferenciación, proliferación, apoptosis, respuesta al estrés, y su alteración contribuye al desarrollo de muchas enfermedades humanas, incluido el cáncer <sup>215</sup>.

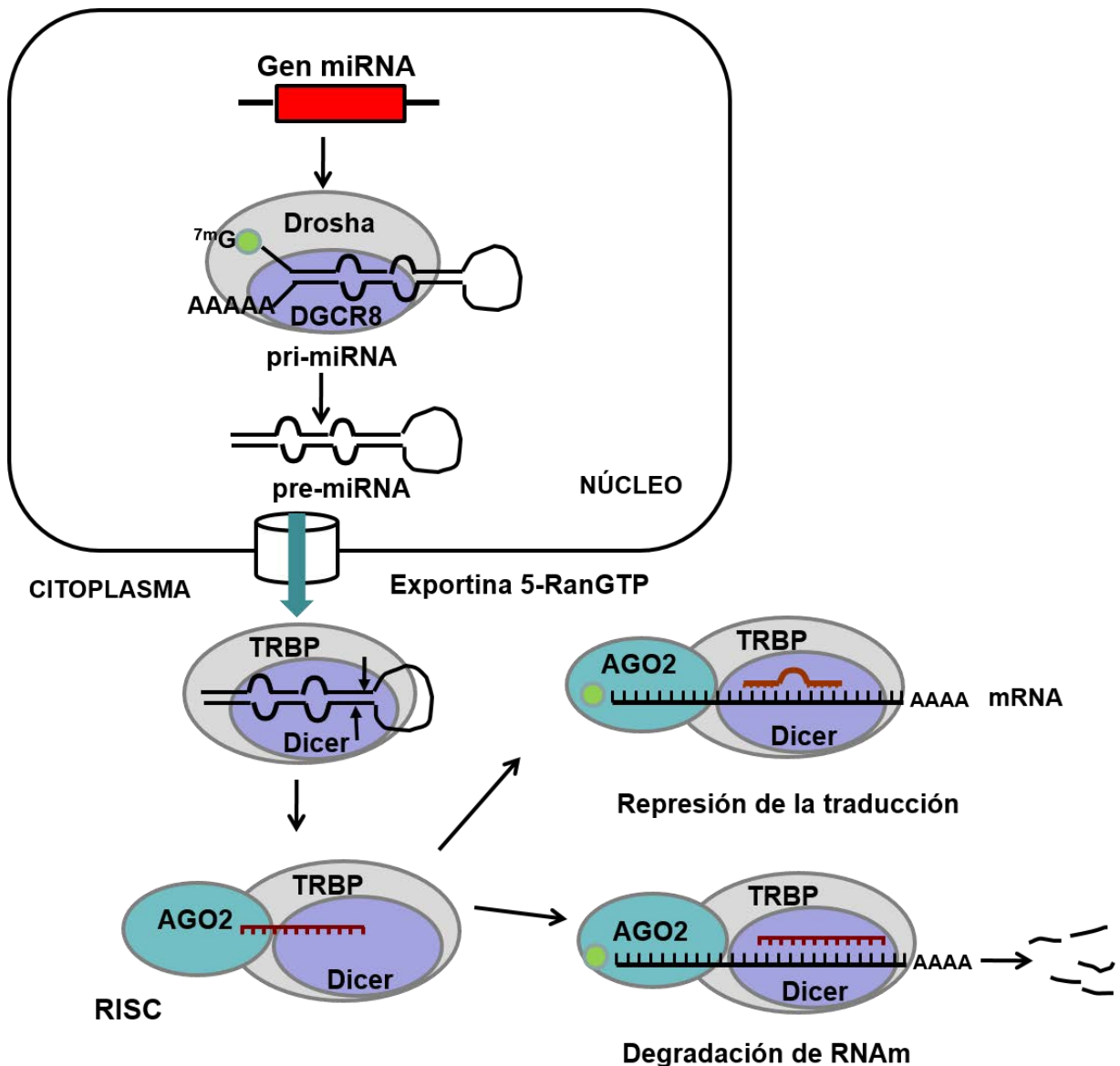
La mayoría de los genes codificantes de miRNAs se disponen en *clusters* en el genoma y se expresan policistricamente a partir de su propio promotor, mientras que otros se localizan en regiones intrónicas y se transcriben como parte de los genes anotados. Durante la biogénesis de miRNAs (Figura 11), la transcripción de los genes codificantes de miRNAs está mediada principalmente por la RNA Polimerasa II (Pol II) y en menor medida por la RNA Polimerasa III (Pol III) resultando en la producción de transcritos precursores largos de RNA llamados miRNAs primarios (pri-miRNAs), que tienen modificados sus extremos 5' y 3' con CAP y cola de poliA, respectivamente. Los pri-miRNAs contienen un tallo de aproximadamente 33 pb, un bucle terminal, y segmentos de RNA monocatenario (RNAss) <sup>216,217</sup>. Se requieren dos reacciones de procesamiento mediadas por ribonucleasas para generar miRNAs maduros. La primera reacción ocurre en el núcleo y está mediada por la proteína RNasa de tipo III, Drosha y la segunda reacción ocurre en el citoplasma y está mediada por la endorribonucleasa tipo III, Dicer. En el núcleo la enzima Drosha se encuentra junto con el



cofactor DGCR8 (por sus siglas en inglés, *Di George syndrome critical region gene 8*), formando el complejo conocido como microprocesador, que es de aproximadamente 650 kDa en los seres humanos <sup>218–220</sup>. El cofactor DGCR8 se une a la base de la estructura del tallo y bucle de los pri-miRNAs, y guía a Drosha para catalizar la rotura de la doble cadena de RNA en el tallo a una distancia aproximada de 11 nt por encima de la base, lo que produce la liberación de un intermediario de 70 nt con estructura de horquilla denominado miRNA precursor (pre-miRNA) <sup>221,222</sup>. El Pre-miRNA resultante es transportado desde el núcleo al citoplasma por Exportina-5 y su cofactor, Ran-GTP donde se producirá el proceso de maduración de los miRNAs <sup>223</sup>. En el citoplasma, Dicer rompe las moléculas de pre-miRNAs cerca del bucle terminal provocando la liberación de miRNAs bicatenarios de aproximadamente 22 nt <sup>224</sup>. Además, Dicer interacciona con otras con proteínas de unión a RNA como TRBP (por sus siglas en inglés, *TAR RNA-binding protein*) que contribuyen a la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC; por sus siglas en inglés, *RNA-induced silencing complex*) <sup>225–227</sup>. Después de la reacción catalizada por Dicer, el RNA bicatenario de 22 nt se une a las proteínas Argonauta (Ago) para generar el complejo efector, RISC. La cadena guía del RNA de 22 nt permanece en el complejo como un miRNA maduro, mientras que la cadena pasajera es degradada <sup>224</sup>. A continuación, la secuencia semilla del miRNA maduro (posiciones 2 a 8 desde el extremo 5') permite el reconocimiento específico de las regiones 3'-UTR de los mRNA diana, guiando al complejo efector RISC para reconocer los mRNA diana y regular negativamente su expresión. Cuando la complementariedad de secuencias entre la secuencia semilla del miRNA y la región 3'-UTR del mRNA diana no es perfecta, se produce represión de la traducción al bloquear el acceso del ribosoma al mRNA. En cambio, cuando la complementariedad es perfecta se produce la degradación del mRNA diana el miRNA maduro <sup>215,225</sup>.

Sin embargo, recientemente se han descrito nuevos mecanismos mediante los cuales los miRNAs regulan la expresión génica. En este sentido, se ha demostrado que algunos miRNAs son capaces de unirse al marco abierto de lectura (ORF), a las regiones 5' no traducida (5'-UTR) o a los promotores de los mRNA diana para reprimir o activar la expresión génica a nivel transcripcional o post-transcripcional <sup>228–231</sup>. En algunos casos, la activación de la traducción se debe a la capacidad del miRNA de unirse competitivamente a los elementos ricos en AU localizados en la región 3'-UTR, que son sitios típicos de unión de las proteínas de unión al RNA (RBPs, del inglés, *RNA binding proteins*) que median la degradación del mRNA. La unión del miRNA en los elementos ricos en AU previene la degradación del mRNA diana mediada por las RBPs resultando en un aumento de los niveles del mRNA y de la expresión proteica <sup>232</sup>. En otros casos, como en el caso de miR-10a, la activación de la traducción se debe a la unión del miRNA a las regiones 5'-UTR justamente detrás de los motivos reguladores 5'TOP

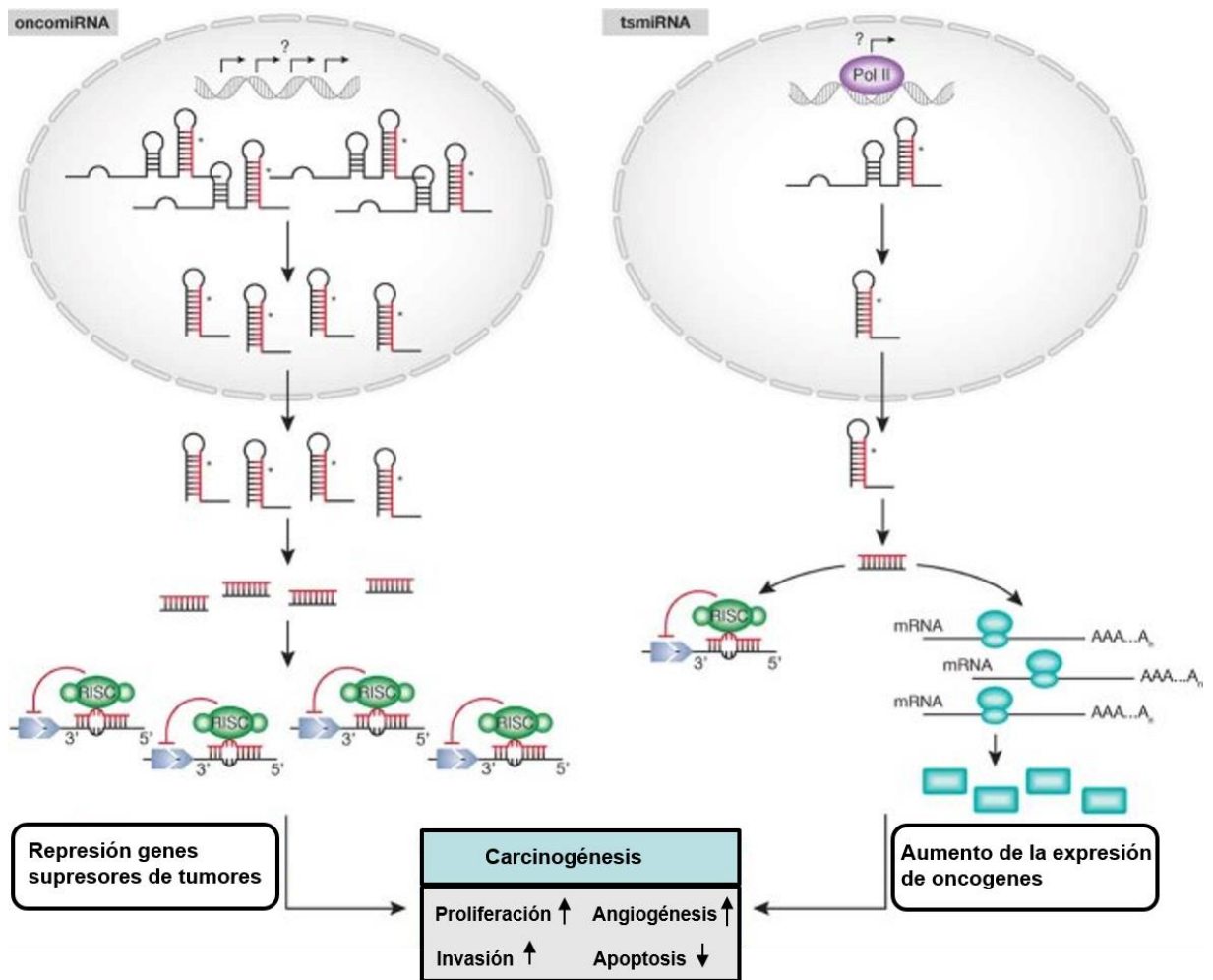
de los mRNA de las proteínas ribosómicas, resultando en la activación global de síntesis de proteínas a través de la estimulación de la traducción de mRNA de proteínas ribosomales <sup>229</sup>.



**Figura 11.** Representación esquemática de la biogénesis de miRNAs. En el núcleo los genes codificantes de miRNAs se transcriben a pri-miRNAs por la acción de las RNA polimerasas POL II y POL III. Una ribonucleasa específica de RNA de doble cadena (Drosha), en conjunto con el cofactor DGCR8 procesan al pri-miRNA a un precursor de aproximadamente 70 nt (pre-miRNA), el cual es translocado desde el núcleo al citoplasma por el sistema Exportina5-Ran-GTP. El pre-miRNA es escindido por un complejo compuesto por las proteínas Dicer y TRBP para dar lugar a una molécula de RNA de doble cadena de aproximadamente 22 nt. Finalmente, el RNA interactúa con proteínas Argonauta, para formar el complejo RISC y la hebra pasajera es degradada. La cadena guía del RNA de 22 nt permanece en el complejo como un miRNA maduro que guía al complejo RISC hacia las regiones 3'UTR de los RNAs dianas para producir represión de la traducción o degradación del RNAm en función del grado de complementariedad existente entre la secuencia semilla del miRNA y del 3'-UTR del mRNA.

### I.3.2. microRNAS EN CÁNCER.

La primera evidencia que puso de manifiesto la implicación de los miRNAs en el cáncer humano derivó de un estudio llevado a cabo por Calin y colaboradores, en el que demostraron que los genes codificantes de los miRNAs, miR-15 y miR-16 están localizados dentro de una región de 30 kb en el cromosoma 13q14, que frecuentemente es delecionada en más de la mitad de casos de leucemia linfocítica crónica de células B <sup>233</sup>. Después de este descubrimiento inicial, múltiples estudios han propuesto un papel relevante de los miRNAs en la patogénesis del cáncer. En este sentido, diversos estudios llevados a cabo con diferentes plataformas para evaluar la expresión de miRNAs (microarray, PCR array, y secuenciación de alto rendimiento) han demostrado la alteración de los niveles de expresión de miRNAs en la mayoría de cánceres humanos en comparación con las células normales <sup>234</sup>. De hecho, la expresión de miRNAs es específica de tejido, y ciertos histotipos de cáncer pueden clasificarse basándose en los perfiles de expresión de miRNAs <sup>235,236</sup>. Además, se ha propuesto que el análisis del perfil de expresión de miRNAs tiene la ventaja de ser más preciso clasificando los tumores que el perfil de expresión génica. La desregulación de los niveles de expresión de miRNAs en los tumores implica la existencia tanto de miRNAs sobreexpresados, como de miRNAs con bajos niveles de expresión en comparación con el tejido normal, aunque principalmente hay una mayor cantidad de miRNAs que tienen reprimida su expresión en los tumores humanos <sup>236</sup>. Los miRNAs sobreexpresados son definidos como “oncomiRs” ya que pueden actuar de forma similar a los oncogenes provocando una regulación negativa de la expresión de genes supresores de tumores, mientras que los miRNAs que tienen suprimida su expresión en los tumores son definidos como “miRNAs supresores de tumores” ya que pueden actuar de forma similar a los genes supresores de tumores provocando una represión de la expresión de oncogenes. Por tanto, la sobreexpresión de “oncomiRs” y la represión de la expresión de “miRNAs supresores de tumores” conduce a la represión de genes supresores de tumores y a la sobreexpresión de oncogenes, respectivamente, que a su vez contribuyen al proceso de tumorigénesis y progresión tumoral (Figura 12) <sup>237</sup>. De hecho, los miRNAs son capaces de controlar las características distintivas de las células tumorales adquiridas durante el proceso de carcinogénesis, como la autosuficiencia en las señales de crecimiento (por ejemplo, familia let-7), la insensibilidad a las señales anti-crecimiento (por ejemplo, *cluster* miR-17-92), la evasión de la apoptosis (por ejemplo, miR-372/373), la angiogénesis (por ejemplo, miR-210), y la invasión y metástasis (por ejemplo, miR-10b) <sup>238</sup>. En la Tabla 3 se resumen los principales miRNAs implicados en cáncer humano. De forma importante, la sobreexpresión o la supresión de miRNAs en modelos animales ha demostrado un vínculo causal entre los miRNAs y el desarrollo del cáncer, poniendo de manifiesto el potencial uso de los miRNAs como dianas terapéuticas <sup>234</sup>



**Figura 12.** Representación esquemática de la desregulación de miRNAs en cáncer. Los miRNAs actúan como oncogenes y genes supresores de tumores (Modificada de Iorio y Croce, 2012<sup>234</sup>).

miRNA	Tipo de tejido	Chr	Función	Tipos de cáncer
<i>cluster let-7/98</i>	Ubicuo	Múltiples miembros (Chr 3, 9, 11, 19, 21, 22,X)	miR-ST	CLL. Linfoma, gástrico, pulmón, próstata, mama, ovario, colon, leiomioma, melanoma
<i>cluster miR-15a/16-1</i>	Ubicuo	13q14.2	miR-ST	CLL, linfoma, mieloma múltiple, adenoma pituitaria, próstata, páncreas
<i>cluster miR-17/92</i>	Ubicuo	Múltiples miembros (Chr 7, 13, X)	OncomiR	Linfoma, mieloma múltiple, pulmón, colon, meduloblastoma, mama, próstata
miR-21	Ubicuo	17q23.1	OncomiR	Linfoma, mama, pulmón, próstata, gástrico, cervical, cabeza y cuello, colorrectal, glioblastoma
miR-26a	Ubicuo	3p22.2 (-1) 12q14.1 (-2)	miR-ST OncomiR	Linfoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma tiroide Glioblastoma
miR-34a/b/c	Ubicuo	1p36.22 (a) 11q23.1 (b) 11q23.1 (c)	miR-ST	CLL, linfoma, páncreas, colon, neuroblastoma, glioblastoma
miR-155	sistema hematopoyético	21q21.3	OncomiR	Linfoma, CLL, mama, pulmón, colon, páncreas
miR-141/200a	Epitelial	Múltiples miembros (Chr 1, 12)	miR-ST OncomiR	Mama, carcinoma renal de células claras, gástrico, vejiga
miR-205	Epitelial	1q32.2	miR-ST OncomiR	Próstata, vejiga, mama, esófago Ovario
miR-206	Músculo esquelético	6p12.2	miR-ST	Rhabdomyosarcoma, mama
miR-9	Sistema nervioso	1q22 (-1) 5q14.3 (-2) 15q26.1 (-3)	miR-ST OncomiR miR-ST	Meduloblastoma, ovario Mama

**Tabla 3.** miRNAs que comunmente están alterados en cáncer. OncomiR: miRNA sobreexpresado en el tumor. miR-ST: miRNA supresor de tumores cuya expresión en tumores está reprimida. Chr: Cromosoma (Modificado de Di Leva, Garofalo, y Croce, 2014 <sup>238</sup>)

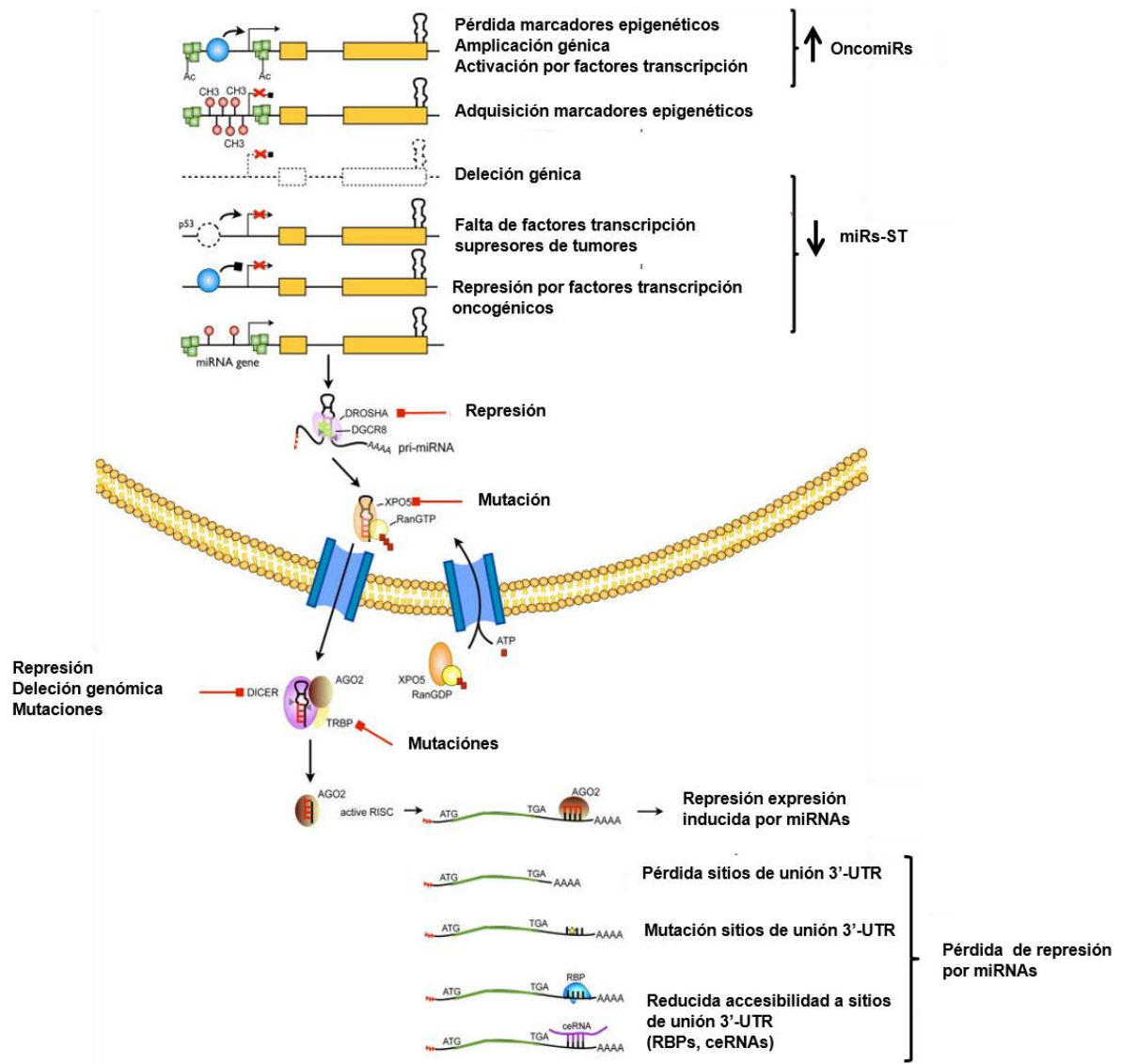
Otro de los hechos significativos que ponen de manifiesto la íntima relación entre miRNAs y cáncer, es la elevada frecuencia que tienen los genes codificantes de miRNAs en estar localizados en regiones genómicas asociadas a cáncer o sitios frágiles propensos a alteraciones genéticas y epigenéticas <sup>239</sup>. Hay una gran variedad de mecanismos que contribuyen a la alteración de los niveles de expresión de miRNAs y que se resumen en la Figura 13. Entre las alteraciones genéticas que afectan a los genes codificantes de miRNAs se encuentran los reordenamientos cromosómicos, amplificaciones genómicas, deleciones o mutaciones. Además, otros de los mecanismos que contribuyen a la alteración de la expresión de miRNAs en cáncer, son las alteraciones epigenéticas como la hipermetilación de promotores de miRNAs supresores de tumores, la hipometilación de DNA en oncomiRs y la pérdida de acetilación de las histonas. <sup>240-242</sup>. No solamente los miRNAs pueden estar controlados epigenéticamente sino que los miRNAs pueden regular la expresión de proteínas de la maquinaria epigenética. Por ejemplo, los miRNAs de la familia miR-29 (miR-29a, miR-29b, y miR-29c) reprimen la expresión de las DNA metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B en

células de cáncer de pulmón y leucemia mieloide aguda induciendo una desmetilación general y la reactivación de genes supresores de tumores y por consiguiente, inhibición de la tumorigénesis <sup>243,244</sup>.

Además, otro mecanismo adicional que contribuye a la alteración de la expresión de miRNAs, es la activación o represión transcripcional de miRNAs. Por ejemplo, el oncogén MYC media la activación transcripcional del *cluster* oncogénico miR-17/92 y la represión transcripcional de miRNAs supresores de tumores como los miembros de la familia miR-29 <sup>245,246</sup>. De igual manera, la pérdida de control transcripcional de miRNAs supresores de tumores conducen a su regulación negativa en tumores. Por ejemplo, los miembros de la familia miR-34 son regulados transcripcionalmente por p53, el cual frecuentemente está mutado o tiene pérdida de su función en varios cánceres, favoreciendo la represión de los miembros de la familia miR-34 <sup>247</sup>.

Otros de los mecanismos responsables de la desregulación de miRNAs son defectos en las enzimas y cofactores de la maquinaria de biosíntesis de miRNAs. Por ejemplo, varios estudios han notificado tanto la reducción como el aumento de los niveles de Dicer y Drosha en varios tipos de cáncer, que se correlacionan inversamente con estadíos avanzados del tumor y mal resultado clínico <sup>248</sup>. Además, estas proteínas actúan como supresores de tumores haploinsuficientes ya que la delección parcial de estas proteínas acelera la tumorigénesis *in vitro* e *in vivo*. También se han descrito mutaciones de TARBP2 que alteran el procesamiento de miRNAs y mutaciones de XPO5 (Exportina 5) que producen un atrapamiento de los transcritos de miRNAs en el núcleo <sup>240</sup>.

Por otra parte, existen mecanismos que no afectan a los niveles de expresión de miRNAs pero que conducen a un escape de la represión por miRNAs. Entre estos mecanismos se incluyen mutaciones en los sitios de unión de miRNAs en los mRNA diana, así como la pérdida de éstos por translocaciones somáticas o *splicing* alternativo. Este es el caso de let-7 y su diana oncogénica HMGA2, en la cual se han descrito reordenamientos cromosómicos que afectan a los sitios de unión de let-7 localizados en el ORF y 3'-UTR provocando el escape de la regulación por let-7 y por tanto, a la sobreexpresión de esta proteína oncogénica <sup>249</sup>. Otros mecanismos se basan en la modulación de la accesibilidad de los sitios de unión de miRNAs por RBPs y en la competición con otros RNAs endógenos competitivos (ceRNAs, del inglés competing endogenous RNAs) que tienen elementos de reconocimiento de miRNAs <sup>240</sup>.



**Figura 13.** Representación de las alteraciones que provocan la desregulación de miRNAs en cáncer. RBP: proteína de unión a RNA; ceRNA: RNA endógeno competitivo. CH-3: Metilación; Ac: Acetilación (Modificado de Di Leva, Garofalo, y Croce, 2014<sup>238</sup>).

### I.3.3. DESREGULACIÓN DE microRNAs EN CÁNCER DE MAMA.

#### I.3.3.1. IMPLICACIONES CLÍNICAS.

La primera evidencia de desregulación de la expresión de miRNAs en cáncer de mama fue reportada por Iorio y colaboradores en el año 2005. El análisis de la expresión de miRNAs mediante microarray en 76 tumores de mama y 10 tejidos normales llevó a la identificación de 29 miRNAs diferencialmente expresados en tumores de mama respecto del tejido normal. Los miRNAs más consistentemente desregulados fueron miR-10b, miR-125b, miR145, miR-21, y miR-155. Entre estos miRNAs, en comparación con el tejido normal la expresión de miR-10, miR-125b y miR-145 estaba disminuida mientras que miR-21 y miR-155 fueron sobreexpresados en los tumores de mama, sugiriendo que potencialmente pueden actuar

como genes supresores de tumores y oncogenes, respectivamente <sup>250</sup>. Después de este hallazgo, han sido varios los estudios que mediante diferentes plataformas (microarray, qRT-PCR, RNA-seq) han identificado nuevos miRNAs desregulados en cáncer de mama <sup>235,251–253</sup>. Además, las firmas moleculares basadas en perfiles de expresión de miRNAs no solamente son capaces de distinguir los tumores del tejido normal, sino también son capaces de identificar perfiles de expresión de miRNAs que predicen con precisión el estado de RE, RP y HER2 en cánceres de mama en estadio temprano así como su asociación con distintas características clínico-patológicas como el estadio del tumor, el índice proliferativo, la invasión vascular y el grado del tumor <sup>250,254–256</sup>. Interesantemente, tres estudios han determinado los perfiles de expresión de miRNAs capaces de diferenciar los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama, Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido, Basal y tipo normal <sup>257–259</sup>. Un meta-análisis de los tres estudios independientes mostró de forma consistente los miRNAs específicos de subtipo comunes en los tres estudios: Los miRNAs let-7c, miR-10a y let-7f fueron asociados al subtipo luminal A; los miRNAs miR-18a, miR-135b, miR-93 y miR-155 fueron asociados con el subtipo basal; y los miRNAs miR-142-3p y miR-150 fueron asociados al subtipo HER2-enriquecido <sup>260</sup>. Respecto al subtipo Luminal B no hubieron miRNAs comunes en los estudios analizados, aunque se ha determinado una firma de 9 miRNAs que diferencian los subtipos Luminal A y Luminal B <sup>258</sup>.

Otros estudios basados en perfiles de expresión de miRNAs han permitido identificar los miRNAs que juegan un papel importante en la progresión del cáncer de mama, así como su asociación con parámetros clínicos pronósticos como la supervivencia general y la supervivencia libre de metástasis. En este sentido, se ha identificado una firma de 9 miRNAs (miR-210, let-7d, miR-181a, miR-221, miR-10b, miR-126, miR-218, miR-335-5p, y miR-143) y 6 miRNAs (miR-375, miR-203, miR-425-5p, miR-183, miR-565, y miR-182) que definen la transición de carcinoma ductal *in situ* a carcinoma ductal invasivo y de carcinoma lobular *in situ* a carcinoma lobular invasivo, respectivamente <sup>253,261</sup>. En los últimos años, se han identificado varios miRNAs con potencial pronóstico, entre los que destaca miR-155 y miR-210. miR-155 tiene importantes funciones en proliferación, angiogénesis y migración, y su sobreexpresión en tumores de mama se ha asociado con un mal pronóstico en términos de supervivencia general, mientras que la sobreexpresión de miR-210 está asociado con un mal pronóstico en términos de supervivencia libre de recurrencia y supervivencia libre de enfermedad <sup>260</sup>. Por tanto, la evaluación de la expresión de miRNAs tiene el potencial de proporcionar nuevos marcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos que a su vez tiene un gran impacto en el manejo clínico de los pacientes con cáncer de mama.

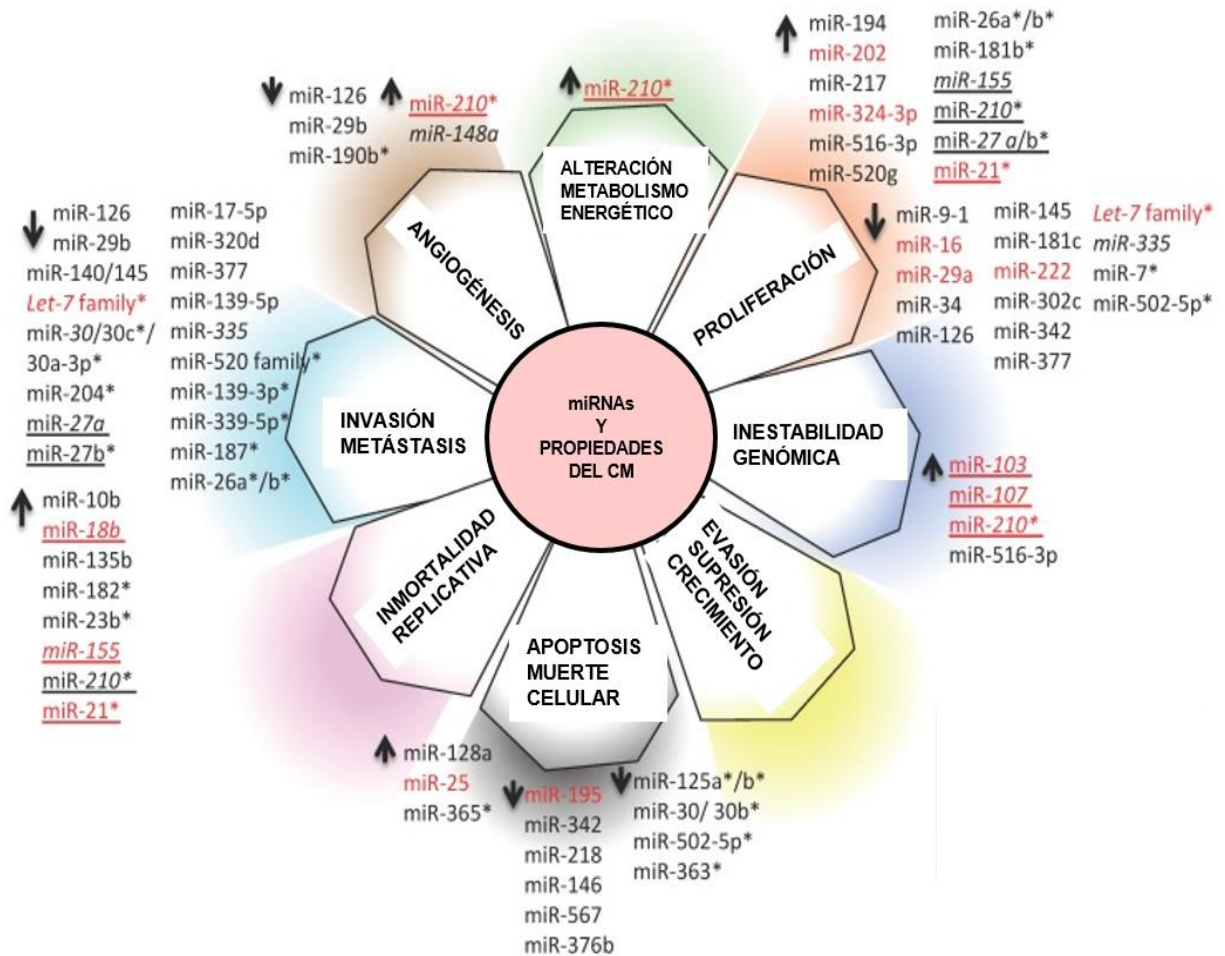


Aunque las mediciones directas de biomarcadores tisulares han mejorado en gran medida el diagnóstico del cáncer de mama, la naturaleza invasiva limita su aplicación. Por ello, el aislamiento y la posterior caracterización de los miRNAs que se encuentran en fluidos corporales circulantes (sangre, plasma, suero, saliva, orina ...) ha supuesto un avance para responder a las necesidades clínicas actuales. Se ha demostrado que los miRNAs se expresan estable y específicamente en el tejido mamario y en los fluidos corporales cuando la enfermedad está en curso, por lo que han emergido recientemente como biomarcadores no invasivos con potencial diagnóstico, pronóstico y predictivo <sup>262</sup>. Un hallazgo relevante fue la identificación de una firma de 4 miRNAs circulantes (miR-18b, miR-103, miR-107, y miR-652) asociada a un alto riesgo de recurrencia o recaída temprana y a una reducida supervivencia general con mal resultado clínico en pacientes con cáncer de mama triple negativo. Si se confirma en ensayos clínicos prospectivos, esta firma de miRNAs podría suponer la primera herramienta no invasiva para estratificar a los pacientes con tumores de mama triple negativo en base al riesgo de recurrencia tumoral, lo que supondría una mejora en la selección de tratamientos en este grupo de pacientes <sup>263</sup>

Además, se han reportado miRNAs circulantes que son capaces de predecir la respuesta terapéutica de los pacientes con cáncer de mama y que, por tanto, ayudan a la selección de un enfoque terapéutico correcto. Por ejemplo, se ha demostrado que altos niveles de miR-210 en plasma están relacionados con resistencia a Trastuzumab y la presencia de tumor en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo <sup>264</sup>. Otro miRNA circulante que se ha utilizado para monitorizar el efecto del tratamiento quimioterápico con taxanos es miR-155. Sun y colaboradores demostraron que se produce una disminución de los niveles de miR-155 en el suero de pacientes con cáncer de mama tras la administración de quimioterapia, alcanzándose niveles comparables a los de los sujetos sanos <sup>265</sup>.

### I.3.3.2. PAPEL DE LOS microRNAs EN TUMORIGÉNESIS DE MAMA.

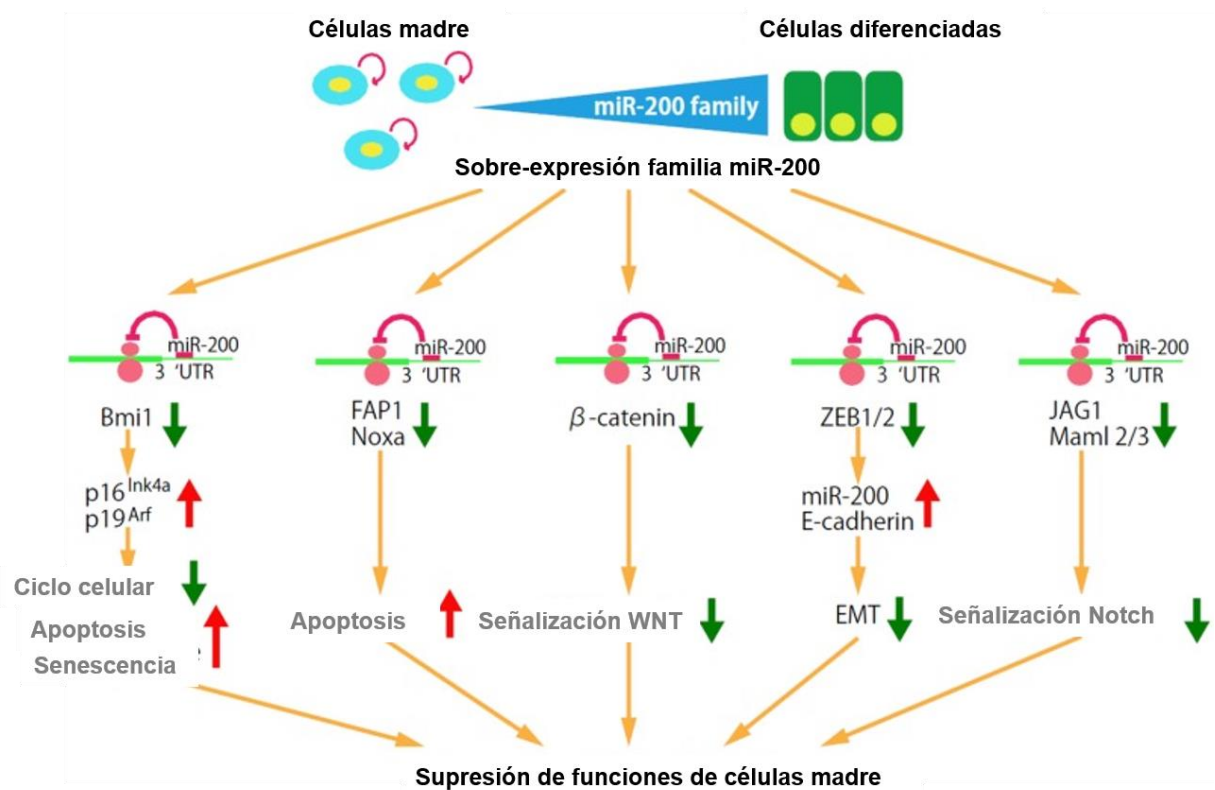
Los miRNAs juegan un papel importante en la fisiopatología del cáncer de mama. Diversos estudios han implicado a los miRNAs en la regulación del inicio, la invasión, la metástasis y la resistencia a quimioterapia en cáncer de mama. En la Figura 14 se muestran los miRNAs principales implicados en la regulación de las características intrínsecas de las células tumorales de mama <sup>262</sup>.



**Figura 14.** Principales miRNAs implicados en la regulación de las características intrínsecas del cáncer de mama. Los miRNAs señalados en cursiva tienen función diagnóstica y pronóstica en cáncer de mama. Los miRNAs señalados con un asterisco son miRNAs predictores de respuesta a terapias en cáncer de mama. Los miRNAs subrayados representan miRNAs con múltiples funciones (diagnósticas/ pronósticas/ predictivas). En color negro se presentan los miRNAs no circulantes y, en color rojo, los miRNAs circulantes. Las flechas indican la sobreexpresión o represión de los miRNAs en cáncer de mama (Modificado de Bertoli y colaboradores., 2015 <sup>262</sup>).

Por otro lado, ya es conocido que las CSCs son la subpoblación de células del tumor responsables de la iniciación tumoral, del crecimiento tumoral y de la resistencia a la quimioterapia y radioterapia, favoreciendo la progresión tumoral y la recaída de la enfermedad. Se ha demostrado que el perfil de expresión de miRNAs de CSCs es notablemente diferente de células no CSC, y que algunos miRNAs, entre los cuales destaca la familia let-7, regulan las propiedades de auto-renovación y diferenciación de las CSCs <sup>266</sup>. La familia let-7 desempeña una función supresora de tumores y está reprimida en muchos tipos de tumores incluido el cáncer de mama. En el tejido normal let-7 desempeña un papel regulando la auto-renovación y actuando como un miRNA pro-diferenciación, mientras que en el cáncer de mama su expresión es reprimida por la vía Wnt /  $\beta$ -catenina, lo que conduce a la des-represión de sus dianas, entre las cuales destacan H-RAS y HMGA2, conduciendo a la supresión de la diferenciación y a un aumento de la población de CSCs <sup>267,268</sup>. Además, otros *clusters* de miRNAs desregulados en CSC de mama, son los *clusters* regulados negativamente, miR-200

que se expresan como dos transcritos de pri-miRNA policistrónicos separados (miR-200b-200a-429 y miR-200c-141) y el *cluster* miR-183 (miR-183-96-182), y el *cluster* regulado positivamente miR-221-222<sup>269</sup>. Se ha demostrado que miR-200 tiene un efecto supresor sobre la transformación celular, la proliferación celular, la migración, la invasión y la metástasis<sup>270</sup>. El factor esencial para capacidad de auto-renovación, Bmi1 es regulado por miR-200, de forma que la represión de la expresión miR-200 en CSCs, conduce al aumento de la expresión de Bim1 que a su vez suprime los genes codificados en el locus Ink4a, p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup> encargados de regular la senescencia, el ciclo celular y la apoptosis<sup>269</sup> (Figura 15). Además, el *cluster* miR-221-222 que está sobreexpresado en las CSCs de mama, regula la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la migración celular y las características de células madre a través de los inhibidores del ciclo celular p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>, PUMA, FOXO3, PTEN, Bim, c-Kit, TIMP3 y la DNA metiltransferasa DNMT3b<sup>271,272</sup>.



**Figura 15.** Regulación de los genes y las vías de señalización por la familia de miRNAs miR-200 para el mantenimiento de las características de células madre. La expresión de los miRNAs de la familia miR-200 está regulada negativamente en las CSCs de mama y en las células madre / progenitoras mamarias normales, y está regulada positivamente en las células más diferenciadas (Modificada de Shimono y colaboradores., 2015<sup>269</sup>).

De forma importante, estudios recientes han destacado un vínculo entre el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y la formación de CSCs<sup>273-275</sup>. Durante el proceso de EMT las células epiteliales tumorales adquieren rasgos mesenquimales y habilidades invasivas y metastásicas. De hecho, la EMT se asocia con la pérdida de las uniones

intercelulares y la polaridad epitelial y el aumento de la motilidad celular, además de ser relevante para la adquisición y el mantenimiento de las características de células madre. Entre los miRNAs que bloquean el proceso de EMT y que actúan como supresores de metástasis se encuentran miR-205, familia miR-200, miR-146a/b, miR-206, miR-335, miR-31, miR-145, miR-7, miR-661, miR-126, miR-15b, miR-16, miR-20a/b y miR-29b <sup>276</sup>. Por el contrario, también se han descrito miRNAs que promueven EMT. Recientemente, se ha demostrado que miR-22 desencadena EMT en modelos animales induciendo hiperplasia de la glándula mamaria y ampliando el compartimento de células madre, por lo tanto, actuando como un promotor del tumor. Además, miR-22 promueve el proceso metastásico mediante el silenciamiento de miR-200 a través de su diana directa TET que es responsable de la desmetilación del promotor de mir-200 <sup>277</sup>.

### **I.3.4. IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS DE LOS microRNAs.**

Las primeras indicaciones de la viabilidad y la eficacia de una terapia basada en microRNAs en cáncer, utilizando estas pequeñas moléculas como dianas y herramientas terapéuticas, derivaron de modelos preclínicos destinados a comprender el papel biológico de un miRNA específico. La aplicación terapéutica de miRNAs implica dos estrategias principales. Las estrategias directas implican el uso de oligonucleótidos o construcciones basadas en virus para bloquear la expresión de un miRNA oncogénico que se sobreexpresa en cáncer o reintroducir un miRNA supresor de tumores cuya expresión está disminuida en cáncer. Las estrategias indirectas implican el uso de fármacos para modular la expresión de miRNAs a nivel transcripcional <sup>234</sup>.

#### **I.3.4.1. ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS DIRECTAS.**

Una de las estrategias para silenciar oncomiRs se basa en la utilización de unas moléculas denominadas oligonucleótidos anti-miR (AMOs, del inglés Anti-miR Oligonucleotides) que consisten en un ácido nucleico complementario contra un microRNA específico, que bloquea las interacciones entre microRNAs y sus mRNA por competencia <sup>278,279</sup>. Este tipo de moléculas se ha empleado con éxito en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los estudios de caracterización funcional de miR-21 representan uno de los primeros ejemplos de inhibición del desarrollo del cáncer mediante la represión de la expresión de un miRNA oncogénico. miR-21 está sobreexpresado en la mayoría de los tipos de tumores y actúa suprimiendo la expresión de muchos genes supresores de tumores relacionados con la proliferación, apoptosis e invasión. Si y colaboradores inhibieron la expresión de miR-21 transfectando células de cáncer de mama MCF7 con oligonucleótidos anti-miR-21 y demostraron que los oligonucleótidos anti-miR-21 suprimieron el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón a través del aumento de la apoptosis y disminución de la proliferación celular <sup>280</sup>. Además, se han

introducido modificaciones químicas en los AMOs para aumentar la afinidad de unión, conferir resistencia a las nucleasas y facilitar la captación celular <sup>281</sup>. Entre los AMOs modificados químicamente se incluyen los 2'-O-metil oligonucleótidos que están conjugados a colesterol y los ácidos nucleicos bloqueados (LNA, del inglés locked nucleic acids) <sup>282</sup>. Recientemente, se ha descrito otra modificación de AMOs en el que múltiples unidades complementarias están diseñadas en una única unidad que es capaz de silenciar simultáneamente múltiples microRNAs. Por ejemplo, el AMO de diana múltiple que contiene secuencias complementarias para miR-21, miR-155 y miR-17-5p tiene un efecto inhibitor mayor sobre el crecimiento celular en células MCF-7 en comparación con los anti-miRs de una sola diana o una combinación de éstos <sup>283</sup>. Este enfoque anti-miR de diana múltiple puede tener una amplia aplicación en tumores humanos.

Otras variantes que interfieren con la expresión de un microRNA oncogénico son las esponjas de miRNAs y máscaras de miRNAs (miR-masks). Las esponjas de miRNAs son transcritos que contienen múltiples sitios de unión en tándem para un miRNA específico, y se forman insertando una protuberancia entre los sitios de unión de miRNAs en la posición normalmente escindida por la enzima Argonauta 2. Como consecuencia se produce una asociación estable de las esponjas de miRNAs con complejos de microrribonucleoproteínas cargadas con el miRNA correspondiente <sup>284</sup>. Estas esponjas de miRNAs pueden desreprimir las dianas de los miRNAs de interés tan fuertemente como las moléculas anti-miR químicamente modificadas *in vitro*. Se han empleado esponjas de miRNAs para inhibir la actividad de miRNAs en *Drosophila* <sup>285</sup>. Además, Liang y colaboradores demostraron que se produce una inhibición de la proliferación, migración e invasión de líneas celulares de mama mediante la represión de miR-10b utilizando esta estrategia <sup>286</sup>. Una molécula estándar miR-mask es una molécula de cadena simple 2-O-metil-modificada que es complementaria a un mRNA diana del miRNA endógeno de interés. En contraste con las estrategias anteriores, un miR-mask no interactúa directamente con su miRNA correspondiente, sino que se une al sitio de unión de ese miRNA en la región 3'-UTR del mRNA diana mediante hibridación complementaria <sup>287</sup>. Aunque los efectos adversos pueden reducirse drásticamente con este enfoque, también supone la desventaja de limitarse a una única diana.

Por otra parte, la terapia de reemplazo de miRNAs se basa en la reintroducción de un miRNA que tiene su expresión reprimida en células tumorigénicas, con el fin de reactivar las vías celulares que conducen a una respuesta terapéutica. Para restablecer los niveles de miRNAs supresores de tumores, se han utilizado pequeños oligonucleótidos sintéticos, denominados miRNAs imitadores (miRNA mimic), que imitan las moléculas de miRNAs maduras endógenas. Recientemente, por primera vez un ensayo clínico en fase I

(Clinicaltrials.gov NCT01829971) evaluó la dosis máxima tolerada, la seguridad, la farmacocinética y la actividad clínica de MRX34 (Mirna Therapeutics, Inc.) como terapia de remplazo de miRNAs en pacientes con tumores sólidos avanzados. MRX34 es una molécula sintética de miR-34a mimic formulada en nanopartículas liposomales que imita el miRNA supresor de tumores miR-34a, el cual tiene suprimida su expresión en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Los resultados preliminares demuestran que el tratamiento con MRX34 es factible y tolerable bajo premedicación adecuada con dexametasona y, proporciona evidencia preliminar de actividad antitumoral <sup>288</sup>. En modelos preclínicos, MRX34 ha demostrado inhibir el crecimiento de células cancerosas mediante la represión de MYC, MET, BCL2, b-catenina, a través de la vía p53. Por lo tanto, MRX34 es capaz de inducir la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis, además de reducir la viabilidad de las células madre del cáncer, inhibiendo la metástasis y la quimiorresistencia <sup>276</sup>.

En general, el mayor desafío para el uso de miRNAs como moléculas terapéuticas se relaciona con la liberación específica de tejidos y la captación celular de cantidades suficientes de oligonucleótidos sintéticos para lograr una inhibición sostenida de la diana <sup>289</sup>. En consecuencia, se han desarrollado estrategias para administrar terapias basadas en miRNAs, incluyendo sistemas de vectores virales y no virales. Por ejemplo, los sistemas de vectores lentivirales tienen alta eficiencia de transferencia de genes pero tienen limitaciones debido a su falta de capacidad de direccionamiento en los tumores y debido a elementos virales residuales que pueden ser inmunogénicos, citopáticos o recombinógenos <sup>290</sup>. Sin embargo, los vectores asociados a adenovirus no se integran en el genoma y se eliminan eficazmente con una toxicidad menor <sup>282</sup>. Por ejemplo, la administración sistémica de miR-26a en un modelo murino de hepatocarcinoma celular utilizando vectores asociados a adenovirus da como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas, la inducción de apoptosis específica del tumor y una protección contra la progresión de la enfermedad sin toxicidad <sup>291</sup>.

Por último, el uso de sistemas de vectores no virales incluye sistemas de transferencia mediados por nanopartículas, por liposomas catiónicos y polímeros para terapia humana *in vivo* <sup>292-294</sup>.

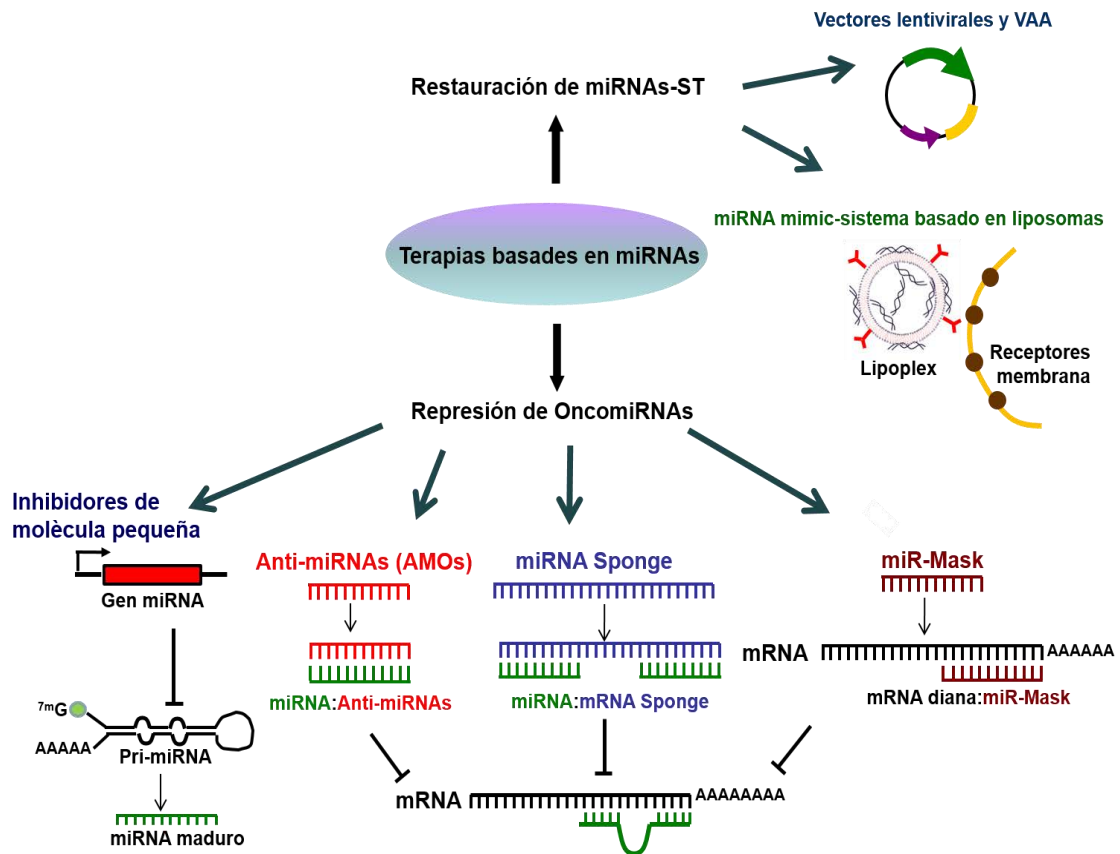
#### I.3.4.2. ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS INDIRECTAS.

Un posible enfoque que podría modular la expresión de miRNAs es la utilización de drogas que afectan al sistema epigenético. Ejemplos de fármacos epigenéticos incluyen aquellos que tienen actividad desmetilante global, tales como los análogos de 5-aza-20-desoxicitidina (5-AZA-CdR) y 5-AZA-CdR, y los que son inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) <sup>295</sup>. Los miRNAs podrían desempeñar un papel crucial en el control epigenético por las siguientes

razones: (a) La expresión de algunos miRNAs es regulada por el estado de metilación del DNA por presentar islas CpG, en los promotores; (b) algunos miRNAs están localizados en regiones silenciadoras epigenéticas de largo alcance, y su expresión depende de la metilación del DNA, la modificación de las histonas y el estado de la cromatina; y (c) la interacción de algunos miRNAs con diversos componentes de la maquinaria epigenética (por ejemplo, DNMTs) demuestra el papel crucial de miRNAs en patrones de expresión globales, influenciando la metilación de las islas CpG individuales y la metilación global del DNA <sup>296</sup>.

Es sorprendente que hasta el 5% de los miRNAs humanos aumenten sus niveles de expresión cuando las células son tratadas con fármacos epigenéticos <sup>297</sup>. Por ejemplo, en células de carcinoma de vejiga, el tratamiento concomitante con los fármacos modificadores de la cromatina 5-aza-2'-desoxicitidina y ácido 4-fenilbutírico, induce la expresión de miR-127 mediante desmetilación de su promotor e inhibición de HDAC <sup>297</sup>. Por tanto, la activación de miRNAs supresores de tumores epigenéticamente silenciados podría permitir nuevas modalidades de tratamiento.

Por otro lado, se ha demostrado que el uso de compuestos de bajo peso molecular puede interferir con la expresión de un miRNA en una etapa temprana de la vía de su biosíntesis. Gumireddy y colaboradores clonaron secuencias complementarias de miR-21 en un gen reportero, utilizándolo como un sensor para detectar moléculas de miR-21 maduras. Se encontró que el compuesto diazobenceno 1 era capaz de afectar la transcripción de miR-21 <sup>298</sup>. Por lo tanto, los inhibidores de moléculas pequeñas son herramientas terapéuticas prometedoras para bloquear la expresión de miRNAs oncogénicos. Una representación esquemática de los enfoques mencionados anteriormente se resume en la Figura 16.



**Figura 16.** Representación esquemática de las posibles terapias contra el cáncer basadas en miRNAs. Para los miRNAs oncogénicos (onco-miRs), que promueven el cáncer cuando se sobreexpresan, las terapias incluyen oligonucleótidos anti-miR, esponjas de miRNAs y enmascaramiento de miRNAs. Los Anti-miRs bloquean las interacciones entre un miRNA y sus RNAm diana por hibridación complementaria con el miRNA. Las esponjas de miRNAs son mRNAs sintéticos que contienen múltiples sitios de unión para miRNAs específicos, evitando así la interacción entre un miRNA y sus RNAm dianas. Un miR-mask es una secuencia complementaria a un sitio de unión del miRNA de interés en el mRNA diana, por lo tanto, se produce el bloqueo del acceso del miRNA a su mRNA diana. Para miRNAs supresores de tumores (miRNAs-ST), que promueven el cáncer cuando se subexpresan, las terapias basadas en miRNAs incluyen la utilización de miRNAs mimics o vectores lentivirales y / o virus adeno-asociados (VAA) que contienen el miRNA específico para restaurar la función supresora de tumores. Los miRNAs mimics son pequeñas moléculas de RNA de doble cadena, químicamente modificadas, que imitan moléculas de miRNAs maduros. Éstos se pueden acomplejar a liposomas catiónicos (lipoplex) que contienen un ligando reconocido por un receptor de superficie celular específico para la transferencia génica.





# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Desde la perspectiva molecular se han descrito cientos de alteraciones genéticas y epigenéticas en cáncer de mama, y a pesar de la caracterización de una gran parte de oncogenes y genes supresores, nuevas vías de regulación de la expresión génica están surgiendo; lo que apunta a la necesidad de explorarlas exhaustivamente. El descubrimiento reciente de los miRNAs como reguladoras de la actividad génica, ha surgido apenas hace 15 años y está significando una revolución en biología y medicina.

Numerosos estudios han determinado la utilidad clínica del análisis de los perfiles de expresión génica en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama. Sin embargo, pocos estudios han explorado la utilidad clínica de los perfiles de expresión de miRNAs en cáncer de mama. Dado el papel importante que desempeñan los miRNAs en la tumorigénesis y su gran potencial como nuevos biomarcadores clínicos, los objetivos específicos de la presente tesis fueron:

- Objetivo 1: Identificación de los miRNAs diferencialmente expresados en tumores de mama respecto al tejido normal mamario adyacente mediante el análisis de su expresión por microarray.
- Objetivo 2: Caracterización biológica y funcional de miR-125b en cáncer de mama:
  - Objetivo 2.1: Estudio de los efectos de la sobreexpresión de miR-125b sobre la proliferación celular y el crecimiento independiente de anclaje en líneas celulares de mama.
  - Objetivo 2.2: Identificación y validación de potenciales dianas de miR-125b por las cuales ejerce su papel supresor de tumores en cáncer de mama.
  - Objetivo 2.3: Estudio de los efectos de la inhibición de la expresión de miR-125b sobre la proliferación celular y la expresión de las proteínas diana de miR-125b en líneas celulares de mama.
  - Objetivo 2.4: Estudio de los efectos de la inhibición de la expresión de las proteínas diana identificadas de miR-125b en células MCF7.
  - Objetivo 2.5: Análisis de la expresión de las nuevas dianas identificadas de miR-125b en tumores de mama y estudiar su posible asociación con la expresión de miR-125b y con las características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama.

- Objetivo 3: Caracterización biológica y funcional de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en cáncer de mama:
  - Objetivo 3.1: Validación de la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en una serie independiente de pacientes con cáncer de mama. Estudio de la correlación de la expresión entre miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, así como con las características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama.
  - Objetivo 3.2: Estudio de los efectos de la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a sobre la proliferación y la invasión celular en líneas celulares de mama.
  - Objetivo 3.3: Estudio de los efectos de la inhibición de la expresión de miR-1260a sobre la proliferación y la invasión celular en líneas celulares de mama en líneas celulares de mama.
  - Objetivo 3.4: Estudio de los efectos de la sobreexpresión de miR-1274a y miR-1274b sobre la expresión de FOXO4 en líneas celulares de mama.





# MATERIALES Y MÉTODOS



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **III.1. PACIENTES Y MUESTRAS.**

##### **III.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO.**

En función del objetivo y el tipo de estudio llevado a cabo durante la tesis doctoral se utilizaron los siguientes tipos de muestras:

- Biopsias de pacientes con cáncer de mama: Para llevar a cabo algunos de los objetivos de la presente tesis doctoral fueron seleccionadas biopsias de pacientes diagnosticados con cáncer de mama del banco de tumores del departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. De forma general, tras recibir la pieza de cirugía se secciona en varias partes o secciones que tendrán un destino distinto en función del posterior análisis a realizar. Brevemente, dos secciones correspondientes al tejido tumoral y al tejido normal adyacente se almacenaron a -80°C para su posterior análisis y la otra parte se congeló en un criomolde con OCT. A partir de este criomolde se realizó un corte con el criostato de cada una de las biopsias para su posterior fijación por inmersión en un baño de formol tamponado al 4% seguido de un proceso de deshidratación empleando baños en alcoholes de graduación creciente 50%, 70%, 80%, 95% y alcohol absoluto. Tras la deshidratación las muestras se someten a un proceso de aclarado con xileno para, por último, incluir las muestras en parafina líquida a una temperatura entre 58° y 65°C. Además, se realizó un control de calidad histológico de las muestras que consistió en la realización de un corte de 5 µm de cada muestra, que fue colocado en portas pretratados con poli-L-lisina para realizar una tinción de hemotoxilina-eosina. Los cortes histológicos teñidos fueron revisados independientemente por patólogos para asegurar que las biopsias tuvieran una adecuada densidad de células tumorales (>80%). De igual manera, el tejido normal adyacente de los mismos pacientes fue teñido con hemotoxilina-eosina para asegurar un adecuado contenido de células epiteliales.

- Muestras procedentes de cultivos de líneas celulares humanas con las cuales se llevaron a cabo los ensayos funcionales para caracterizar los miRNAs seleccionados en el presente trabajo de investigación.

##### **III.1.2. PACIENTES.**

Se obtuvieron consentimientos informados de cada uno de los pacientes participantes en los estudios que conforman la presente tesis doctoral. Todos los procedimientos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron diagnosticados con cáncer de mama

esporádico y fueron seguidos por un mínimo de 2-3 años. Ningún paciente incluido en este estudio ha sido tratado con quimioterapia y radioterapia previo a la cirugía, y los tumores primarios fueron aislados en todos los casos.

Los pacientes y donantes participantes en este estudio fueron agrupados de la forma siguiente:

**Serie/Cohorte 1:** Una serie inicial de 50 pacientes con cáncer de mama fue utilizada para analizar la expresión diferencial de 939 miRNAs entre el tejido tumoral y el tejido sano adyacente mediante microarray (Agilent). Las biopsias de la cohorte 1 corresponden a pacientes diagnosticado con cáncer de mama en el Hospital Vall d'Hebron entre 2007 y 2009. No pudo obtenerse tejido normal adyacente de los 50 pacientes de cáncer de mama. Únicamente se obtuvo tejido normal adyacente de 24 pacientes del total de los 50 pacientes. Los tejidos normales adyacentes fueron agrupados en tres grupos, cada uno con 8 pacientes (grupos A, B y C).

Para cada paciente las siguientes características patológicas fueron estudiadas (Tabla 4), edad (<60 *versus* >60), tamaño del tumor, grado del tumor, presencia y número de nódulos linfáticos, presencia de metástasis a distancia y subtipo molecular. En la serie de carcinomas seleccionados encontramos que el 42% corresponden al subtipo Luminal A, 38% corresponden al subtipo Luminal B, el 6% corresponden al subtipo HER2+ y el 14% corresponden al subtipo triple negativo.

**Serie/Cohorte 2:** Una serie adicional de 50 pacientes con cáncer de mama con características anatomopatológicas similares fue utilizada para confirmar el patrón diferencial de expresión de microRNAs obtenido con los pacientes de la cohorte 1 mediante otra plataforma de microarray (FEBIT). Los pacientes de la cohorte 2 fueron agrupados en dos grupos. En un grupo agrupamos las muestras de tejido tumoral de los 50 pacientes con cáncer de mama mientras que en el otro grupo agrupamos las muestras disponibles de tejido normal adyacente que fueron 20 del total de 50 pacientes. Las biopsias de los pacientes de la cohorte 2 al igual que los de la cohorte 1 fueron seleccionadas del banco de tumores del departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona.

**Serie/Cohorte 3:** Una serie adicional de 25 pacientes con cáncer de mama con características clínico-patológicas similares fue utilizada para analizar la expresión de los miRNAs seleccionados y de sus potenciales proteínas diana.

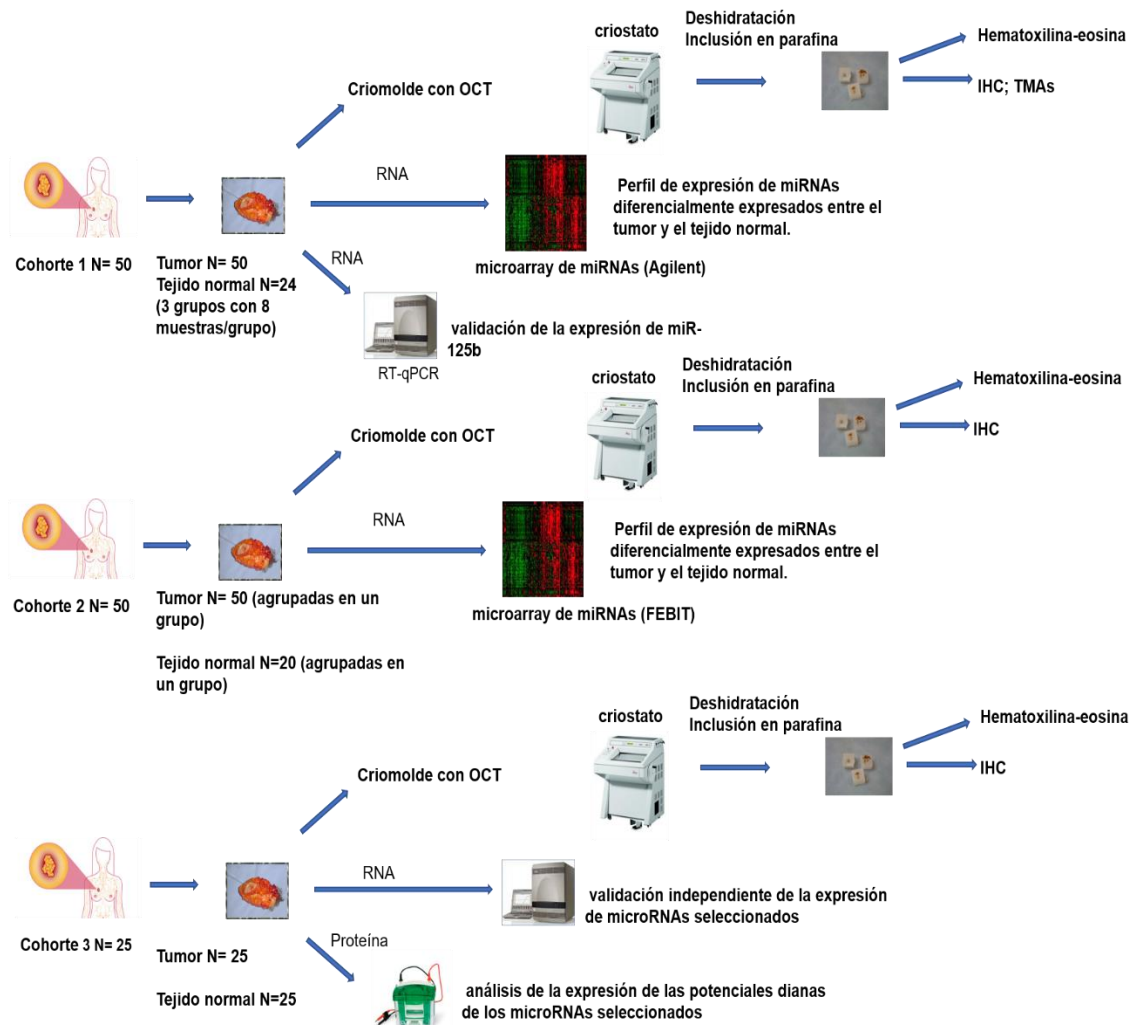
Las variables clínico-patológicas de los pacientes de la cohorte 3 se resumen en la Tabla 4.



<b>Características clínico-patológicas</b>		<b>Cohorte 1</b>	<b>Cohorte 3</b>
<b>Edad (años)</b>	> 60	29 (58%)	14 (56%)
	< 60	21 (42%)	11 (44%)
<b>Tamaño del tumor (cm)</b>	pT1	16 (32%)	5 (20%)
	pT2	29 (58%)	18 (72%)
	pT3	5 (10%)	2 (8%)
	Desconocido	0 (0%)	0 (0%)
<b>Grado histológico</b>	I (bien diferenciado)	3 (6%)	1 (4%)
	II (parcialmente diferenciado)	19 (38%)	8 (32%)
	III (poco diferenciado)	28 (56%)	15 (60%)
	Desconocido	0 (0%)	1 (4%)
<b>Receptores de estrógenos</b>	Positivo	41 (82%)	23 (92%)
	Negativo	9 (18%)	2 (8%)
	Desconocido	0 (0%)	0 (0%)
<b>Receptores de progesterona</b>	Positivo	36 (72%)	17 (68%)
	Negativo	14 (28%)	8 (32%)
	Desconocido	0 (0%)	0 (0%)
<b>Her2/neu</b>	Positivo	11 (22%)	1 (4%)
	Negativo	39 (78%)	24 (96%)
	Desconocido	0 (0%)	0 (0%)
<b>Subtipo molecular (St Gallen 2013)</b>	Luminal A	21 (42%)	5 (20%)
	Luminal B (Her2 negativo)	11 (22%)	16 (64%)
	Luminal B (Her2 positivo)	8 (16%)	1 (4%)
	Her2 positivo (no luminal)	3 (6%)	0 (0%)
	Triple negativo	7 (14%)	2 (8%)
	Desconocido	0 (0%)	1 (4%)
<b>Ki67</b>	< 14%	22 (44%)	6 (24%)
	> 14%	28 (56%)	17 (68%)
	Desconocido	0 (0%)	2 (8%)
<b>Metástasis ganglionar</b>	pN0	23 (46%)	10 (40%)
	pN1	18 (36%)	10 (40%)
	pN2	5 (10%)	3 (12%)
	pN3	4 (8%)	2 (8%)
	Desconocido	0 (0%)	0 (0%)

**Tabla 4.** Características clínico-patológicas de los pacientes de la cohorte 3. pT1: tumor  $\leq 2$  cm; pT2: tumor  $> 2$  y  $\leq 5$  cm; pT3: tumor  $> 5$  cm. pN0: ausencia de metástasis en ganglios regionales; pN1: metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o en ganglios mamaros internos; pN2: metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares, o en ganglios linfáticos mamaros internos clínicamente aparentes en ausencia de metástasis de ganglios linfáticos axilares a ganglio(s) linfático(s) axilar(es) ipsilateral(es) fijos entre sí o a otras estructuras; pN3: metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares, o en ganglios linfáticos infraclaviculares, o en ganglios linfáticos mamaros ipsilaterales clínicamente aparentes.

En la Figura 17 se representa de forma esquemática el origen y el destino de las muestras seleccionadas en el presente trabajo de investigación.



**Figura 17.** Esquema representativo de la agrupación de las muestras en cohortes y la finalidad de las mismas.

### III.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA Y CUANTIFICACIÓN.

El RNA total incluyendo la fracción de miRNAs fue extraído de las biopsias de tejido de los pacientes y de las diferentes líneas celulares utilizadas en este estudio usando el kit comercial mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion® Life Technologies, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Este kit se basa en una extracción orgánica seguida de una inmovilización del RNA en filtros de fibra de vidrio o sílica GFF en condiciones específicas para purificar el RNA total o el RNA enriquecido con RNAs de pequeño tamaño. Primeramente, las muestras se lisan con un tampón de lisis desnaturante y a continuación, las muestras se someten a una extracción con ácido-fenol:cloroformo. Posteriormente se realizan lavados con tampones que contienen alcohol y se pasan las muestras a través de los filtros mediante ciclos cortos de centrifugación

para inmovilizar el RNA en los mismos. Finalmente, el RNA es eluído con agua libre de nucleasas (Ambion® Life Technologies, CA, USA).

La concentración del RNA se cuantificó en Nanodrop-2000 UV-Vis Spectrophotometer (Fisher Scientific), usando 1-2 µl de muestra. La integridad del RNA se midió mediante el sistema de electroforesis en chip Bioanalyzer (Agilent).

### III.2.2. MICROARRAY DE microRNAs.

Un microarray de miRNAs consiste en una superficie sólida en la cual están fijadas una colección de sondas específicas que hibridan con los miRNAs diana con la finalidad de determinar el nivel de expresión de los mismos. Generalmente, el RNA de las muestras es marcado con un fluoróforo y a continuación hibridado con el chip de manera que el nivel de hibridación entre la sonda específica y el miRNA diana determinará una intensidad de fluorescencia cuantificable mediante un análisis de imagen.

Se realizó un array de miRNAs (Agilent, Santa Clara, CA, USA) conteniendo 13737 sondas para 939 microRNAs con las muestras de RNA de tejido tumoral y normal adyacente de la cohorte 1 de pacientes con cáncer de mama. En resumen, 500 ng de RNA total de cada muestra fue marcada químicamente mediante desforilación con fosfatasa alcalina intestinal de ternero y ligación de Cianina 3 (Cy3)-Citidina difosfato (pCp) con la ligasa RNA-T4 utilizando el kit Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (p/n5190-0456; Agilent). Las muestras de RNA marcadas se secaron, se resuspendieron en 18 l de agua libre de nucleasas y se cohibridaron con el array de miRNAs en tampón de hibridación *in situ* durante 20 h a 55°C. Las muestras se lavaron a temperatura ambiente durante 5 minutos con el tampón de lavado gene expression 1 y 5 min a 37 ° C con el tampón de lavado gene expression 2. Las imágenes de las muestras se generaron en un escáner confocal de microarrays (G2565BA; Agilent) a 5 µm de resolución y cuantificado con el programa Agilent Feature Extraction (Agilent). Los datos crudos y procesados del array fueron depositados en la base de datos de acceso público en la base de datos de acceso público Gene Expression Omnibus (GEO) con código de acceso GSE44124 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44124>).

Para validar nuestros resultados con una serie independiente de pacientes (cohorte 2) se utilizó una plataforma diferente de array de miRNAs (FEBIT, Heidelberg, Alemania). Los protocolos para la preparación de la muestra y el análisis de esta plataforma de array se describen en otra parte <sup>299,300</sup>.

### III.2.3. SÍNTESIS DE cDNA Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR).

La detección y cuantificación de microRNAs de biopsias de tejido (cohorte 1 y 3) y de las líneas celulares se realizó en dos pasos usando los ensayos comerciales prediseñados específicos para cada miRNA, TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, la transcripción reversa fue realizada a partir de 10 ng de RNA usando cebadores específicos stem-loop RT para miR-125b, miR-1274a, miR-1274b, miR-1260a y para los controles endógenos small nuclear RNU24 (RNU24) y small nuclear RNU6 (RNU6) junto con el Kit comercial Taqman microRNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA). Las reacciones de retrotranscripción fueron llevadas a cabo en el termociclador Veriti™ Thermal Cycler Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA) usando los siguientes ciclos de temperatura: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. Posteriormente, la expresión de cada miRNA es cuantificada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) usando las sondas y cebadores prediseñados para miR-125b (ID: 000449), miR-1274a (ID: 002883), miR-1274b (ID: 002884), miR-1260a (ID: 002896) y para los controles endógenos RNU24 (ID: 001001) y RNU6 (ID: 001093) junto con la mezcla TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA). Todos los ensayos fueron llevados a cabo en el equipo ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA) usando los siguientes ciclos de temperatura: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El método de cuantificación utilizado en este estudio fue el método de cuantificación relativa denominado  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  <sup>301</sup>. Este método asume que tanto los miRNAs que queremos cuantificar como el control endógeno son amplificados con una eficiencia similar y muy próxima al 100%.

$\Delta\Delta Ct$  equivale a [(Ct del miRNA de interés – Ct control endógeno) muestra de análisis – (Ct del miRNA de interés – Ct control endógeno) control o calibrador]. El Ct (cycle threshold) es ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral el cual es siempre fijado en la fase exponencial de la reacción de amplificación, por encima de la línea base. El control endógeno se utiliza para normalizar y corregir las diferencias de expresión del miRNA de interés relacionadas con diferencias en la cantidad de RNA total de partida de las muestras. Por tanto, es crucial que la expresión del control endógeno no varíe por las diferentes condiciones experimentales de las muestras a comparar. En nuestro estudio los valores de Ct de los controles endógenos RNU24 y RNU6 no variaron entre las muestras de tejido tumoral y tejido normal adyacente, así como en las diferentes líneas celulares. Con este método los

datos se relativizan respecto a un a una muestra o grupo que se denomina control o calibrador al cual se le asigna un valor de expresión relativa de 1. En nuestro caso, para la cuantificación de miRNAs en las biopsias de tejido, el calibrador o control fue el tejido normal mientras que para la cuantificación de microRNAs en líneas celulares fue la línea celular control o sin tratar.

### III.3. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y CLONAJE.

#### III.3.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Para los experimentos de sobreexpresión estable de miR-125b, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en las líneas celulares, las secuencias precursoras pri-miR-125b, pri-miR-1274a, pri-miR-1274b y pri-miR-1260a se clonaron en el vector retroviral miR-Vec que fue amablemente donado por el Dr. R. Agami (Instituto de Cáncer de Holanda, Amsterdam). Este vector fue originado mediante delección del sitio múltiple de clonaje (MCS) y el promotor de PGK del vector pMSCV-Blast, seguido por la inserción del promotor CMV de pcDNA-3.1 + y un DNA de relleno derivado de los primeros 211 nucleótidos de hTR por debajo del marcador de resistencia (Figura 18). Para la amplificación por PCR se seleccionaron aproximadamente 500 nucleótidos de la secuencia de DNA genómico que codifica para la secuencia precursora de miR-125b, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, y sus secuencias flanqueantes, y se clonaron tras la región promotora CMV del vector miR-Vec de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente por Borgdorff y colaboradores <sup>302</sup>. Los cebadores utilizados se especifican en la Tabla 5.

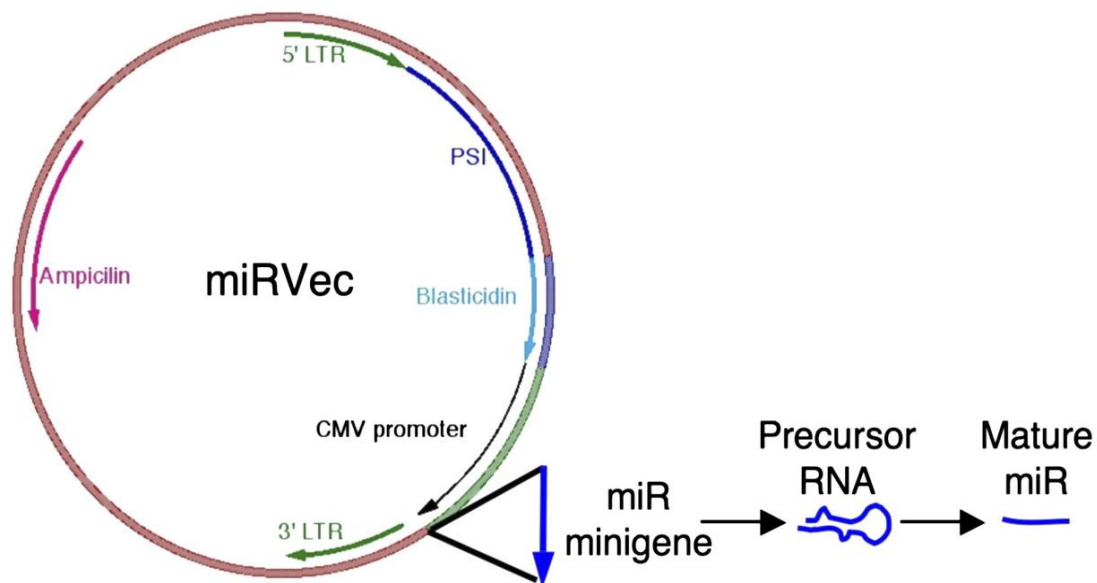


Figura 18. Mapa del vector miR-Vec.

Para los ensayos reporteros de luciferasa, se construyeron vectores reporteros que contienen la secuencia que codifica para Renilla luciferasa (RL; Renilla reniformis) seguida de la región 3'-UTR, *wild type* (WT) o mutante de las potenciales dianas de miR-125b. En resumen, las secuencias WT de la región 3'-UTR de ENPEP (945 nt), CK2- $\alpha$  (1245 nt), CCNJ (916 nt), y MEGF9 (2061 nt), que contienen los putativos sitios de unión a miR-125b, fueron amplificadas por PCR a partir de tejido normal mamario y clonados en el sitio XbaI tras la región Renilla luciferasa (RL) del vector pCI-neo-hRL de acuerdo a como se ha descrito previamente <sup>303</sup>. De la misma manera, se clonaron en el vector pCI-neo-hRL las secuencias que portan mutaciones en los potenciales sitios de unión a miR-125b de las regiones 3'-UTR de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9. Los cebadores utilizados se especifican en la Tabla 5. En todos los casos, los productos de PCR clonados se validaron por secuenciación.

<b>clonaje de miR-125b</b>	
F-125b	5'-CGGGATCCATTTTGCCCAAATCTTGAAA-3'
R-125b	5'-CGGAATTCACCAGGCAGATGAGTTCCAC-3'
F-1274a	5'-GAAGATCTCTGCTGGCTTCTGCTAGTCTC-3'
R-1274a	5'-GAGCAATTGAAAGGGCTATGAAAGCTCAGG-3'
F-1274b	5'-CGGGATCCAACCATGGGTTATGCGTGAT-3'
R-1274b	5'-CGGAATTCATGCTAAGGGCAGTCACACC-3'
F-1260a	5'-CTGGATCCCCTTCTGCGAGTTCTGATT-3'
R-1260a	5'-CTGAATTCATCCATCTGTGTCTGTCT-3'
<b>clonaje de las regiones 3'-UTR</b>	
F-CK2- $\alpha$	5'-GCTCTAGATGTCTCCTGATGCCTGAGCAG-3'
R-CK2- $\alpha$	5'-TTTATTTAGCGGCCGCAATTCCAACACTGGATCTTTC-3'
RP-CCNJ	5'-CAATTATTGCGGCCGCCAGTTAATACTGGTACAGT-3'
LP-CCNJ	5'-CTGTGGTCTAGACTGGGCCTAATGTTGGCTTC-3'
F-ENPEP	5'-GGAATTCATGAACTTTGCGGAGAGAGAG-3'
R-ENPEP	5'-CCGCTCGAGTTAACCACTCTCAAG-3'
F-MEGF9	5'-CGGGATCCATGAATGGCGGAGCCGAG-3'
R-MEGF9	5'-CGGAATCTTAGGCTTTGTAGTTATGTATGGGCGTCGTCAGGGTC-3'

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para el clonaje de miR-125b, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en el vector miRVec. También se especifican los cebadores utilizados para el clonaje de las regiones WT 3'-UTR de de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 en el vector pCI.

### III.3.2. MUTAGÉNESIS DE SITIO DIRIGIDO.

La mutagénesis de sitio dirigido es la técnica que nos permitió introducir mutaciones puntuales en los potenciales sitios de unión a miR-125b localizados en la región 3'-UTR del mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9, que fueron previamente clonados en el vector pCI-neo-hRL. Este proceso consta de tres pasos. El primer paso consistió en diseñar los cebadores complementarios y antiparalelos con las mutaciones a introducir en los constructos pCI-3'-UTR-ENPEP, pCI-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-3'-UTR-CCNJ pCI-3'-UTR-MEGF9, seguido de

una reacción de PCR en la cual el plásmido de doble cadena superenrollado se desnaturaliza y los cebadores sentido y antisentido hibridan con cada una de las hebras del plásmido. A continuación, la DNA polimerasa produce la extensión a partir de los cebadores para generar plásmidos que contienen la mutación deseada. Al finalizar, el producto de la PCR se trata con la endonucleasa Dpn I que es específica de DNA metilado y hemimetilado y, se usa para digerir el DNA parental dejando intacto el DNA que contiene la mutación ya que éste no está metilado. Por último, el DNA que ha incorporado la mutación es transformado en células ultracompetentes.

Se utilizó el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuikChange II XL (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante, para introducir mutaciones puntuales en la posición 202 de la región 3'-UTR-ENPEP, en las posiciones 210 y 450 de la región 3'-UTR-CK2- $\alpha$ , en la posición 714 del 3'-UTR-CCNJ, y en las posiciones 416, 654 y 1721 de la región 3'-UTR-MEGF9. Las posiciones de las mutaciones introducidas en las regiones 3'-UTR de cada una de las potenciales dianas de miR-125b, así como el alineamiento de éstas con la secuencia de miR-125b se indican en la Figura 19. Se construyó un plásmido mutante diferente para cada potencial sitio de unión a miR-125b localizado en la región 3'-UTR del mRNA. Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 6.

Posición 202-209 de 3' UTR-ENPEP miR-125b	5' ...AGAGUACUAAUUAUA <b>CUCAGGGA</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>
Posición 212-218 de 3' UTR-CSNK2A1 miR-125b	5' ...UCGAACUUUUCAUAA <b>CUCAGGGG</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>
Posición 449-455 de 3' UTR-CSNK2A1 miR-125b	5' ...ACAAAAUGUAGCUU <b>CUCAGGGG</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>
Posición 714-721 de 3' UTR-CCNJ miR-125b	5' ...UUAAAUAACAUUUAA <b>CUCAGGGA</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>
Posición 417-423 de 3' UTR-MEGF9 miR-125b	5' ...UUUUUUAAAACAGUG <b>UCAGGGAU</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>
Posición 655-661 de 3' UTR-MEGF9 miR-125b	5' ...AGGCUGAUGGUCCUC <b>CUCAGGGU</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>
Posición 1722-1728 de 3' UTR-MEGF9 miR-125b	5' ...GACCCCUAAGUUGUU <b>-CUCAGGGU</b> ... 3' AGUGUCAAUCCCA <b>GAGUCCCU</b>

**Figura 19.** Alineamiento de las regiones 3'-UTRs de los mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 y los potenciales sitios de unión de miR-125b en las posiciones indicadas. Las mutaciones puntuales que son introducidas en las regiones 3'-UTR de cada constructo mutante están indicadas en negrita. La secuencia semilla está indicada en sombreado amarillo.

Cebadores	
F-MEGF9(416)	5'-CTTCATCTCCATTCTGAAACATTTTTTTTAAACAGTGCGCCCGTTATATTCGTTTTACTATACAAAAGGACATCATTGAGGA-3'
R-MEGF9(416)	3'-GAAGTAGAGGTAAGGACTTTGTAAAAAATTTTGTACGCGGGGCAATATAAGCAAAATGATATGTTTTCTGTAGTAACCTCT-5'
F-MEGF9(654)	5'-GCAGCATTGGGGAGCAGGAGGCTGATGGTCTCACTGAATTCTCAGTGAAATGATAAATGTCTAAAAATAAG-3'
R-MEGF9(654)	3'-CGTCGTAACCCCTCGTCTCCGACTACCAGGAGTGACTTAAGAGTCACATTTACTATTTAACAGATTTTTTATTC-5'
F-MEGF9(1721)	5'-CATCCCTTTATAGGAGACCCCTAAGTGTACTCCACTTTGGAGATGATGTTCTGGAGGGAGTACAA-3'
R-MEGF9(1721)	3'-GTAGGGAATATCTCTGGGATTCAACAATGAGGTGAAACCTCTACTACAAGACCTCCCTCATGTT-5'
F-ENPEP (202)	5'-CCTTTAAATGTCTCTTTGTTTATGAAGAAAGATACTAATAGAGTACTTAATATAGCGCTCCATTCCTTAAGTGTACTTCATAAGATATT-3'
R-ENPEP (202)	3'-GGAAATTTAACAAGGAGAAACAAACTTCTTTCTATGATTATCTCATGAAATATATCGCGAGGTAAGGAAGTTCACATGAAGTATTCTATAA-5'
F-CCNJ (714)	5'-TTTTCCCTAAGTGATCAACATCAAAATTTTGAATTAATAATCTAGAGAAATTTGTACTACTTGGAACAC-3'
R-CCNJ (714)	3'-GGGATCACTAGTTGTAGTTAAAAATCTTAATTTATGTAATTAGATCTCTAAACATGATGAACCTTTGTGAATTG-5'
F-CK2- $\alpha$ (210)	5'-GCTGATTTCTTTTTCTTTTTTTTTAACTCGAAGTTCATAAATACTGGGATCCCTGAAAAATTACC-3'
R-CK2- $\alpha$ (210)	3'-CCGACTAAAAGAAAAAGAAAAAATTTGAGCTTGAAAAGTATTTATGACCCTAAGGGACTTTTTAATGGACG-5'
F-CK2- $\alpha$ (450)	5'-TCGTGCTCTTCCAGAGATTACAAAAATGTAGCTAATACTGGGAGGCAGGAAGAAAGG-3'
R-CK2- $\alpha$ (450)	3'-GCACGAGAAGAGGTCTCTAATGTTTTTACATCGATTATGACCCTCCGCTCTCTTC-5'

**Tabla 6.** Cebadores utilizados para la inserción de mutaciones puntuales en las regiones 3'-UTR del mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9.

La reacción de PCR se preparó añadiendo 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 20 ng del DNA de doble cadena de interés, 125 ng de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 1  $\mu$ l de mezcla de desoxirribonucleótido trifosfato, 3  $\mu$ l de QuickSolution, 1  $\mu$ l de DNA polimerasa Pfu Ultra HF (2,5 U /  $\mu$ l), y agua doblemente destilada hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. La PCR se realizó en el termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA) con los siguientes ciclos de temperatura: 18 ciclos (95 ° C durante 50 segundos, 60 ° C durante 50 segundos y 68 ° C durante 1 min / kb de la longitud del plásmido), incluyendo una incubación inicial a 95 ° C durante 1 min y un período de extensión final a 68 ° C durante 7 min. Después de la reacción de PCR, se añadió 1  $\mu$ l de la enzima de restricción DpnI (10 U /  $\mu$ l) directamente a cada reacción de amplificación y se incubó a 37 ° C durante 1 hora. El DNA de doble cadena tratado con DpnI se transformó en las células Ultracompetentes XL10-Gold siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, las colonias seleccionadas fueron crecidas en medio LB (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) con ampicilina durante toda la noche para la posterior extracción del DNA plasmídico usando el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La presencia de la mutación en cada uno de los casos fue confirmada mediante secuenciación. Tras comprobar la mutación parte de la miniprep se creció en 250 ml de LB con ampicilina durante toda la noche y a continuación se aisló y purificó el DNA mediante maxiprep usando el kit comercial NucleoBond® PC 500 (Cultek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



### III.4. CULTIVOS CELULARES Y ENSAYOS FUNCIONALES.

#### III.4.1. LÍNEAS CELULARES, MANTENIMIENTO Y SUBCULTIVO DE CÉLULAS.

Para llevar a cabo la caracterización de los miRNAs de interés, seleccionamos las siguientes líneas celulares:

- HMEC: Células epiteliales mamarias humanas aisladas de tejido procedente de reducción de mamoplastia. Células no tumorigénicas (Lonza, Basilea, Suiza).
- MCF10A: Línea celular epitelial de mama humana. Células no tumorigénicas (American Type Culture Collection; ATCC, número CRL-10317).
- MCF-7: Línea celular de adenocarcinoma de mama que conserva varias características de epitelio mamario diferenciado incluyendo la capacidad de procesar estradiol a través de receptores de estrógeno citoplásmicos y la capacidad de formar domos (ATCC, número HTB-22).
- MDA-MB-231: Línea celular de adenocarcinoma de mama. Respuesta a quimioterápicos intermedia, altamente invasora y tumorigénica (ATCC, número CRM-HTB-26).
- MDA-MB-468: Línea celular de carcinoma de mama (ATCC, número HTB-132). Responden a quimioterapia moderadamente, invasora y tumorigénica.
- MDA-MB-435: Línea celular de carcinoma de mama aunque recientemente se cuestiona su origen ya que son casi idénticas a la línea celular de melanoma M14 (ATCC, número HTB-129).
- T-47D: Línea celular de carcinoma de mama que tienen receptores de 17 beta estradiol, otros esteroides y calcitonina (ATCC, número HTB-133).
- HEK 293T: Línea celular de riñón embrionario con expresión del antígeno T del adenovirus SV40 (ATCC, número CRL-11238). Productora de lentivirus.
- Phoenix: Línea celular derivada de las células HEK 293T con expresión estable de los genes GAG, Pol y Env del virus de la leucemia murina de Moloney. Productora de retrovirus (ATCC, número CRL-3215).

Las células HMEC se cultivaron en medio basal de epitelio mamario MEBM (Lonza) suplementado con MEGM SingleQuots (Lonza). Las células MCF7, MDA-MB-435 y MDA-MB-468 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium; Gibco) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Labclinics, Barcelona, España), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Labclinics, Barcelona, España). Las células MDA-MB-231 y T-47D se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (Labclinics, Barcelona, España), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de

estreptomycin (Labclinics, Barcelona, España). Las células MCF10A se cultivaron en medio DMEMF/12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (Labclinics, Barcelona, España), 10 % L-Glutamina (Labclinics, Barcelona, España), 10 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 0.005 mg/ml de insulina (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 100 ng/ml hidrocortisona (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) y 20 ng/ml de EGF (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). La línea celular Phoenix se cultivó en medio MEM (Minimum Essential Media, Gibco) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (Labclinics, Barcelona, España), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (Labclinics, Barcelona, España). Todas las líneas celulares fueron manipuladas bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical (Bio II, Telstar, Life Science solutions). Todas las células fueron crecidas en un incubador de aire (AutoFlow UN-5510 incubator, Nuair) a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el mantenimiento en cultivo las células fueron pasadas a subconfluencia tres veces por semana. Además, se recogieron periódicamente sobrenadantes de los cultivos para detectar mediante PCR la presencia de Mycoplasma usando el Kit comercial test EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries, Haemek, Israel) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **III.4.2. GENERACIÓN DE RETROVIRUS E INFECCIÓN.**

Para la generación de retrovirus seleccionamos la línea celular empaquetadora Phoenix que contiene y expresa de forma estable los siguientes vectores: Gag, necesario para el procesamiento de proteínas de matriz y del núcleo del retrovirus; Pol, gen que incluye la transcriptasa reversa, Rnasa H y la integrasa; y Env, responsable de las glicoproteínas de la superficie viral y de proteínas transmembrana que median la unión de receptores celulares y la fusión de membranas. Por tanto, sólo es necesario transfectar las células con el vector de interés.

Para llevar a cabo los experimentos de sobreexpresión estable de miRVec-125b, miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP (células control) en las líneas celulares de mama, se transfectaron 30 µg de cada vector retroviral en células Phoenix mediante el método del fosfato cálcico. Este método químico se basa en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos. Al coprecipitar forman unos agregados que son endocitados o fagocitados por las células. A continuación, se describe el protocolo que se siguió para transfectar las células empaquetadoras e infectar las líneas celulares de mama:

- El día anterior a la transfección se plantaron  $4 \times 10^6$  de células Phoenix en placas de 10 cm.
- Al día siguiente, se añaden en tubos Falcon de 15 ml el volumen correspondiente a 30  $\mu\text{g}$  de cada uno de los vectores retrovirales
  - Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5M. Mezclar e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade el volumen de agua estéril necesario hasta completar 500  $\mu\text{l}$ .
  - Se añaden gota a gota 500  $\mu\text{l}$  de solución HBS 2X a pH 7,02 (50 mM Hepes, pH7; 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 280 mM NaCl) mientras la solución de DNA y  $\text{CaCl}_2$  está burbujeando. Incubar a temperatura ambiente durante 25 minutos. Durante este periodo de tiempo se cambia el medio a las células.
  - Se añade gota a gota la solución sobre las placas donde están plantadas las Phoenix. Incubar durante toda noche a  $37^\circ\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ .
  - Al día siguiente se cambia el medio de las placas de las células productoras añadiéndose 6 ml de medio fresco. Además, se plantan en placas de 10 cm las líneas celulares de mama seleccionadas a la densidad que se especifica en la Tabla 7.

Observamos bajo el microscopio de fluorescencia la placa transfectada con el vector miRVec-GFP para determinar que la eficiencia de transfección es mayor o igual al 90%.

- A las 24 y 48 horas de la transfección se recoge el sobrenadante viral de las placas de Phoenix y se filtran con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), permitiendo que tan solo los virus contenidos en el medio puedan atravesar la membrana, quedando los restos celulares o células enteras adheridas al filtro. El sobrenadante viral filtrado es diluido 1:2 con medio fresco y es suplementado con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Polibreno (Sigma-Aldrich).
  - Se retira el medio de las líneas celulares de mama y se añade 7 ml del sobrenadante viral. Se centrifugan las placas a 500 rpm durante una hora
  - Con el fin de seleccionar las células infectadas con los vectores de interés, se reemplaza el sobrenadante por medio fresco con la concentración de Blastidina (InvivoGen, San Diego, CA, USA) específica para cada línea celular utilizada (Tabla 7). Cada dos o tres días se cambia el medio con medio fresco suplementado con Blastidina durante 12 días. La dosis de selección de los diferentes modelos celulares se determinó realizando curvas de resistencia a Blastidina. En todos los experimentos se incluyó una placa de cada línea celular sin infectar con el fin de controlar la efectividad de la Blastidina a los 12 días.

Línea celular	Densidad celular/placa 10cm	Blasticidina (µg/ml)
HMEC	500000	3
MCF7	1500000	10
MDA-MB-231	1500000	10

*Tabla 7. Densidad de células que se plantan en placas de 10 cm el día previo a la infección. Concentración de Blasticidina utilizada para la selección de las líneas celulares de mama infectadas.*

### III.4.3. TRANSFECCIÓN.

#### III.4.3.1. TRANSFECCIÓN CON MOLÉCULAS PRE-miRNAs Y ANTI-miRNAs.

Con el fin de silenciar de forma transitoria la expresión de miR-125b, se sembraron células MDA-MB-435 y MCF7, a  $2.5 \times 10^5$  y  $2.0 \times 10^5$  células por pocillo, respectivamente, en placas de 6 pocillos que se transfectaron con la molécula anti-miR-125b (anti-125b, ID : AM10148; Ambion), o con un control negativo #1 marcado con Cy3 (anti-Cy3; ID: AM17010; Ambion) a una concentración final de 80 nM utilizando el reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen, Hilden Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De igual manera, con el fin de silenciar y sobreexpresar de forma transitoria la expresión de miR-1260a se sembraron células MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47D y MCF10A a  $2 \times 10^5$ ,  $2.25 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$  y  $2 \times 10^5$  células por pocillo, respectivamente, en placas de 6 pocillos que se transfectaron con la molécula anti-miR-1260a (anti-1260, ID : AM13282; Ambion), o con un control negativo marcado con Cy3 (anti-Cy3; ID: AM17010; Ambion), o con la molécula precursora pre-miR-1260 (pre-1260, ID: PM13282; Ambion) o con el control negativo marcado con Cy3 1260 (pre-Cy3, ID: AM17120; Ambion) a una concentración final de 80 nM utilizando el reactivo HiPerFect (Qiagen, Hilden Alemania).

Por un lado, las moléculas precursoras Pre-miR™ son secuencias de RNA de doble cadena modificadas químicamente diseñadas para mimetizar a los miRNAs maduros endógenos y por tanto permitir el análisis funcional por la regulación a la alta de la actividad del miRNA de interés. Por otro lado, Las moléculas inhibidoras Anti-miR™ son pequeñas moléculas de RNA de cadena sencilla modificadas químicamente, diseñadas para unirse e inhibir específicamente las moléculas de miRNAs endógenas permitiendo el análisis funcional del miRNA de interés mediante la regulación a la baja de su actividad.

Los controles Negativos # 1 Pre-miR™ y Anti-miR™ marcados con Cy™3 son moléculas Pre-miR™ y Anti-miR™ respectivamente, de secuencia aleatoria que han sido ampliamente testadas en líneas celulares y tejidos humanos y han sido validadas para no producir efectos identificables en la función del miRNA. Con estos controles monitorizamos la eficiencia de transfección bajo el microscopio de fluorescencia, ya que el marcador fluorescente permite la observación directa de la captación celular, la distribución y la localización del control.

Todas las líneas celulares fueron transfectadas siguiendo el protocolo *Fast Forward* proporcionado por la casa comercial (Qiagen) que tiene la particularidad de que las células se siembran y se transfectan el mismo día. Después de 72 horas, se contaron las células, se tomaron imágenes bajo el microscopio, se realizaron ensayos funcionales y se recogieron los lisados celulares para el análisis de la expresión de las potenciales proteína diana de los miRNAs de interés.

#### III.4.3.2. TRANSFECCIÓN CON siRNAs.

Con el fin de silenciar de forma transitoria la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9, se sembraron  $2 \times 10^5$  de células MCF7 por pocillo en una placa de 6 pocillos y se transfectaron con pools de siRNAs (siGENOME SMARTpool) contra ENPEP (M-005865-01-0005), CK2- $\alpha$  (M-003475-03), CCNJ (M-020397-01-0005) y MEGF9 (M-026241-01-0005) o con un pool de siRNAs control negativo (siGENOME Non-Targeting siRNA Pool # 1; 0-001206-13-05) (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) a una concentración final de 30 nM con el reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen) de acuerdo con el protocolo *Fast Forward* del fabricante. Cada pool de siRNAs contiene una mezcla de 4 siRNAs diferentes para cada gen. Para monitorizar la eficiencia de transfección, se incluyó el siRNA polo-like kinase 1 (PLK1) (ON-TARGET plus SMART pool, Dharmacon L-003290-00-0005) (datos no mostrados). Las células transfectadas se incubaron a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h, tras las cuales se contaron las células, se tomaron imágenes bajo el microscopio, se realizaron ensayos funcionales y se recogieron los lisados celulares para el análisis de la expresión de proteínas.

#### III.4.4. CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR.

Se sembraron 200000 células de MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y T-47D por placa de 35mm previamente transfectadas con las moléculas sintéticas pre-1260a y anti-1260 o sus respectivos controles pre-Cy3 y anti-Cy3 en un volumen final de 3 ml y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se tripsinizaron (Tripsina 0,25 % en PBS sin Calcio, magnesio y phenol red, Labclincis), se centrifugaron 1200 rpm por 5 minutos y el *pellet* o precipitado de células se resuspendió en un volumen de medio fresco variable en función de la cantidad de células. Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l de las células resuspendidas para teñirla con Azul de Tripano al 0,4% (Gibco by Life technologies) con el fin de determinar la viabilidad de las células de forma que las células vivas son impermeables al colorante y las células muertas son permeables y por tanto estarán teñidas. Se realizó un recuento de células con la cámara de Neubauer a las 48 horas de ser sembradas y a continuación, se volvieron a sembrar todas las células en una placa de 60 mm incubándose a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se volvió a realizar este procedimiento 2 veces más haciendo resiembras de las células cada 48 h en placas de mayor

diámetro. Por tanto, se hicieron recuentos cada 48 horas correspondientes a los puntos 48, 96 y 144 horas. De todas las condiciones se hicieron triplicados.

#### **III.4.5. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.**

Se utilizó el ensayo XTT para determinar el efecto sobre la proliferación de la expresión estable de los vectores miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP en las células MCF7 y MDA-MB-231. El ensayo XTT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) es un ensayo colorimétrico basado en la reducción de las sales de tetrazolio XTT de color amarillo a sales solubles de formazán de color anaranjado por deshidrogenasas mitocondriales de mitocondrias intactas en células activas metabólicamente. La cantidad de sales de formazán producida durante el ensayo es proporcional al número de células metabólicamente activas y se determina midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

Para cuantificar el efecto sobre la proliferación de la sobreexpresión estable de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, se sembraron en placas de 96 pocillos 5000 células por pocillo de MCF7 y MDA-MB-231 infectadas con miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP en un volumen final de 100  $\mu$ l y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante toda la noche para que se adhirieran completamente. Al día siguiente, se añadió a cada pocillo 50  $\mu$ l de una mezcla conteniendo 50  $\mu$ l del reactivo de marcado XTT y 1  $\mu$ l de reactivo de acoplamiento de electrones quedando el reactivo XTT a una concentración final de 0,3 mg/ml en cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas tras las cuales se midió la absorbancia a 492 nm (DO<sub>492</sub>) a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de su sembrado usando el espectrofotómetro Synergy (Biotek). Como lectura de referencia se utiliza una longitud de 695nm. Se realizaron triplicados de todas las condiciones.

#### **III.4.6. ENSAYO CLONOGÉNICO.**

El ensayo clonogénico se basa en la capacidad que tiene una célula aislada de crecer formando una colonia, entendiendo como tal un grupo de al menos 50 células. Para realizar el ensayo clonogénico se sembraron 1000 células en placas de 60 mm y fueron mantenidas en cultivo a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 días. Durante este periodo se les cambió el medio cada 3 días. Tras los 15 días, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (Sigma-aldrich, Taufkirchen, Alemania) durante 30 minutos, lavadas dos veces con PBS1X y teñidas con Cristal violeta al 0,1% (Sigma-aldrich, Taufkirchen, Alemania) durante 30 minutos. A continuación, se lavaron las células con agua para eliminar el exceso de Cristal violeta y se dejaron secar. Finalmente, se adquirieron imágenes de las colonias formadas y se hizo un recuento de las mismas.

### III.4.7. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO.

En primer lugar, se prepararon placas de 6 pocillos con una base de agar D-1 Bajo EEQ agarosa (Pronadisa, Madrid, España) al 2,8% en medio de cultivo suplementado con 13,3% de FBS. Posteriormente, se resuspendieron  $5 \times 10^4$  de células MCF7 y MDA-MB-231 que expresan el control miRVec-GFP o miRVec-125b en una mezcla de medio de cultivo suplementado con 13,3% de FBS y agar al 1,4%. La mezcla se plaqueó uniformemente sobre la base de agar preparada anteriormente. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 20 días añadiendo medio fresco cada tres días. Se cuantificó el número de colonias bajo el microscopio. Se realizaron 3 experimentos independientes y triplicados de todas las condiciones.

### III.4.8. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

El análisis de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo se basa en la capacidad que tiene un marcador fluorescente como el Ioduro de Propidio (IP) de intercalarse entre los pares de bases de ácido nucleico, tanto del DNA como del RNA, por lo que es necesario eliminar este último mediante un tratamiento con RNAsa. La unión al DNA se realiza estequiométricamente para poder relacionar la cantidad de fluorescencia medida con el contenido del DNA. Una vez las células están marcadas, con el citómetro de flujo el IP es excitado con una longitud de onda en torno a 480nm provocando una emisión de fluorescencia roja en torno a 620 nm proporcional al contenido de DNA de la célula. Tras tratar los datos, los resultados se muestran mediante histogramas que relacionan el número de células con el contenido de DNA. Generalmente en los histogramas se diferencian tres regiones: pico G0/G1 correspondiente a células con contenido diploide de DNA, fase S de síntesis correspondiente a células con contenido de DNA variable entre 2N y 4N, y por último fase G2/M correspondiente a células tetraploides.

El procedimiento consistió en tripsinizar (Tripsina 0,25 % en PBS sin Calcio, magnesio y phenol red, Labclincis), y centrifugar 1200 rpm por 5 minutos las células HMEC, MCF7 y MBA-MB-231 que expresan de forma estable el control miRVec-GFP o miRVec-125b, y las células transfectadas con siRNAs (siENPEP, siCK2- $\alpha$ , siCCNJ, y siMEGF9). Se resuspendieron en PBS (Dulbecco's PBS, Labsclinics) y se contaron con la cámara de Neubauer. Un millón de células de cada muestra se fijó con etanol al 70% en PBS durante 15 minutos a -20 ° C, se lavaron con PBS dos veces, se trataron con 100  $\mu$ g/ml de RNasa A (Sigma-Aldrich) y se tiñeron con 50  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich). Cada una de las muestras se pasaron por el citómetro de flujo (FACS Calibur Becton Dickinson, E0772; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analizándose  $2 \times 10^4$  células por muestra. Para adquirir los eventos en el citómetro

de flujo se establecieron los siguientes plots: SSC-H/FSC-H; FL2-W/FL2-A y el histograma Número de células/FL2-A (contenido de DNA). Se calculó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular basado en el contenido de DNA determinado con el programa FACS Express Software.

#### **III.4.9. ANÁLISIS DE APOPTOSIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.**

El procedimiento seleccionado para detectar la apoptosis se basa en la capacidad de la proteína dependiente de calcio Anexina-V de unirse a fosfolípidos, preferencialmente fosfatidilserina (PS). La membrana plasmática de las células viables en estado fisiológico es asimétrica de forma que en la cara interna de la membrana se localizan fosfolípidos aniónicos como la PS. Durante el proceso de apoptosis la bicapa lipídica pierde su asimetría y la PS es translocada a la cara externa de la membrana plasmática para que sean reconocidas como células diana de fagocitosis. La PS en la cara externa de la membrana puede ser detectada por la unión de Anexina-V marcada fluorescentemente en una manera calcio dependiente. Durante la apoptosis temprana la integridad de la membrana está intacta por lo que excluye marcadores de viabilidad como IP y las células sólo estarán marcadas con Anexina-V. Sin embargo, durante la apoptosis tardía se pierde la integridad de la membrana y la Anexina-V tendrá acceso a la PS del interior. Por tanto, una forma para diferenciar la apoptosis temprana de la tardía es la adición de IP.

Realizamos un análisis de apoptosis en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 que sobreexpresan miRVec-125b o miRVec-GFP, así como de las células transfectadas con siRNAs (siENPEP, siCK2- $\alpha$ , siCCNJ, y siMEGF9) usando el kit comercial de detección de apoptosis Anexina-V-APC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se recogió en un tubo el medio de cultivo de las placas, y se lavaron con PBS y se tripsinizaron las células adheridas. Se mezcló el medio de cultivo recogido y las células despegadas y tras centrifugar 1200 rpm por 5 minutos se contaron las células y 500000 células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de tampón de unión. Se añadió 5  $\mu$ l de Anexina-V-APC y se incubó en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Tras sedimentar las células se resuspendieron de nuevo en tampón de unión y se añadió 5  $\mu$ l de IP (0.5  $\mu$ g/ml). Cada una de las muestras se pasaron por el citómetro de flujo (FACS Calibur Becton Dickinson, E0772; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para adquirir los eventos en el citómetro de flujo se establecieron los siguientes plots: SSC-H/FSC-H; FL3-H/FSC-H; FL4-H/FSC-H y FL2-H/FL4-H). Se calculó el porcentaje de células viables (Anexina-V-/IP-), células en apoptosis temprana (Anexina-V+/IP-), células en apoptosis tardía (Anexina-V+/IP+) y células necróticas (Anexina-V-/IP+) usando el programa FACS Express Software. Los resultados se confirmaron en al menos tres experimentos independientes.



#### III.4.10. ANÁLISIS DE SENESCENCIA.

Se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (SA-gal) de las células HMEC y MCF7 que sobreexpresan miRVec-125b o miRVec-GFP usando el kit comercial de tinción  $\beta$ -galactosidasa de senescencia (Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incluyeron controles de senescencia como se indica.

Este procedimiento se basa en la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 que es una característica específica de células senescentes y no puede encontrarse en células pre-senescentes, quiescentes o inmortales. Esta actividad es detectada por tinción citohistoquímica utilizando el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) y se cree que es consecuencia del aumento en el contenido lisosomal que poseen las células senescentes.

De forma breve, lavamos las placas de 35 mm donde están adheridas las células con PBS 1X (Labsclinics), se fijaron las células con la solución fijadora 1X y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS 1X, se añadió 1 ml de la solución de tinción de  $\beta$ -galactosidasa y las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche en un incubador seco. Por último, se observaron bajo el microscopio.

#### III.4.11. ENSAYOS REPORTEROS DE LUCIFERASA.

Para los ensayos reporteros de luciferasa se sembraron  $1,4 \times 10^5$  de células HEK293T por pocillo en una placa de 24 pocillos y se co-transfectaron al día siguiente usando Lipofectamina 2000 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU) con las siguientes plásmidos y moléculas por pocillo a transfectar:

- Las moléculas sintéticas pre-125b (ID: PM10148; Ambion), anti-125b (ID: PM10149; Ambion), o el control negativo # 1 a una concentración final de 30 nM (ID: AM17110; Ambion)
- 100 ng de los constructos reporteros Renilla luciferasa (RL) WT previamente clonados en el plásmido pCI-neo-hRL: pCI-neo-hRL (vector vacío), pCI-3'-UTR-ENPEP, pCI-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-3'-UTR-CCNJ o pCI-3'-UTR - MEGF9
- 10 ng del plásmido PGL3-Pm (Promega) que expresa de forma constitutiva el gen luciferasa de luciérnaga (FL; Photinus pyralis). Lo utilizamos como control interno para la normalización de la actividad Renilla luciferasa con el fin de reducir la variabilidad causada por diferencias en la viabilidad celular o en la eficiencia de transfección.
- Plásmido pBS-SK Bluescript (+) (Stratagene) para la normalización del contenido de DNA en todas las transfecciones.

La eficiencia de la transfección fue de aproximadamente 95%, y la actividad luciferasa se midió 48 horas después de la cotransfección usando el ensayo sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En este ensayo la actividad luciferasa de luciérnaga y la actividad Renilla luciferasa se miden secuencialmente en la misma muestra. Las células se lavaron con PBS 1X frío, se añadió 100 µl de tampón de lisis pasivo PBL 1X a cada pocillo y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 15 minutos. A continuación, se transfirió 20 µl del lisado de cada pocillo a una placa opaca blanca de 96 pocillos (Corning) y se añadió a cada pocillo 100 µl reactivo de ensayo luciferasa LAR II (sustrato de la luciferasa de luciérnaga). Se introdujo la placa en el luminómetro para realizar la primera medida correspondiente a la actividad luciferasa de luciérnaga y a continuación, se añadió 100 µl del reactivo Stop & Glo® y se realizó la segunda medida en el luminómetro correspondiente a la actividad Renilla luciferasa.

En cada caso, las diferentes concentraciones de las moléculas pre-125b y anti-125b fueron establecidas por titulación de pre-125b y anti-125b con cada uno de los cuatro constructos reporteros WT pCI-3'-UTR mRNA para establecer una relación dosis-respuesta entre 10-80 nM.

Además, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente explicado, se cotransfectaron células HEK-293T sembradas a una densidad de  $1,4 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos usando Lipofectamina 2000 con los siguientes plásmidos y moléculas:

- Las moléculas sintéticas pre-125b (ID: PM10148; Ambion), o el control negativo # 1 a una concentración final de 30 nM (ID: AM17110; Ambion).
- 100 ng de uno de los constructos reporteros mutantes pCI-M202-3'-UTR-ENPEP, pCI-M210-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-M450-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-M714-3'-UTR-CCNJ, pCI-M416-3'-UTR-MEGF9, pCI-M654-3'-UTR-MEGF9, pCI-M1721-3'-UTR-MEGF9- o los respectivos constructos WT pCI-3'-UTR-ENPEP, pCI-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-3'-UTR-CCNJ, pCI-3'-UTR-MEGF9.
- 10 ng del plásmido PGL3-Pm (Promega) que expresa de forma constitutiva el gen luciferasa de luciérnaga.
- Plásmido pBS-SK Bluescript (+) (Stratagene) para la normalización del contenido de DNA en todas las transfecciones.

Los valores de actividad Renilla luciferasa son normalizados respecto a los valores de actividad luciferasa de luciérnaga para corregir las variaciones en la eficiencia de transfección (RL/FL). La actividad luciferasa normalizada es relativizada al control negativo # 1, adquiriendo

este último el valor de 1. Todos los experimentos de transfección se realizaron por triplicado y se repitieron al menos 3 veces independientemente.

#### **III.4.12. ENSAYOS DE INVASIÓN CELULAR.**

En primer lugar, se recubrieron las cámaras o insertos de membrana PET (8 µm de poro, Corning Costar) para placas de 24 pocillos con Matrigel reducido en factores de crecimiento (BD Biosciences) diluido en medio fresco sin FBS a una concentración de 2 mg/ml y 1 mg/ml para analizar la capacidad invasiva en células MCF7 y MDA-MB-231, respectivamente. Posteriormente, se sembraron en las cámaras sobre el matrigel  $1 \times 10^5$  células por pocillo de MCF7 y MDA-MB-231 infectadas con miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP, así como células MCF7 y MDA-MB-231 transfectadas con las moléculas sintéticas, pre-1260a, anti-1260a y sus respectivos controles pre-Cy3 y anti-Cy3. Las células situadas en la parte superior de la cámara fueron resuspendidas en 150 µl de medio fresco sin FBS mientras que en la parte inferior se añadió como quimioatrayente 800 µl por pocillo de medio fresco con 10 % de FBS. Se incubaron las células a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas en el caso de células MCF7 o durante 16 horas en el caso de las células MDA-MB-231, tras las cuales las cámaras fueron lavadas con PBS 1X y las células adheridas a la membrana fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se tiñeron las membranas con Cristal violeta durante una hora. Finalmente se lavaron las membranas con PBS y se dejaron secar. Las células invasivas serán las únicas capaces de degradar el matrigel y por tanto, de atravesar las membranas de las cámaras pudiendo ser visualizadas en el microscopio una vez fijadas y teñidas. Se realizaron fotos en cuatro campos diferentes en el microscopio y posteriormente se contó el número de células usando el programa ImageJ. Los datos obtenidos fueron relativizados al control que en nuestro caso fueron las células MCF7 y MDA-MB-231 infectadas con miRVec-GFP y transfectadas con los controles pre-Cy3 y anti-Cy3 de forma que las muestras control tomaron el valor de 1.

### **III.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.**

#### **III.5.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**

Las placas de cultivo celular fueron lavadas con PBS 1X y lisadas con el tampón de lisis: HEPES 50 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; 1% Triton X-100; EDTA 1 mM; Glicerol 10 %, en presencia de inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml; DTT 1 mM) e inhibidores de fosfatasa (NaF 20 mM; NaPPi 0,1 M; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM; PMSF en etanol 1 mM; β-Glicerofosfato 20 mM). El lisado celular fue recogido en un tubo de 1,5 ml, se agitó con un vortex y se incubó durante 30 minutos en hielo. Durante el tiempo de incubación el lisado se

agitó con un vortex varias veces. A continuación, se centrifugó el lisado a 15000 g durante 20 minutos a 4 °C para separar las proteínas del resto de componentes celulares. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue recogido en un tubo nuevo de 1,5 ml.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (BioRad, Munich, Alemania). Este ensayo consiste en la adición de un colorante ácido (Comassie) a la solución de proteínas y a la posterior medición de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro o colorímetro. Por cada ml del tampón 1X en tubos de 1,5 ml se añadió 1 µl de la muestra y se agitó con un vortex. A continuación, se traspasó 200 µl de la mezcla a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia obtenidos son interpolados en una curva patrón con concentraciones crecientes conocidas (0 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml y 4 µg/ml) de Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-aldrich, Taufkirchen, Alemania) para determinar la concentración de proteína de las muestras.

Para realizar el análisis por western blot se igualaron las muestras a una misma concentración diluyéndolas con el buffer de lisis correspondiente y añadiendo el tampón de carga a 1 X (tampón Laemli 1 X: 0,0626 M Tris HCl pH 6,8; 2 % SDS; 0,01 % azul de bromofenol; 10 % glicerol). Posteriormente, fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 95 °C.

#### **III.5.2. WESTERN BLOT.**

Realizamos western blots para analizar el nivel de expresión de las potenciales proteínas diana de los miRNAs de interés. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis PAGE-SDS en el cual se usan geles de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS). El detergente SDS confiere carga negativa a las proteínas para poder separarlas según su peso molecular.

Los geles de poliacrilamida tienen dos partes: una es el gel concentrador que permite que las proteínas de diferente peso molecular queden retenidas a un mismo nivel para que puedan ser separadas correctamente por el denominado gel separador, donde las proteínas se separan según su peso molecular. La composición del gel concentrador y separador se especifica en las Tablas 8 y 9. Para las proteínas de bajo peso molecular realizamos geles del 12%, mientras que para las proteínas de alto peso molecular realizamos geles entre el 6 y 10%. Los geles fueron introducidos en cubetas de electroforesis (BioRad, Munich, Alemania) previamente llenadas con tampón de electroforesis (0,1 % de SDS, 25 mM Tris y 190 mM glicina) y se corrieron las electroforesis con un voltaje de 120V. Como marcador de peso molecular utilizamos el marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, Thermo Scientific™).

Una vez realizada la electroforesis y separadas las proteínas por peso molecular, se transfirieron a una membrana de PDVF previamente activada en metanol durante un minuto mediante transferencia aplicando un amperaje constante de 400 mA durante 90 minutos para proteínas de bajo peso molecular y de 350 mA durante 2 horas para proteínas de alto peso molecular. Como tampón se utilizó 25 mM Trizma, 190 mM glicina y metanol a una concentración final del 20 %.

Componente	Volúmenes para un gel (5ml)
H <sub>2</sub> O	3,4
30% Acrilamida/bis acrilamida (Mix Ratio 29:1)	0,83
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% PSA	0,05
TEMED	5

*Tabla 8. Componentes y cantidades utilizadas para preparar el gel concentrador.*

Componente	Volúmenes para un gel (10 ml)	
	gel 8%	Gel 12%
H <sub>2</sub> O	4,6	3,3
30% Acrilamida/bis acrilamida (Mix Ratio 29:1)	2,7	4
1,0 M Tris (pH 6,8)	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1
10% PSA	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004

*Tabla 9. Componentes y cantidades utilizadas para preparar el gel separador.*

Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con un 5 % de leche desnatada en T-BST (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM y 0,1 % de Tween-20) durante 1 hora. Tras el bloqueo, se incubó cada membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 10) en 5 % de leche desnatada en T-BST o 5 % de BSA en T-BST durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con T-TBS y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 10) diluido con 5 % de leche desnatada en T-TBS. Para extraer el exceso de anticuerpo secundario se realizaron tres lavados de 10 minutos con T-TBS y se pasó a revelar la señal utilizando el sistema de emisión de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharma-Biotech, Dreieich, Alemania). Como control de carga se utilizó la expresión de la proteína  $\beta$ -actina.

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Referencia y casa comercial</b>	<b>Dilución</b>
anti-MEGF9	#Ab74939; Abcam	1:1000
anti-CCNJ	#sc-81064; Santa Cruz Biotechnology	1:500
anti-ENPEP	#NBP1-32442; Novus Biologicals	1:1000
anti-FOXO4	#SAB2100854; Sigma-Aldrich	1:1000
anti-CK2- $\alpha$	#A300-196A; Bethyl Laboratories	1:1000
anti-CCND1	#sc-718; Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-CCNB1	#sc-245; Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-E2F1	#sc-251; Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-E2F2	#Ab65222; Abcam	1:1000
anti-p16	#sc-1207; Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-p21	#sc-397; Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-p53	#sc-6243; Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-AKT	#2920; Cell Signaling Technology	1:1000
anti-p-AKT	#3787; Cell Signaling Technology	1:1000
anti-HMD2	#Ab16895; Abcam	1:50
anti- $\beta$ -actin	#A3854; Sigma-Aldrich	1:400000
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Referencia y casa comercial</b>	<b>Dilución</b>
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	#7076; Cell Signaling Technology	1:3000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	#7074; Cell Signalling Technology	1:3000

*Tabla 10. Anticuerpos utilizados para Western blot.*

### III.5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Se analizó la expresión de la proteína CK2- $\alpha$  por inmunohistoquímica (IHC) en las 50 muestras de pacientes de la cohorte 1. El estudio IHC se realizó en microarrays de tejidos (TMAs). El microarray de tejido permite incluir en único un bloque de parafina (bloque receptor) cilindros de tejido parafinado de múltiples pacientes (bloques donadores), permitiendo realizar un análisis inmunohistoquímico de un gran número de muestras a la vez. El TMA se realizó por cuadruplicado y fue construido en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. En resumen, primero se seleccionaron de cada uno de los pacientes tejido tumoral con una densidad tumoral mayor del 80% y tejido normal adyacente con una densidad adecuada en células epiteliales para incluirlos en el bloque receptor. Una vez seleccionados, con un Tissue-Arrayer se perfora el bloque receptor con una aguja para dejar un orificio donde se insertará el cilindro de tejido del paciente seleccionado extraído del bloque donador. Este procedimiento se repitió con cada una de las muestras de los pacientes. El tejido fijado con formalina y parafinado se cortó en secciones de 5  $\mu$ m con un microtomo, se colocó sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina, se desparafinó en xilol (2 x 10') y posteriormente fue rehidratado en un gradiente de concentraciones decrecientes de etanol: etanol absoluto (2 x 5'), etanol al 96% (2 x 5'), etanol al 70% (2 x 5') y agua destilada. El desenmascaramiento de antígenos fue llevado a cabo mediante calentamiento en microondas

en tampón citrato 10 mM (pH 6,0) y las muestras se bloquearon con solución de peróxido de hidrógeno al 0,3 %. Las secciones se incubaron a 4°C durante la noche con el anticuerpo CK2- $\alpha$  (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, EE.UU.). La inmunotinción se realizó con el kit de detección peroxidasa / DAB ChemMate DAVO EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca), que dio lugar a un precipitado de color marrón en el sitio del antígeno. Posteriormente, se realizó una contratinción de las secciones con hematoxilina-eosina, se procedió a realizar un proceso de deshidratación mediante un gradiente de concentraciones crecientes de etanol (Etanol 70%, 96% y 100%) y al posterior pase en xilol. Finalmente, se montaron en un medio de montaje no acuoso (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, EE.UU.).

La evaluación inmunohistoquímica fue llevada a cabo por patólogos para determinar el porcentaje de células positivas y la intensidad de tinción. El Hscore fue calculado de la siguiente forma: (1 x % células con tinción débil) + (2 x % células con tinción moderada) + (3 x % células con tinción fuerte), con un resultado que va en el intervalo de 0 a 300. El tejido de mama adyacente también fue analizado para poder definir el umbral del Hscore para los casos positivos. La expresión de CK2- $\alpha$  se consideró positiva cuando más del 50% de las células tumorales en la biopsia se tiñeron positivas (puntuación > 60).

### **III.6. PREDICCIÓN *IN SILICO* DE LAS DIANAS DE LOS microRNAs.**

Las potenciales dianas de miR-125b, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a se analizaron utilizando bases de datos disponibles públicamente basadas en diferentes algoritmos, tales como PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), miRanda (<http://www.microrna.org/>), y DIANA-microT (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>). Para reducir el número de mRNA candidatos y aumentar la probabilidad de seleccionar las dianas de los miRNAs de interés se utilizaron dos criterios diferentes. El primer criterio consistió en la selección de potenciales mRNAs dianas de los miRNAs que sean comunes en más de una base de datos con algoritmos de predicción distintos. Con este criterio fueron seleccionados las potenciales dianas de miR-125b, ENPEP, CK2- $\alpha$  y MEGF9. El segundo criterio consistió en seleccionar los mRNAs con una puntuación alta (p valor) en la base de datos TargetScan. Basándose en este último criterio, se seleccionó CCNJ como potencial diana de miR-125b.

### **III.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis estadístico de los datos se realizó con los programas SPSS (versión 11.0, SPSS, Chicago, IL, USA) y GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, E.E.U.U.).

En primer lugar, se analizó la normalidad con las pruebas D'Agostino-Pearson Omnibus y Shapiro-wilk de manera que los datos se consideraron ajustados a una distribución normal cuando ninguna de las pruebas descartaran que no lo fueran, es decir, cuando los p-valores de las pruebas fueron mayores a 0,05. También se comprobó el supuesto de homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos aplicando el test de Fisher de manera que las varianzas se consideraron iguales cuando el p-valor fue mayor a 0,05. Cuando los datos se ajustaron a una distribución normal y cumplieron el supuesto de homocedasticidad, se llevaron a cabo pruebas paramétricas. Cuando los datos siguieron una distribución normal pero no fueron homocedásticos se aplicaron pruebas paramétricas con correcciones. En el caso de variables categóricas, para la comparación de dos grupos se utilizó la prueba t-Student (con corrección de Welch si no son homocedásticos). Para la comparación de 3 o más grupos utilizamos el test ANOVA + *post-test* de comparación múltiple Dunnett's. Cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal se aplicaron pruebas no paramétricas. En este sentido, para la comparación de dos grupos optamos por aplicar la prueba U de Mann Withney si las muestras son independientes o la prueba de Wilcoxon si las muestras son dependientes o pareadas. Para la comparación de 3 o más grupos se aplicó el test de Kruskal Wallis.

Para valorar la asociación entre dos variables cuantitativas se realizó un análisis de correlación mediante el coeficiente de correlación por rangos de Spearman que permite medir la fuerza y la dirección de la asociación de dos variables cuantitativas aleatorias que no tengan una distribución normal. Los valores de la correlación de Spearman van desde -1 hasta 1, siendo los valores extremos los que indican mayor correlación entre variables, y siendo el 0 el punto que indica la no existencia de correlación. El signo positivo o negativo del coeficiente indica si la relación es directa (positivo) o inversa (negativo). La correlación no implica causalidad o dependencia.

En todos los casos el nivel de significación estadístico seleccionado fue p-valor < 0,05. En las figuras los valores de significación estadística se indicaron con el siguiente código: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.





# RESULTADOS

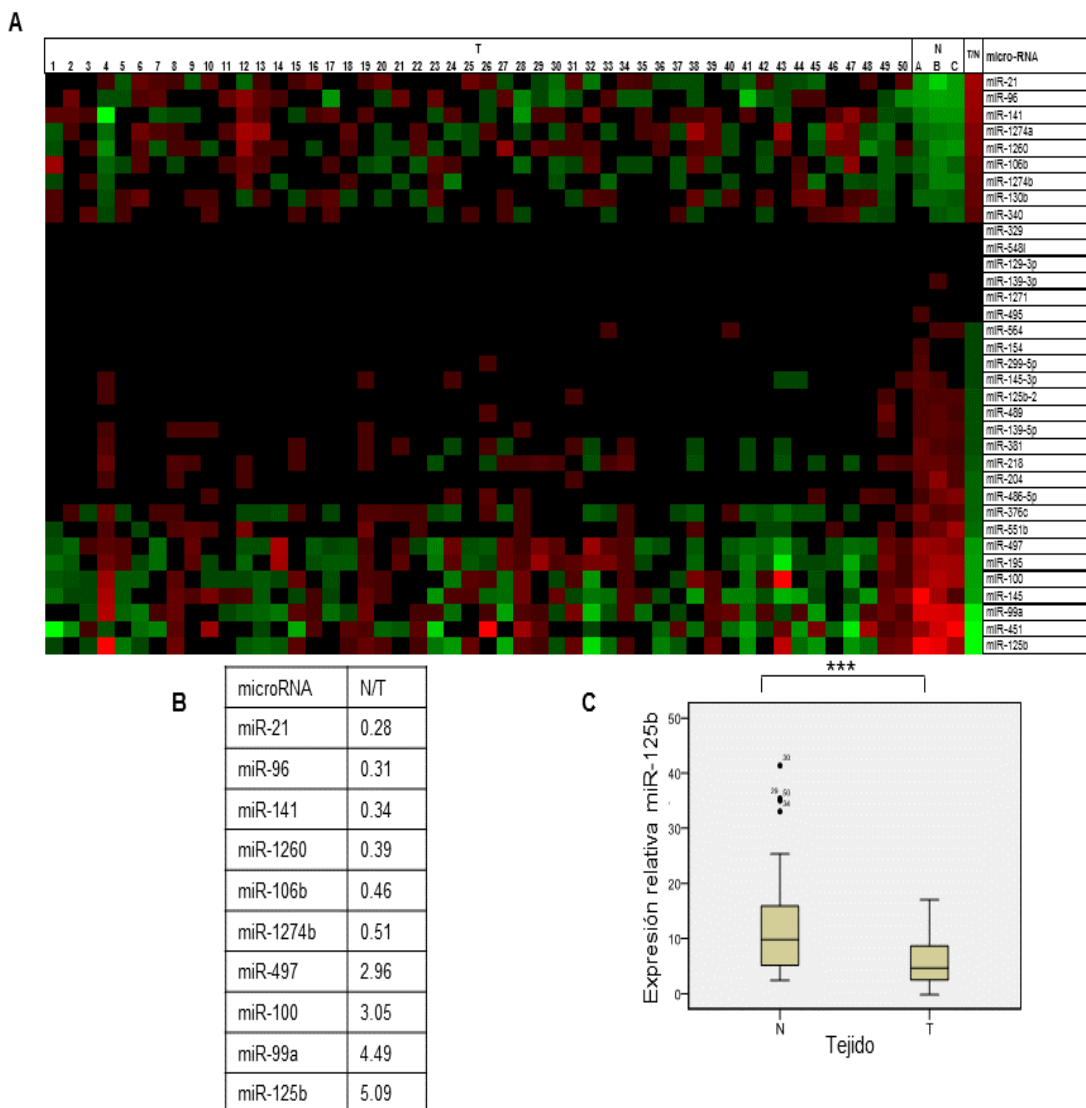


## IV. RESULTADOS.

### IV.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE microRNAs EN TUMORES DE MAMA.

Con el objetivo de identificar los miRNAs que están aberrantemente expresados en tumores de mama respecto al tejido normal adyacente, se analizó un panel completo de 939 miRNAs mediante microarray (plataforma Agilent) en 50 muestras de tumores de cáncer de mama, que se compararon con tres grupos de muestras de tejido mamario normal de los mismos pacientes (8 pacientes por grupo, Cohorte 1, ver Materiales y Métodos). Se identificaron un total de 35 miRNAs desregulados en los tumores de mama respecto del tejido normal adyacente de los mismos pacientes (Figura 20A). Entre los miRNAs identificados encontramos miRNAs potencialmente oncogénicos o supresores de tumores en función de si éstos tienen aumentada o disminuida su expresión con respecto al tejido normal adyacente, respectivamente. De los 35 miRNAs desregulados, identificamos 9 miRNAs potencialmente oncogénicos: miR-21, miR-96, miR-141, miR-1274a, miR-1260a, miR-106b, miR-1274b, miR-130b y miR-340. Los 26 potenciales miRNAs supresores de tumores fueron: miR-125b, miR-451, miR-99a, miR-145, miR-100, miR-195, miR-497, miR-551b, miR-376c, miR-486-5p, miR-204, miR-218, miR-381, miR-139-5p, miR-489, miR-125b-2, miR-145-3p, miR-299-5p, miR-154, miR-564, miR-495, miR-1271, 139-3p, miR-129-3p, miR-548i y miR-329. Así mismo, comparando los datos de expresión de los miRNAs identificados con la prueba t-Student en los grupos tejido tumoral y tejido normal, y aplicando un nivel de significación p-valor <0,01 se determinó una firma de los 10 miRNAs más desregulados en tumores de mama. Estos 10 miRNAs comportan el número mínimo de miRNAs que distinguen los tumores de mama del tejido normal adyacente (Figura 20B).

Para confirmar la firma de miRNAs propuesta, se analizó el perfil de expresión de miRNAs con otra plataforma de array diferente (FEBIT) y en una serie diferente de 50 pacientes con cáncer de mama (Cohorte 2). Todos los miRNAs desregulados identificados en los pacientes de la cohorte 1 fueron confirmados en las muestras de los pacientes de la cohorte 2, con la excepción de miR-21 (Tabla 11).



**Figura 20.** Perfil de expresión de miRNAs en pacientes con cáncer de mama. **A)** Se identificaron un total de 35 miRNAs significativamente desregulados en 50 tumores de mama respecto del tejido normal adyacente de los mismos pacientes (3 grupos con 8 pacientes por grupo) ( $p < 0,05$ ). **B)** Firma de miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con cáncer de mama. Para determinar la firma de miRNAs, los miRNAs que fueron diferencialmente expresados entre el tejido tumoral y el tejido normal fueron comparados con la prueba t-Student ( $p < 0,01$ ). N/T: El valor resultante del cociente indica las veces que un miRNA aumenta o disminuye en el tejido normal con respecto al tejido tumoral. El miRNA más significativamente desregulado en la serie de pacientes con cáncer de mama fue miR-125b, el cual presentó una expresión de 5 veces más en el tejido normal respecto al tumor. **C)** Niveles de expresión de miR-125b medidos por qRT-PCR en la serie de 50 pacientes de cáncer de mama de la cohorte 1. Se observó una disminución significativa de su expresión en los tumores respecto del tejido normal adyacente ( $p < 0,001$ ).

El miRNA que presentó el nivel de expresión más bajo en tumores de mama de los 10 miRNAs de la firma propuesta fue miR-125b, de forma que se procedió a su caracterización. En primer lugar, se midieron los niveles de expresión de miR-125b por qRT-PCR en las muestras de tejido tumoral y normal adyacente de los pacientes de la cohorte 1, con el fin de validar de forma independiente su subexpresión en tumores de mama. Como puede observarse, la expresión de miR-125b está significativamente reprimida en los tumores de

mama ( $p < 0,01$ ) (Figura 20C). Además, se evaluó la asociación de la expresión de miR-125b con las características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 1, incluyendo edad, tamaño tumoral, grado de diferenciación, presencia de metástasis ganglionares, número de nódulos linfáticos afectados, presencia de metástasis a distancia y clasificación molecular de los tumores (luminal A, luminal B, HER2 +, y triple negativo). La expresión de miR-125b no correlacionó con ninguna de las características clínico-patológicas de los pacientes (Tabla 4). Es probable, que la ausencia de correlación con la clasificación molecular de tumores de mama sea debida a que sólo el 6% de los tumores fueron HER2 + y el 14% de los tumores fueron triples negativos en los pacientes de la cohorte 1, por lo que consideramos que los resultados respecto a la clasificación molecular son preliminares. Por tanto, para obtener unos resultados estadísticamente fiables con respecto a la clasificación molecular de los tumores, se requeriría una serie de pacientes más grande y con mayor variedad para aumentar el número de los subtipos moleculares menos frecuentes, es decir, HER2+ y triple negativo. A pesar de la ausencia de correlación de miR-125b con las características clínico-patológicas procedimos a caracterizar la función supresora de tumores de dicho miRNA, por ser el miRNA significativamente con la expresión más baja.

miRNA	Grupo N	Grupo T	fold change (T/N)	miRNA	Grupo N	Grupo T	fold change (T/N)	miRNA	Grupo N	Grupo T	fold change (T/N)
hsa-miR-144	9,812	7,805	0,134	hsa-miR-1267	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-616	4,444	5,202	2,132
hsa-let-7f	10,051	8,261	0,167	hsa-miR-450b-5p	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-2116	4,444	5,202	2,132
hsa-miR-31	10,088	8,417	0,188	hsa-miR-641	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-1252	3,794	4,553	2,135
hsa-miR-103-2*	6,720	5,067	0,191	hsa-miR-1282	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-342-3p	13,225	13,987	2,143
hsa-miR-615-3p	6,720	5,067	0,191	hsa-miR-630	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-758	5,094	5,858	2,145
hsa-miR-145	13,384	11,811	0,207	hsa-miR-325	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-493*	5,094	5,858	2,145
hsa-miR-422a	9,797	8,261	0,215	hsa-miR-582-3p	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-1183	7,431	8,194	2,146
hsa-miR-506	6,720	5,202	0,219	hsa-miR-589	4,924	5,336	1,511	hsa-miR-141	10,734	11,498	2,147
hsa-miR-99a	13,617	12,128	0,226	hsa-miR-200b	12,112	12,525	1,511	hsa-miR-889	4,299	5,067	2,156
hsa-miR-224*	7,022	5,603	0,242	hsa-miR-135a	3,794	4,211	1,517	hsa-miR-548b-3p	4,299	5,067	2,156
hsa-miR-1537	6,720	5,336	0,251	hsa-miR-541*	3,794	4,211	1,517	hsa-miR-938	5,439	6,208	2,157
hsa-miR-451	11,179	9,844	0,263	hsa-miR-519e	3,794	4,211	1,517	hsa-miR-330-5p	5,439	6,208	2,157
hsa-miR-496	6,664	5,336	0,265	hsa-miR-497*	7,634	8,051	1,517	hsa-miR-137	4,032	4,803	2,163
hsa-miR-1236	7,922	6,608	0,269	hsa-miR-484	9,752	10,170	1,519	hsa-miR-2114	4,032	4,803	2,163
hsa-miR-518c	6,487	5,202	0,277	hsa-miR-367*	5,439	5,858	1,520	hsa-miR-20a	11,098	11,872	2,168
hsa-miR-205	12,654	11,369	0,277	hsa-miR-1266	6,360	6,782	1,525	hsa-miR-421	7,198	7,973	2,171
hsa-miR-199b-5p	8,997	7,714	0,277	hsa-miR-874	8,208	8,636	1,534	hsa-miR-454	7,198	7,973	2,171
hsa-miR-335	12,005	10,747	0,284	hsa-miR-200a	10,502	10,936	1,544	hsa-miR-1296	6,225	7,015	2,203
hsa-miR-223*	7,112	5,858	0,285	hsa-miR-220b	8,807	9,250	1,557	hsa-miR-25	10,027	10,817	2,203
hsa-let-7d*	6,720	5,471	0,287	hsa-miR-509-5p	7,974	8,417	1,558	hsa-miR-1203	8,072	8,870	2,222
hsa-let-7b	12,613	11,381	0,292	hsa-miR-372	4,758	5,202	1,559	hsa-miR-1264	5,180	5,979	2,222
hsa-miR-518d-3p	6,827	5,603	0,294	hsa-miR-2116*	8,655	9,110	1,576	hsa-miR-17	12,353	13,156	2,232

hsa-miR-125b-2*	6,827	5,603	0,294	hsa-miR-519c-5p	6,827	7,283	1,578	hsa-miR-93	10,278	11,084	2,239
hsa-miR-125b	15,107	13,920	0,305	hsa-miR-1226*	7,431	7,892	1,585	hsa-miR-505	4,924	5,732	2,244
hsa-miR-576-5p	5,094	3,912	0,306	hsa-miR-937	5,267	5,732	1,592	hsa-miR-433	5,608	6,417	2,245
hsa-miR-98	8,119	6,940	0,308	hsa-miR-654-5p	7,198	7,666	1,597	hsa-miR-429	7,569	8,387	2,266
hsa-miR-100	13,770	12,592	0,308	hsa-miR-553	4,597	5,067	1,599	hsa-miR-1268	10,908	11,726	2,267
hsa-miR-548e	5,608	4,434	0,309	hsa-miR-23b*	4,597	5,067	1,599	hsa-miR-19a	9,706	10,530	2,278
hsa-miR-452	8,448	7,283	0,312	hsa-miR-1270	4,597	5,067	1,599	hsa-miR-920	4,758	5,603	2,328
hsa-miR-494	8,622	7,459	0,312	hsa-miR-19b-2*	4,597	5,067	1,599	hsa-miR-760	5,009	5,858	2,337
hsa-miR-1468	5,267	4,106	0,313	hsa-miR-501-5p	4,597	5,067	1,599	hsa-miR-622	4,597	5,471	2,394
hsa-miR-493	6,225	5,067	0,314	hsa-miR-2053	4,597	5,067	1,599	hsa-miR-487a	5,439	6,315	2,401
hsa-miR-551b	6,225	5,067	0,314	hsa-miR-181c*	6,225	6,697	1,603	hsa-miR-770-5p	5,094	5,979	2,422
hsa-let-7c	12,421	11,265	0,315	hsa-miR-297	6,225	6,697	1,603	hsa-miR-675	7,868	8,758	2,433
hsa-miR-486-5p	9,451	8,325	0,324	hsa-miR-2276	6,225	6,697	1,603	hsa-miR-548d-3p	4,444	5,336	2,440
hsa-miR-1294	5,439	4,320	0,327	hsa-miR-298	6,927	7,402	1,608	hsa-miR-136	4,444	5,336	2,440
hsa-miR-497	12,115	11,037	0,340	hsa-miR-22	13,255	13,740	1,625	hsa-miR-149*	10,236	11,131	2,447
hsa-miR-132*	5,267	4,211	0,348	hsa-miR-215	5,931	6,417	1,626	hsa-miR-658	6,607	7,513	2,475
hsa-miR-548f	5,267	4,211	0,348	hsa-miR-376b	5,931	6,417	1,626	hsa-miR-296-3p	6,487	7,402	2,497
hsa-miR-1258	5,608	4,553	0,348	hsa-miR-24-1*	5,931	6,417	1,626	hsa-miR-1182	5,773	6,697	2,519
hsa-miR-943	5,608	4,553	0,348	hsa-miR-194*	5,608	6,096	1,628	hsa-miR-1274b	11,354	12,284	2,534
hsa-miR-495	7,569	6,515	0,348	hsa-miR-1912	7,696	8,194	1,646	hsa-miR-655	4,924	5,858	2,544
hsa-miR-16-1*	7,569	6,515	0,348	hsa-miR-15b	11,694	12,193	1,647	hsa-miR-193a-3p	8,655	9,591	2,549
hsa-miR-101	10,340	9,315	0,359	hsa-miR-1975	12,562	13,061	1,648	hsa-miR-301a	7,112	8,051	2,555
hsa-miR-378	8,997	7,973	0,359	hsa-miR-194	9,142	9,642	1,650	hsa-miR-572	5,267	6,208	2,562
hsa-miR-616*	6,360	5,336	0,359	hsa-miR-656	4,299	4,803	1,656	hsa-miR-208a	5,267	6,208	2,562
hsa-miR-33a*	6,487	5,471	0,362	hsa-miR-875-5p	4,299	4,803	1,656	hsa-miR-331-5p	5,267	6,208	2,562
hsa-miR-450b-3p	6,082	5,067	0,362	hsa-miR-744	8,622	9,128	1,658	hsa-miR-192	8,555	9,509	2,596
hsa-miR-376a	8,864	7,849	0,363	hsa-miR-181d	5,094	5,603	1,663	hsa-miR-762	9,976	10,946	2,640
hsa-miR-2277	7,431	6,417	0,363	hsa-miR-1979	8,717	9,233	1,674	hsa-miR-142-5p	8,293	9,266	2,648
hsa-miR-26b*	5,439	4,434	0,366	hsa-miR-933	7,198	7,714	1,675	hsa-miR-1293	4,758	5,732	2,649
hsa-miR-573	5,439	4,434	0,366	hsa-miR-505*	6,424	6,940	1,675	hsa-miR-1208	5,094	6,096	2,722
hsa-miR-126*	5,439	4,434	0,366	hsa-miR-339-3p	8,589	9,110	1,683	hsa-miR-595	8,807	9,811	2,728
hsa-miR-518e	6,607	5,603	0,366	hsa-miR-105*	4,032	4,553	1,684	hsa-miR-95	4,597	5,603	2,733
hsa-miR-523	6,607	5,603	0,366	hsa-miR-1265	4,032	4,553	1,684	hsa-miR-1291	5,931	6,940	2,744
hsa-miR-218	7,198	6,208	0,371	hsa-miR-130b*	3,909	4,434	1,690	hsa-miR-548d-5p	4,032	5,067	2,816
hsa-miR-1908	11,626	10,636	0,372	hsa-miR-29a*	3,794	4,320	1,691	hsa-miR-106a	11,588	12,625	2,821
hsa-miR-302d	5,094	4,106	0,372	hsa-miR-220c	6,082	6,608	1,692	hsa-miR-105	4,299	5,336	2,823
hsa-miR-424*	6,827	5,858	0,380	hsa-miR-33a	6,082	6,608	1,692	hsa-miR-517c	4,299	5,336	2,823
hsa-miR-150	11,478	10,516	0,382	hsa-miR-200c	13,008	13,534	1,693	hsa-miR-579	4,161	5,202	2,830
hsa-miR-376a*	5,267	4,320	0,388	hsa-miR-1286	6,927	7,459	1,701	hsa-miR-637	5,267	6,315	2,852
hsa-miR-127-3p	7,726	6,782	0,389	hsa-miR-1323	4,924	5,471	1,727	hsa-miR-766	12,623	13,671	2,853
hsa-miR-26b	11,282	10,345	0,392	hsa-miR-555	4,924	5,471	1,727	hsa-miR-191	13,045	14,121	2,932
hsa-miR-31*	7,634	6,697	0,392	hsa-miR-582-5p	4,924	5,471	1,727	hsa-miR-671-5p	6,487	7,566	2,941
hsa-miR-146b-5p	11,074	10,144	0,394	hsa-miR-449c	4,924	5,471	1,727	hsa-miR-659	5,608	6,697	2,970
hsa-miR-15a*	7,022	6,096	0,396	hsa-miR-154*	4,924	5,471	1,727	hsa-miR-608	8,072	9,164	2,980
hsa-miR-362-5p	7,022	6,096	0,396	hsa-miR-1225-5p	6,607	7,154	1,728	hsa-miR-765	7,755	8,848	2,983
hsa-miR-1184	8,208	7,283	0,396	hsa-miR-220a	6,664	7,220	1,743	hsa-miR-208b	5,094	6,208	3,044
hsa-miR-143	15,001	14,081	0,399	hsa-miR-329	6,225	6,782	1,745	hsa-miR-129-5p	4,597	5,732	3,110
hsa-miR-299-3p	5,353	4,434	0,399	hsa-miR-216b	6,827	7,402	1,778	hsa-miR-708	7,431	8,584	3,169
hsa-miR-613	4,924	4,007	0,400	hsa-miR-522	4,758	5,336	1,784	hsa-miR-1290	4,444	5,603	3,185

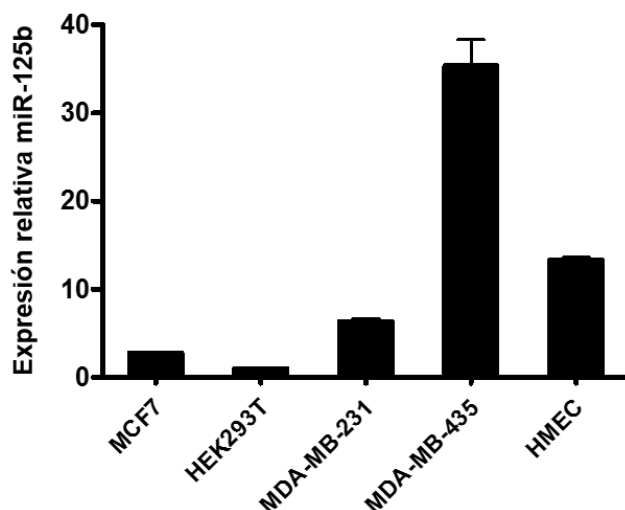
hsa-miR-140-3p	12,390	11,502	0,411	hsa-miR-449c*	4,758	5,336	1,784	hsa-miR-184	5,439	6,608	3,218
hsa-miR-643	6,225	5,336	0,411	hsa-miR-363	7,431	8,012	1,789	hsa-miR-557	4,299	5,471	3,228
hsa-miR-1915*	6,487	5,603	0,413	hsa-miR-339-5p	8,072	8,661	1,802	hsa-miR-32*	4,299	5,471	3,228
hsa-miR-424	10,389	9,509	0,415	hsa-miR-133a	8,072	8,661	1,802	hsa-let-7a-2*	4,924	6,096	3,228
hsa-miR-1287	5,931	5,067	0,422	hsa-miR-647	5,267	5,858	1,806	hsa-miR-921	6,225	7,402	3,246
hsa-miR-508-3p	5,180	4,320	0,423	hsa-miR-592	5,267	5,858	1,806	hsa-miR-720	12,252	13,449	3,310
hsa-miR-377	8,655	7,805	0,428	hsa-miR-25*	5,267	5,858	1,806	hsa-miR-664*	5,094	6,315	3,388
hsa-miR-139-5p	8,251	7,402	0,428	hsa-miR-338-5p	5,267	5,858	1,806	hsa-miR-18a	7,431	8,661	3,422
hsa-miR-1231	6,827	5,979	0,428	hsa-miR-34c-3p	9,095	9,692	1,818	hsa-miR-551a	5,608	6,863	3,506
hsa-miR-1284	5,773	4,934	0,432	hsa-miR-1909*	5,608	6,208	1,821	hsa-miR-939	6,007	7,283	3,581
hsa-miR-886-5p	6,927	6,096	0,435	hsa-miR-488*	5,608	6,208	1,821	hsa-miR-183	7,501	8,781	3,595
hsa-miR-30e*	7,431	6,608	0,439	hsa-miR-200b*	7,279	7,892	1,845	hsa-miR-1255b	4,444	5,732	3,625
hsa-miR-216a	8,208	7,402	0,447	hsa-miR-590-5p	6,607	7,220	1,845	hsa-miR-885-5p	5,931	7,220	3,629
hsa-miR-559	5,608	4,803	0,447	hsa-miR-1471	6,607	7,220	1,845	hsa-miR-106b	11,062	12,352	3,632
hsa-miR-93*	7,112	6,315	0,450	hsa-miR-18b	6,082	6,697	1,850	hsa-miR-155	7,501	8,848	3,847
hsa-miR-1289	7,112	6,315	0,450	hsa-miR-1260	12,468	13,095	1,872	hsa-miR-124	7,022	8,372	3,855
hsa-let-7e	11,334	10,550	0,457	hsa-miR-7-1*	7,755	8,387	1,880	hsa-miR-9*	8,072	9,495	4,150
hsa-miR-487b	7,198	6,417	0,458	hsa-miR-509-3p	3,686	4,320	1,885	hsa-miR-342-5p	4,597	6,096	4,474
hsa-miR-518b	7,922	7,154	0,464	hsa-miR-548n	4,299	4,934	1,887	hsa-miR-196a	5,094	6,608	4,542
hsa-miR-135b*	5,439	4,676	0,466	hsa-miR-570	6,225	6,863	1,893	hsa-miR-488	4,299	5,858	4,753
hsa-miR-600	6,360	5,603	0,469	hsa-miR-635	6,225	6,863	1,893	hsa-miR-1180	4,299	5,858	4,753
hsa-miR-596	7,696	6,940	0,470	hsa-miR-532-3p	10,726	11,365	1,895	hsa-miR-96	7,112	8,710	4,941
hsa-miR-520d-3p	6,487	5,732	0,470	hsa-miR-187	4,161	4,803	1,900	hsa-miR-516a-5p	7,198	8,826	5,095
hsa-miR-512-5p	6,225	5,471	0,470	hsa-miR-363*	5,439	6,096	1,929	hsa-miR-625	4,444	6,096	5,214
hsa-miR-126	14,041	13,289	0,472	hsa-miR-198	5,439	6,096	1,929	hsa-miR-1246	6,607	8,261	5,230
hsa-miR-320d	8,208	7,459	0,473	hsa-miR-598	5,439	6,096	1,929	hsa-miR-182	9,659	11,422	5,832
hsa-miR-490-5p	6,607	5,858	0,473	hsa-miR-711	9,164	9,822	1,930	hsa-miR-30b*	4,032	5,858	6,209
hsa-miR-193b*	6,607	5,858	0,473	hsa-miR-499-3p	6,487	7,154	1,949	hsa-miR-1253	6,487	8,475	7,298
hsa-miR-500	6,082	5,336	0,475	hsa-miR-148a	11,930	12,601	1,956	hsa-miR-936	6,487	8,584	8,141
hsa-let-7b*	5,931	5,202	0,482	hsa-miR-548g	4,924	5,603	1,972	hsa-miR-1283	4,758	6,863	8,206
hsa-miR-195	15,533	14,812	0,486	hsa-miR-885-3p	7,813	8,503	1,993	hsa-miR-210	7,022	9,250	9,275
hsa-miR-223	10,456	9,741	0,489	hsa-miR-877	7,112	7,805	1,999	hsa-miR-425	9,950	12,352	11,046
hsa-miR-642	5,267	4,553	0,490	hsa-miR-362-3p	7,357	8,051	2,001	hsa-miR-203	7,198	9,705	12,265
hsa-miR-609	5,267	4,553	0,490	hsa-miR-423-5p	10,214	10,920	2,027	hsa-miR-519a	5,439	8,160	15,193
hsa-miR-190b	5,267	4,553	0,490	hsa-miR-182*	5,608	6,315	2,027	hsa-miR-375	8,293	11,056	15,854
hsa-miR-34a	7,569	6,863	0,494	hsa-miR-106b*	5,608	6,315	2,027				
hsa-miR-586	5,773	5,067	0,494	hsa-miR-374b*	4,758	5,471	2,040				
hsa-miR-769-5p	5,773	5,067	0,494	hsa-miR-21*	6,607	7,344	2,089				
hsa-miR-147	5,773	5,067	0,494	hsa-miR-632	4,597	5,336	2,094				
hsa-miR-1233	9,231	8,530	0,496	hsa-miR-1306	4,597	5,336	2,094				
hsa-miR-449b*	11,086	10,391	0,499	hsa-miR-542-3p	5,773	6,515	2,100				

**Tabla 11.** miRNAs diferencialmente expresados entre el tejido tumoral y tejido normal adyacente en otra serie independiente de pacientes con cáncer de mama (cohorte 2). Se analizó la expresión del panel de miRNAs con otra plataforma de array diferente en un grupo correspondiente al tejido tumoral de 50 pacientes con cáncer de mama y en otro grupo correspondiente a 20 muestras de tejido normal del total de los 50 pacientes (ver materiales y métodos). Los miRNAs sombreados en color verde corresponden a los miRNAs que tienen reprimida su expresión en el tumor respecto del tejido normal. Los miRNAs sombreados en naranja corresponden a los miRNAs que están sobreexpresados en el tumor respecto del tejido normal.

## IV.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-125b EN CÁNCER DE MAMA.

### IV.2.1. miR-125b DISMINUYÓ LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EL CRECIMIENTO CELULAR INDEPENDIENTE DE ANCLAJE EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA.

Con el fin de investigar los efectos biológicos del miRNA más significativamente desregulado en tumores de mama, miR-125b fue sobreexpresado de forma estable mediante infección retroviral en las células epiteliales mamarias no tumorigénicas HMEC y en las líneas celulares tumorigénicas MCF7 y MDA-MB-231, las cuales tienen grados variables de malignidad. La selección de estas líneas nos permitió determinar si el efecto biológico de miR-125b difiere entre células normales y tumorigénicas. En primer lugar, analizamos por qRT-PCR el nivel de expresión endógena de miR-125b en un panel de líneas celulares de cáncer. La expresión endógena de miR-125b en las células de mama fue relativizada a los niveles de miR-125b en células HEK-293T por presentar el nivel de expresión más bajo (Figura 21). La línea celular con mayor expresión de miR-125b fue MDA-MB-435 seguidas por orden decreciente de las células HMEC, MDA-MB-231 y MCF7.

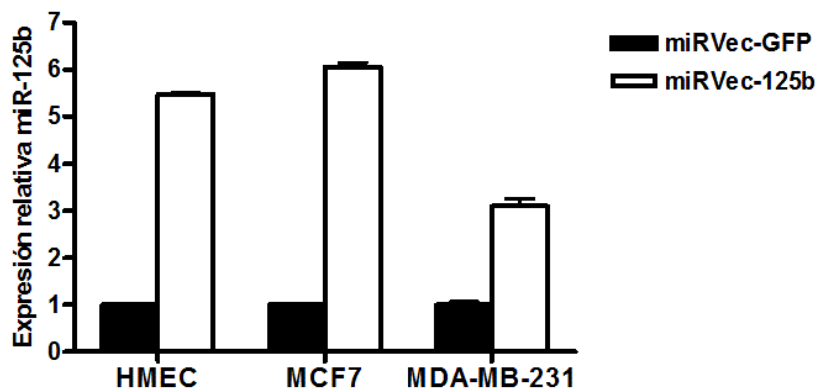


**Figura 21.** Niveles de expresión de miR-125b determinados mediante qRT-PCR en diferentes líneas celulares. Los datos de expresión de miR-125b fueron normalizados con el control endógeno RNU24 en cada línea celular y relativizado a los niveles de miR-125b de las células HEK-293T usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

En segundo lugar, medimos los niveles de expresión de miR-125b mediante qRT-PCR en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y HMEC infectadas con miRVec-125b y miRVec-GFP para validar la expresión ectópica de miR-125b en dichas células y, por tanto, asegurar que los efectos biológicos son debidos a la sobreexpresión de miR-125b (Figura 22). Los

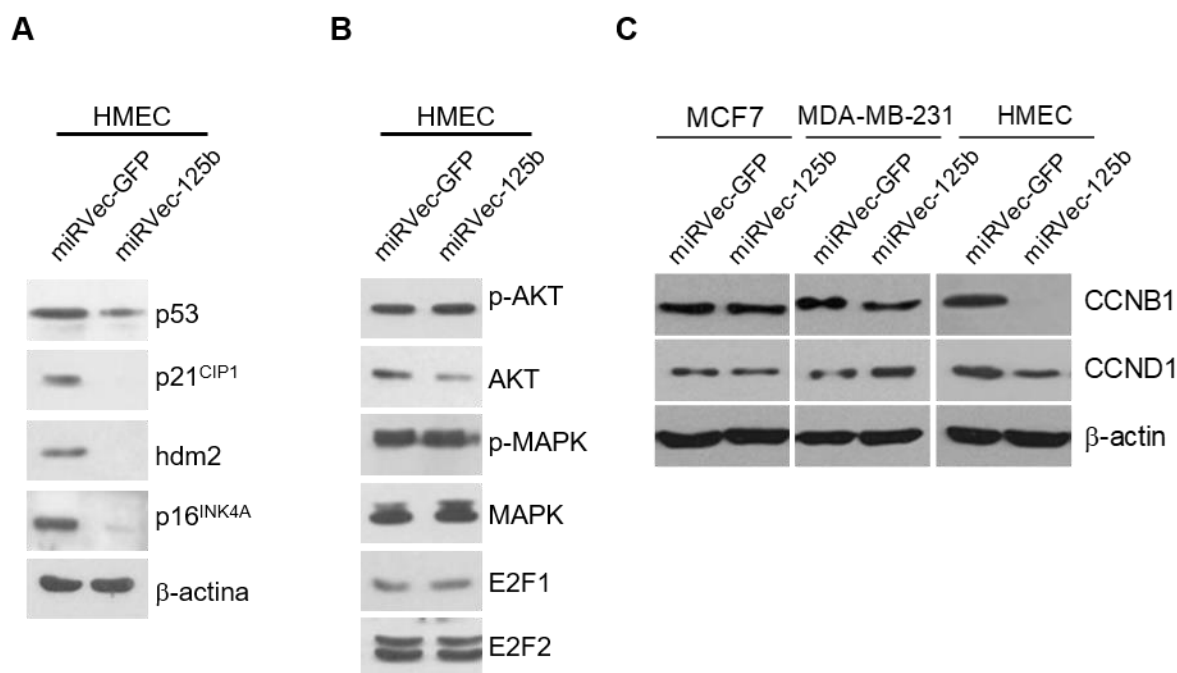


niveles de miR-125b de las células de mama que sobreexpresan miRVec-125b fueron relativizados a los niveles de miR-125b de las células infectadas con miRVec-GFP. Como puede observarse miR-125b fue sobreexpresado en las tres líneas celulares respecto a las mismas líneas celulares infectadas con miRVec-GFP asegurando así que los efectos biológicos de miR-125b son debidos a su expresión ectópica.



**Figura 22.** Validación mediante qRT-PCR de la expresión ectópica de miR-125b en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231. El gráfico muestra los niveles de expresión relativa de miR-125b en las células de mama HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 que sobreexpresan de forma estable miRVec-125b y miRVec-GFP. Las células han sido establecidas a partir de clones heterogéneos una vez infectadas y seleccionadas con Blastidicina por 12 días.

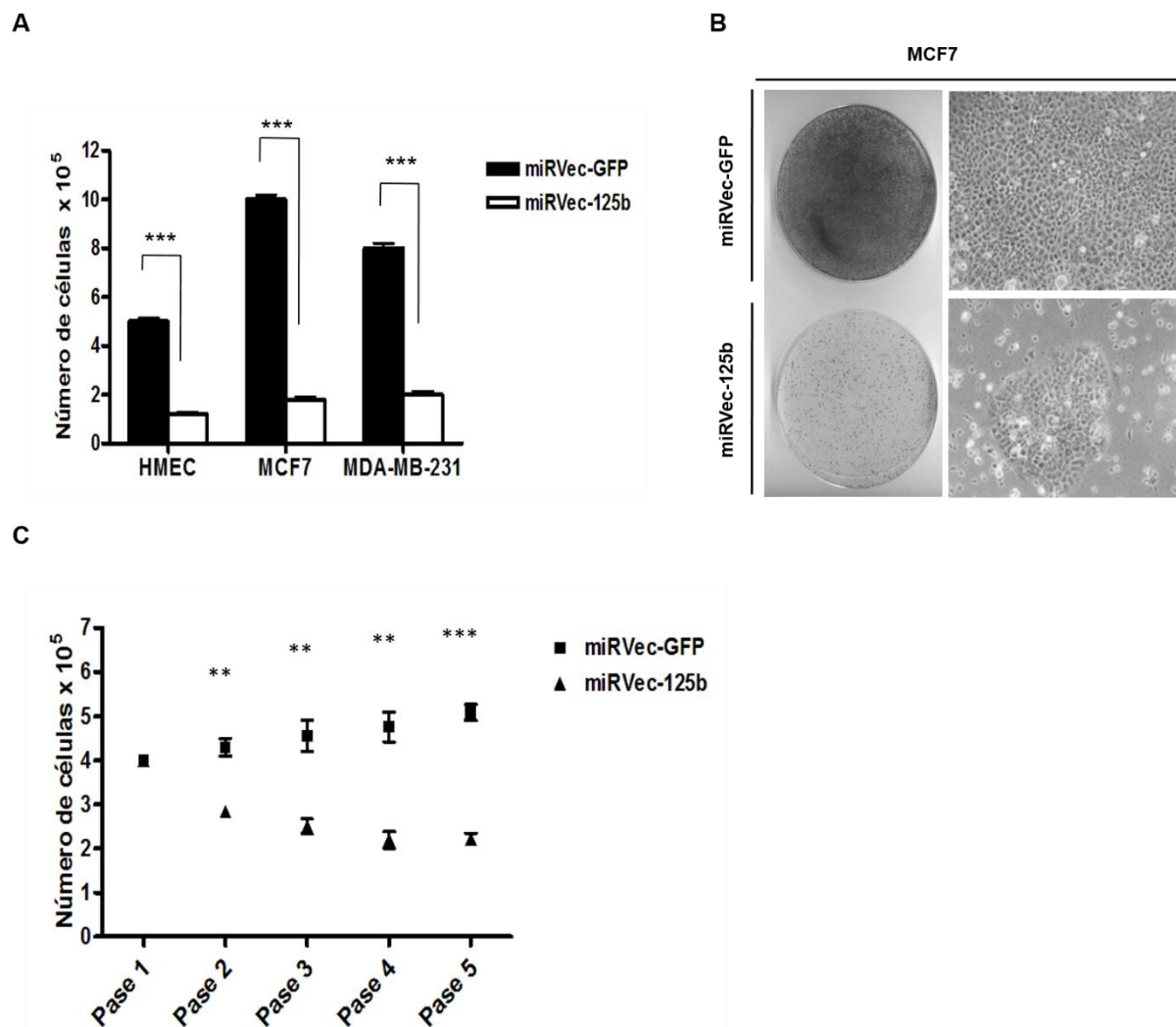
Además, para confirmar la sobreexpresión de miR-125b, se analizó mediante Western blot en células HMEC que sobreexpresan de forma estable miRVec-125b y miRVec-GFP, la expresión de proteínas cuyas regiones 3'-UTR-mRNA habían sido descritas previamente por interaccionar directamente con miR-125b, tales como p53, p-AKT, p-MAPK y miembros de la familia E2F<sup>304-306</sup> (Figura 23). Nuestros resultados confirmaron la represión de la expresión de p53 (la diana validada más conocida de miR-125b<sup>307</sup>) en las células HMEC infectadas con miRVec-125b respecto de las células infectadas con miRVec-GFP. Como era de esperar, la expresión de otras proteínas relacionadas con la vía p53, como p21<sup>CIP1</sup>, HDM2 y p16<sup>INK4A</sup>, fue alterada en las células HMEC que sobreexpresaron miRVec-125b. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de p-AKT, p-MAPK, E2F1 y E2F2 entre las células HMEC que sobreexpresan miRVec-125b y las células que sobreexpresan miRVec-GFP (Figura 23).



**Figura 23. A)** Expresión por Western blot de las proteínas relacionadas con el ciclo celular p53, p21<sup>CIP1</sup>, HDM2 y p16<sup>INK4A</sup> en células HMEC que expresan de forma estable miRVec-125b o el control miRVec-GFP. **B)** Análisis por Western blot de la expresión de p-AKT, p-MAPK, E2F1, y E2F2 en células HMEC que expresan de forma estable miRVec-125b o el control miRVec-GFP. **C)** Análisis por Western blot de la expresión de las ciclinas CCNB1 y CCND1 en células MCF7, MDA-MB-231 y HMEC que expresan de forma estable miRVec-125b o el control miRVec-GFP.

Una vez que se estableció la expresión estable de miR-125b en células MCF7, MDA-MB-231 y HMEC, se examinó los efectos que tiene la sobreexpresión de miR-125b sobre la proliferación celular. Para ello, se hizo un recuento del número de células a tiempo final una vez que las células MCF7, MDA-MB-231 y HMEC fueron infectadas y seleccionadas con Blasticidina por 12 días. De igual manera, se realizaron fotografías de las células en el microscopio y se tiñeron con cristal violeta al 0,1% a tiempo final para obtener una información más visual sobre el efecto de miR-125b sobre la proliferación celular. También, se realizó una curva de crecimiento en células HMEC con expresión estable de miRVec-125b o el control miRVec-GFP. Nuestros resultados mostraron que la expresión ectópica de miR-125b provocó una disminución significativa de la proliferación celular en las tres líneas celulares (Figura 24 A, B y C y datos no mostrados). Concretamente, puede observarse la reducción significativa a tiempo final del número de células MCF7, MDA-MB-231 y HMEC con expresión estable de miRVec-125b respecto de las que expresaron miRVec-GFP (t-test con nivel de significación  $p < 0,001$  en las tres líneas celulares) (Figura 24A). Además, puede observarse de forma visual la disminución del número de células MCF7 que sobreexpresan miRVec125b respecto de las células con expresión estable de miRVec-GFP (Figura 24B). Así mismo, la sobreexpresión de miR-125b provocó una disminución significativa del crecimiento en células HMEC al compararlas con las células que expresan el control miRVec-GFP (Figura 24C). Esta disminución en el crecimiento fue significativa desde el pase 2 de las células (t-test con nivel

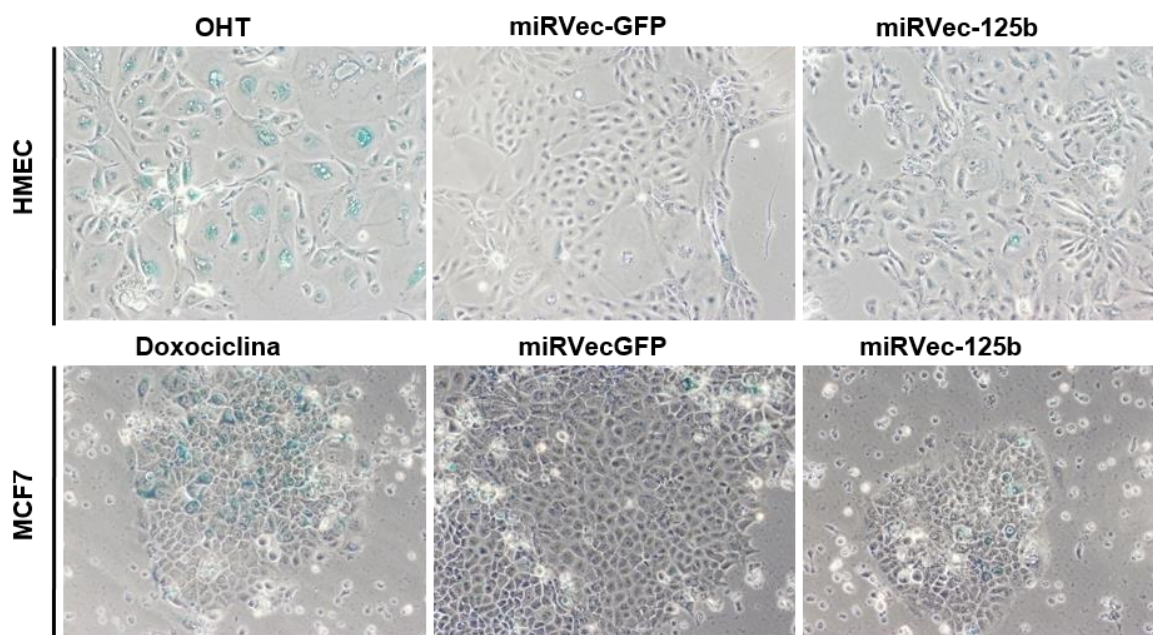
de significación  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  en los pases 2, 3, 4 y 5 respectivamente).



**Figura 24.** La sobreexpresión de miR-125b causó una reducción de la proliferación en líneas celulares de mama. **A)** Gráfica que muestra el número de células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-125b o el control miRVec-GFP tras ser infectadas con dichos vectores y seleccionadas con Blastomicina por 12 días. **B)** Morfología fenotípica de células MCF7 con expresión estable de miRVec-125b o miRVec-GFP (panel derecho). células MCF7 con expresión estable de miRVec-125b y miRVec-GFP teñidas con cristal violeta una vez se han infectado y seleccionado. **C)** Curva de crecimiento celular de células HMEC con expresión estable de miRVec-125b y miRVec-GFP. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para identificar el potencial mecanismo por el cual miR-125b es capaz de reducir la proliferación celular, se realizó un análisis de detección de senescencia, un análisis del ciclo celular y se evaluaron las tasas de apoptosis en las tres líneas celulares con expresión estable de miRVec-125b o miRVec-GFP. Para las tres líneas celulares, la disminución de la proliferación celular no se debió a un proceso de senescencia ya que no se detectó la actividad- $\beta$ -galactosidasa a pH=6 asociada específicamente al fenotipo senescente y tampoco las células mostraron la morfología característica de las células senescentes que consiste en

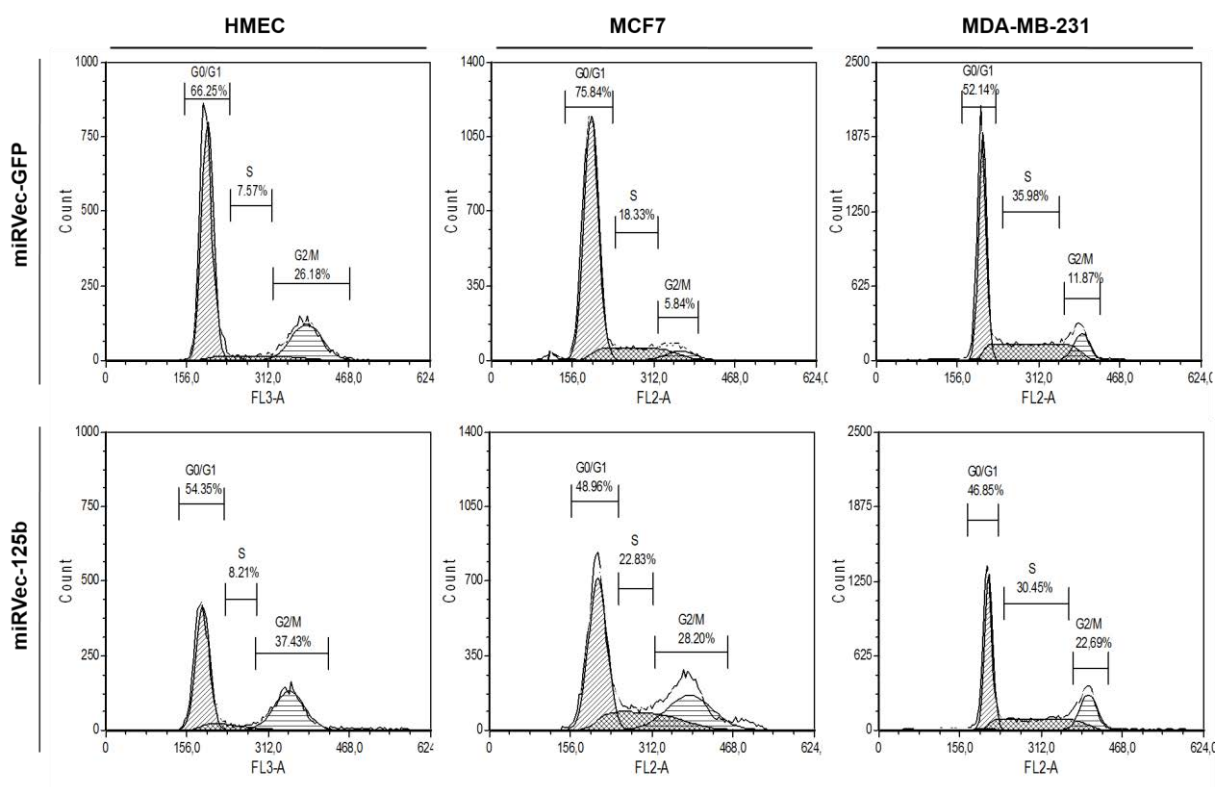
una morfología alargada, aplanada y un aumento en el tamaño celular de hasta dos veces (Figura 25 y datos no mostrados).



**Figura 25.** Detección de actividad  $\beta$ -Galactosidasa en células HMEC y MCF7 con expresión estable de miRVec-125b y miRVec-GFP para detectar la presencia de células senescentes. Se incluyeron como controles positivos de senescencia células MCF7 tratadas con tamoxifeno (OHT) y células HMEC tratadas con Doxociclina.

El análisis del ciclo celular mediante FACS reveló que la expresión ectópica de miRVec-125b provocó una parada del ciclo celular en la fase G2/M en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 (Figura 26). Además del aumento del número de células que se acumulan en la fase G2/M del ciclo celular, la sobreexpresión de miRVec-125b causó un aumento de la apoptosis temprana (38,91%) y tardía (26,36%) en las células MDA-MB-231 respecto de las células con expresión del control miRVec-GFP (apoptosis temprana: 1,31%; apoptosis tardía: 2,69%) (Figura 27A). Por el contrario, no hubo diferencias en las tasas de apoptosis temprana y tardía entre las células que sobreexpresan miRVec-125b y miRVec-GFP en las células MCF7 y HMEC (Figura 27A). Además, se evaluó la fragmentación de PARP mediante Western blot en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 que sobreexpresan miRVec-GFP y miRVec-125b. PARP es una proteína nuclear con motivos de dedo de zinc de unión al DNA, que cataliza la ADP-ribosilación de proteínas usando NAD (+) como sustrato y tiene un importante papel en la reparación del DNA, en la modulación de la estructura de la cromatina y en la apoptosis. PARP es escindida por la caspasa 3 una vez desencadenada la apoptosis, por lo que la fragmentación de PARP es una prueba directa de inducción de apoptosis por vía de las caspasas que puede ser evaluada mediante el análisis de la expresión de PARP completo y fragmentado mediante Western blot. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de miRVec-125b provocó la fragmentación de PARP en las células MDA-MB-231 respecto de las

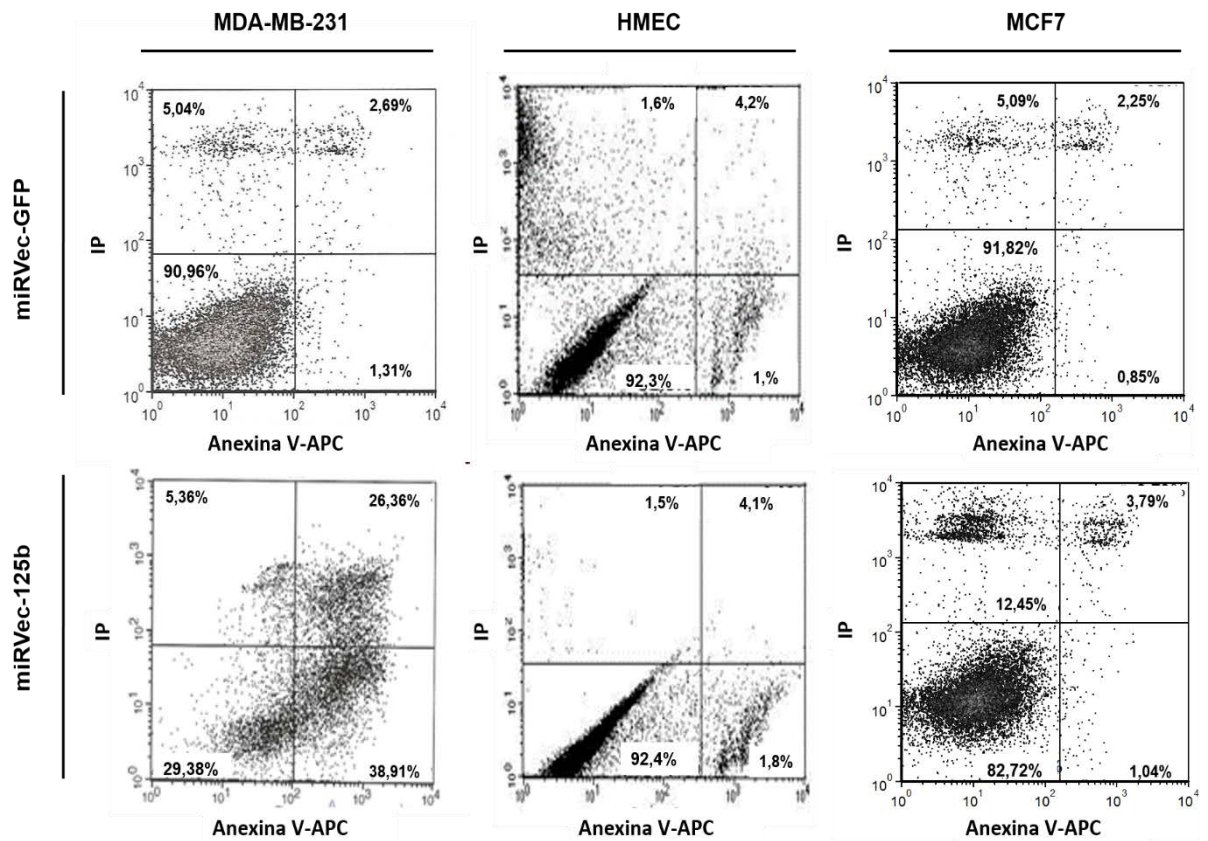
células con expresión estable del control miRVec-GFP. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de PARP completo y fragmentado entre las células HMEC y MCF7 que sobreexpresan miRVec-GFP y miRVec-125b (Figura 27B). Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que la reducción de proliferación celular provocada por la expresión ectópica de miR-125b es mediada por parada del ciclo celular en la fase G2/M en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 y por inducción de apoptosis en las células MDA-MB-231.



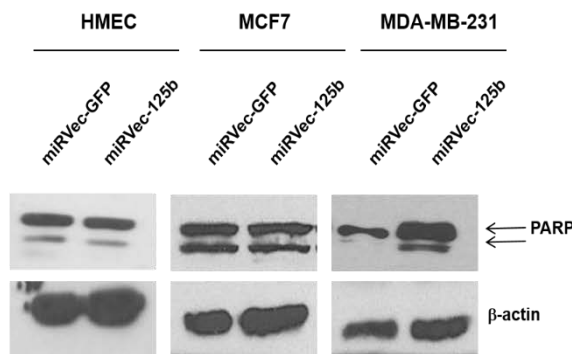
**Figura 26.** Perfiles de ciclo celular representados mediante histogramas de contenido de DNA en células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP y miRVec-125b. Los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo fueron: HMEC-miRVec-GFP (G0/G1, 66.2%; S, 7.6%; G2/M, 26.2%) versus HMEC-miRVec-125b (G0/G1, 54.3%; S, 8.2%; G2/M, 37.4%); MCF7-miRVec-GFP (G0/G1, 75.8%; S, 18.3%; G2/M, 5.8%) versus MCF7-miRVec-125b (G0/G1, 48.9%; S, 22.8%; G2/M, 28.2%), y MDA-MB-231-miRVec-GFP (G0/G1, 52.1%; S, 36%; G2/M, 11.9%) versus MDA-MB-231-miRVec-125b (G0/G1, 46.9%; S, 30.5%; G2/M, 22.7%).



A



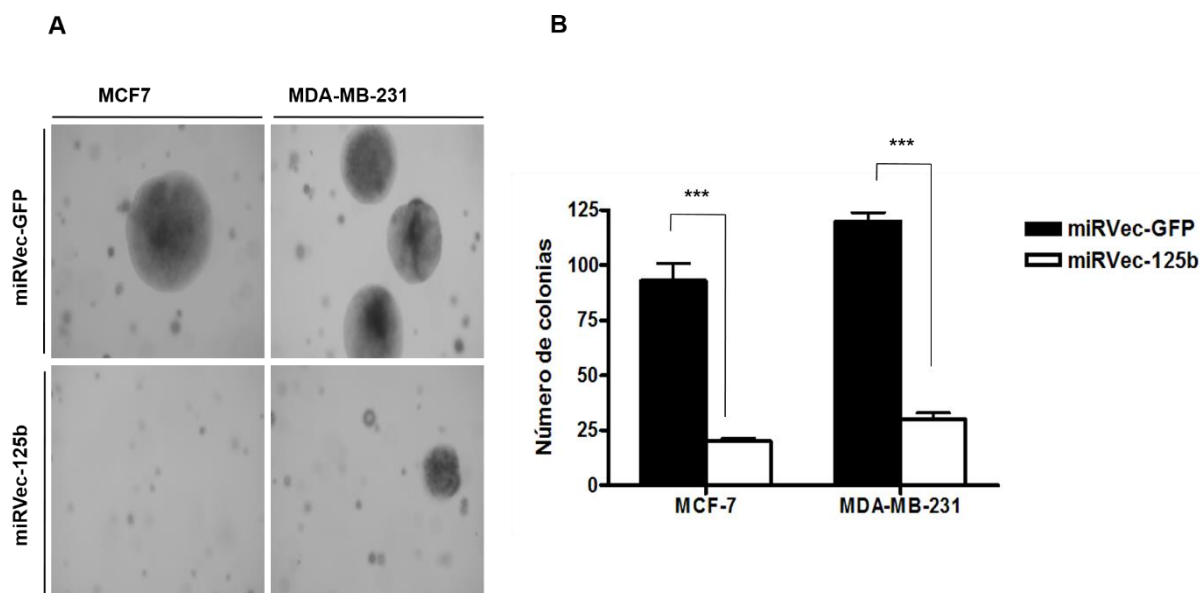
B



**Figura 27. A)** Tasas de apoptosis analizadas por FACS en células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP y miRVec-125b. Los porcentajes de células viables (panel inferior izquierdo), con apoptosis temprana (panel inferior derecho), con apoptosis tardía (panel superior derecho), y células necróticas (panel superior izquierdo) están indicados para cada línea celular. Obsérvese el incremento de apoptosis temprana (1.3  $\diamond$  38.9%) y tardía (2.6  $\diamond$  26.3%) en las células MDA-MB-231 que sobreexpresan miRVec-GFP y miRVec-125b. **B)** Análisis de la expresión de PARP por Western blot en células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP y miRVec-125b.

Por otra parte, para evaluar el potencial papel supresor tumoral de miR-125b *in vitro*, se examinó su capacidad para revertir el proceso de transformación celular mediante la realización de ensayos de formación de colonias en agar blando en células MCF7 y MDA-MB-231 que sobreexpresan miRVec-125b y miRVec-GFP. Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de miR-125b disminuyó significativamente el número de colonias del orden de

80% y 75%, respectivamente, en células MCF7 y MDA-MB-231 que expresan miRVec-125b en comparación con las células que expresan miRVec-GFP (Figura 28). Por lo tanto, miR-125b disminuyó dramáticamente la capacidad de crecimiento celular independiente de anclaje de células MCF7 y MDA-MB-231.

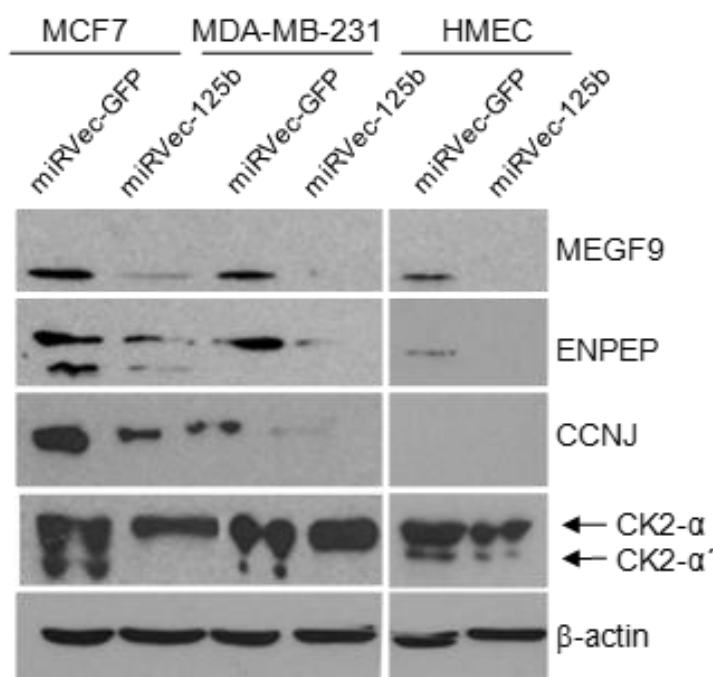


**Figura 28.** miR-125b redujo el crecimiento independiente de anclaje en células MCF7 y MDA-MB-231. **A)** Imágenes representativas de las colonias crecidas en agar blando de células MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP y miRVec-125b. **B)** Gráfica que muestra el número de colonias crecidas en agar blando de células MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-GFP y miRVec-125b. \*\*\* $p < 0.001$ .

#### IV.2.2. ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 SON DIANAS DIRECTAS DE miR-125b.

Se predijeron potenciales sitios de unión de miR-125b en las regiones 3'-UTR de los mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 mediante el uso de programas de predicción de dianas de miRNAs (PicTar, TargetScan, miRanda y DIANA-microT). A continuación, con el fin de evaluar la posible regulación de la expresión de estas proteínas por miR-125b, se analizó la expresión de cada una por Western blot en células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231. El análisis por Western blot reveló que los niveles de expresión de las potenciales proteínas diana ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 disminuyeron en las células MCF7, MDA-MB-231 y HMEC que sobreexpresan miRVec-125b, con la excepción de CCNJ que no se expresa en células HMEC (Figura 29

).



**Figura 29.** Análisis de la expresión por Western blot de MEGF9, ENPEP, CCNJ, y CK2- $\alpha$  (subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$ ) en células MCF7, MDA-MB-231, y HMEC con expresión estable de miRVec-GFP y miRVec-125b.

Para determinar si la represión de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 es debida a la interacción directa de miR-125b con las regiones 3'-UTR de los mRNA de cada una de las potenciales diana de miR-125b, se realizó un ensayo reportero de luciferasa en células HEK293T. Se seleccionó este modelo celular debido a que estas células expresan bajos niveles endógenos de miR-125b, pudiendo reflejar más claramente los efectos biológicos de la sobreexpresión de miR-125b con las moléculas sintéticas miméticas pre-125b (Figura 21). Para este propósito, se construyeron vectores reporteros que contienen la secuencia que codifica para Renilla luciferasa seguida de la región 3'-UTR WT o mutante de las potenciales dianas de miR-125b, y se siguieron dos enfoques de cotransfección diferentes, tal y como se describe en Materiales y métodos.

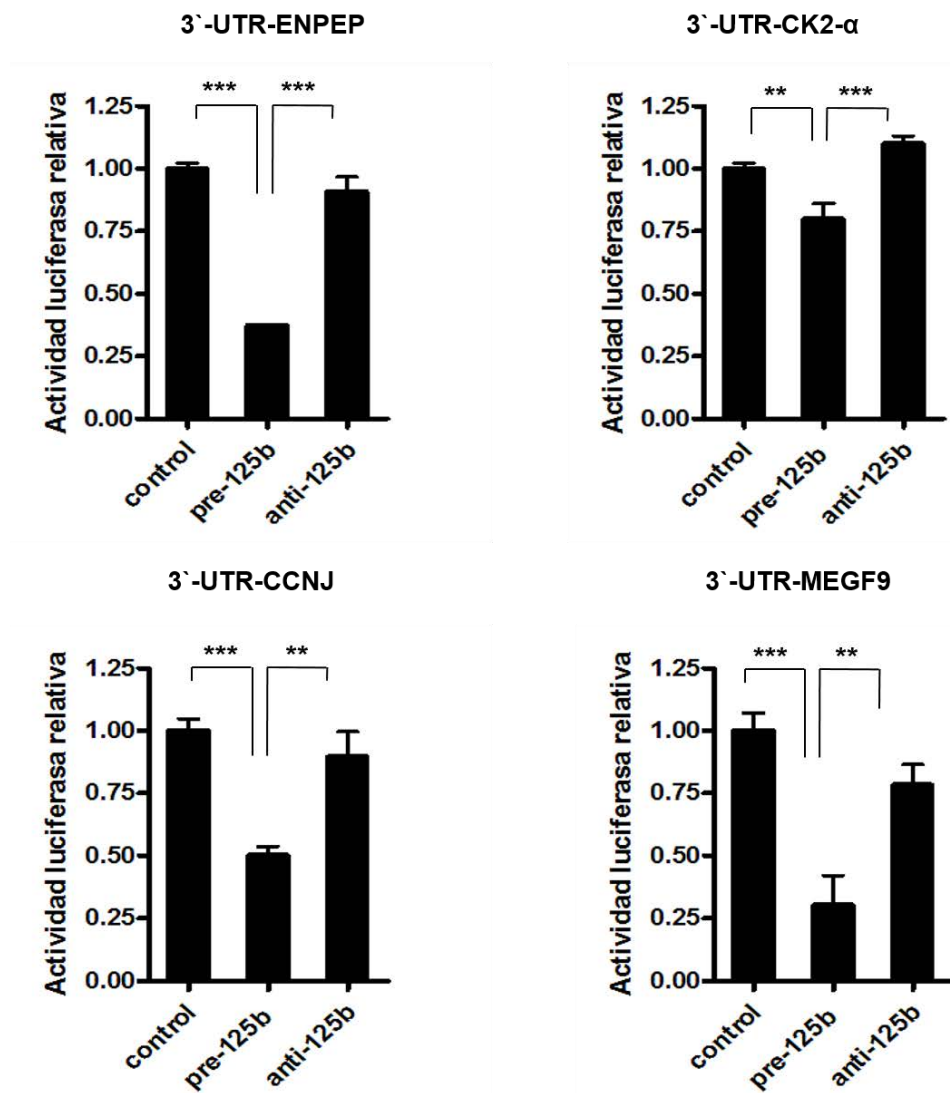
En primer lugar, se analizó el efecto de la expresión transitoria de las moléculas sintéticas pre-125b y anti-125b sobre la actividad luciferasa, cuando éstas se cotransfectaron con los constructos reporteros WT, pCI-3'-UTR de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9. En todos los casos, los experimentos de cotransfección mostraron que la expresión de luciferasa en los constructos WT, pCI-3'-UTR-ENPEP, pCI-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-3'-UTR-CCNJ y pCI-3'-UTR-MEGF9 se redujo significativamente tras la transfección de pre-125b (t-test: ENPEP p-valor < 0,001; CK2- $\alpha$  p-valor < 0,01; CCNJ p-valor < 0,001; MEGF9 p-valor < 0,001), pero no del control negativo (Figura 30A). De forma adicional, no se observaron efectos similares en ninguno los constructos WT pCI-3'-UTR en presencia de anti-125b (Figura 30A). Para validar la función inhibidora de las moléculas anti-125b en



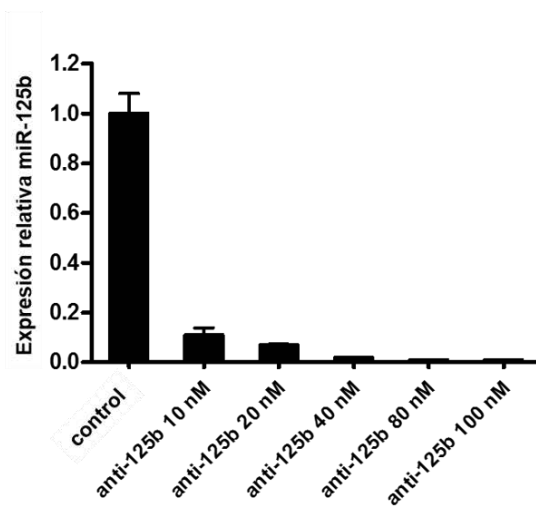
la reducción de la expresión endógena de miR-125b en células HEK293T, se midieron los niveles de expresión de miR-125b mediante qRT-PCR en células HEK293T transfectadas con diferentes concentraciones de anti-125b. Nuestros resultados mostraron que anti-125b inhibió eficientemente la expresión de miR-125b expresión de manera dosis dependiente (Figura 30B).

En segundo lugar, se cotransfectaron en las células HEK293T las moléculas pre-125b o el control negativo # 1 junto con cada uno de los constructos reporteros WT o mutantes pCI-3'-UTR-mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9. Nuestros resultados mostraron que pre-125b redujo significativamente la actividad luciferasa en las células transfectadas con cada uno de los cuatro constructos WT pCI-3'-UTR-mRNA respecto de las células transfectadas con el control negativo (*t-test*: ENPEP p-valor < 0,001; CK2- $\alpha$  p-valor < 0,01; CCNJ p-valor < 0,01; MEGF9 p-valor < 0,001) (Figura 31). No obstante, la expresión de pre-125b no disminuyó de forma significativa la actividad luciferasa en las células transfectadas con los constructos reporteros mutantes pCI-M202-3'-UTR-ENPEP y pCI-M714-3'-UTR-CCNJ (Figura 31). En el caso de los constructos mutantes pCI-3'-UTR-mRNA de MEGF9 y CK2- $\alpha$ , la actividad luciferasa no disminuyó significativamente en las células que expresan los constructos mutantes específicos pCI-M654-3'-UTR-MEGF9 y pCI-M210-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , respectivamente, tras cotransfección con pre-125b (Figura 31). En cada caso, los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestran los resultados de un experimento representativo de 3 experimentos independientes. En resumen, nuestros resultados demostraron que la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 es reprimida a través de la interacción directa de miR-125b con sus respectivas regiones 3'-UTR-mRNA.

A

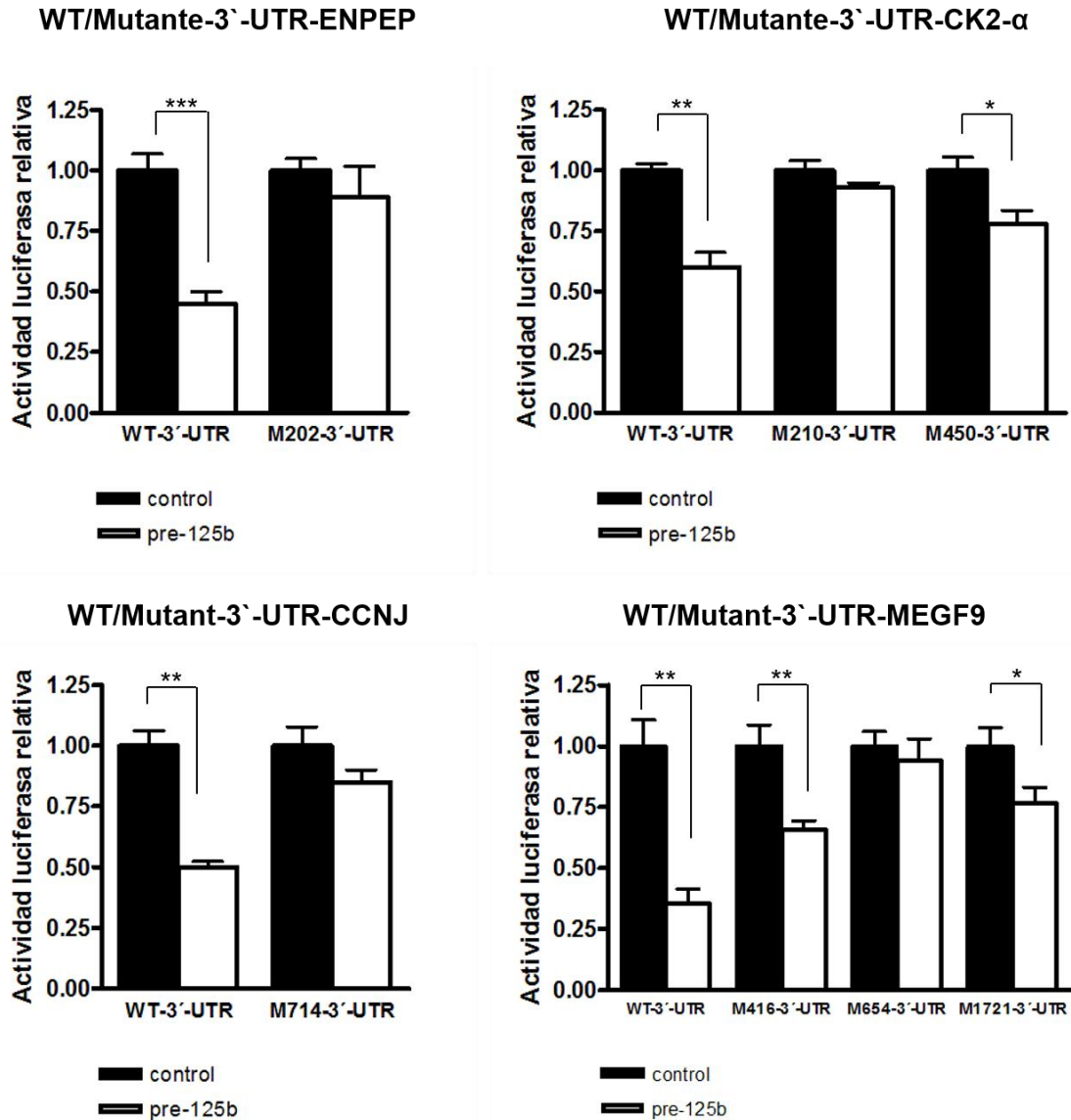


B



**Figura 30. A)** Actividad luciferasa relativa de células HEK293T transfectadas con pre-125b, anti-125b, o el control en presencia de los constructos reporteros WT, pCI-3'-UTR-ENPEP, pCI-3'-UTR-CK2- $\alpha$ , pCI-3'-UTR-CCNJ y pCI-3'-UTR-MEGF9. Las células HEK293T fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000 con el

control negativo #1, o pre-125b, o anti-125b a una concentración final de 30 nM. Se usó 100 ng de cada uno de los constructos reporteros pCI-3'-UTR-mRNA en las cotransfecciones. Se usó 10 ng del plásmido PGL3-Pm (FL) como control interno para la normalización. Los datos son presentados como actividad luciferasa normalizada (RL/FL) y relativizada al control negativo #1. **\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.** **B)** Dosis-respuesta de anti-125b en células HEK293T. El efecto inhibitorio de distintas concentraciones de anti-125b (10–100 nM) sobre los niveles de expresión endógena de miR-125b, fue analizado por qRT-PCR. Obsérvese la progresiva disminución de la expresión de miR-125b conforme los niveles de anti-125b aumentan.

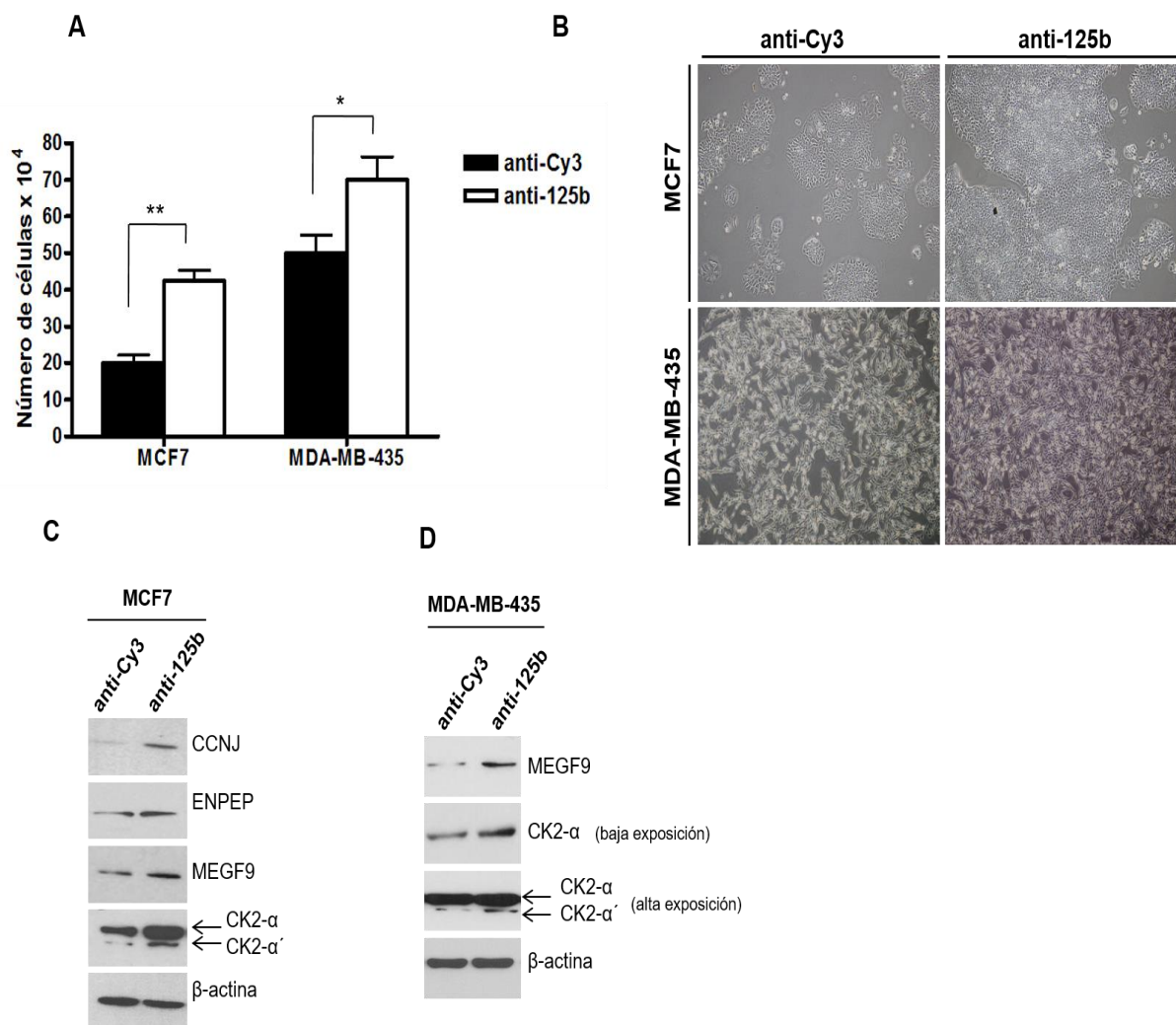


**Figura 31.** Actividad luciferasa relativa de células HEK293T transfectadas con pre-125b o el control negativo #1 en presencia de los constructos reporteros WT o mutantes, pCI-3'-UTR-ENPEP, pCI-3'-UTR-CK2-α, pCI-3'-UTR-CCNJ y pCI-3'-UTR-MEGF9. Los datos son presentados como actividad luciferasa normalizada (RL/FL) y relativizada al control negativo #1. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

### IV.2.3. LA INHIBICIÓN DE miR-125b AUMENTÓ LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9.

Con el objetivo de confirmar que miR-125b reduce la proliferación celular y causa una regulación negativa de la expresión de sus nuevas dianas ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9, se realizó la inhibición funcional de la expresión endógena de miR-125b con las moléculas sintéticas anti-125b. Para este propósito, se transfectaron de manera transitoria células MCF7 y MDA-MB-435 con moléculas anti-125b o su respectivo control negativo anti-Cy3. Se contaron las células al final del experimento y se analizó por Western blot la expresión de las nuevas dianas identificadas de miR-125b. Las células MDA-MB-435 fueron seleccionadas debido a que, previamente, se ha descrito que los niveles miR-125b son de aproximadamente 20 veces más alto que en las células MCF7 y HEK293T<sup>308</sup>, una observación corroborada en nuestro estudio (Figura 21).

En primer lugar, se verificó la funcionalidad de las moléculas anti-125b en células MCF7 y MDA-MB-435. Se observó que el efecto inhibitorio de anti-125b sobre la expresión endógena de miR-125b en las células MCF7 y MDA-MB-435 fue similar a la de células HEK293T. Nuestros resultados mostraron que la inhibición funcional de los niveles endógenos de miR-125b aumentó significativamente la proliferación de células MCF7 y MDA-MB-435 en comparación con el control negativo anti-Cy3 (*t-test*: MCF7 p valor < 0,01; MDA-MB-435 p-valor < 0,05) (Figura 32A y B). En las células MCF7 este incremento de la proliferación celular fue acompañado por un aumento de la expresión proteica de las cuatro nuevas dianas identificadas de miR-125b, ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 (Figura 32C). Por lo tanto, la inhibición funcional de miR-125b mediante el empleo de moléculas anti-125b revertió los efectos de la expresión de miR-125b sobre la proliferación celular y la expresión proteica. En las células MDA-MB-435, la inhibición funcional de miR-125b únicamente causó un aumento de los niveles de expresión de la proteína CK2- $\alpha$  (ambas subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$ ) y MEGF9 (Figura 32D). Sin embargo, se observó que las células MDA-MB-435 no expresaron CCNJ y ENPEP, un hecho que podría estar asociado con los altos niveles de miR-125b en estas células.



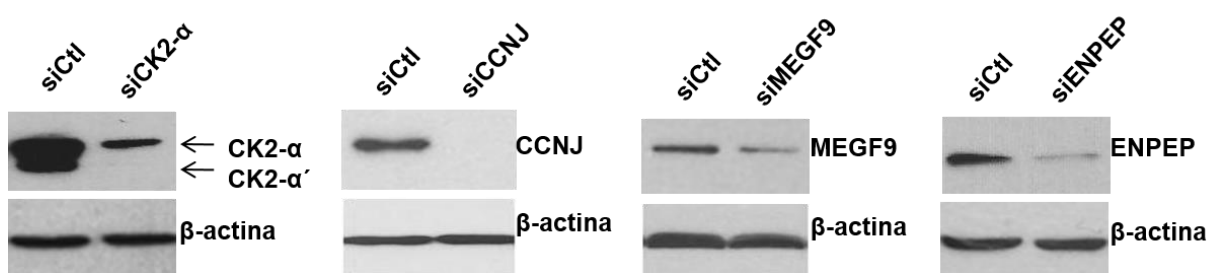
**Figura 32.** La inhibición funcional de miR-125b provocó un aumento de la proliferación celular y de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9. **A)** Gráfico que muestra el número de células MCF7 y MDA-MB-435 tras ser transfectadas con anti-125b o su respectivo control negativo anti-Cy3. Las células fueron transfectadas con los oligonucleótidos indicados a una concentración final de 80 nM usando el reactivo de transfección HiPerFect. Después de 72 horas de la transfección, las células fueron contadas, fotografiadas y se lisaron para la posterior extracción de proteínas. **B)** Fotografías que muestran los efectos fenotípicos de anti-125b y anti-Cy3 sobre la proliferación celular en células MCF7 y MDA-MB-435. Las condiciones de transfección fueron las mismas que las descritas en el apartado A. **C)** Análisis por Western blot de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 en células MCF7 transfectadas con anti-125b o su respectivo control negativo anti-Cy3. Las condiciones de transfección fueron las mismas que las descritas en el apartado A. **D)** Análisis por Western blot de la expresión de MEGF9 y CK2- $\alpha$  en células MDA-MB-435 transfectadas con anti-125b o su respectivo control negativo anti-Cy3. Las condiciones de transfección fueron las mismas que las descritas en el apartado A. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

#### IV.2.4. LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 RECAPITULÓ LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE miR-125b.

Una vez identificadas las regiones 3'-UTR de los mRNA de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 como dianas directas de miR-125b, se examinó si la represión transitoria de la expresión de estas proteínas imitó los efectos de la sobreexpresión de miR-125b. Para conocer la contribución de cada una de las proteínas a la reducción de la proliferación inducida por la expresión de miR-125b, se transfectaron de forma transitoria células MCF7 con *pools*

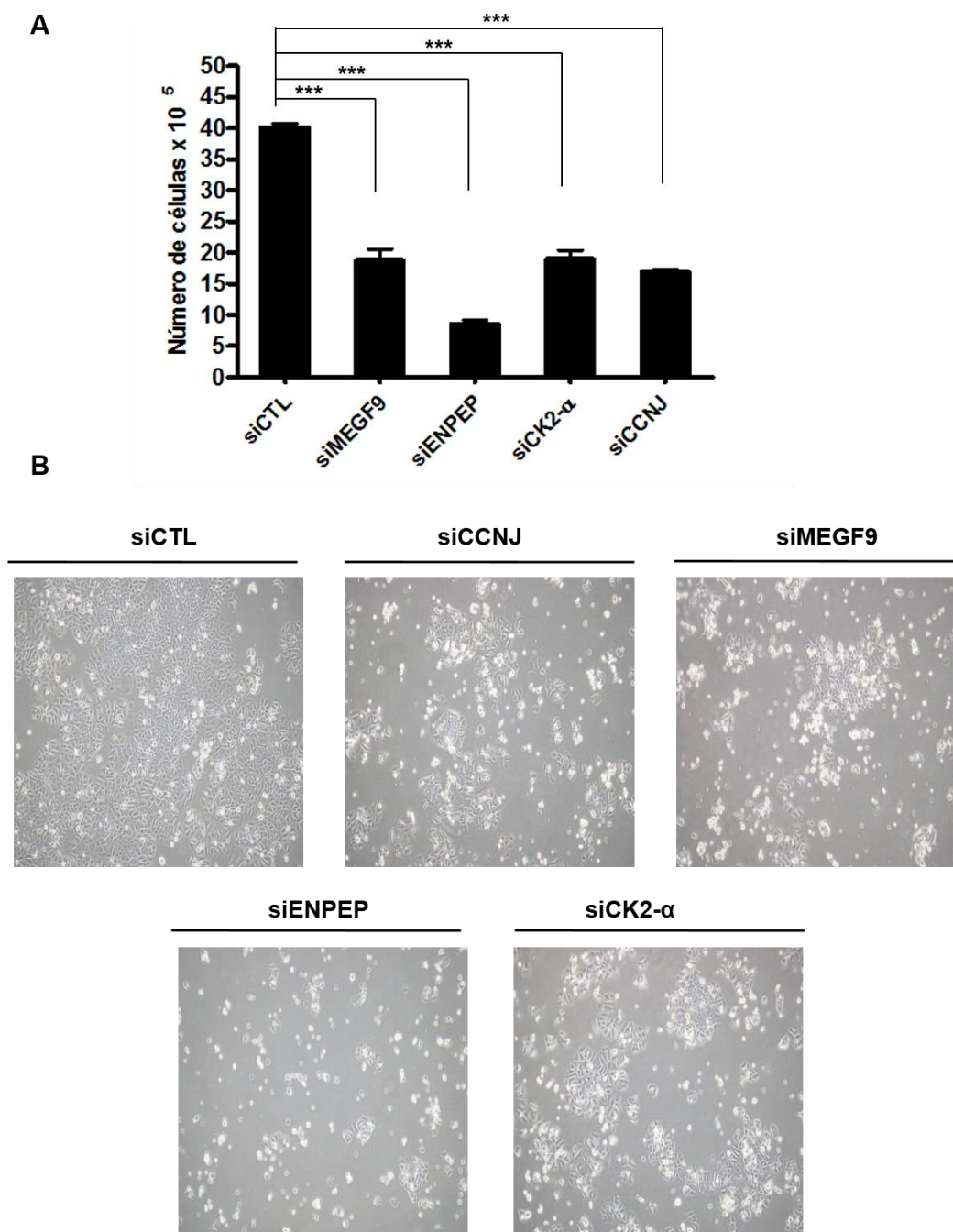
de siRNAs específicos de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9, o un siRNA control negativo a una concentración de 30nM. Tras 72 horas de la transfección, las células se fotografiaron, se contaron y se colectaron para extracción de proteínas o se tripsinizaron para realizar un análisis de ciclo celular y de detección de apoptosis mediante FACS. Se procedió a realizar las transfecciones en células MCF7 porque los niveles endógenos de miR-125b fueron más bajos en células MCF7 que otras líneas celulares de forma que es más probable que haya una mayor expresión de las dianas de miR-125b (Figura 21). De hecho, previamente demostramos que los niveles de algunas proteínas diana de miR-125b como CCNJ fueron más altos en células MCF7 que en células MDA-MB-231 o HMEC (que no expresan CCNJ) (Figura 29).

Para validar la efectividad y la especificidad de cada siRNA en la reducción de los niveles de proteína, se analizó mediante Western blot la expresión de cada una de las proteínas diana de miR-125b tras ser transfectadas con los pools de siRNAs específicos, siENPEP, siCK2- $\alpha$ , siCCNJ y siMEGF9, o el siRNA control negativo. El análisis reveló una eficiente represión de la expresión de cada una de las 4 proteínas de aproximadamente el 80% respecto de las células transfectadas con el siRNA control negativo (Figura 33).



**Figura 33.** Análisis por Western blot de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 tras la transfección de los siRNAs específicos indicados y el siRNA control negativo (siCt) en células MCF7. Las células fueron transfectadas con los pools de siRNAs indicados a una concentración final de 30 nM usando el reactivo de transfección HiPerFect. Después de 72 horas de transfección las células fueron colectadas y lisadas para extraer la fracción proteica.

La transfección de cada pool de siRNAs específicos de cada proteína provocó una disminución significativa de la proliferación celular en más del 60% en el caso de siCK2- $\alpha$ , siCCNJ y siMEGF9. Además, siENPEP redujo la proliferación celular en aproximadamente el 80% (t-test p-valor < 0,001 en todos los casos) (Figura 34 A y B).

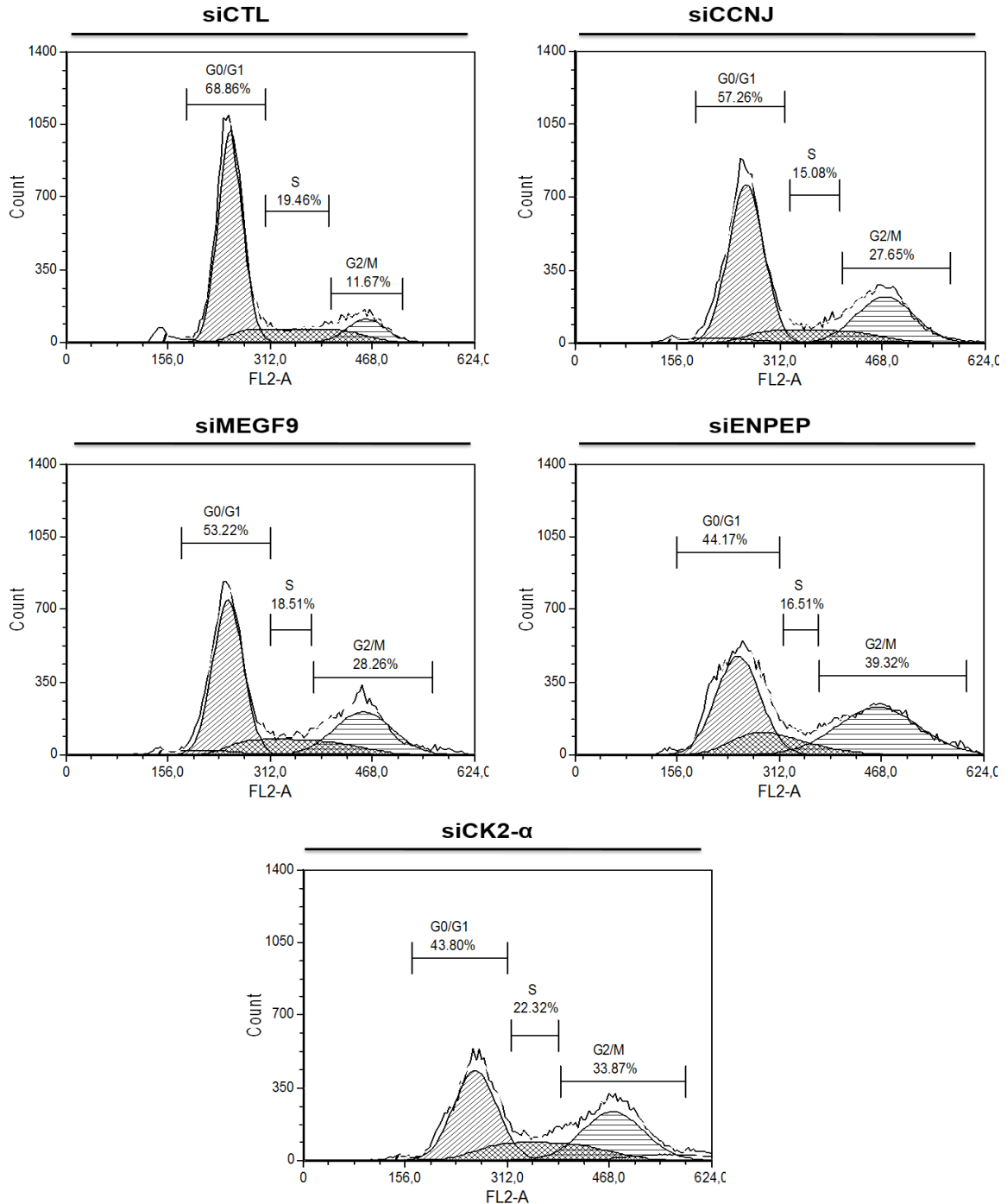


**Figura 34.** La inhibición de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 causó una reducción de la proliferación celular. **A)** Número de células después de 72 horas de transfección con los pools de siRNAs indicados en células MCF7. **B)** Imágenes que muestran los efectos fenotípicos sobre la proliferación celular después de 72 horas de transfección con los pools de siRNAs indicados en células MCF7. \*\*\* $p < 0,001$ .

Para conocer el mecanismo por el cual la represión de la expresión de las dianas de miR-125b reduce la proliferación celular, se analizaron los perfiles de ciclo celular y apoptosis mediante FACS de las células transfectadas con cada uno de los pools siRNAs y el siRNA control negativo. La reducción de la proliferación inducida por la inhibición de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 fue acompañada por un aumento de células detenidas en la fase G2/M del ciclo celular (Figura 35). Por otra parte, el análisis de apoptosis mediante FACS

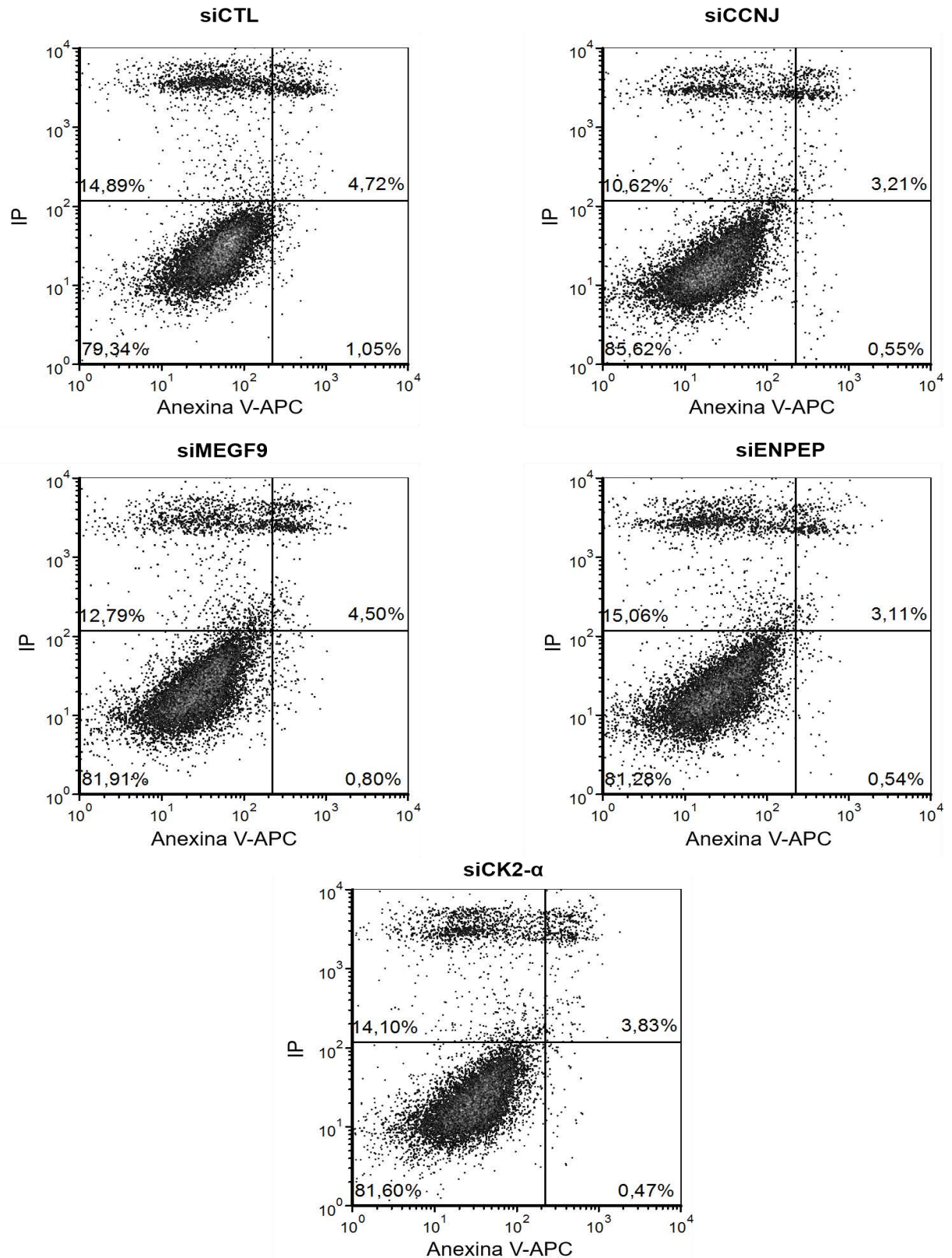


mostró que la represión de la expresión de cada proteína no causó un aumento de células en apoptosis temprana y/o tardía, en comparación con las células transfectadas con el siRNA control (Figura 36).



**Figura 35.** Perfiles de ciclo celular representados mediante histogramas de contenido de DNA de células MCF7 transfectadas con los siRNAs específicos indicados o el siRNA control negativo. Las células fueron transfectadas con los pools de siRNAs indicados a una concentración final de 30 nM usando el reactivo de transfección HiPerFect. Después de 72 horas de transfección las células fueron tripsinizadas, teñidas con IP y analizadas por FACS. siCTL (G0/G1, 68.9%; S, 19.6%; G2/M, 11.7%), siCCNJ (G0/G1, 44.2%; S, 16.5%; G2/M, 39.2%), siMEGF9 (G0/G1, 53.2%; S, 18.5%; G2/M, 28.2%), siENPEP (G0/G1, 44.1%; S, 16.5%; G2/M, 39.3%), and siCK2- $\alpha$  (G0/G1, 43.8%; S, 22.3%; G2/M, 33.9%).





**Figura 36.** Tasas de apoptosis analizadas por FACS en células MCF7 transfectadas con los siRNAs específicos indicados y el siRNA control negativo. Se muestran los porcentajes de células viables (panel inferior izquierdo), con apoptosis temprana (panel inferior derecho), con apoptosis tardía (panel superior derecho), y células necróticas (panel superior izquierdo).

#### IV.2.5. EXPRESIÓN DE ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ Y MEGF9 EN TUMORES DE MAMA.

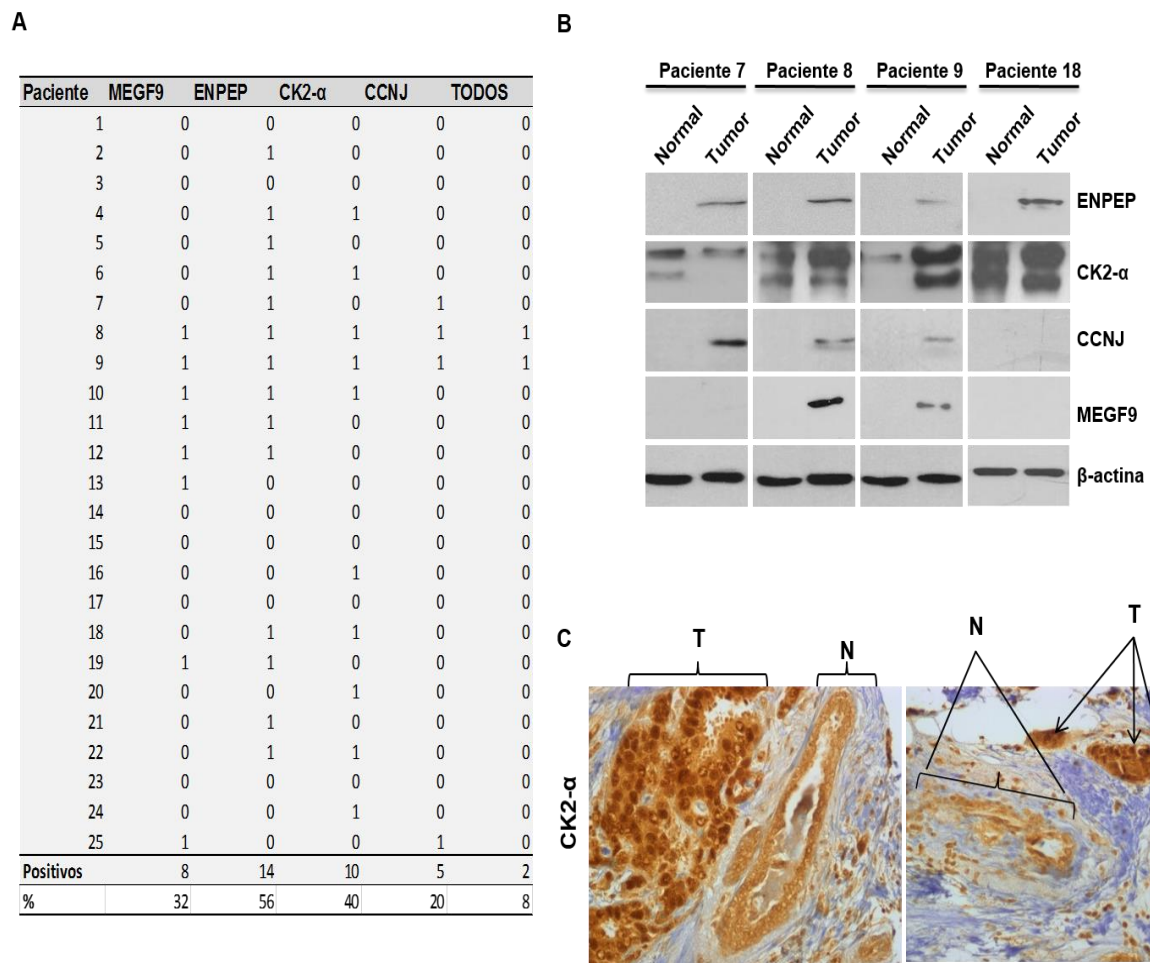
Para investigar la importancia de las proteínas ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en tumores de mama, se analizó la expresión de cada proteína mediante Western blot en 25 muestras de tejido tumoral y tejido normal adyacente de los pacientes con cáncer de mama correspondientes a la cohorte 3 (Figura 37A y B). Además, también se analizó la expresión de CK2- $\alpha$  mediante IHC en las 50 muestras de pacientes con cáncer de la cohorte 1 (Figura 37C). El estudio inmunohistoquímico de CK2- $\alpha$  se llevó a cabo empleando TMAs.

La expresión de la proteína ENPEP no se detectó en el tejido normal de ninguno de los pacientes, en cambio se expresó en las muestras de tejido tumoral correspondientes al 56% de los pacientes (Figura 37A). El análisis por Western blot y por IHC de la expresión de CK2- $\alpha$  mostró que se expresó en los tejidos normales y tumorales de los 25 pacientes, pero su expresión fue mayor en los tumores (Figura 37B y C). Concretamente, el análisis de CK2- $\alpha$  por IHC reveló que CK2- $\alpha$  se sobreexpresó en el tejido tumoral del 56% de pacientes en comparación con los niveles de CK2- $\alpha$  en el tejido normal de los pacientes. El análisis por Western blot mostró que CK2- $\alpha$  se sobreexpresó en el 40% de las muestras de tejido tumoral de los pacientes respecto de las muestras de tejido normal adyacente (Figura 37). CCNJ se expresó en el 20% de las muestras de tejido tumoral de los pacientes con cáncer de mama y no se detectó en el tejido normal adyacente de ningún paciente (Figura 37A y B). Finalmente, el análisis por Western blot de MEGF9 reveló que dicha proteína no se expresó en el tejido normal de ninguno de los 25 pacientes, pero si se expresó en el tejido tumoral del 32% de los pacientes con cáncer de mama (Figura 37A y B).

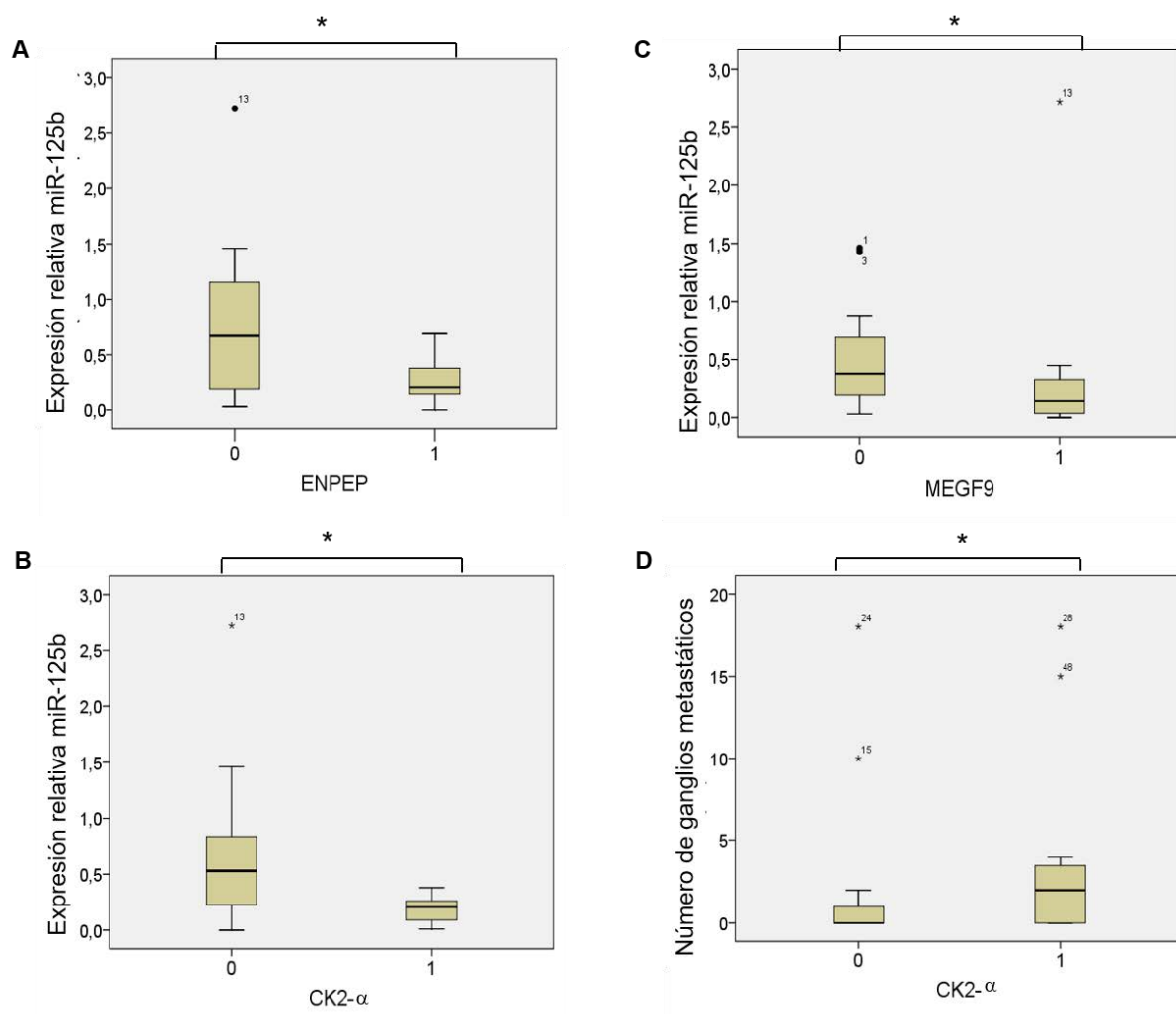
Además, se analizó la correlación existente entre los niveles de expresión de miR-125b analizados por qRT-PCR y la expresión de las proteínas ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en las 25 muestras de pacientes con cáncer de mama (cohorte 3). Se identificó una correlación inversa entre la expresión de miR-125b y la expresión de proteínas ENPEP y CK2- $\alpha$  (*test* Mann Whitney; p-valor < 0,05) (Figura 38A y 7B). Sin embargo, no hubo resultados significativos para MEGF9 y CCNJ, aunque se pudo observar una tendencia clara para la proteína MEGF9 (Figura 38C).

Además, se analizó si la expresión de las proteínas ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 correlaciona con las características clínicas de los pacientes. Nuestros resultados

mostraron, que únicamente la expresión de CK2- $\alpha$  correlacionó con la presencia y número de nódulos linfáticos metastáticos (Figure 36D).



**Figura 37.** Expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 en tumores de mama. **A)** Tabla que muestra un resumen de la expresión por Western blot de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, and MEGF9 en tumores y tejido normal adyacente de 25 pacientes con cáncer de mama (cohorte 3). Los porcentajes totales de pacientes que expresan/sobreexpresan cada una de las proteínas es mostrado. 0, ausencia de expresión; 1, expresión/sobreexpresión positiva. **B)** Expresión proteica analizada por Western blot de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 en cuatro pacientes del total de 25. **C)** Análisis por IHC de dos pacientes que sobreexpresan CK2- $\alpha$ . Obsérvese la diferencia en la tinción del tumor (T) en comparación con el tejido normal adyacente mamario (N).



**Figura 38. A)** Asociación de la expresión de miR-125b y ENPEP en tumores de mama. **B)** Asociación de la expresión de miR-125b y CK2- $\alpha$  en tumores de mama **C)** Asociación de la expresión de miR-125b y MEGF9 en tumores de mama. **D)** Correlación de la expresión de CK2- $\alpha$  y el número de nódulos linfáticos metastáticos. (0, ausencia de expresión; 1, expresión/sobreexpresión positiva). \* $p < 0.05$ .

### IV.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a EN CÁNCER DE MAMA.

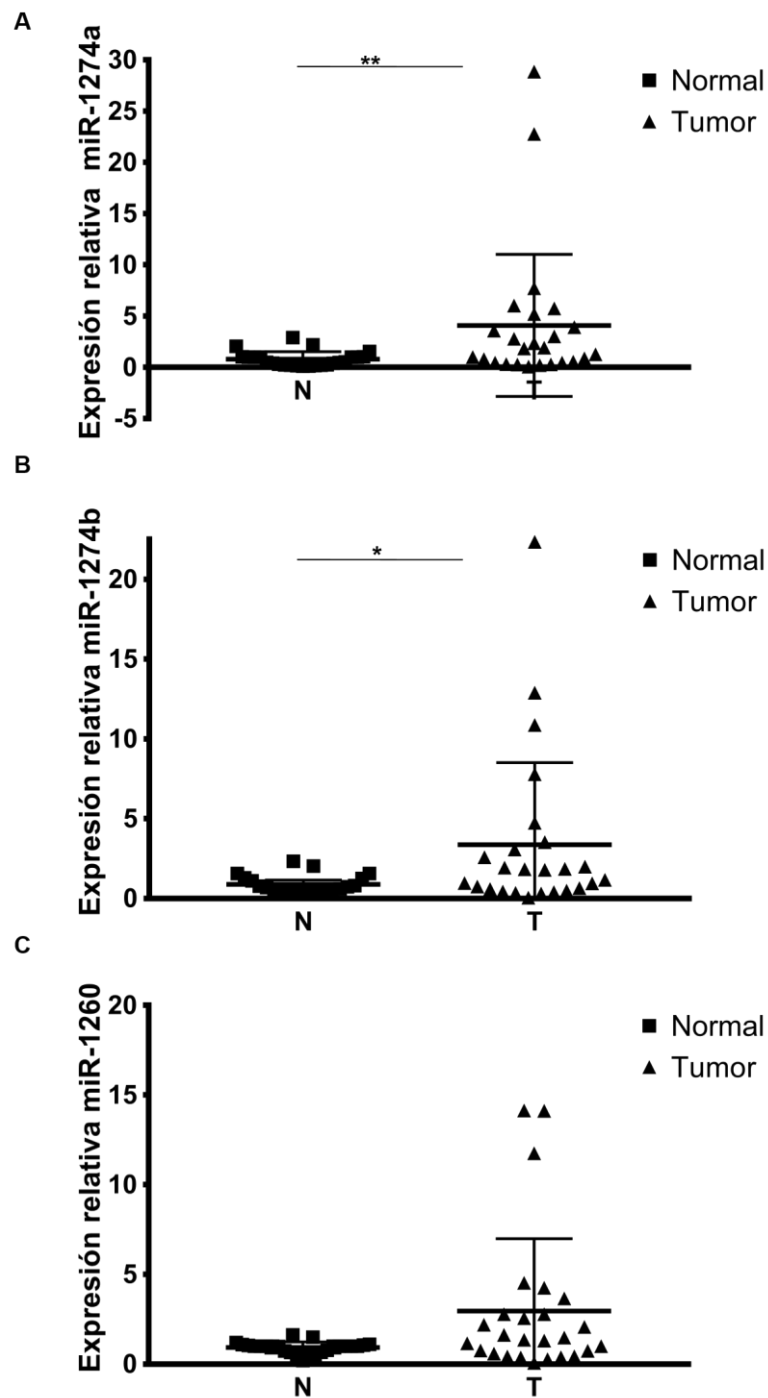
#### IV.3.1. EXPRESIÓN DE miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a EN TUMORES DE MAMA.

De los 35 miRNAs diferencialmente expresados entre el tejido tumoral y el tejido normal adyacente de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 1, seleccionamos los miRNAs potencialmente oncogénicos miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a para su caracterización funcional. La selección de estos miRNAs se realizó en base a que son miRNAs de los cuales se desconoce su papel en carcinogénesis y más concretamente la implicación de los mismos en cáncer de mama. Conforme a los resultados obtenidos del perfil de expresión de miRNAs mediante microarray en tumores de mama, los miRNAs miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a

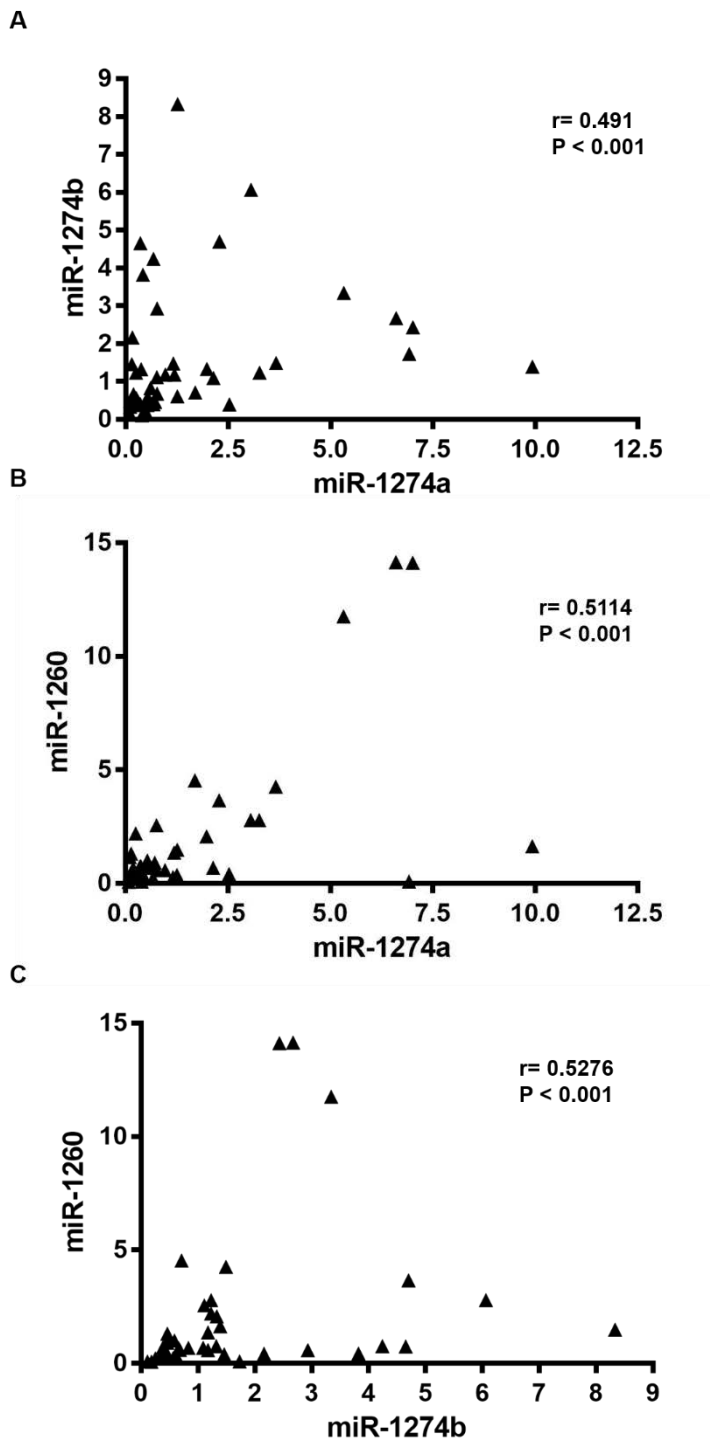
se sobreexpresaron en los tumores en comparación con sus respectivos niveles de expresión en el tejido normal adyacente de los 50 pacientes con cáncer de mama de la cohorte 1 (Figura 20). Además, miR-1274b y miR-1260a fueron de los miRNAs con mayor potencial oncogénico de los 35 miRNAs desregulados en tumores de mama junto con miR-21, miR-96, miR-141 y miR-106b, ya que formaron parte de los 10 miRNAs que distinguen el tumor del tejido normal adyacente con un nivel de significación  $p$ -valor  $< 0,01$  (Figura 20).

Con el fin de confirmar la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en otra serie de tumores de mama, se midieron los niveles de expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a por qRT-PCR en las 25 muestras de tejido tumoral y normal adyacente de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 3. Nuestros resultados revelaron que miR-1274a, miR-1274b se sobreexpresaron de forma significativa en los tumores en comparación con el tejido sano adyacente (*test* Mann Whitney; miR-1274a  $p$ -valor = 0,0076; miR-1274b  $p$ -valor = 0,0458) (Figura 39A y B). En el caso de miR-1260a, se observó claramente que su expresión fue mayor en el tumor respecto del tejido normal, sin embargo, no tuvo un nivel de significación  $p$ -valor  $< 0,05$  (*test* Mann Whitney; miR-1260a  $p$ -valor = 0,0538) (Figura 39C). Teniendo en cuenta que se observó una tendencia evidente de miR-1260a sobreexpresarse en los tumores de mama sería necesario aumentar el número de pacientes del estudio para tener una mayor potencia estadística.

Por otro lado, con el objetivo de valorar la asociación entre la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, se realizó un análisis de correlación mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) que permite medir la fuerza y la dirección de la asociación de dos variables cuantitativas aleatorias que no tengan una distribución normal. Los resultados del análisis revelaron la existencia de correlación moderada positiva entre la expresión de miR-1274a y miR-1274b ( $r = 0,491$ ;  $p$ -valor = 0,0007), de miR-1274a y miR-1260a ( $r = 0,5114$ ;  $p$ -valor = 0,0004), y de miR-1274b y miR-1260a ( $r = 0,5276$ ;  $p$ -valor = 0,0002) (Figura 40).



**Figura 39.** Niveles de expresión de **A)** miR-1274a, **B)** miR-1274b y **C)** miR-1260a medidos por qRT-PCR en la serie de 25 pacientes de cáncer de mama de la cohorte 3. Se observó un aumento significativo de la expresión de miR-1274a y miR-1274b en los tumores respecto del tejido normal adyacente. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .



**Figura 40.** Diagramas de dispersión que muestran la correlación entre **A)** la expresión de miR-1274a y miR-1274b, **B)** la expresión de miR-1274a y miR-1260a, y **C)** la expresión de miR-1274b y miR-1260a. Se indica el coeficiente rho de Spearman ( $r$ ) y el nivel de significación.

De igual manera, se determinó la potencial asociación de la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a con los marcadores inmunohistoquímicos patológicos de los 50 pacientes con cáncer de mama de la cohorte 1 (Tabla 12). La expresión de miR-1274a correlacionó negativamente con la expresión de receptores de estrógeno y progesterona; y positivamente con la expresión de Akt citoplásmico y nuclear y pMEK. Igualmente, la expresión de miR-

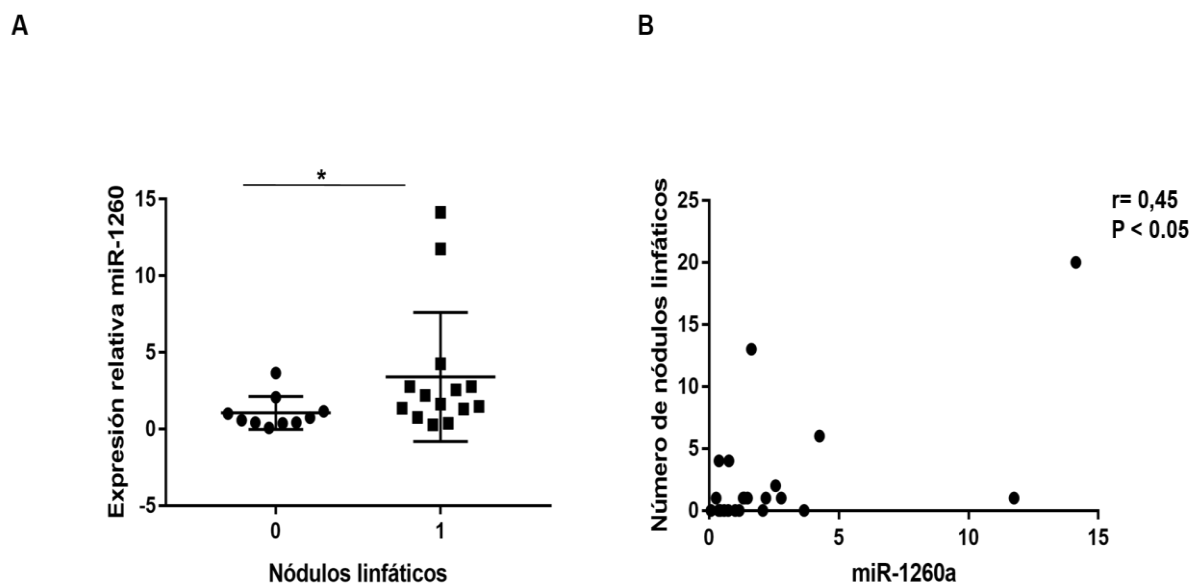
1274b correlacionó negativamente con la expresión de receptores de estrógeno y progesterona; y positivamente con la expresión de Akt nuclear. En cambio, la expresión de miR-1260a correlacionó positivamente con la expresión de ciclina D1 nuclear.

		er	pr	her2ihq	ki67	p53	akt_c	akt_n	ciclinaD1_c	ciclinaD1_n	p16_c	p16_n	pMAPK_c	pMAPK_n	pMEK	EBP1_c	EBP1_n
hsa-miR-1260a	Correlación de Pearson	,068	-,027	-,190	,056	,135	,210	,167	,106	,307	,011	-,050	-,250	-,210	,110	,103	,014
	Sig. (bilateral)	,640	,850	,187	,700	,351	,143	,247	,463	,030	,940	,730	,080	,143	,448	,477	,924
	N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
hsa-miR-1274a	Correlación de Pearson	-,320	-,367	,150	,233	,334	,317	,316	,038	-,052	,125	-,123	-,011	-,096	,286	,055	,107
	Sig. (bilateral)	,023	,009	,299	,103	,018	,025	,025	,794	,719	,389	,396	,942	,506	,044	,704	,460
	N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
hsa-miR-1274b	Correlación de Pearson	-,368	-,370	,021	,184	,267	,199	,364	,157	-,064	,090	-,233	-,005	,051	,174	-,030	,143
	Sig. (bilateral)	,009	,008	,884	,200	,061	,166	,009	,275	,661	,536	,103	,973	,723	,227	,838	,323
	N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabla 12. Asociación de la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a con los marcadores inmunohistoquímicos de los pacientes de cáncer de mama de la cohorte 1.

Además, se evaluó la posible asociación de la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a con las características clínico-patológicas de los pacientes de cáncer de mama de la cohorte 3, tales como el estado de los receptores de progesterona (presencia/ausencia), índice Ki67, tamaño del tumor, grado del tumor, presencia y número de ganglios linfáticos metastáticos y la clasificación molecular de los tumores de mama. El análisis de asociación de la expresión de los tres miRNAs con el estado de RE y HER2 no se realizó debido a que la ausencia de expresión de RE y la presencia de casos HER2 positivos está representada solamente en el 8 y 4%, respectivamente, de un total de 25 pacientes. Igualmente, esto mismo ocurrió cuando se evaluó la asociación de la expresión de los tres miRNAs con la clasificación molecular de los tumores. Del total de los 25 pacientes con cáncer de mama, el 20% fueron tumores luminal A, el 68% fueron tumores luminal B, el 0% fueron tumores HER2+ y el 8% fueron tumores triple negativo, por lo que se optó por analizar diferencias entre tumores luminal A y luminal B. No se obtuvieron resultados significativos para la mayoría de los análisis debido al pequeño número de pacientes y a la poca variedad de los grupos a comparar, por lo que sería necesario aumentar el número de pacientes para detectar asociaciones significativas que podrían estar enmascaradas. Únicamente, la expresión de miR-1260a se asoció significativamente a la presencia de ganglios linfáticos metastáticos (*test* Mann Whitney; p-valor = 0,03) y correlacionó de forma positiva con el número de nódulos linfáticos metastáticos, aunque la fuerza de la correlación es moderada ( $r = 0,4491$ ; p-valor = 0,027) (Figura 41).

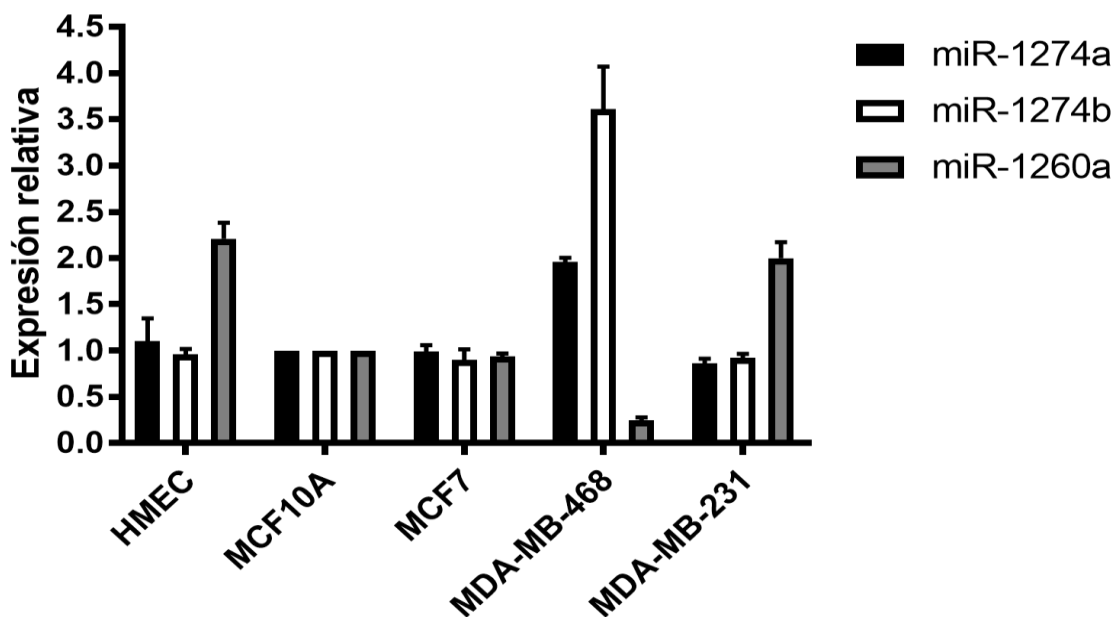




**Figura 41.** La expresión de miR-1260a correlaciona con la presencia y número de nódulos linfáticos metastáticos. **A)** Gráfica que muestra la asociación de la expresión miR-1260a con la presencia de nódulos linfáticos metastáticos (0, ausencia de ganglios metastáticos; 1, presencia de ganglios metastáticos). **B)** Diagrama de dispersión que muestra la correlación positiva entre la expresión de miR-1260a y el número de nódulos linfáticos metastáticos. Se indica el coeficiente rho de Spearman ( $r$ ) y el nivel de significación. \* $p < 0,05$

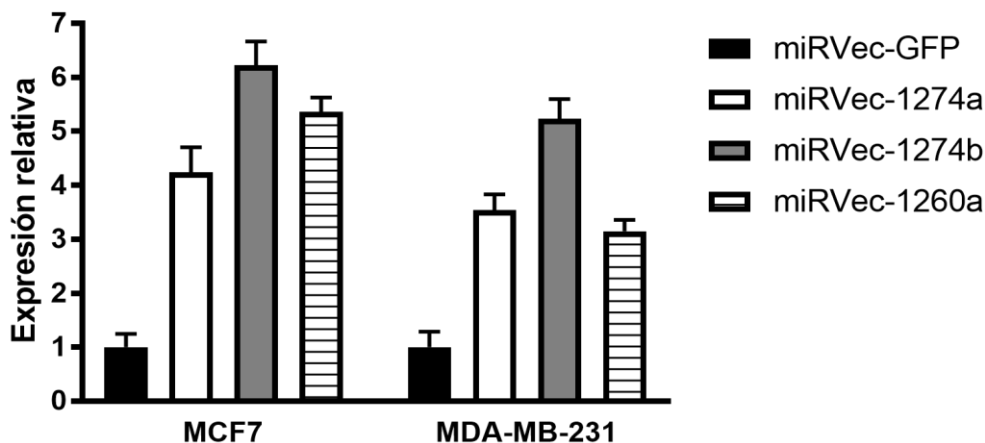
### IV.3.2. miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a AUMENTARON LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA.

Con el fin de investigar los efectos biológicos de los miRNAs potencialmente oncogénicos, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a sobre la proliferación celular, se procedió a sobreexpresarlos de forma estable mediante infección retroviral en las líneas celulares de mama tumorigénicas MCF7 y MDA-MB-231, después de ser clonados en el vector retroviral miRVec. En primer lugar, analizamos la expresión de los niveles endógenos de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a por qRT-PCR en las células HMEC, MCF10A, MCF7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. La expresión de los tres miRNAs en las líneas celulares fue relativizada a la expresión de los mismos en las células de mama no tumorigénicas MCF10A (Figura 42). Este análisis mostró que las células con mayor expresión de miR-1274a y miR-1274b fueron las células MDA-MB-468, mientras que la expresión de miR-1260a fue mayor en las células HMEC y MDA-MB-231.



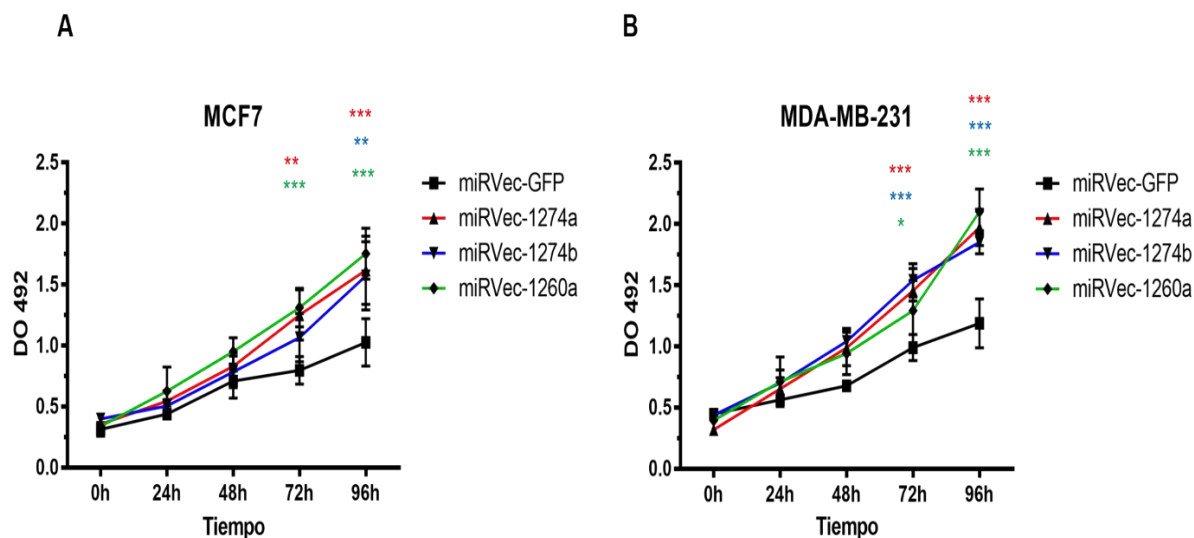
**Figura 42.** Niveles de expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a determinados mediante qRT-PCR en diferentes líneas celulares de mama. Los datos de expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a fueron normalizados con el control endógeno RNU6B en cada línea celular y relativizado a sus respectivos niveles en las células MCF10A usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Adicionalmente, se determinaron los niveles de expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a mediante qRT-PCR en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 infectadas con miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y el control miRVec-GFP, con el fin de validar la sobreexpresión de los tres miRNAs potencialmente oncogénicos en dichas líneas celulares (Figura 43). Los niveles de miR-1274a, miR-1274b, miR-1260a de las células que sobreexpresan cada uno de los miRNAs fueron relativizados a los niveles de dichos miRNAs de las células infectadas con miRVec-GFP. Según los resultados, los tres miRNAs fueron sobreexpresados en las células MCF7, MDA-MB-231 respecto a las células con expresión estable de control miRVec-GFP.



**Figura 43.** Validación mediante qRT-PCR de la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. El gráfico muestra los niveles de expresión relativa de cada uno de los miRNAs en las células de mama MCF7 y MDA-MB-231 que sobreexpresan miR-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP. Las células han sido establecidas a partir de clones heterogéneos una vez infectadas y seleccionadas con Blastidina por 12 días.

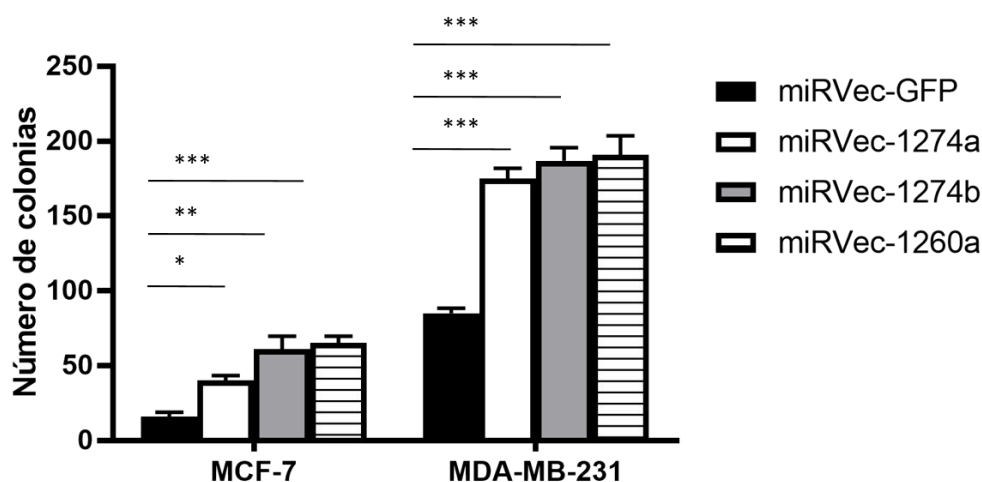
Una vez que las células MCF7, MDA-MB-231 fueron infectadas y seleccionadas con Blastidina por 12 días, se examinaron los efectos que tiene la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a sobre la proliferación celular. Para ello, se realizaron ensayos XTT en las células con expresión estable de cada uno de los miRNAs y del control miRVec-GFP previamente sembradas en placas de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de su sembrado (ver Materiales y métodos). Los resultados se analizaron mediante test ANOVA + *post-test* de comparación múltiple Dunnett's referida a miRVec-GFP y mostraron que la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a aumentó significativamente la proliferación celular de células MCF7 y MDA-MB-231 (Figura 44). Concretamente, a las 72 horas se observaron diferencias significativas en las células MCF7 que sobreexpresan miRVec-1274a y miR-1260a en comparación con el control miRVec-GFP (miRVec-1274a p-valor = 0,0023; miRVec-1260a p-valor = 0,0006), y a las 96 horas en las células MCF7 que sobreexpresan cada uno de los tres miRNAs respecto del control (miRVec-1274a p-valor = 0,0001; miRVec-1274b p-valor = 0,003; miRVec-1260a p-valor = 0,0001). En las células MDA-MB-231, hubo diferencias significativas en las células con expresión estable de cada vector miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a respecto de las células control a las 72 horas (miRVec-1274a p-valor = 0,0006; miRVec-1274b p-valor = 0,0001; miRVec-1260a p-valor = 0,0312) y a las 96 horas (miRVec-1274a p-valor = 0,0001; miRVec-1274b p-valor = 0,0001; miRVec-1260a p-valor = 0,0001).



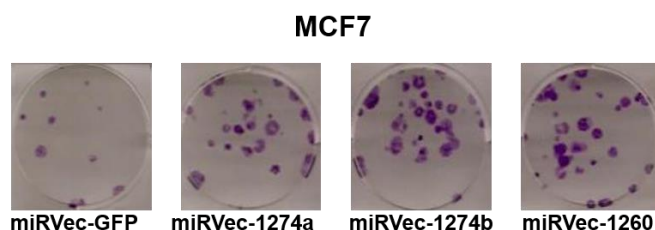
**Figura 44.** La sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a causó un aumento de la proliferación celular. **A)** Gráfica que muestra la absorbancia a 492 nm a las 0, 24, 72 y 96 horas de células MCF7 con expresión estable de miRV-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP. Una vez infectadas y seleccionadas las células con Blastidina por 12 días, se analizó la proliferación mediante ensayo XTT. A mayor valor de absorbancia mayor será tasa de proliferación de células metabólicamente activas. **B)** Gráfica que muestra la absorbancia a 492 nm a las 0, 24, 72 y 96 horas de células MDA-MB-231 con expresión estable de miRV-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP. Estas células siguieron el mismo procedimiento que las células MCF7. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Además, se realizaron ensayos clonogénicos en las células MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y el control miRVec-GFP como otra aproximación para examinar la capacidad proliferativa de estas células a través de evaluar la capacidad que tienen las células individuales de dividirse y formar colonias. Tras el recuento de las colonias y aplicar un test ANOVA + *post-test* de comparación múltiple Dunnett's referida a miRVec-GFP para cada línea celular, se evidenció que la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a causó un aumento significativo del número y tamaño de las colonias en las líneas celulares MCF7 (miRVec-1274a p-valor = 0,0340; miRVec-1274b p-valor = 0,001; miRVec-1260a p-valor = 0,0005) y MDA-MB-231(miRVec-1274a p-valor = 0,0002; miRVec-1274b p-valor = 0,0001; miRVec-1260a p-valor = 0,0001) (Figura 45).

A



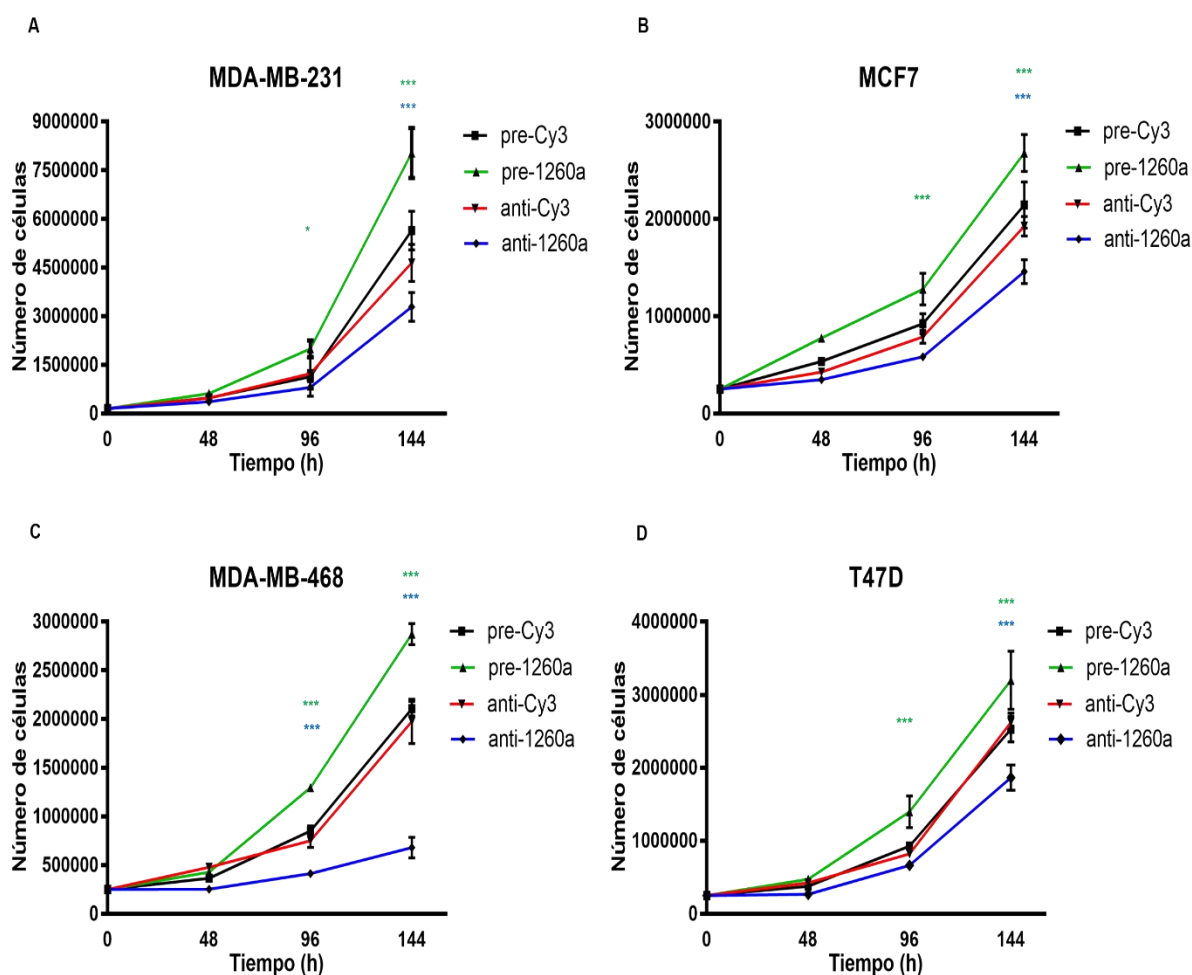
B



**Figura 45.** La sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a causó un aumento de la clonogenicidad. **A)** Gráfica que representa el número de colonias formadas de células MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRV-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP tras haber sido cultivadas diluidas durante 12 días, teñidas con cristal violeta al 0,1% y contadas. **B)** Imágenes de las colonias teñidas con cristal violeta al 0,1%, formadas a partir de células MCF7 individualizadas con expresión estable de miRV-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a y miRVec-GFP. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Por otra parte, se transfectaron de forma transitoria células MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y T47D con las moléculas sintéticas miméticas pre-1260a e inhibidoras anti-1260a o con sus respectivos controles negativos marcados fluorescentemente, pre-Cy3 y anti-Cy3; y se realizaron curvas de crecimiento celular haciendo resiembra y recuento de las células cada 48h durante 6 días (Figura 46). Los resultados de las curvas de crecimiento analizados con un *test* ANOVA + *post-test* de comparación múltiple Tukey's en cada punto de tiempo, evidenciaron que la transfección de las moléculas miméticas pre-1260a provocó un aumento significativo de la proliferación celular en comparación con las células transfectadas con el control pre-Cy3 en las cuatro líneas celulares a las 96 y a las 144 horas (MDA-MB-231: 96 horas p-valor = 0,0225, 144h p-valor < 0,0001; MCF7: 96 horas p-valor = 0,0008, 144h p-valor < 0,0001; MDA-MB-468: 96 horas p-valor < 0,0001, 144h p-valor < 0,0001; T47D: 96 horas p-valor = 0,0009, 144h p-valor < 0,0001). Por el contrario, la transfección de las moléculas

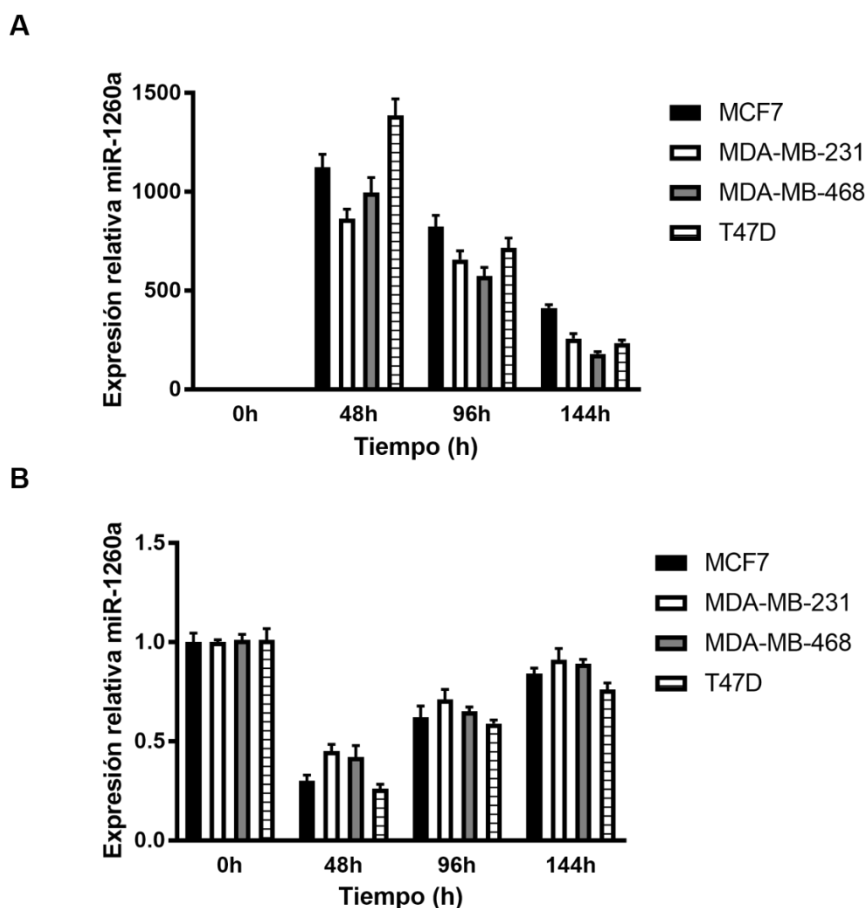
sintéticas inhibitoras anti-1260a provocó una reducción significativa de la proliferación con respecto a las células transfectadas con su respectivo control negativo anti-Cy3 en las cuatro líneas celulares a las 144 horas (MDA-MB-231: 144h p-valor = 0,0002; MCF7: 144h p-valor < 0,0001; MDA-MB-468: 96 horas p-valor < 0,0001, 144h p-valor < 0,0001; T47D: 144h p-valor < 0,0001). Por tanto, la inhibición funcional de miR-1260a revierte los efectos de la expresión de pre-1260a sobre la proliferación celular en las cuatro líneas celulares.



**Figura 46.** La transfección transitoria de pre-1260a y anti-1260a causó un aumento y disminución de la proliferación celular respectivamente. **A)** Curva de crecimiento celular de células MDA-MB-231 con expresión transitoria de pre-1260a o su respectivo control negativo pre-Cy3 y de células con expresión transitoria de anti-1260a o su respectivo control anti-Cy3. Las células fueron transfectadas con dichos oligonucleótidos a una concentración de 80 nM para las moléculas pre-miRs, y a una concentración de 100 nM para las moléculas anti-miRs usando el reactivo de transfección HiPerFect. Se sembraron 150000 células de cada condición en placas de 35 mm y se hizo un recuento y resembrado de células cada 48h durante 6 días. **B)** Curva de crecimiento celular de células MCF7 con expresión transitoria de pre-1260a o su respectivo control negativo pre-Cy3 y de células con expresión transitoria de anti-1260a o su respectivo control anti-Cy3. Las células recibieron el mismo tratamiento descrito en el apartado A) con la excepción de que se sembraron 250000 células de partida. **C)** Curva de crecimiento celular de células MDA-MB-468 con expresión transitoria de pre-1260a o su respectivo control negativo pre-Cy3 y de células con expresión transitoria de anti-1260a o su respectivo control anti-Cy3. Las células recibieron el mismo tratamiento descrito en el apartado A) con la excepción de que se sembraron 250000 células de partida. **D)** Curva de crecimiento celular de células T47D con expresión transitoria de pre-1260a o su respectivo control negativo pre-Cy3 y de células con expresión transitoria de anti-1260a o su respectivo control anti-

Cy3. Las células recibieron el mismo tratamiento descrito en el apartado A) con la excepción de que se sembraron 250000 células de partida. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Con el fin de validar la efectividad de las moléculas sintéticas pre-1260a y anti-1260a en el aumento y represión de la expresión de miR-1260a respectivamente, se determinaron los niveles de expresión de miR-1260a a las 48, 96 y 144 horas en células MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y T47D transfectadas con pre-1260 a una concentración de 80 nM o con anti-1260a a una concentración de 100 nM (Figura 47). La expresión de miR-1260a de cada línea celular fue relativizada a los niveles de expresión de miR-1260a en las células sin transfectar (0 horas). Puede observarse una pérdida gradual de expresión de miR-1260a en las células transfectadas con pre-1260a, y un aumento gradual de la expresión de miR-1260a en las células transfectadas con las moléculas inhibidoras anti-1260a.



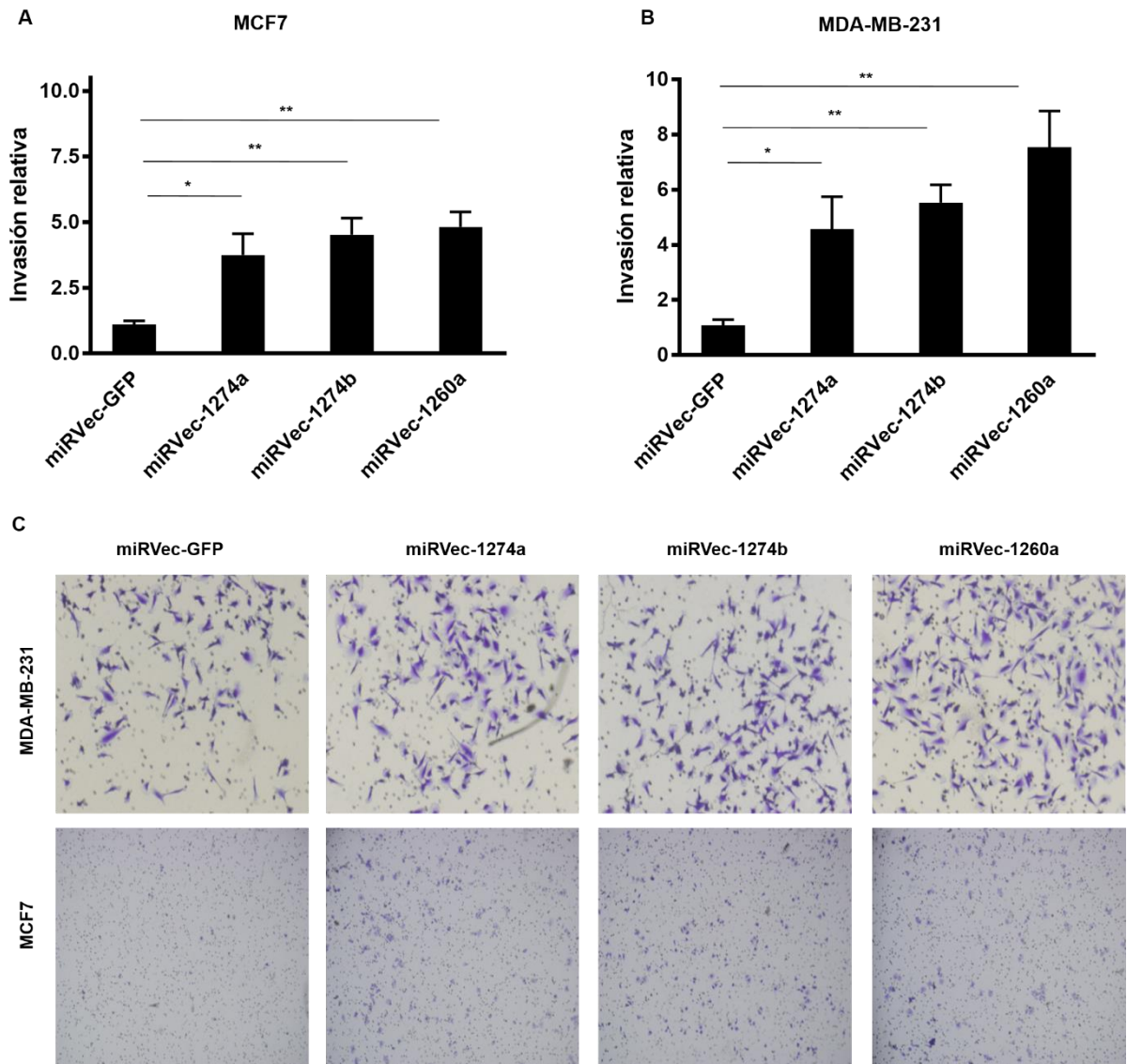
**Figura 47.** Validación de la efectividad de pre-1260a y anti-1260a en las células MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-231 y T47D. **A)** Análisis por qRT-PCR de la expresión de miR-1260 en células transfectadas con pre-1260 tras 48, 96 y 144 horas de la transfección. La expresión miR-1260a fue normalizada con el control endógeno RNU6B en cada línea celular y relativizado a sus respectivos niveles en las células sin transfectar (0 horas) usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . **B)** Análisis por qRT-PCR de la expresión de miR-1260a en células transfectadas con anti-1260 tras 48, 96 y 144 horas de la transfección. Los datos tuvieron el mismo tratamiento descrito en el apartado A).

### IV.3.3. miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a CAUSARON UN AUMENTO DE LA DE LA INVASIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA.

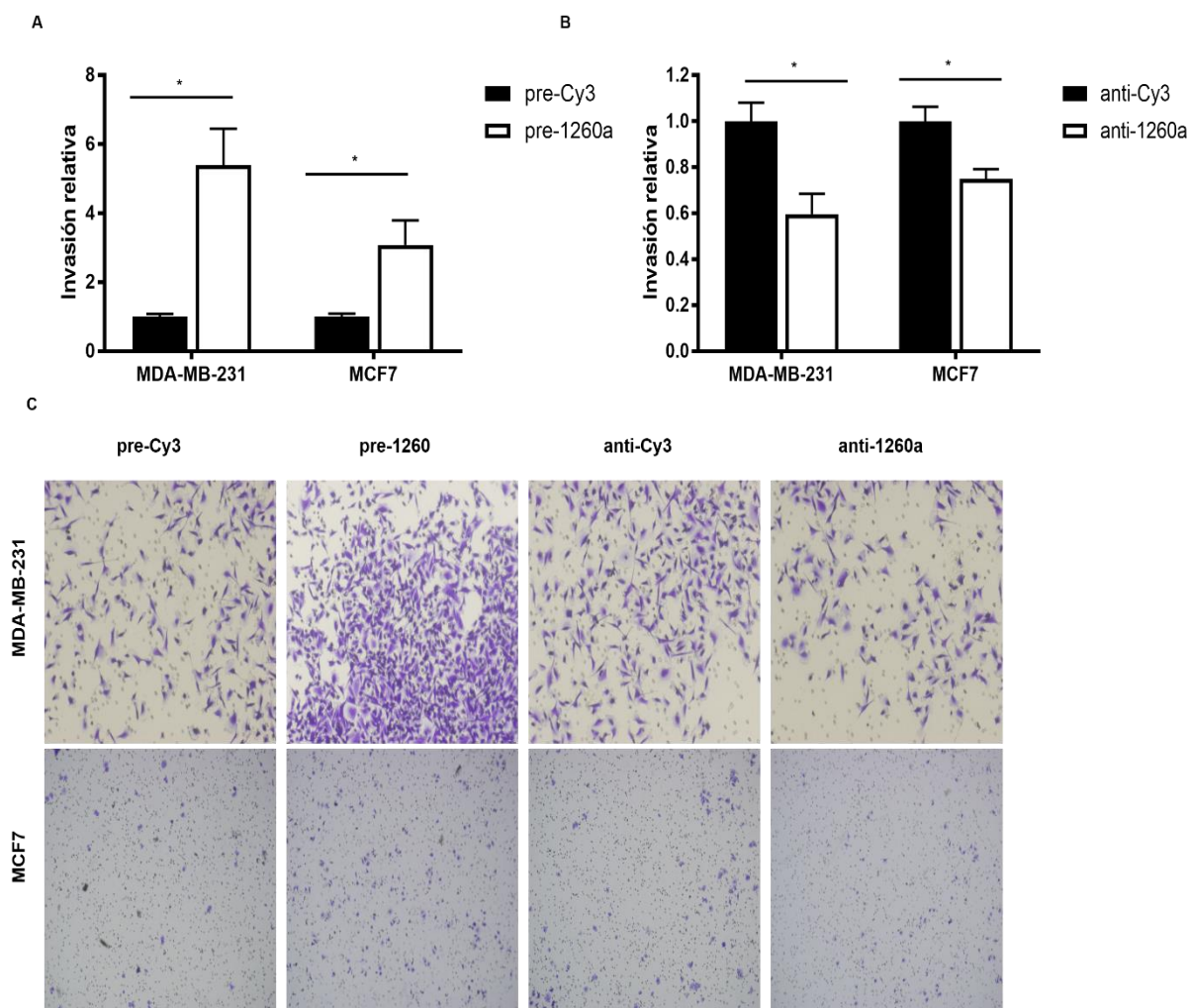
Para investigar el papel que tienen miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en la invasión celular se realizaron ensayos de invasividad celular en cámaras Boyden cuya membrana está cubierta de matrigel. Para ello se sembraron en la parte superior de cada cámara  $1 \times 10^5$  células MCF7 y MDA-MB-231 infectadas con miRVec-1274a, miRVec-1274b, miRVec-1260a o el control miRVec-GFP en medio fresco sin FBS, mientras que en la parte inferior se puso medio con 10% de FBS. Tras 24 horas, las células adheridas al filtro fueron fijadas, teñidas con cristal violeta al 0,1% y contabilizadas. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a aumentó de forma significativa la invasividad de las células MCF7 y MDA-MB-231 en comparación con las células que expresaron miRVec-GFP (t-test MCF7: miRVec-1274a p-valor = 0,0319, miRVec-1274b p-valor = 0,0062, miRVec-1260a p-valor = 0,0031; t-test MDA-MB-231: miRVec-1274a p-valor = 0,0435, miRVec-1274b p-valor = 0,0029, miRVec-1260a p-valor = 0,0084) (Figura 48).

De forma adicional, se realizaron ensayos de invasión en células MCF7 y MDA-MB-231 que expresaron de forma transitoria las moléculas sintéticas miméticas pre-1260a e inhibidoras anti-1260a o sus respectivos controles negativos, pre-Cy3 y anti-Cy3. La transfección de las moléculas pre-1260a incrementaron significativamente la capacidad invasiva de las células MCF7 y MDA-MB-231 respecto a las células transfectadas con el control negativo pre-Cy3 (t-test: MCF7 p-valor = 0,0447; MDA-MB-231 p-valor = 0,0146). Como era de esperar, la represión de la expresión de los niveles endógenos de miR-1260a causó una disminución de la invasividad en las células MCF7 y MDA-MB-231 en comparación con las células controles transfectadas con anti-Cy3 (t-test: MCF7 p-valor = 0,0298; MDA-MB-231 p-valor = 0,0282) (Figura 49). Por tanto, los miRNAs miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a pueden tener una función relevante en la regulación de la invasión celular, al menos en las células MCF7 y MDA-MB-231.





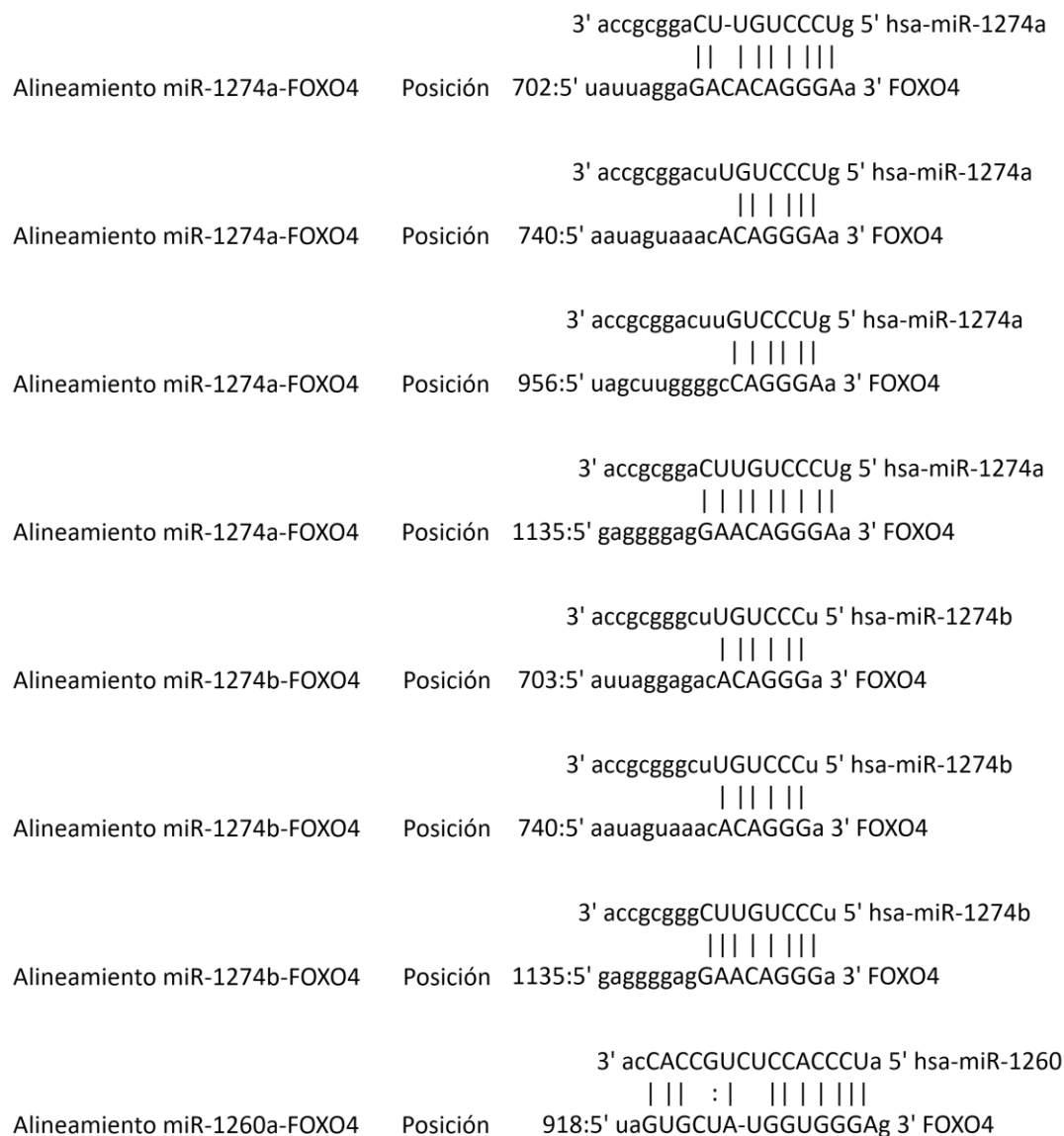
**Figura 48.** La sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a incrementó la invasividad de células MCF7 y MDA-MB-231. **A)** Gráfico que representa la invasión relativa al control (miRVec-GFP) de células MCF7 con expresión estable de miRVec-1274a, miRVec-1274b y miRVec-1260a. Después de infectar y seleccionar las células con Blastidina por 12 días, se sembraron 100000 células en cámaras Boyden cubiertas de matrigel con medio fresco sin FBS. Como quimioatrayente se utilizó medio completo con un 10% de FBS. Tras 24 horas las células adheridas a la membrana fueron fijadas, teñidas con cristal violeta al 0,1% y contabilizadas. **B)** Gráfico que representa la invasión relativa al control (miRVec-GFP) de células MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-1274a, miRVec-1274b y miRVec-1260a. Las células se trataron de la misma forma descrita en el apartado A) a excepción de que la duración del ensayo fue de 16 horas. **C)** Imágenes de los filtros teñidos donde se visualizan las células MCF7 y MDA-MB-231 con sobreexpresión de los miRNAs indicados, que fueron capaces de degradar el matrigel y por tanto de invadir. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 49.** La transfección transitoria de pre-1260a y anti-1260a provocó un aumento y disminución de la invasión celular respectivamente. **A)** Gráfico que representa la invasión relativa al control (pre-Cy3) de células MCF7 y MDA-MB-231 que expresan transitoriamente las moléculas sintéticas miméticas pre-1260a. Las células fueron transfectadas con pre-1260a a una concentración de 80 nM usando el reactivo de transfección HiPerfect. Al día siguiente se sembraron 100000 células en cámaras Boyden cubiertas de matrigel con medio fresco sin FBS. Como quimioatrayente se utilizó medio completo con un 10% de FBS. Tras 24 horas las células adheridas a la membrana fueron fijadas, teñidas con cristal violeta al 0,1% y contabilizadas. **B)** Gráfico que representa la invasión relativa al control (anti-Cy3) de células MCF7 y MDA-MB-231 que expresan transitoriamente las moléculas sintéticas inhibitoras anti-1260a. Las células se trataron de la misma forma descrita en el apartado A) a excepción de que la concentración final de anti-1260a fue 100nM y la duración del ensayo fue de 16 horas. **C)** Imágenes de los filtros teñidos donde se visualizan las células MCF7 y MDA-MB-231 adheridas, que fueron capaces de degradar el matrigel y por tanto de invadir. \* $p < 0,05$ .

#### IV.3.4. miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a REGULARON LA EXPRESIÓN DE FOXO4.

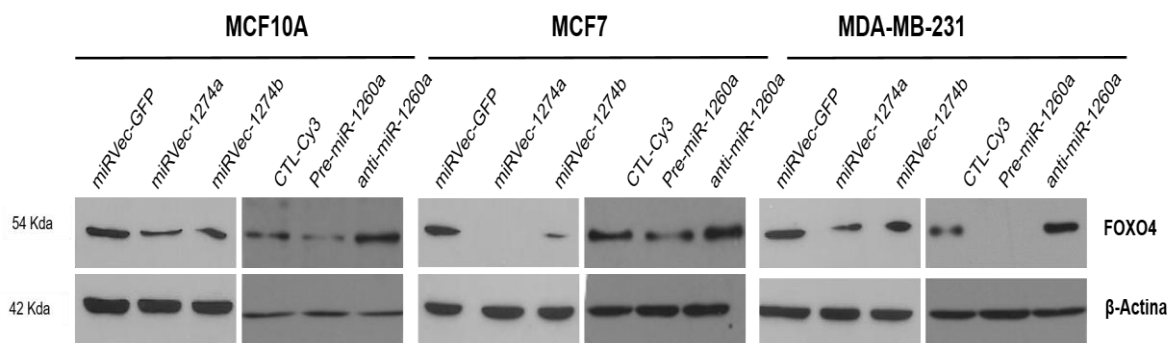
Utilizando los principales programas de predicción de dianas de miRNAs (PicTar, TargetScan, miRanda y DIANA-microT), se identificaron 3 potenciales sitios de unión de miR-1274a y un potencial sitio de unión de miR-1274b en la región 3'-UTR del mRNA de FOXO4 (Figura 50).



**Figura 50.** Alineamiento de los potenciales sitios de unión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en las regiones 3'-UTRs del mRNA de FOXO4.

A continuación, para conocer la posible regulación de la expresión de FOXO4 por miR-1274a y miR-1274b, se analizó la expresión de dicha proteína por Western blot en células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 con expresión estable de miRVec-1274a, miRVec-1274b y el control miRVec-GFP. El análisis por Western blot reveló que la expresión de FOXO4 se redujo en las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 que sobreexpresan miRVec-1274a y miR-1274b en comparación con las células que expresan el control miRVec-GFP (Figura 51). Con estos resultados únicamente podemos concluir que como mínimo la expresión de FOXO4 es regulada de forma indirecta por miR-1274a y miR-1274b. Para determinar que la regulación de la expresión de FOXO4 es mediada de forma directa por estos miRNAs, sería necesario demostrar la interacción directa con los potenciales sitios de unión de miR-1274a y miR-1274b

localizados en la región 3'UTR del mRNA de FOXO4 mediante ensayos reporteros de luciferasa.



**Figura 51.** Análisis por Western blot de la expresión de FOXO4 en células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 que expresan de forma estable miRVec-1274a, miRVec-1274b y el control miRVec-GFP. También se analiza la expresión de FOXO4 en las mismas células transfectadas con moléculas pre-miR-1260a y anti-miR-1260a. Como control de carga se utilizó la  $\beta$ -Actina.



# DISCUSIÓN



## V. DISCUSIÓN.

### V.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN CÁNCER DE MAMA.

En este estudio, presentamos los datos derivados del análisis del perfil de expresión de miRNAs en diferentes series de tumores de mama y tejidos normales adyacentes mamarios. Nuestros resultados proporcionan una visión actualizada de la expresión de miRNAs en cáncer de mama ya que hemos identificado nuevos miRNAs desregulados que hasta la fecha no han sido descritos. En la última década, varios estudios han reportado la desregulación de la expresión de miRNAs en cáncer de mama y han puesto de manifiesto el potencial uso de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos y pronósticos<sup>235,250</sup>. Así mismo, se han identificado miRNAs clave en la progresión del cáncer de mama, así como firmas de miRNAs asociadas con los diferentes tipos moleculares de cáncer de mama<sup>250,254,258,309</sup>. En el presente trabajo, hemos identificado un total de 35 miRNAs aberrantemente expresados en tumores de mama en comparación con el tejido normal mamario de los mismos pacientes (Figura 20A). Nosotros confirmamos la sobreexpresión o la subexpresión de la mayoría de miRNAs desregulados en nuestro estudio, incluyendo miRNAs potencialmente oncogénicos (miR-21, miR-96, miR-141, miR-106b, miR-130b y miR-340) y potenciales miRNAs supresores tumorales (miR-125b, miR-451, miR-99a, miR-145, miR-100, miR-195, miR-497, miR-376c, miR-486-5p, miR-204, miR-218, miR-381, miR-489, miR-125b-2, miR-299-5p, miR-154, miR-564, y miR-495) que han sido descritos en estudios previos, lo cual validan de forma consistente nuestros resultados<sup>250,252,254,310</sup>. Algunos de estos miRNAs descritos en estudios previos tienen un potencial uso como biomarcadores diagnóstico y pronóstico (tisulares y circulantes) ya que además de diferenciar el tejido maligno del tejido normal, algunos están asociados a características clínico-patológicas y factores pronósticos asociados a distintos resultados clínicos en cáncer de mama<sup>250,254,258,311-314</sup>. De igual manera, varios de estos miRNAs son biomarcadores potenciales para el diagnóstico de las lesiones mamarias preinvasivas<sup>309,315,316</sup>. A fecha de la publicación de nuestro estudio<sup>317</sup>, el cual forma parte de la presente tesis doctoral, nuestro estudio fue el primero en proponer varios miRNAs implicados en tumorigénesis de mama, como potenciales miRNAs oncogénicos o supresores de tumores, incluyendo miR-1274a, miR-1274b, miR-1260a, miR-329, miR-139-5p, miR-145-3p, miR-1271, miR-139-3p, miR-564, miR-551b, miR-129-3p y miR-548i. La relevancia de estos miRNAs en cáncer de mama debe examinarse en futuros estudios.

También hemos determinado una firma con los 10 miRNAs más significativamente desregulados en cáncer de mama, que es capaz de distinguir el tejido tumoral del tejido normal. El perfil de expresión de miRNAs analizado en las muestras de tumor y tejido normal

de la serie independiente de pacientes con cáncer de mama (cohorte 2) confirmó todos los miRNAs desregulados de la firma derivada de los pacientes de la cohorte 1, con la excepción de miR-21. Este hecho puede ser debido a que agrupamos las muestras de los pacientes de cáncer de mama de la cohorte 2 en dos grupos; un grupo conteniendo las 50 muestras de tejido tumoral, y otro grupo conteniendo 20 muestras de tejido normal adyacente del total de 50 pacientes con cáncer de mama. Por tanto, es probable que haya habido un enmascaramiento de la desregulación y del papel oncogénico relevante de miR-21 en cáncer de mama, reportado anteriormente por nosotros y otros investigadores (Figura 20A y 20B)<sup>300,318</sup>. En conclusión, los datos de expresión de miRNAs analizados con una plataforma diferente y derivados de una serie independiente de pacientes con cáncer de mama, apoyan la lista de 10 miRNAs propuesta como una firma fiable para evaluar la malignidad del tejido mamario.

## V.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-125b EN CÁNCER DE MAMA.

Los resultados del análisis del perfil de expresión han revelado que miR-125b es el miRNA más significativamente subexpresado en pacientes con cáncer de mama.

Se ha demostrado la implicación de miR-125b en varias enfermedades, como la psoriasis, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer<sup>306,319-321</sup>. Varios estudios han demostrado que la expresión de miR-125b está desregulada en diferentes tipos de tumores. A este respecto, miR-125b puede estar subexpresado y funcionar como un miRNA supresor de tumores en muchos tipos de tumores, como el cáncer de ovario<sup>322</sup>, carcinoma hepatocelular<sup>319</sup>, melanoma<sup>323</sup>, cáncer de vejiga<sup>306</sup>, glioma<sup>324</sup>, cáncer colorrectal<sup>325</sup>, cáncer de mama<sup>326</sup> y osteosarcoma<sup>327</sup>. Sin embargo, miR-125b puede estar sobreexpresado y funcionar como un oncomiR en otros tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de próstata<sup>328</sup> y la leucemia<sup>329</sup>. Por tanto, miR-125b representa un miRNA paradójico ya que sus efectos fenotípicos difieren considerablemente, dependiendo del tipo celular. No obstante, su papel en cáncer de mama está emergiendo desde hace pocos años. En este sentido, varios estudios han reportado la represión de la expresión de miR-125b en tumores de mama<sup>250,309,326,330</sup>. Entre los mecanismos responsables de su represión en cáncer de mama se incluyen la hipermetilación del promotor del gen codificante de miR-125b y la delección del loci de miR-125b por estar localizado en sitios frágiles propensos a estas alteraciones<sup>239,326</sup>. En los últimos años, la relevancia clínica de miR-125b en cáncer de mama se ha puesto de manifiesto por el hecho de que la desregulación de su expresión ocurre incluso antes del desarrollo del carcinoma invasivo, lo que sugiere un papel de miR-125b en el desarrollo temprano de cáncer de mama<sup>309</sup>. Este hallazgo pone de manifiesto el potencial uso de miR-125b como biomarcador para el diagnóstico de lesiones



preinvasivas de mama, como el carcinoma ductal *in situ* que tiene el riesgo posterior de progresar a un carcinoma invasivo. Además, se ha sugerido previamente el papel pronóstico de miR-125b, ya que pacientes con cáncer de mama con bajos niveles de miR-125b tienen una tasa de supervivencia a 5 años significativamente menor (53,8%) que los pacientes con altos niveles de miR-125b (81,8%)<sup>326</sup>. Este parámetro lo analizaremos en nuestra serie una vez transcurridos 5 años de la cirugía. En consonancia con estudios previos<sup>304,326</sup>, corroboramos el papel supresor tumoral de miR-125b en la tumorigénesis de mama mediante la demostración de lo siguiente: (1) su fuerte subexpresión en los tumores de mama, (2) su efecto sobre la disminución de la proliferación de líneas celulares de mama con diferentes grados de malignidad, y (3) su capacidad para reducir la transformación celular. Nuestros resultados mostraron que la disminución de la proliferación celular observada tras la sobreexpresión de miR-125b provoca una respuesta diferente en función de la línea celular. Concretamente, la sobreexpresión de miR-125b indujo de forma evidente la entrada en apoptosis en las células MDA-MB-231, y la detención del ciclo celular en la fase G2/M en las células HMEC, MCF7 y MDA-MB-231. Este hallazgo destaca la plasticidad funcional de miR-125b según el contexto celular. Es importante destacar que incluimos las células HMEC, que son células epiteliales de mama no transformadas de tipo salvaje.

La inducción de apoptosis observada en las células MDA-MB-231 puede deberse a alteraciones asociadas con la naturaleza de células altamente tumorigénicas, a diferencia de las células MCF7 o las células normales HMEC que tienen un menor o nulo grado de malignidad, respectivamente. miR-125b puede regular la apoptosis a través de la represión directa de reguladores proapoptóticos, como p53, Bak1 y Puma, o reguladores antiapoptóticos, como Bcl2, Mcl-1 y Bcl-w, promoviendo la respectiva inhibición o inducción de la apoptosis dependiendo del contexto celular<sup>305,307,325,331,332</sup>. Otro mecanismo por el cual miR-125b puede regular la apoptosis es a través de la represión de p14<sup>ARF</sup> que conduce a una reducción de la degradación de Hdm2 por el proteasoma y, por tanto, de la estabilidad de p53 en células tumorales de próstata en las cuales miR-125b actúa como un oncomiR<sup>328</sup>. De hecho, nosotros observamos una represión de la expresión de dianas directas de miR-125b previamente validadas, como p53 y de proteínas asociadas a la vía de p53 como por ejemplo p21<sup>CIP1</sup> y Hdm2 en las líneas celulares con p53 de tipo salvaje (HMEC y MCF7)<sup>305</sup>. Sin embargo, el efecto fenotípico observado en las células de mama tras la sobreexpresión de miR-125b no puede ser debido a la represión de p53 ya que no observamos un aumento de la proliferación sino todo lo contrario, por lo que miR-125b debe estar modulando dianas implicadas en vías de señalización oncogénica más relevantes que la vía de p53 en las células de mama empleadas. A este respecto, se ha demostrado que miR-125b suprime la fosforilación de ERK1/2 y AKT inhibiendo la señalización de estas vías, a través de la

regulación negativa de ERBB2 y ERBB3 <sup>304</sup>. Además, otros mecanismos previamente documentados por los cuales miR-125b reduce la proliferación celular y la apoptosis incluyen la regulación de la vía PI3K/AKT/mTOR a través de la represión de la subunidad catalítica de PI3K (PIK3CD), y la regulación del ciclo celular a través de la modulación directa de los factores de transcripción de la familia E2F <sup>306,333</sup>. Sin embargo, la expresión de p-ERK, p-AKT, y los miembros de la familia E2F, no se vieron afectadas en ninguna de las líneas celulares empleadas. También, mostramos que miR-125b es capaz de reprimir la expresión de otras proteínas implicadas en el ciclo celular y que no son dianas directas de miR-125b, como CCND1 y CCNB1 en las células normales de mama HMEC. Este hallazgo puede reflejar la detención del ciclo celular en la fase G2/M tras la sobreexpresión de miR-125b en las líneas celulares de mama empleadas.

Con el fin de descubrir las proteínas responsables de los efectos fenotípicos de miR-125b en los modelos celulares utilizados, hemos explorado otras posibles proteínas oncogénicas que podrían ser moduladas por miR-125b. En este sentido, identificamos nuevas dianas directas de miR-125b, entre las que se incluyen, ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9. Además, los efectos de miR-125b sobre las proteínas diana identificadas en las tres líneas celulares utilizadas (con la excepción de CCNJ, que no se expresa en células HMEC) parecen ser una respuesta generalizada en células mamarias.

La implicación y relevancia de las proteínas ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en tumorigénesis está emergiendo gradualmente. Las peptidasas de superficie celular, incluyendo ENPEP, juegan papeles claves en la regulación del crecimiento, diferenciación y transducción de señales de muchos sistemas celulares a través de la modulación de las actividades de los sustratos peptídicos y la regulación del acceso a sus receptores <sup>334,335</sup>. ENPEP, también conocida como Aminopeptidasa A, es una proteína transmembrana homodimérica de tipo II con actividad zinc metalopeptidasa que hidroliza péptidos que contienen residuos glutamilo y aspártico en sus extremos amino, siendo el sustrato mejor conocido la Angiotensina II (AngII) <sup>336</sup>. Los péptidos de angiotensina del sistema renina-angiotensina están implicados en el control del crecimiento celular y la permeabilidad vascular. De hecho, se ha demostrado que AngII estimula la angiogénesis y el crecimiento tumoral, y aunque clásicamente ha sido considerado como el péptido efector del sistema renina-angiotensina, varios de sus productos de degradación, incluyendo la angiotensina III (AngIII) y la angiotensina IV (AngIV), también poseen funciones biológicas <sup>337-339</sup>. Estos péptidos de angiotensina se forman a través de la actividad de varias aminopeptidasas reguladoras del sistema renina-angiotensina, entre las que se incluye ENPEP.

Nosotros demostramos por primera vez, que la represión de la expresión de ENPEP tiene un fuerte efecto sobre la disminución de la proliferación de células MCF7, lo cual contrasta con la menor magnitud del efecto sobre la reducción de la proliferación celular que tiene la supresión de la expresión del resto de dianas moduladas por miR-125b, CK2- $\alpha$ , CCNJ o MEGF9. Además, por primera vez hemos demostrado que ENPEP se sobreexpresa en un porcentaje relativamente alto de pacientes con cáncer de mama (56%) mientras que no hay expresión en el tejido normal adyacente. Estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia de esta proteína en cáncer de mama, cuyo papel será desvelado en mayor profundidad en futuros estudios. Varios trabajos han sugerido el potencial papel oncogénico de ENPEP. Marchio y colaboradores<sup>340</sup> han mostrado que por un lado, ENPEP se sobreexpresa y está activa enzimáticamente en vasos sanguíneos de tumores humanos, y por otro lado, que su inhibición suprime la migración y proliferación de células endoteliales inhibiendo la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, lo que pone de manifiesto el potencial uso de ENPEP como una diana vascular funcional<sup>340</sup>. Además, en un modelo de ratón de glioma se ha demostrado que se produce un incremento de la actividad de ENPEP conforme el tumor va creciendo, y también que la inhibición de esta enzima por diferentes compuestos inhibidores de plata reducen el crecimiento y la proliferación de líneas celulares de glioma y neuroblastoma<sup>341,342</sup>. Otro trabajo ha revelado que ENPEP se expresa en lesiones neoplásicas del cuello uterino, y sus niveles se incrementan a medida que las lesiones progresan desde neoplasias intraepiteliales cervicales a carcinomas invasivos de células escamosas<sup>343</sup>. Interesantemente, un estudio ha mostrado un incremento de la actividad de ENPEP en un modelo murino de carcinogénesis mamaria química inducido por metilnitrosourea (NMU) en comparación con ratas no tratadas con NMU, sugiriendo una acción predominante de AngIII en la tumorigénesis de mama<sup>344</sup>. Por último, en el presente año Chuang y colaboradores<sup>345</sup> han demostrado la existencia de correlación positiva entre la expresión de ENPEP y el grado del tumor en cáncer colorrectal, sugiriendo un papel pronóstico de ENPEP. También han mostrado que la sobreexpresión de ENPEP en líneas celulares de cáncer colorrectal provoca un aumento de la migración y la invasión celular, del crecimiento independiente de anclaje y de características de células madre a través de la regulación de TWIST, conocido marcador mesenquimal que promueve la iniciación tumoral y las propiedades de las células madre del cáncer durante el proceso de EMT. Los mismos investigadores también demostraron que la sobreexpresión y el silenciamiento de ENPEP aumentan y disminuyen respectivamente, la tumorigenicidad *in vivo*<sup>345</sup>. Estos hallazgos junto con nuestros resultados sugieren que ENPEP puede desempeñar un papel regulador en la transformación neoplásica y la progresión de la enfermedad en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama.

La proteína CK2 es una quinasa serina / treonina altamente conservada, que es ubicua en células eucariotas y se encuentra principalmente formando un complejo tetramérico que consiste en dos subunidades catalíticas ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ) y dos subunidades  $\beta$  reguladoras. Notablemente, CK2- $\alpha$  es una proteína quinasa multifuncional con cientos de sustratos, muchos de los cuales están implicados en procesos que están desregulados en cáncer como el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, y en la regulación de múltiples vías, incluyendo las cascadas de señalización PI3K / AKT y WNT, NF- $\kappa$ B, y la respuesta al daño del DNA<sup>346-348</sup>. CK2- $\alpha$  es considerado un no-oncogén prototípico necesario para mantener el fenotipo transformado y previamente se ha mostrado que su actividad y niveles de expresión están elevados en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama<sup>349</sup>, pulmón<sup>350</sup>, próstata<sup>351</sup>, colorrectal<sup>352</sup>, renal<sup>353</sup> y leucemia mieloide aguda<sup>354</sup>. Consistente con trabajos previos<sup>349,355</sup>, confirmamos que la proteína CK2- $\alpha$  se sobreexpresa en el 40%-56% de los pacientes con cáncer de mama. Además, la sobreexpresión de CK2 en el tejido canceroso se ha asociado con frecuencia con la progresión de la enfermedad y un mal pronóstico. Nuestros resultados revelaron que la sobreexpresión de CK2- $\alpha$  se asoció de forma directa con la presencia y número de metástasis de ganglios linfáticos. En este sentido, se ha demostrado que CK2  $\alpha$  es parte de una firma de genes de invasividad asociada con la supervivencia global y la supervivencia libre de metástasis en pacientes con cáncer de mama<sup>356</sup>. Este hecho subraya la utilidad de CK2- $\alpha$  como marcador pronóstico en cáncer de mama, como ha sido sugerido anteriormente para los cánceres de colon, mama y carcinoma hepatocelular<sup>352,357,358</sup>.

CK2- $\alpha$  tiene importantes funciones en el control de la proliferación celular, supervivencia celular, migración, invasión y la angiogénesis<sup>349,359-362</sup>. En concreto, CK2 ha sido ampliamente caracterizado como un importante regulador de la progresión del ciclo celular y está implicado en la regulación de cada una de las fases del ciclo celular en una manera dependiente del tipo celular<sup>363,364</sup>. En el presente estudio, revelamos que el silenciamiento de CK2- $\alpha$  causa una reducción de la proliferación de células MCF7 a través del detenimiento del ciclo celular en la fase G2/M. Este hallazgo va en consonancia con los resultados obtenidos en dos estudios previos. En un estudio se mostró que el silenciamiento de la expresión de CK2- $\alpha$  mediante siRNAs causó una reducción de la proliferación de células de carcinoma hepatocelular acompañada de un aumento de células detenidas en la fase G2/M del ciclo celular<sup>365</sup>. Otro estudio mostró que el tratamiento de células de cáncer de mama BT-474 con el inhibidor químico de CK2- $\alpha$ , CX-4945, provocó una parada en la fase G2/M del ciclo celular, además de provocar una significativa reducción del crecimiento tumoral en un modelo murino de xenoinjerto con las mismas células de mama<sup>363</sup>. Los autores sugieren que CX-4945 evita la progresión del ciclo celular y reduce el crecimiento tumoral *in vivo*, a través de la reducción de la fosforilación de los inhibidores de la progresión del ciclo celular p21 y p27 mediada por la

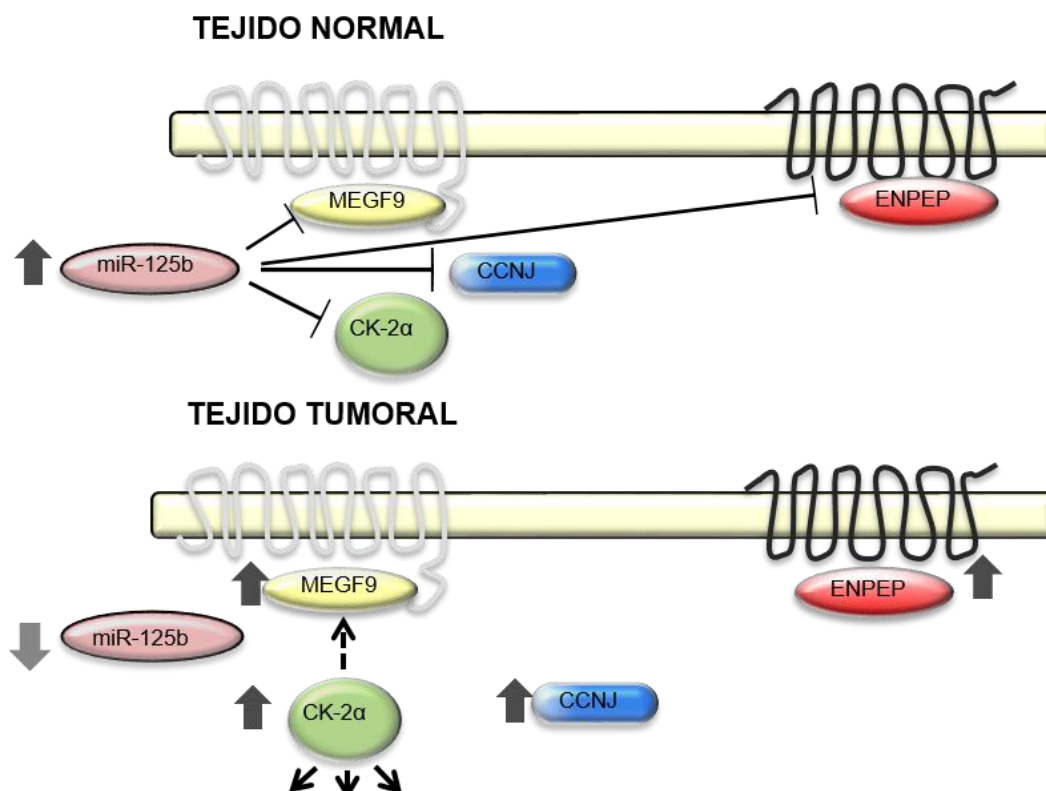
reducción de los niveles de p-Akt, lo que conduce a un aumento de la estabilidad proteosomal de p21 y p27 y por tanto de sus niveles totales <sup>363</sup>. Además se han sugerido papeles específicos para CK2 en la transición G2/M del ciclo celular y la mitosis ya que CK2 colocaliza con el huso mitótico y los centrosomas, y además muchas proteínas implicadas en el punto de control G2/M en la respuesta al daño de DNA, y en la mitosis, son socios que interactúan con CK2 y/o sustratos de CK2, entre los que se incluyen,  $\beta$ -tubulina, Cdc25B, Tau, Condensina, PP2A, las quinasas de punto de control Chk1 y Chk2, Topoisomerasa II, BRCA1 y Plk1 <sup>364</sup>. En resumen, los datos derivados de nuestro estudio y los de otros investigadores sugieren que CK2- $\alpha$  juega un papel importante en el inicio y progresión del cáncer de mama con relevantes implicaciones clínicas y terapéuticas.

MEGF9 es una nueva proteína transmembrana con múltiples repeticiones de tipo EGF que se expresa predominantemente en el sistema nervioso central y periférico en el desarrollo y en el adulto <sup>366</sup>. Los dominios tipo EGF son importantes componentes modulares presentes en muchas proteínas de la matriz extracelular, que están implicados en la adhesión celular, interacciones receptor-ligando y reparación de tejidos. Mutaciones en proteínas con dominios de tipo EGF se han asociado a diversas enfermedades como el síndrome de Marfan <sup>367</sup> y la leucoencefalopatía <sup>368</sup>. Además desregulación de la expresión de este tipo de proteínas en tumores humanos se han relacionando con la progresión y pronóstico del cáncer <sup>369,370</sup>. La implicación de MEGF9 en cáncer ha sido previamente reportada por Cunha y colaboradores <sup>371</sup>, en cuyo estudio mostraron que la disminución de la expresión de MEGF9 en tumores mesenquimales de tejidos blandos está asociada a la agresividad local de estos tumores y por tanto, a la invasión local tumoral. Sin embargo, nuestros resultados no son consistentes con los resultados de Cunha y colaboradores <sup>371</sup>, posiblemente debido a que el estudio se realizó en tumores de tejidos blandos en contraposición a los tumores sólidos que analizamos nosotros. Además, los resultados de Cunha y colaboradores <sup>371</sup> se basaron únicamente en datos de expresión de RNA, lo cual requiere una confirmación adicional por análisis de expresión a nivel de proteína. Por primera vez, nuestros datos muestran que MEGF9 es capaz de regular la proliferación celular ya que el silenciamiento de la expresión de MEGF9 provocó una reducción significativa de la proliferación de células MCF7 relacionada con un detenimiento en la fase G2/M del ciclo celular. Además, revelamos que MEGF9 se ha expresado en el 32% de los tumores de mama analizados mientras que no se detectó su expresión en el tejido normal adyacente. Este hallazgo pone de manifiesto el potencial papel de MEGF9 como diana terapéutica en pacientes con cáncer de mama, ya que esta proteína es un receptor de membrana cuyo bloqueo podría alterar la señal proliferativa. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para profundizar en la caracterización del papel de MEGF9 en la tumorigénesis de mama.

Por último, CCNJ es una ciclina que controla la mitosis celular y que se caracteriza por su exclusivo patrón de expresión materno, sugiriendo que puede tener un papel en la regulación de la ovogénesis y la embriogénesis <sup>372,373</sup>. CCNJ no es una ciclina ubicua ya que no se expresa en algunos tejidos o en ciertas líneas celulares de cáncer con orígenes distintos al tejido mamario ([www.proteinatlas.com](http://www.proteinatlas.com)). Además, su peculiar expresión en el citoplasma también la diferencia de las otras ciclinas ([www.proteinatlas.com](http://www.proteinatlas.com)). Por primera vez, se sugirió el posible papel oncogénico de CCNJ al demostrarse que esta ciclina forma parte de un grupo de genes que se encuentran desregulados en leucemia linfoblástica aguda infantil de células B <sup>374</sup>. El hecho de que el silenciamiento de la expresión de CCNJ disminuyó la proliferación de células MCF7 por inducción de parada del ciclo celular en la fase G2/M, es consistente con el papel proliferativo de CCNJ sugerido por otros estudios en *Drosophila* y en células de cáncer de próstata y vejiga <sup>372,375</sup>. Concretamente, Ting y colaboradores <sup>375</sup> mostraron que la sobreexpresión de miR-98 provocó una parada del ciclo celular en la fase G2/M a través de la regulación negativa de CCNJ en células de cáncer de próstata. Otro estudio consistente con nuestros resultados reveló que miR-205, un miRNA que está subexpresado en cáncer de vejiga, es capaz de reducir la proliferación de células de cáncer de vejiga por inducción de una parada del ciclo celular en la fase G2/M, a través de la regulación negativa de CCNJ <sup>376</sup>. Además, los autores muestran que los niveles de expresión de CCNJ están disminuidos exclusivamente en tumores de cáncer de vejiga que sobreexpresan miR-205, sugiriendo que miR-205 media su papel supresor de tumores *in vivo* a través de la regulación negativa de CCNJ <sup>376</sup>. Recientemente, se ha reportado que el silenciamiento de CCNJ revierte la resistencia de células de cáncer de pulmón resistentes a cisplatino por inducción del detenimiento del ciclo celular y aumento de la apoptosis, además de reducir la motilidad y la invasión de dichas células <sup>377</sup>. Además, el hecho de que CCNJ no se exprese en las células normales HMEC pero si se exprese en las células tumorigénicas de mama MCF7 y MDA-MB-231 es consistente con los resultados de expresión CCNJ en líneas celulares de cáncer de vejiga <sup>376</sup>. Cabe destacar que CCNJ se expresó en el 20% de los pacientes con cáncer de mama, exclusivamente en los tejidos malignos. Por tanto, a la vista de nuestros resultados, sugerimos un posible papel oncogénico de CCNJ en la tumorigénesis de mama.

Uno de los objetivos de analizar la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en tumores de mama fue aclarar su asociación con miR-125b. Concretamente, la expresión de miR-125b está inversamente correlacionada con la expresión de ENPEP y CK2- $\alpha$  en los tumores de mama, mientras que en el caso de MEGF9 únicamente observamos una tendencia de correlación negativa, por lo que esta asociación necesitará ser confirmada en estudios posteriores. Nuestros resultados sugieren que estas proteínas son reguladas por miR-125b en tumores de mama, además de sugerir un papel relevante en la tumorigénesis de mama

con potenciales implicaciones clínicas. Respecto a la falta de asociación entre la expresión de miR-125b y CCNJ, hipotetizamos que miR-125b puede correlacionar con los niveles de CCNJ en ciertas células tumorigénicas (por ejemplo, células madre de cáncer). Varios estudios describen un papel en el mantenimiento de las características de células madre para miR-125b y CCNJ, lo que explicaría por qué su expresión se asocia con células madre, pero no con células maduras diferenciadas<sup>378-380</sup>. Además de la sobreexpresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, y MEGF9 en ciertos pacientes con cáncer de mama, el potencial papel oncogénico de estas proteínas se apoya en el hecho de que el silenciamiento de la expresión de cada una de las proteínas provoca una reducción significativa de la proliferación celular. Nuestros datos sugieren que además de la sobreexpresión de estas proteínas potencialmente oncogénicas en algunos de los tumores de pacientes cáncer de mama, ocurre concomitantemente una represión de los niveles de miR-125b. Por tanto, sugerimos que miR-125b reprime la expresión de ENPEP y CK2- $\alpha$ , y potencialmente de MEGF9 y CCNJ, y que la supresión de la expresión de miR-125b en tumores de mama conduce a la sobreexpresión de sus nuevas dianas validadas en cáncer de mama (Figura 52). En consecuencia, miR-125b actuaría modulando las diferentes vías moleculares asociadas con estas proteínas. Hipotetizamos que la desregulación de estas proteínas oncogénicas podría contribuir en gran medida al fenotipo tumorigénico, que se explica, al menos en parte, por la regulación negativa de los niveles de miR-125b. Las vías en las que estas proteínas están implicadas parecen desempeñar un papel importante en las células cancerosas derivadas de los tejidos mamarios, independientemente del estado de RE o p53 (que difieren entre las líneas celulares estudiadas). Un mejor conocimiento de las vías que son utilizadas por estas proteínas para disminuir la proliferación abriría nuevas vías para el tratamiento del cáncer de mama.



**Figura 52.** Representación esquemática de cómo miR-125b modula sus proteínas diana y sus posibles interacciones. Las flechas con líneas discontinuas representan potenciales interacciones.

### V.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE miR-1274a, miR-1274b Y miR-1260a EN CÁNCER DE MAMA.

Decidimos caracterizar los miRNAs potencialmente oncogénicos miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en base a su sobreexpresión en tumores de mama y al desconocimiento existente de su función en tumorigénesis, especialmente en tumorigénesis de mama.

Es necesario destacar que, durante la presente tesis doctoral, los miRNAs miR-1274a y miR-1274b han sido eliminados de la base de datos pública de miRNAs, miRBase (<http://www.mirbase.org>) al descubrir que no son miRNAs canónicos, sino miRNAs derivados de tRNAs o fragmentos derivados de tRNAs (tRFs)<sup>381-383</sup>. El reciente aumento del uso de la secuenciación profunda de RNA ha conducido al descubrimiento de nuevas especies de RNA no codificantes, entre las que se incluyen los tRFs. Los tRFs están altamente expresados y por lo tanto, son particularmente propensos a producir artefactos de mapeo cruzado durante el análisis de los datos de secuenciación profunda, que conducen a anotaciones erróneas de miRNAs<sup>382</sup>. Evidencias recientes sugieren que algunos tRFs pueden funcionar como los miRNAs por el hecho de que su biogénesis es similar a la de los miRNAs, siendo ésta dependiente de Dicer y, porque los 3'-tRFs son capaces de unirse a proteínas argonauta al



igual que los miRNAs, preferencialmente Ago1, Ago3 y Ago4, sugiriendo que tienen un papel en la regulación de la expresión génica<sup>384,385</sup>. De hecho, se ha demostrado que los 3' tRFs interactúan específicamente con las regiones 3'-UTR de los mRNA para inhibir su expresión. La primera evidencia fue aportada por Maute y colaboradores<sup>386</sup>, que mostraron que un tRF de 22-nt de largo, el cual está subexpresado en linfomas de células B, utiliza la maquinaria canónica de los miRNAs para reprimir la expresión del mRNA de la proteína de replicación 1 (RPA1) lo que conduce a la supresión de la proliferación<sup>385,386</sup>. Otros estudios recientes han revelado que algunos de estos tRFs actúan de forma idéntica a los miRNAs regulando la proliferación celular, la invasión celular y la metástasis y/o muestran expresión diferencial en los tejidos normales y los tumores malignos<sup>123,129,385,387</sup>. Este hallazgo pone de manifiesto que estas moléculas con potenciales implicaciones clínicas y terapéuticas, tienen un relevante papel en la tumorigénesis.

miR-1274a y miR-1274b son pequeñas moléculas de RNA no codificante que derivan de los transcritos de tRNA<sup>Lys3</sup> y tRNA<sup>Lys5</sup>, respectivamente. Estos fragmentos adoptan la característica conformación de horquilla de los pre-miRNAs e incluyen en su secuencia el trinucleótido CCA en su extremo 3' como modificación post-transcripcional. La relación de los fragmentos miR-1274a:miR-1274b es muy similar a la de los fragmentos tRNA<sup>Lys3</sup>:tRNA<sup>Lys5</sup> en la célula y además, las secuencias de los dos miRNAs difieren sólo en un único nucleótido al igual que los transcritos tRNA<sup>Lys3</sup> y tRNA<sup>Lys5</sup>. Este polimorfismo de un solo nucleótido podría ser causado por edición del RNA sin embargo, se ha revelado que los genes codificantes de miR-1274a y miR-1274b se localizan en los cromosomas 5 y 19 respectivamente, y se transcriben independientemente.<sup>381,385</sup>. Del mismo modo, es probable que el mapeo cruzado sea responsable de un falso sitio de edición en miR-1260a. La secuencia de este miRNA únicamente tiene una discordancia en un solo nucleótido con el tRNA de leucina, y además incluye en su secuencia el trinucleótido CCA en su extremo 3' como modificación post-transcripcional, al igual que los 3'-tRFs<sup>382</sup>. De hecho, recientemente se han catalogado los miRNAs que se superponen con las secuencias de tRFs en los seres humanos utilizando miRBase, y se predijo de forma significativa que miR-1260a se superpone con los 3'-tRFs 3001a y 3010a<sup>388</sup>. No obstante, en la actualidad miR-1260a sigue presente en la base de datos de miRNAs miRBase. Además, aunque miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a no sean miRNAs canónicos sino derivados de tRNAs, las compañías biotecnológicas continúan vendiendo productos relacionados a estas moléculas (por ejemplo pre-miRs y anti-miRs) con la nomenclatura de miRNAs, al igual que se siguen publicando artículos designándolos como miRNAs. A la vista de la complejidad del origen de ciertos miRNAs, en el presente trabajo nombramos a miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a como miRNAs teniendo en cuenta su origen.

Por primera vez, hemos demostrado la existencia de desregulación de la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260 en tumores de mama. Acorde con nuestros resultados, el potencial papel oncogénico de los tres miRNAs ha sido sugerido por estudios previos que mostraron la sobreexpresión de los tres miRNAs en linfoma folicular, melanoma y craneofaringioma <sup>389-391</sup>. Además, otro trabajo mostró que miR-1274a es sobreexpresado en carcinoma renal de células claras <sup>392</sup>. De forma contraria, se ha reportado que la expresión de miR-1274a y miR-1274b está disminuida en cáncer de esófago de células escamosas en comparación con el tejido normal adyacente <sup>393</sup>. Este hallazgo sugiere que miR-1274a y miR-1274b, al igual que otros miRNAs como por ejemplo miR-125b, pueden tener un papel dual oncogénico o supresor de tumores en función del contexto celular.

De forma sorprendente, los niveles de expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a fueron similares entre las células no tumorigénicas de mama MCF10A y las células tumorigénicas de mama MCF7. En este sentido, Guzmán y colaboradores mostraron que no hubo diferencias significativas entre los niveles expresión de estos miRNAs derivados de tRNAs en células MCF10 y células MCF7, sin embargo, la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a fue considerablemente mayor en microvesículas extracelulares derivadas de MCF7 que en microvesículas extracelulares derivadas de MCF10 <sup>394</sup>. De forma general, las células cancerosas liberan vesículas extracelulares, entre las que se incluyen los exosomas, que contienen miRNAs que pueden ser recuperados de la sangre periférica, orina, saliva u otros fluidos corporales y que tienen un papel en la comunicación intercelular. Entre los miRNAs más abundantes en microvesículas extracelulares de células MCF7 se encuentran miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, que también están altamente expresados en las células MCF7, pero a niveles notablemente más bajos <sup>394</sup>. Es probable, que una manifestación de la sobreexpresión característica de tRNAs en células cancerosas <sup>395,396</sup>, sea la expresión elevada de tRFs o miRNAs derivados del procesamiento de los tRNAs. También, se ha revelado que miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a se sobreexpresan en microvesículas extracelulares de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células B y células T, lo que pone de manifiesto que los tres miRNAs derivados de tRNAs pueden tener un papel relevante en la patogénesis y progresión del cáncer a través de la comunicación intercelular <sup>397</sup>. La interacción entre las células tumorales y las células del estroma tiene un importante papel en la progresión del cáncer. El hecho de que la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a aumenta en células del estroma cuando éstas son cultivadas en medio condicionado de células de mieloma múltiple que contienen exosomas y, en células del estroma derivados de pacientes con mieloma múltiple con respecto a células del estroma de donantes sanos, pone de manifiesto que los 3 miRNAs podrían jugar un papel esencial en la patogénesis y progresión del cáncer a través de la transferencia de exosomas a las células del estroma <sup>398</sup>.

Hay una notable escasez de información sobre la funcionalidad de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en tumorigénesis. Es más, somos los primeros en demostrar que la sobreexpresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a provoca un aumento de la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama, lo que sugiere que además de ser potenciales biomarcadores diagnóstico pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis de mama. Un estudio previo que apoya nuestros resultados, ha reportado que miR-1274a se sobreexpresa en cáncer gástrico y que dicha sobreexpresión es responsable del aumento de la proliferación de células de cáncer gástrico y de promover la tumorigénesis *in vivo* <sup>399</sup>. Además, otro hallazgo previo ha mostrado que el tratamiento de células de carcinoma hepatocelular con sorafenib, un inhibidor multiquinasa con actividad antiproliferativa utilizado para tratar pacientes con carcinoma hepatocelular en estadio avanzado, causa la sobreexpresión de de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a. Los autores sugieren que miR-1274a contribuye al mecanismo antitumoral de sorafenib en base a que miR-1274a reprime de forma directa la expresión de ADAM9, una proteasa cuya expresión es suprimida por el tratamiento con sorafenib en células carcinoma hepatocelular <sup>400</sup>. Este hallazgo no está en consonancia con el papel proliferativo sugerido por nosotros. Cabe destacar, que los autores del estudio no han analizado la expresión de miR-1274a en tumores de hígado ni han caracterizado los efectos que tiene miR-1274a sobre la proliferación de las células carcinoma hepatocelular, por lo que su relevancia en la carcinogénesis hepatocelular no puede ser determinada. Por otro lado, aunque se haya validado a ADAM9 como diana directa de miR-1274a *in vitro*, la asociación negativa entre la expresión de ambas no ha sido evaluada en tumores de cáncer de hígado.

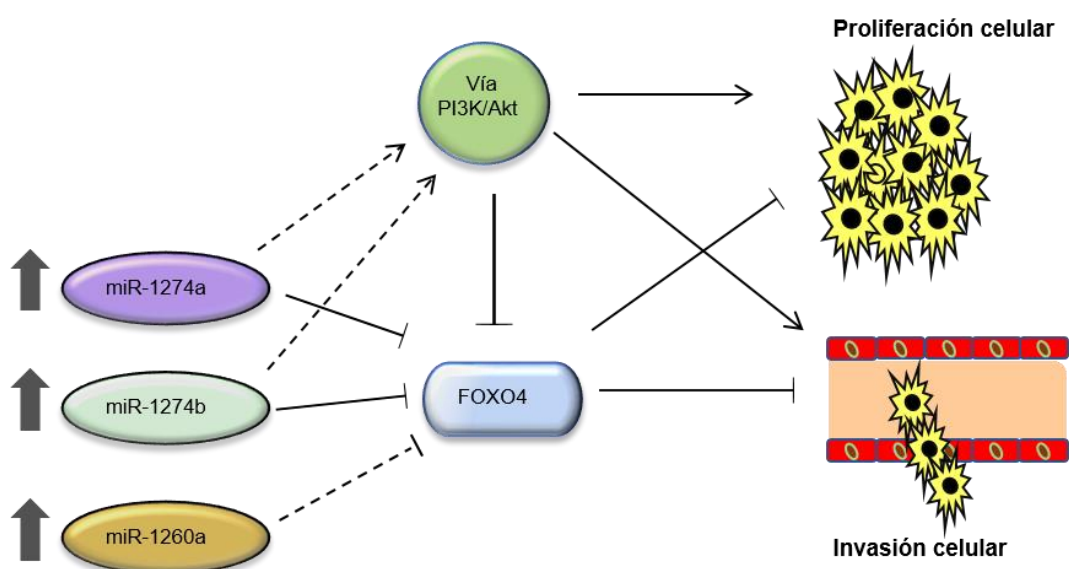
De forma importante, somos los primeros en demostrar que miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, además de aumentar la proliferación celular, promueven el potencial invasivo de células de cáncer de mama. Además, la expresión de miR-1260a en tumores de mama se asoció de forma significativa con la presencia y número de ganglios linfáticos metastáticos. Estos hallazgos ponen de manifiesto la implicación de estos miRNAs en la progresión del cáncer de mama y el potencial papel de miR-1260a como biomarcador pronóstico en cáncer de mama. Un reciente estudio ha revelado que miR-1274a y miR-1260a forman parte de una firma pronóstica de miRNAs circulantes en cáncer de mama metastático. Concretamente altos niveles de estos miRNAs se han asociado a una menor supervivencia global y supervivencia libre de progresión. Además, los autores sugieren que ambos miRNAs son específicos de cáncer de mama metastático ya que no se detectó su expresión en una serie de muestras de plasma que incluía pacientes de cáncer de mama con y sin metástasis <sup>401</sup>. Además, en otro trabajo reciente se identificó a miR-1260a como un metastamiR (miRNA específico de metástasis) en neuroblastoma ya que sus niveles de expresión fueron significativamente más

elevados en tumores metastáticos en un modelo murino de neuroblastoma agresivo de alto riesgo en comparación con tumores primarios no metastáticos <sup>402</sup>. Otro reciente hallazgo que pone de manifiesto el potencial papel pronóstico de miR-1274a en cáncer de próstata, mostró que los niveles circulantes de miR-1274a fueron más elevados en sueros de pacientes con cáncer de próstata respecto a sueros de donantes sanos, y que los niveles circulantes de miR-1274a se incrementan a medida que aumenta el riesgo de progresión del paciente hasta la enfermedad metastática <sup>403</sup>.

De forma importante, apoyando nuestros resultados, Wang y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de miR-1274a causó un aumento de la proliferación y migración, además de promover EMT en células de cáncer gástrico a través de la interacción directa con la región 3'-UTR de FOXO4. También, los autores han sugerido que miR-1274a contribuye a la progresión del cáncer gástrico a través de la activación de la vía de la señalización PI3K/Akt conduciendo al aumento de la expresión de Ciclina D1, MMP9 y MMP2 <sup>399</sup>. Los miembros de la familia FOXO, FOXO1, FOXO3a y FOXO4, son factores de transcripción conocidos por jugar papeles claves en proliferación, apoptosis, metástasis, metabolismo celular y envejecimiento, cuya actividad transcripcional es regulada por fosforilación, acetilación y ubiquitinación. Estas proteínas con función supresora de tumores limitan la proliferación celular e inducen apoptosis en varios cánceres incluido el cáncer de mama <sup>404</sup>. Así mismo, crecientes evidencias sugieren un papel supresor de metástasis para FOXO4. En este sentido, se ha mostrado que la expresión de FOXO4 está disminuida en tejidos metastáticos de cáncer gástrico en comparación con muestras de tumor primario de cáncer gástrico y que la sobreexpresión de FOXO4 inhibió la proliferación, migración e invasión de líneas celulares de cáncer gástrico *in vitro* y condujo a la inhibición de la tumorigenesis y de la metástasis *in vivo* <sup>405</sup>. También, se sugiere que el papel supresor de metástasis de FOXO4 subyace de la regulación de EMT a través del aumento de la expresión del marcador epitelial E-cadherina y disminución del marcador mesenquimal Vimentina en cáncer gástrico <sup>405</sup>. Así mismo, se ha reportado que el silenciamiento de FOXO4 provocó aumento de la migración, y promovió EMT a través de la regulación del circuito NF-κB/snail/YY1/RKIP en el que se produce aumento de la expresión NF-κB, Snail, N-cadherina y vimentina y la disminución de la expresión de E-cadherina en células de cáncer de pulmón <sup>406</sup>. Complementariamente, otro estudio mostró que la baja expresión de FOXO4 correlaciona con una baja expresión de E-cadherina y elevada expresión de Vimentina en tejidos de cáncer de pulmón sugiriendo la relevancia de la asociación de EMT y FOXO4 en tumores <sup>407</sup>. El hecho de que un estudio haya reportado que la expresión de FOXO4 fosforilado y por tanto, inactivo aumente desde lesiones hiperplásicas tempranas a lesiones malignas derivadas de modelos murinos *in vivo* de cáncer de mama con diferentes grados de malignidad sugiere que FOXO4 puede jugar un papel importante en el

inicio y progresión del cáncer de mama <sup>408</sup>. Gracias a los hallazgos previos anteriormente citados y al hecho de que en nuestro trabajo la sobreexpresión de miR-1274a y miR-1274b causó un aumento de la proliferación y de la invasión celular y una disminución de la expresión de FOXO4 en células de cáncer de mama, nos lleva a hipotetizar que el papel oncogénico de miR-1274a y de miR-1274b en cáncer de mama es mediado por 1) la disminución de la expresión FOXO4, que potencia las propiedades proliferativas, migratorias e invasoras de las células, y 2) la activación de la señalización de la vía PI3K/Akt, que ocurre en más de la mitad de los tumores de mama y que es responsable del crecimiento y la progresión del tumor (Figura 53). En estudios futuros se estudiará la relevancia de FOXO4 en tumores de mama, así como su asociación inversa con los niveles de miR-1274a y miR-1274b en tumores de mama.

Otro hallazgo que apoya la implicación de los tres miRNAs potencialmente oncogénicos en la progresión del cáncer de mama es el hecho de que la mayor expresión de miR-1260a se observó en las células MDA-MB-231, mientras que la mayor expresión de miR-1274a y miR-1274b se observó en las células MDA-MB-468, siendo ambos tipos de células altamente invasivas *in vitro* y metastáticas *in vivo* <sup>409-412</sup>. Sin embargo, las series de pacientes empleadas en el presente estudio apenas incluyen pacientes con cáncer metastático, de forma que en estudios posteriores se estudiará la relevancia de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en tumores de mama metastáticos y en modelos murinos de EMT y metástasis de cáncer de mama.



**Figura 53.** Representación esquemática de la funcionalidad de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en cáncer de mama. Las flechas con líneas discontinuas representan potenciales interacciones.





# CONCLUSIONES





## VI. CONCLUSIONES

- A) En el análisis de la desregulación de la expresión de 939 miRNAs en tumores de mama destacamos las siguientes conclusiones:
- 1) Identificamos un total de 35 miRNAs cuya expresión está desregulada en tumores de mama, entre los que se encuentran 9 potenciales miRNAs oncogénicos y 26 potenciales miRNAs supresores de tumores.
  - 2) Determinamos una firma de miRNAs que incluye los 10 miRNAs más desregulados en tumores de mama que distinguen el tejido tumoral del tejido normal adyacente. En la firma están incluidos los potenciales miRNAs oncogénicos: miR-21, miR-96, miR-141, miR-1260a, miR-106b y miR-1274b; y los los potenciales miRNAs supresores de tumores: miR-497, miR-100, miR-99a y miR-125b.
- B) En el estudio de la caracterización funcional de miR-125b en cáncer de mama destacamos las siguientes conclusiones:
- 1) miR-125b fue el miRNA que presentó la mayor subexpresión en los tumores de mama en comparación con el tejido normal adyacente.
  - 2) La sobreexpresión estable de miR-125b en las células epiteliales de mama no tumorigénicas HMEC y en las células tumorigénicas de mama MCF7 y MDA-MB-231 causó una disminución de la proliferación celular a través de una parada del ciclo celular en la fase G2/M en las tres líneas celulares de mama. Igualmente, la sobreexpresión de miR-125b provocó un aumento de las tasas de apoptosis temprana y tardía en las células MDA-MB-231.
  - 3) La sobreexpresión estable de miR-125b provocó una disminución significativa del crecimiento celular independiente de anclaje en células MCF7 y MDA-MB-231.
  - 4) La expresión ectópica de miR-125b disminuyó la expresión de sus nuevas dianas identificadas ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en las tres líneas celulares de mama a través de la interacción directa con las regiones 3'-UTR de los mRNA de dichas proteínas.
  - 5) El silenciamiento de la expresión de miR-125b mediante el empleo de moléculas anti-miR, provocó un aumento significativo de la proliferación celular y de la

expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en las células MCF7 y MDA-MB-435.

- 6) La inhibición transitoria de la expresión de ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ y MEGF9 en células MCF7 causó una disminución significativa de la proliferación celular a través del detenimiento del ciclo celular en la fase G2/M.
  - 7) El análisis de la expresión de las dianas de miR-125b en tumores de mama reveló que ENPEP se expresó en el 56% de los tumores de mama; CK2- $\alpha$  se sobreexpresó en el 56% y 40% de los tumores de mama mediante inmunohistoquímica y Western blot respectivamente; CCNJ se expresó en el 20 % de los tumores de pacientes con cáncer de mama; y MEGF9 se expresó en el 32% de los tumores de mama. La expresión de ENPEP, CCNJ y MEGF9 no se detectó en el tejido normal adyacente de ninguno de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 3.
  - 8) La expresión de miR-125b correlacionó de forma inversa con la expresión de ENPEP y CK2- $\alpha$ , en los tumores de mama de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 3. No hubo resultados significativos para MEGF9 y CCNJ, aunque se pudo observar una tendencia clara para la proteína MEGF9.
  - 9) La expresión de CK2- $\alpha$  se asoció de forma directa con la presencia y número de nódulos linfáticos metastáticos en los tumores de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 3.
- C) En el estudio de la caracterización funcional de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en cáncer de mama destacamos las siguientes conclusiones:
- 1) Los miRNAs derivados de tRNAs, miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a, se sobreexpresaron en los tumores de pacientes con cáncer de mama en comparación con el tejido normal adyacente.
  - 2) Se observó una correlación moderada positiva entre la expresión de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a en los tumores de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 3.
  - 3) La expresión de miR-1260a se asoció significativamente a la presencia de ganglios linfáticos metastáticos y correlacionó de forma moderada y positiva con el número de nódulos linfáticos metastáticos en los pacientes con cáncer de mama de la cohorte 3.

- 4) La sobreexpresión estable de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a provocó un aumento significativo de la proliferación celular y de la clonogenicidad en células MCF7 y MDA-MB-231. Además, la sobreexpresión e inhibición transitoria de la expresión de miR-1260a en células MDA-MB-231, MDA-MB-468 y T47D causó un aumento y disminución del crecimiento celular, respectivamente.
- 5) La sobreexpresión estable de miR-1274a, miR-1274b y miR-1260a provocó un aumento significativo de la invasión celular en células MCF7 y MDA-MB-231. Además, la sobreexpresión e inhibición transitoria de la expresión de miR-1260a en células MCF7 y MDA-MB-231 provocó un aumento y disminución, respectivamente, de la invasión celular.
- 6) La sobreexpresión estable de miR-1274a, miR-1274b disminuyó la expresión de su diana previamente validada, FOXO4 en las células epiteliales no tumorigénicas MCF10A y en las células tumorigénicas MCF7 y MDA-MB-231.





# BIBLIOGRAFÍA



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 87 (2011).
5. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936 (2005).
6. Hickey, M. M. & Simon, M. C. in *Current topics in developmental biology* **76**, 217–257 (2006).
7. Saylor, P. J., Escudier, B. & Michaelson, M. D. Importance of Fibroblast Growth Factor Receptor in Neovascularization and Tumor Escape from Antiangiogenic Therapy. *Clin. Genitourin. Cancer* **10**, 77–83 (2012).
8. Hirohashi, S. & Kanai, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* **94**, 575–81 (2003).
9. Lombaerts, M. *et al.* E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **94**, 661–71 (2006).
10. Shapiro, L. *et al.* Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327–337 (1995).
11. Paredes, J. *et al.* Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1826**, 297–311 (2012).
12. Davis, M. A., Ireton, R. C. & Reynolds, A. B. A core function for p120-catenin in

- cadherin turnover. *J. Cell Biol.* **163**, 525–534 (2003).
13. Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W. & van Roy, F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107–19 (1991).
  14. Hsu, M. Y. *et al.* E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.* **156**, 1515–25 (2000).
  15. Cavallaro, U. & Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 118–32 (2004).
  16. Dusek, R. L. & Attardi, L. D. Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 317–23 (2011).
  17. Li, J. *et al.* Human fucosyltransferase 6 enables prostate cancer metastasis to bone. *Br. J. Cancer* **109**, 3014–3022 (2013).
  18. Geng, Y., Yeh, K., Takatani, T. & King, M. R. Three to Tango: MUC1 as a Ligand for Both E-Selectin and ICAM-1 in the Breast Cancer Metastatic Cascade. *Front. Oncol.* **2**, 76 (2012).
  19. Ben-David, T. *et al.* The involvement of the sLe-a selectin ligand in the extravasation of human colorectal carcinoma cells. *Immunol. Lett.* **116**, 218–224 (2008).
  20. McFarlane, S. *et al.* CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget* **6**, 11465–11476 (2015).
  21. Gao, Y. *et al.* Up-regulation of CD44 in the development of metastasis, recurrence and drug resistance of ovarian cancer. *Oncotarget* **6**, 9313–9326 (2015).
  22. Hanahan, D. *et al.* Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  23. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The



- Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
24. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
  25. Pagès, F. *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**, 1093–1102 (2010).
  26. Hölzel, M., Bovier, A. & Tüting, T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat. Rev. Cancer* **13**, 365–76 (2013).
  27. Williams, G. M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* **166**, 3–10 (2001).
  28. Counts, J. L. & Goodman, J. I. Hypomethylation of DNA: a possible epigenetic mechanism involved in tumor promotion. *Prog. Clin. Biol. Res.* **391**, 81–101 (1995).
  29. Counts, J. L. & Goodman, J. I. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell* **83**, 13–5 (1995).
  30. Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. & Xu, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**, 543–555 (2000).
  31. Loeb, L. A. & Cheng, K. C. Errors in DNA synthesis: a source of spontaneous mutations. *Mutat. Res.* **238**, 297–304 (1990).
  32. Dixon, K. & Koprás, E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 441–448 (2004).
  33. Pitot, H. C. & Dragan, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* **5**, 2280–6 (1991).
  34. Lutz, W. K. A true threshold dose in chemical carcinogenesis cannot be defined for a population, irrespective of the mode of action. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**, 566–568 (2000).

35. Loeb, L. A. Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**, (1991).
36. Hartwell, L. H. & Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821–8 (1994).
37. Campbell, L. L. & Polyak, K. Breast Tumor Heterogeneity: Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332–2338 (2007).
38. Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112**, 4793–4807 (2008).
39. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–8 (1976).
40. Ding, L., Raphael, B. J., Chen, F. & Wendl, M. C. Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Lett.* **340**, 212–219 (2013).
41. Roth, A. *et al.* PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat. Methods* **11**, 396–398 (2014).
42. Oesper, L., Satas, G. & Raphael, B. J. Quantifying tumor heterogeneity in whole-genome and whole-exome sequencing data. *Bioinformatics* **30**, 3532–40 (2014).
43. Nik-Zainal, S. *et al.* The Life History of 21 Breast Cancers. *Cell* **149**, 994–1007 (2012).
44. Shah, S. P. *et al.* Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* **461**, 809–813 (2009).
45. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).
46. Ding, L. *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**, 506–510 (2012).
47. Visvader, J. E. *et al.* Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* **10**, 717–28 (2012).

48. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
49. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–7 (1997).
50. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003).
51. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
52. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **65**, 10946–10951 (2005).
53. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).
54. Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 973–978 (2007).
55. Li, C. *et al.* Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **67**, 1030–1037 (2007).
56. Eramo, A. *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* **15**, 504–514 (2008).
57. Chaffer, C. L. *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 7950–7955 (2011).
58. Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B. & Rich, J. N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* **8**, 3274–

- 3284 (2009).
59. Anderson, K. *et al.* Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **469**, 356–361 (2011).
  60. Piccirillo, S. G. M. *et al.* Genetic and Functional Diversity of Propagating Cells in Glioblastoma. *Stem Cell Reports* **4**, 7–15 (2015).
  61. Wang, J., Ma, Y. & Cooper, M. K. Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities. *Transl. Cancer Res.* **2**, 429–441 (2013).
  62. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–58 (2013).
  63. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**, E131-6 (2002).
  64. Croce, C. M. Oncogenes and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–511 (2008).
  65. Gabay, M., Li, Y. & Felsher, D. W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, (2014).
  66. Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. Perspective ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* **25**, 282–303 (2014).
  67. Fernandez-Medarde, A. & Santos, E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* **2**, 344–358 (2011).
  68. Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 761–74 (2011).
  69. Sherr, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235–46 (2004).
  70. Biegging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 359–70 (2014).
  71. Hernández-Monge, J., Rousset-Roman, A. B., Medina-Medina, I. & Olivares-Illana, V. Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53

- and RB. *Genes Cancer* **7**, 278–287 (2016).
72. Hermeking, H. *et al.* 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* **1**, 3–11 (1997).
73. el-Deiry, W. S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817–25 (1993).
74. Mihara, M. *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**, 577–90 (2003).
75. Muller, P. J. & Vousden, K. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304–317 (2014).
76. Oren, M. & Rotter, V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001107–a001107 (2010).
77. Hutcheson, J., Witkiewicz, A. K. & Knudsen, E. S. The RB tumor suppressor at the intersection of proliferation and immunity: relevance to disease immune evasion and immunotherapy. *Cell Cycle* **14**, 3812–9 (2015).
78. Dyson, N. J. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev.* **30**, 1492–502 (2016).
79. Levitt, N. C. & Hickson, I. D. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol. Med.* **8**, 179–86 (2002).
80. Curtin, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 801–817 (2012).
81. Chae, Y. K. *et al.* Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget* **7**, 23312–21 (2016).
82. Wei, Q., Cheng, L., Xie, K., Bucana, C. D. & Dong, Z. Direct correlation between DNA repair capacity and metastatic potential of K-1735 murine melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 3–6 (1997).
83. Loeb, L. A. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 450–7 (2011).

84. Bouwman, P. & Jonkers, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 587–598 (2012).
85. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501 (2015).
86. You, J. S. & Jones, P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? (2012). doi:10.1016/j.ccr.2012.06.008
87. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148–1159 (2008).
88. Hur, K. *et al.* Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut* **63**, 635–646 (2014).
89. Yi, J. *et al.* Overexpression of NSUN2 by DNA hypomethylation is associated with metastatic progression in human breast cancer. *Oncotarget* **8**, 20751–20765 (2014).
90. Stefanska, B. *et al.* Definition of the Landscape of Promoter DNA Hypomethylation in Liver Cancer. *Cancer Res.* **71**, 5891–5903 (2011).
91. Lu, J. *et al.* IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF- $\kappa$ B signaling. *J. Clin. Invest.* **125**, 1839–1856 (2015).
92. Fujii, S. *et al.* Epigenetic upregulation of ARL4C, due to DNA hypomethylation in the 3' untranslated region, promotes tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 81571–81587 (2016).
93. Sandoval, J. & Esteller, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 50–55 (2012).
94. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the Histone Code. *Science (80-. )*. **293**, 1074–1080 (2001).
95. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27–36 (2010).

96. Bhaskara, S. *et al.* Hdac3 Is Essential for the Maintenance of Chromatin Structure and Genome Stability. *Cancer Cell* **18**, 436–447 (2010).
97. Lu, H. *et al.* Regulation and role of post-translational modifications of enhancer of zeste homologue 2 in cancer development. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 2737–2754 (2016).
98. Hargreaves, D. C. & Crabtree, G. R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* **21**, 396–420 (2011).
99. Walter, D. M. *et al.* Systematic *In Vivo* Inactivation of Chromatin-Regulating Enzymes Identifies Setd2 as a Potent Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **77**, 1719–1729 (2017).
100. Wu, Q. *et al.* The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer. *Epigenomics* epi-2017-0034 (2017). doi:10.2217/epi-2017-0034
101. Kumar, R., Li, D.-Q., Müller, S. & Knapp, S. Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene* **35**, 4423–4436 (2016).
102. Birney, E. *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799–816 (2007).
103. Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787–98 (2003).
104. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347–355 (2012).
105. Gutschner, T. & Diederichs, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* **9**, 703–19 (2012).
106. Zhu, J., Fu, H., Wu, Y. & Zheng, X. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions. *Sci. China. Life Sci.* **56**, 876–85 (2013).
107. Zhao, J. *et al.* Long non-coding RNA Linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in

- gastric cancer. *Cell Cycle* **14**, 3112–23 (2015).
108. Liang, W.-C. *et al.* The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget* **6**, 22513–25 (2015).
109. Lin, C. *et al.* Transcriptional and posttranscriptional regulation of HOXA13 by lncRNA HOTTIP facilitates tumorigenesis and metastasis in esophageal squamous carcinoma cells. *Oncogene* (2017). doi:10.1038/onc.2017.133
110. Wang, B. *et al.* Increased MIR31HG lncRNA expression increases gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines through the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol. Lett.* **13**, 3494–3500 (2017).
111. Jiang, Z. *et al.* lincIN, a novel NF90-binding long non-coding RNA, is overexpressed in advanced breast tumors and involved in metastasis. *Breast Cancer Res.* **19**, 62 (2017).
112. Liu, J., Lin, J., Li, Y., Zhang, Y. & Chen, X. Prognostic role of lncRNA TUG1 for cancer outcome: Evidence from 840 cancer patients. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.17844
113. Zhu, F.-F., Zheng, F.-Y., Wang, H.-O., Zheng, J.-J. & Zhang, Q. Downregulation of lncRNA TUBA4B is Associated with Poor Prognosis for Epithelial Ovarian Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* (2017). doi:10.1007/s12253-017-0258-7
114. Lü, L. *et al.* Identification of circular RNAs as a promising new class of diagnostic biomarkers for human breast cancer. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.17307
115. Zhang, P. *et al.* Identification of differentially expressed circular RNAs in human colorectal cancer. *Tumor Biol.* **39**, 101042831769454 (2017).
116. Han, D. *et al.* Circular RNA MTO1 acts as the sponge of miR-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* (2017). doi:10.1002/hep.29270



117. Shao, Y. *et al.* Decreased expression of hsa\_circ\_0001895 in human gastric cancer and its clinical significances. *Tumor Biol.* **39**, 101042831769912 (2017).
118. Chen, L. *et al.* circRNA\_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family. *Oncogene* (2017). doi:10.1038/onc.2017.89
119. Zhao, Z.-J. & Shen, J. Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer. *RNA Biol.* **14**, 514–521 (2017).
120. Meng, S. *et al.* CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer. *Mol. Cancer* **16**, 94 (2017).
121. Cole, C. *et al.* Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA* **15**, 2147–2160 (2009).
122. Li, Z. *et al.* Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6787–6799 (2012).
123. Lee, Y. S., Shibata, Y., Malhotra, A. & Dutta, A. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.* **23**, 2639–2649 (2009).
124. Martens-Uzunova, E. S., Olvedy, M. & Jenster, G. Beyond microRNA ? Novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. *Cancer Lett.* **340**, 201–211 (2013).
125. Fu, Y., Lee, I., Lee, Y. S. & Bao, X. Small Non-coding Transfer RNA-Derived RNA Fragments (tRFs): Their Biogenesis, Function and Implication in Human Diseases. *Genomics Inform.* **13**, 94–101 (2015).
126. Sobala, A. & Hutvagner, G. Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA Biol.* **10**, 553–63 (2013).
127. Olvedy, M. *et al.* A comprehensive repertoire of tRNA-derived fragments in prostate cancer. *Oncotarget* **7**, 24766–77 (2016).
128. Shao, Y. *et al.* tRF-Leu-CAG promotes cell proliferation and cell cycle in non-

- small cell lung cancer. *Chem. Biol. Drug Des.* (2017). doi:10.1111/cbdd.12994
129. Goodarzi, H. *et al.* Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. *Cell* **161**, 790–802 (2015).
130. Schäfer, V. *et al.* EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 1641–1650 (2016).
131. Zhang, X., Wei, C., Li, J., Liu, J. & Qu, J. MicroRNA-194 represses glioma cell epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Bmi1. *Oncol. Rep.* **37**, 1593–1600 (2017).
132. Liu, C. *et al.* Hypermethylation of miRNA-589 promoter leads to upregulation of HDAC5 which promotes malignancy in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* **50**, 2079–2090 (2017).
133. Elkhadragy, L., Chen, M., Miller, K., Yang, M.-H. & Long, W. A regulatory BMI1/let-7i/ERK3 pathway controls the motility of head and neck cancer cells. *Mol. Oncol.* **11**, 194–207 (2017).
134. Berindan-Neagoe, I., Monroig, P. del C., Pasculli, B. & Calin, G. A. MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA. Cancer J. Clin.* **64**, 311–336 (2014).
135. Miremedi, A., Oestergaard, M. Z., Pharoah, P. D. P. & Caldas, C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum. Mol. Genet.* **16**, R28–R49 (2007).
136. Karpf, A. R. & Matsui, S. Genetic Disruption of Cytosine DNA Methyltransferase Enzymes Induces Chromosomal Instability in Human Cancer Cells. *Cancer Res.* **65**, 8635–8639 (2005).
137. Feinberg, A. P., Koldobskiy, M. A. & Göndör, A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 284–99 (2016).
138. DeSantis, C. E. *et al.* International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomarkers* **24**, (2015).

139. Youlden, D. R. *et al.* The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* **36**, 237–248 (2012).
140. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
141. Anders, C. K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M. & Bleyer, A. Breast cancer before age 40 years. *Semin. Oncol.* **36**, 237–49 (2009).
142. Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R. & Viale, G. Breast cancer. *Lancet* **365**, 1727–1741 (2005).
143. Azim, H. A. *et al.* Elucidating Prognosis and Biology of Breast Cancer Arising in Young Women Using Gene Expression Profiling. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1341–1351 (2012).
144. Fredholm, H. *et al.* Breast Cancer in Young Women: Poor Survival Despite Intensive Treatment. *PLoS One* **4**, e7695 (2009).
145. Gnerlich, J. L. *et al.* Poorer Survival Outcomes for Male Breast Cancer Compared with Female Breast Cancer May Be Attributable to In-Stage Migration. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 1837–1844 (2011).
146. Gathani, T. *et al.* Ethnic differences in breast cancer incidence in England are due to differences in known risk factors for the disease: prospective study. *Br. J. Cancer* **110**, 224–9 (2014).
147. Chlebowski, R. T. *et al.* Ethnicity and Breast Cancer: Factors Influencing Differences in Incidence and Outcome. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 439–448 (2005).
148. Lalloo, F. & Evans, D. G. Familial Breast Cancer. *Clin. Genet.* **82**, 105–114 (2012).
149. Ghossaini, M. *et al.* Inherited Genetic Susceptibility to Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* **183**, 1038–1051 (2013).

150. Fostira, F. *et al.* Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 353–362 (2012).
151. Antoniou, A. *et al.* Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1117–1130 (2003).
152. Wang, Y. *et al.* BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* **14**, 927–39 (2000).
153. Levy-Lahad, E. & Friedman, E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br. J. Cancer* **96**, 11–5 (2007).
154. Thorlacius, S. *et al.* Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet (London, England)* **352**, 1337–9 (1998).
155. Narod, S. A. & Foulkes, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 665–676 (2004).
156. Apostolou, P. & Fostira, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res. Int.* **2013**, 747318 (2013).
157. Weischer, M., Bojesen, S. E., Ellervik, C., Tybjørg-Hansen, A. & Nordestgaard, B. G. *CHEK2* \*1100delC Genotyping for Clinical Assessment of Breast Cancer Risk: Meta-Analyses of 26,000 Patient Cases and 27,000 Controls. *J. Clin. Oncol.* **26**, 542–548 (2008).
158. Ahmed, M. & Rahman, N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* **25**, 5906–5911 (2006).
159. Chun, H. H. & Gatti, R. A. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1187–1196 (2004).
160. Cuzick, J., Sestak, I. & Thorat, M. A. Impact of preventive therapy on the risk of

- breast cancer among women with benign breast disease. *Breast* **24 Suppl 2**, S51-5 (2015).
161. Sieri, S. *et al.* Sex Hormone Levels, Breast Cancer Risk, and Cancer Receptor Status in Postmenopausal Women: the ORDET Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 169–176 (2009).
162. Samavat, H. & Kurzer, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* **356**, 231–243 (2015).
163. Marchbanks, P. A. *et al.* Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 2025–2032 (2002).
164. Ban, K. A. & Godellas, C. V. Epidemiology of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **23**, 409–422 (2014).
165. Colditz, G. A., Bohlke, K. & Berkey, C. S. Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 567–79 (2014).
166. Hsieh, C. C., Trichopoulos, D., Katsouyanni, K. & Yuasa, S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int. J. cancer* **46**, 796–800 (1990).
167. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, C. G. on H. F. in B. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet. Oncol.* **13**, 1141–51 (2012).
168. Shah, R., Rosso, K. & Nathanson, S. D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 283–98 (2014).
169. Feola, A. *et al.* Multifaceted Breast Cancer: The Molecular Connection With Obesity. *J. Cell. Physiol.* **232**, 69–77 (2017).
170. Xia, H., Ma, S., Wang, S. & Sun, G. Meta-Analysis of Saturated Fatty Acid Intake and Breast Cancer Risk. *Medicine (Baltimore).* **94**, e2391 (2015).

171. Li, C., Yang, L., Zhang, D. & Jiang, W. Systematic review and meta-analysis suggest that dietary cholesterol intake increases risk of breast cancer. *Nutr. Res.* **36**, 627–635 (2016).
172. Cao, Y., Hou, L. & Wang, W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Int. J. Cancer* **138**, 1894–1904 (2016).
173. de Lorgeril, M. & Salen, P. Helping women to good health: breast cancer, omega-3/omega-6 lipids, and related lifestyle factors. *BMC Med.* **12**, 54 (2014).
174. Witte, T. R. & Hardman, W. E. The Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Consumption on Mammary Carcinogenesis. *Lipids* **50**, 437–446 (2015).
175. Seitz, H. K., Pelucchi, C., Bagnardi, V. & Vecchia, C. L. Epidemiology and Pathophysiology of Alcohol and Breast Cancer: Update 2012. *Alcohol Alcohol.* **47**, 204–212 (2012).
176. Romieu, I. *et al.* Alcohol intake and breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int. J. Cancer* **137**, 1921–1930 (2015).
177. de Boer, M. C., Wörner, E. A., Verlaan, D. & van Leeuwen, P. A. M. The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **17**, 272–278 (2017).
178. Martelotto, L. G., Ng, C. K., Piscuoglio, S., Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res.* **16**, 210 (2014).
179. Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J. Cancer* **7**, 1281–94 (2016).
180. Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S. & Paryan, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biol.* **37**, 14479–14499 (2016).
181. Sinn, H.-P. & Kreipe, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition.

- Breast Care (Basel)*. **8**, 149–54 (2013).
182. Elston, C. W. & Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403–10 (1991).
183. Giuliano, A. E. *et al.* Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* (2017). doi:10.3322/caac.21393
184. Rivenbark, A. G. *et al.* Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* **183**, 1113–1124 (2013).
185. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **24**, 2206–23 (2013).
186. Cheang, M. C. U. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736–750 (2009).
187. Prat, A. *et al.* Prognostic Significance of Progesterone Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 203–209 (2013).
188. Yersal, O. & Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 412–24 (2014).
189. Kwa, M., Makris, A. & Esteva, F. J. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2017). doi:10.1038/nrclinonc.2017.74
190. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
191. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).

192. Rouzier, R. *et al.* Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5678–5685 (2005).
193. Sotiriou, C. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10393–8 (2003).
194. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869–10874 (2001).
195. Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* **24**, S26–S35 (2015).
196. Koletsa, T. *et al.* EGFR expression and activation are common in HER2 positive and triple-negative breast tumours. *Histol. Histopathol.* **25**, 1171–9 (2010).
197. Toss, A. & Cristofanilli, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **17**, 60 (2015).
198. Foulkes, W. D. *et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1482–5 (2003).
199. Prat, A. *et al.* Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* **18**, 123–33 (2013).
200. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–67 (2011).
201. Sabatier, R. *et al.* Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol. Cancer* **13**, 228 (2014).
202. Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 698–707 (2012).



203. Sparano, J. A. *et al.* Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2005–2014 (2015).
204. Paik, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2817–26 (2004).
205. Goldstein, L. J. *et al.* Prognostic Utility of the 21-Gene Assay in Hormone Receptor–Positive Operable Breast Cancer Compared With Classical Clinicopathologic Features. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4063–4071 (2008).
206. Gnant, M. *et al.* Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **25**, 339–45 (2014).
207. Parker, J. S. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
208. Cardoso, F. *et al.* 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 717–729 (2016).
209. Harris, L. N. *et al.* Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol.* **34**, 1134–50 (2016).
210. Albain, K. S. *et al.* Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* **11**, 55–65 (2010).
211. Paik, S. *et al.* Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3726–3734 (2006).
212. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from

- BRCA Mutation Carriers. *n engl j med* **361**, 1056–1064 (2009).
213. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
214. Pfeffer, S. *et al.* Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* (80- ). **304**, 734–736 (2004).
215. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
216. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).
217. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).
218. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
219. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–240 (2004).
220. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027 (2004).
221. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Efficient Processing of Primary microRNA Hairpins by Drosha Requires Flanking Nonstructured RNA Sequences. *J. Biol. Chem.* **280**, 27595–27603 (2005).
222. Han, J. *et al.* Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).
223. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3026 (2003).
224. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat.*

- Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139 (2009).
225. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655 (2009).
226. Haase, A. D. *et al.* TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* **6**, 961–967 (2005).
227. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
228. Lytle, J. R., Yario, T. A. & Steitz, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9667–9672 (2007).
229. Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell* **30**, 460–471 (2008).
230. Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J. & Dahiya, R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1608–1613 (2008).
231. Mandke, P. *et al.* MicroRNA-34a Modulates MDM4 Expression via a Target Site in the Open Reading Frame. *PLoS One* **7**, e42034 (2012).
232. Ma, F. *et al.* MicroRNA-466l Upregulates IL-10 Expression in TLR-Triggered Macrophages by Antagonizing RNA-Binding Protein Tristetraprolin-Mediated IL-10 mRNA Degradation. *J. Immunol.* **184**, 6053–6059 (2010).
233. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–9 (2002).
234. Iorio, M. V & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* **4**, 143–59 (2012).

235. Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 2257–2261 (2006).
236. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
237. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269 (2006).
238. Di Leva, G., Garofalo, M. & Croce, C. M. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 287–314 (2014).
239. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2999–3004 (2004).
240. Jansson, M. D. & Lund, A. H. MicroRNA and cancer. *Mol. Oncol.* **6**, 590–610 (2012).
241. Formosa, A. *et al.* DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene* **32**, 127–134 (2013).
242. Brueckner, B. *et al.* The Human let-7a-3 Locus Contains an Epigenetically Regulated MicroRNA Gene with Oncogenic Function. *Cancer Res.* **67**, 1419–1423 (2007).
243. Fabbri, M. *et al.* MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15805–15810 (2007).
244. Garzon, R. *et al.* MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* **113**, 6411–6418 (2009).
245. O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V. & Mendell, J. T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**, 839–843 (2005).

246. Mott, J. L. *et al.* Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J. Cell. Biochem.* **110**, 1155–1164 (2010).
247. Corney, D. C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A. K., Wang, W. & Nikitin, A. Y. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c Are Targets of p53 and Cooperate in Control of Cell Proliferation and Adhesion-Independent Growth. *Cancer Res.* **67**, 8433–8438 (2007).
248. Hata, A. & Kashima, R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 121–134 (2016).
249. Mayr, C., Hemann, M. T. & Bartel, D. P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* **315**, 1576–9 (2007).
250. Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **65**, (2005).
251. Farazi, T. A. *et al.* MicroRNA Sequence and Expression Analysis in Breast Tumors by Deep Sequencing. *Cancer Res.* **71**, 4443–4453 (2011).
252. van Schooneveld, E. *et al.* Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res.* **14**, R34 (2012).
253. Volinia, S. *et al.* Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 3024–3029 (2012).
254. Lowery, A. J. *et al.* MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neureceptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **11**, R27 (2009).
255. Mattie, M. D. *et al.* Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol. Cancer* **5**, 24 (2006).
256. Cava, C. *et al.* Integration of mRNA Expression Profile, Copy Number

- Alterations, and microRNA Expression Levels in Breast Cancer to Improve Grade Definition. *PLoS One* **9**, e97681 (2014).
257. Dvinge, H. *et al.* The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* **497**, 378–382 (2013).
258. Blenkiron, C. *et al.* MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* **8**, R214 (2007).
259. de Rinaldis, E. *et al.* Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics* **14**, 643 (2013).
260. van Schooneveld, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res.* **17**, 21 (2015).
261. Giricz, O. *et al.* Hsa-miR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity. *J. Pathol.* **226**, 108–119 (2012).
262. Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* **5**, 1122–1143 (2015).
263. Kleivi Sahlberg, K. *et al.* A Serum MicroRNA Signature Predicts Tumor Relapse and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **21**, (2015).
264. Jung, E.-J. *et al.* Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer* **118**, 2603–14 (2012).
265. Sun, Y. *et al.* Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer. *PLoS One* **7**, e47003 (2012).
266. Chhabra, R. & Saini, N. microRNAs in cancer stem cells: current status and

- future directions. *Tumor Biol.* **35**, 8395–8405 (2014).
267. Cai, W.-Y. *et al.* The Wnt- -catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *J. Cell Sci.* **126**, 2877–2889 (2013).
268. Yu, F. *et al.* let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* **131**, 1109–1123 (2007).
269. Shimono, Y., Mukohyama, J., Nakamura, S.-I. & Minami, H. MicroRNA Regulation of Human Breast Cancer Stem Cells. *J. Clin. Med.* **5**, (2015).
270. Humphries, B. & Yang, C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget* **6**, 6472–6498 (2015).
271. Garofalo, M., Quintavalle, C., Romano, G., Croce, C. M. & Condorelli, G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr. Mol. Med.* **12**, 27–33 (2012).
272. Roscigno, G. *et al.* MiR-221 promotes stemness of breast cancer cells by targeting DNMT3b. *Oncotarget* **7**, 580–592 (2016).
273. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Res.* **69**, 4116–4124 (2009).
274. Morel, A.-P. *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, e2888 (2008).
275. Mani, S. A. *et al.* The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
276. Serpico, D., Molino, L. & Di Cosimo, S. microRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 595–604 (2014).
277. Song, S. J. *et al.* MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via TET-Family-Dependent Chromatin Remodeling. *Cell* **154**,

- 311–324 (2013).
278. Stenvang, J. & Kauppinen, S. MicroRNAs as targets for antisense-based therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 59–81 (2008).
279. Krützfeldt, J. *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* **438**, 685–689 (2005).
280. Si, M.-L. *et al.* miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* **26**, 2799–2803 (2007).
281. Krützfeldt, J. *et al.* Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2885–92 (2007).
282. Garzon, R., Marcucci, G. & Croce, C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 775–89 (2010).
283. Lu, Y. *et al.* A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res.* **37**, e24–e24 (2009).
284. Ebert, M. S., Neilson, J. R. & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* **4**, 721–726 (2007).
285. Loya, C. M., Lu, C. S., Van Vactor, D. & Fulga, T. A. Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms. *Nat. Methods* **6**, 897–903 (2009).
286. Liang, A.-L. *et al.* miRNA-10b sponge: An anti-breast cancer study in vitro. *Oncol. Rep.* **35**, 1950–8 (2016).
287. Choi, W.-Y., Giraldez, A. J. & Schier, A. F. Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430. *Science (80-. )*. **318**, 271–274 (2007).
288. Beg, M. S. *et al.* Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **35**, 180–188 (2017).



289. Aagaard, L. & Rossi, J. J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 75–86 (2007).
290. Annoni, A. *et al.* In vivo delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance. *Blood* **114**, 5152–5161 (2009).
291. Kota, J. *et al.* Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model. *Cell* **137**, 1005–1017 (2009).
292. Zuhorn, I. S., Engberts, J. B. F. N. & Hoekstra, D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J.* **36**, 349–362 (2007).
293. Rosi, N. L. *et al.* Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science (80-. )*. **312**, (2006).
294. Chirila, T. V, Rakoczy, P. E., Garrett, K. L., Lou, X. & Constable, I. J. The use of synthetic polymers for delivery of therapeutic antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials* **23**, 321–42 (2002).
295. Sigalotti, L. *et al.* Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: Biomolecular aspects and clinical applications. *J. Cell. Physiol.* **212**, 330–344 (2007).
296. Friedman, J. M. *et al.* The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2. *Cancer Res.* **69**, 2623–2629 (2009).
297. Saito, Y. *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9**, 435–443 (2006).
298. Gumireddy, K. *et al.* Small-molecule inhibitors of microrna miR-21 function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 7482–4 (2008).
299. Artero-Castro, A. *et al.* Cold-inducible RNA-binding protein bypasses replicative senescence in primary cells through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1855–68 (2009).

300. Yan, L. X. *et al.* Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast Cancer Res.* **13**, R2 (2011).
301. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
302. Borgdorff, V. *et al.* Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene* **29**, 2262–2271 (2010).
303. Gregory, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
304. Scott, G. K. *et al.* Coordinate Suppression of ERBB2 and ERBB3 by Enforced Expression of Micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J. Biol. Chem.* **282**, 1479–1486 (2007).
305. Le, M. T. N. *et al.* MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* **23**, 862–76 (2009).
306. Huang, L. *et al.* MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *Int. J. cancer* **128**, 1758–69 (2011).
307. Le, M. T. N. *et al.* Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. *PLoS Genet.* **7**, e1002242 (2011).
308. Mohri, T., Nakajima, M., Takagi, S., Komagata, S. & Yokoi, T. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int. J. Cancer* **125**, 1328–1333 (2009).
309. Hannafon, B. N., Sebastiani, P., de las Morenas, A., Lu, J. & Rosenberg, C. L. Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* **13**, R24 (2011).
310. Janssen, E. A. M. *et al.* Biologic profiling of lymph node negative breast cancers by means of microRNA expression. *Mod. Pathol.* **23**, 1567–1576

- (2010).
311. Antolín, S. *et al.* Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer. *BMC Cancer* **15**, 297 (2015).
  312. Li, J. *et al.* Low levels of serum miR-99a is a predictor of poor prognosis in breast cancer. *Genet. Mol. Res.* **15**, (2016).
  313. Li, W. *et al.* Decreased expression of miR-204 is associated with poor prognosis in patients with breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 3287–92 (2014).
  314. Liu, B. *et al.* Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer. *Oncol. Rep.* **35**, 3178–84 (2016).
  315. Buffa, F. M. *et al.* microRNA-Associated Progression Pathways and Potential Therapeutic Targets Identified by Integrated mRNA and microRNA Expression Profiling in Breast Cancer. *Cancer Res.* **71**, 5635–5645 (2011).
  316. Chen, L. *et al.* Role of Deregulated microRNAs in Breast Cancer Progression Using FFPE Tissue. *PLoS One* **8**, e54213 (2013).
  317. Feliciano, A. *et al.* miR-125b Acts as a Tumor Suppressor in Breast Tumorigenesis via Its Novel Direct Targets ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, and MEGF9. *PLoS One* **8**, e76247 (2013).
  318. Yan, L.-X. *et al.* MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* **14**, 2348–2360 (2008).
  319. Liang, L. *et al.* MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatology* **52**, 1731–40 (2010).
  320. Xu, N. *et al.* MiR-125b, a MicroRNA Downregulated in Psoriasis, Modulates Keratinocyte Proliferation by Targeting FGFR2. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1521–1529 (2011).

321. Lukiw, W. J. & Alexandrov, P. N. Regulation of Complement Factor H (CFH) by Multiple miRNAs in Alzheimer's Disease (AD) Brain. *Mol. Neurobiol.* **46**, 11–19 (2012).
322. Guan, Y., Yao, H., Zheng, Z., Qiu, G. & Sun, K. MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation. *Int. J. Cancer* **128**, 2274–2283 (2011).
323. Kappelmann, M., Kuphal, S., Meister, G., Vardimon, L. & Bosserhoff, A.-K. MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene* **32**, 2984–91 (2013).
324. Xia, H.-F. *et al.* MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf. *Cell. Physiol. Biochem.* **23**, 347–58 (2009).
325. Gong, J. *et al.* MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene* **32**, 3071–3079 (2013).
326. Zhang, Y. *et al.* miR-125b Is Methylated and Functions as a Tumor Suppressor by Regulating the ETS1 Proto-oncogene in Human Invasive Breast Cancer. *Cancer Res.* **71**, 3552–3562 (2011).
327. Liu, L. *et al.* miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 31–8 (2011).
328. Amir, S. *et al.* Oncomir miR-125b suppresses p14(ARF) to modulate p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer. *PLoS One* **8**, e61064 (2013).
329. Bousquet, M., Harris, M. H., Zhou, B. & Lodish, H. F. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21558–63 (2010).
330. Baffa, R. *et al.* MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J. Pathol.* **219**, 214–221 (2009).
331. Shi, X.-B. *et al.* An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* **104**, 19983–19988 (2007).
332. Zhao, A. *et al.* MicroRNA-125b Induces Cancer Cell Apoptosis Through Suppression of Bcl-2 Expression. *J. Genet. Genomics* **39**, 29–35 (2012).
333. Cui, F. *et al.* MiR-125b Inhibits Tumor Growth and Promotes Apoptosis of Cervical Cancer Cells by Targeting Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit Delta. *Cell. Physiol. Biochem.* **30**, 1310–1318 (2012).
334. Drukker, M. *et al.* Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **30**, 531–542 (2012).
335. Song, L. & Healy, D. P. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **33**, 746–52 (1999).
336. Nanus, D. M. *et al.* Molecular cloning of the human kidney differentiation antigen gp160: human aminopeptidase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7069–73 (1993).
337. Fernandez, L. A., Twickler, J. & Mead, A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J. Lab. Clin. Med.* **105**, 141–5 (1985).
338. Andrade, S. P., Cardoso, C. C., Machado, R. D. P. & Beraldo, W. T. Angiotensin-II-Induced Angiogenesis in Sponge Implants in Mice. *Int. J. Microcirc.* **16**, 302–307 (2008).
339. Juillerat-Jeanneret, L., Lohm, S., Hamou, M.-F. & Pinet, F. Regulation of Aminopeptidase A in Human Brain Tumor Vasculature: Evidence for a Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Lab. Investig.* **80**, 973–980 (2000).
340. Marchiò, S. *et al.* Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell* **5**, 151–62 (2004).
341. Ramírez-Expósito, M. J. *et al.* Silver(I)/6-hydroxyiminolumazine compounds differently modify renin–angiotensin system-regulating aminopeptidases A and N in human neuroblastoma and glioma cells. *J. Inorg. Biochem.* **138**, 56–63 (2014).

342. Mayas, M. D., Ramírez-Expósito, M. J., Carrera, M. P., Cobo, M. & Martínez-Martos, J. M. Renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases in tumor growth of rat C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Anticancer Res.* **32**, 3675–82 (2012).
343. Suganuma, T. *et al.* Regulation of aminopeptidase A expression in cervical carcinoma: role of tumor–stromal interaction and vascular endothelial growth factor. *Lab. Investig.* **84**, 639–648 (2004).
344. del Pilar Carrera, M., Ramírez-Expósito, M. J., Mayas, M. D., García, M. J. & Martínez-Martos, J. M. Mammary renin–angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in rats with breast cancer. *Tumor Biol.* **31**, 583–588 (2010).
345. Chuang, H.-Y. *et al.* Aminopeptidase A initiates tumorigenesis and enhances tumor cell stemness via TWIST1 upregulation in colorectal cancer. *Oncotarget* **8**, 21266–21280 (2017).
346. MEGGIO, F. & Pinna, L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* **17**, 349–368 (2003).
347. Guerra, B. & Issinger, O.-G. Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1870–86 (2008).
348. Pinna, L. A. & Meggio, F. in *Progress in Cell Cycle Research* 77–97 (Springer US, 1997). doi:10.1007/978-1-4615-5371-7\_7
349. Landesman-Bollag, E. *et al.* Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* **20**, 3247–3257 (2001).
350. O-charoenrat, P. *et al.* Casein Kinase II Alpha Subunit and C1-Inhibitor Are Independent Predictors of Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5792–5803 (2004).
351. Laramas, M. *et al.* Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2 $\alpha$ ) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur. J. Cancer* **43**, 928–934 (2007).

352. Lin, K.-Y. *et al.* Overexpression of nuclear protein kinase CK2  $\alpha$  catalytic subunit (CK2 $\alpha$ ) as a poor prognosticator in human colorectal cancer. *PLoS One* **6**, e17193 (2011).
353. Stalter, G. *et al.* Asymmetric Expression of Protein Kinase CK2 Subunits in Human Kidney Tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 141–147 (1994).
354. Kim, J. S. *et al.* Protein Kinase CK2 as an Unfavorable Prognostic Marker and Novel Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1019–1028 (2007).
355. Münstermann, U. *et al.* Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur. J. Biochem.* **189**, 251–7 (1990).
356. Liu, R. *et al.* The Prognostic Role of a Gene Signature from Tumorigenic Breast-Cancer Cells. *N. Engl. J. Med.* **356**, 217–226 (2007).
357. Giusiano, S. *et al.* Protein kinase CK2 $\alpha$  subunit over-expression correlates with metastatic risk in breast carcinomas: quantitative immunohistochemistry in tissue microarrays. *Eur. J. Cancer* **47**, 792–801 (2011).
358. Zhang, H.-X. *et al.* Protein kinase CK2 $\alpha$  catalytic subunit is overexpressed and serves as an unfavorable prognostic marker in primary hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **6**, 34800–17 (2015).
359. Zou, J. *et al.* Protein kinase CK2 $\alpha$  is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes. *J. Transl. Med.* **9**, 97 (2011).
360. Brown, M. S. *et al.* CK2 Modulation of NF- $\kappa$ B, TP53, and the Malignant Phenotype in Head and Neck Cancer by Anti-CK2 Oligonucleotides In vitro or In vivo via Sub-50-nm Nanocapsules. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2295–2307 (2010).
361. Zhang, F., Yang, B., Shi, S. & Jiang, X. RNA interference (RNAi) mediated stable knockdown of protein casein kinase 2-alpha (CK2 $\alpha$ ) inhibits migration and invasion and enhances cisplatin-induced apoptosis in HEP-2 laryngeal

- carcinoma cells. *Acta Histochem.* **116**, 1000–1006 (2014).
362. Ku, M. J. *et al.* CK2 inhibitor CX4945 induces sequential inactivation of proteins in the signaling pathways related with cell migration and suppresses metastasis of A549 human lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 5609–5613 (2013).
363. Siddiqui-Jain, A. *et al.* CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* **70**, 10288–10298 (2010).
364. St-Denis, N. A. & Litchfield, D. W. Protein Kinase CK2 in Health and Disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1817–1829 (2009).
365. Kim, H. S. *et al.* Oncogenic potential of CK2 $\alpha$  and its regulatory role in EGF-induced HDAC2 expression in human liver cancer. *FEBS J.* **281**, 851–861 (2014).
366. Brandt-Bohne, U., Keene, D. R., White, F. A. & Koch, M. MEGF9: a novel transmembrane protein with a strong and developmentally regulated expression in the nervous system. *Biochem. J.* **401**, 447–57 (2007).
367. Dowgiert, J., Sosne, G. & Kurpakus-Wheater, M. Laminin-2 stimulates the proliferation of epithelial cells in a conjunctival epithelial cell line. *Cell Prolif.* **37**, 161–175 (2004).
368. Haritunians, T. *et al.* CADASIL Notch3 mutant proteins localize to the cell surface and bind ligand. *Circ. Res.* **90**, 506–8 (2002).
369. Luo, B.-H. *et al.* Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7 (EGFL7) enhances EGF receptor-AKT signaling, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis of gastric cancer cells. *PLoS One* **9**, e99922 (2014).
370. Bai, S. *et al.* EGFL6 Regulates the Asymmetric Division, Maintenance, and Metastasis of ALDH<sup>+</sup> Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* **76**, 6396–6409 (2016).
371. Cunha, I. W. *et al.* Identification of genes associated with local aggressiveness



- and metastatic behavior in soft tissue tumors. *Transl. Oncol.* **3**, 23–32 (2010).
372. Kolonin, M. G. & Finley, R. L. A Role for Cyclin J in the Rapid Nuclear Division Cycles of Early *Drosophila* Embryogenesis. *Dev. Biol.* **227**, 661–672 (2000).
373. Finley, R. L., Thomas, B. J., Zipursky, S. L., Brent, R. & Brent, R. Isolation of *Drosophila* cyclin D, a protein expressed in the morphogenetic furrow before entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3011–5 (1996).
374. Harvey, R. C. *et al.* Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* **116**, 4874–4884 (2010).
375. Ting, H.-J., Messing, J., Yasmin-Karim, S. & Lee, Y.-F. Identification of microRNA-98 as a Therapeutic Target Inhibiting Prostate Cancer Growth and a Biomarker Induced by Vitamin D. *J. Biol. Chem.* **288**, 1–9 (2013).
376. Sun, X. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR regulates cyclin J via inhibition of microRNA-205 expression in bladder cancer. *Cell Death Dis.* **6**, e1907 (2015).
377. Shi, L. *et al.* Up-regulation of miR-146a increases the sensitivity of non-small cell lung cancer to DDP by downregulating cyclin J. *BMC Cancer* **17**, 138 (2017).
378. Cui, Y. *et al.* MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin. *BMC Neurosci.* **13**, 116 (2012).
379. Wu, L. & Belasco, J. G. Micro-RNA regulation of the mammalian *lin-28* gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9198–208 (2005).
380. Ferretti, E. *et al.* Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J.* **27**, 2616–27 (2008).
381. Schopman, N. C. T., Heynen, S., Haasnoot, J. & Berkhout, B. A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA. *RNA Biol.* **7**, 573–576 (2010).

382. de Hoon, M. J. L. *et al.* Cross-mapping and the identification of editing sites in mature microRNAs in high-throughput sequencing libraries. *Genome Res.* **20**, 257–264 (2010).
383. Guo, L. *et al.* Cross-Mapping Events in miRNAs Reveal Potential miRNA-Mimics and Evolutionary Implications. *PLoS One* **6**, e20517 (2011).
384. Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S. B. & Dutta, A. Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biol.* **12**, 78 (2014).
385. Keam, S. P. & Hutvagner, G. tRNA-Derived Fragments (tRFs): Emerging New Roles for an Ancient RNA in the Regulation of Gene Expression. *Life (Basel, Switzerland)* **5**, 1638–51 (2015).
386. Maute, R. L. *et al.* tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1404–1409 (2013).
387. Telonis, A. G. *et al.* Dissecting tRNA-derived fragment complexities using personalized transcriptomes reveals novel fragment classes and unexpected dependencies. *Oncotarget* **6**, 24797–24822 (2015).
388. Venkatesh, T., Suresh, P. S. & Tsutsumi, R. tRFs: miRNAs in disguise. *Gene* **579**, 133–138 (2016).
389. Sand, M. *et al.* Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res.* **351**, 85–98 (2013).
390. Weixin Wang, *by et al.* MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response.  
doi:10.3324/haematol.2011.048132
391. Nerv Syst, C., Samis, J., Vanin, E. F. & Treiger, S. Child's Nervous System

- Extensive miRNA expression analysis in craniopharyngiomas. *Child's Nerv. Syst.* doi:10.1007/s00381-016-3131-1
392. Yoshino, H. *et al.* microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **8**, 20881–20894 (2017).
393. Shinozuka, E. *et al.* SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 101–106 (2013).
394. Guzman, N. *et al.* Breast Cancer–Specific miR Signature Unique to Extracellular Vesicles Includes ‘microRNA-like’ tRNA Fragments. *Mol. Cancer Res.* **13**, (2015).
395. Haussecker, D. *et al.* Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* **16**, 673–695 (2010).
396. Pavon-Eternod, M. *et al.* tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7268–7280 (2009).
397. Lu, L. *et al.* Regulation of the expression of zinc finger protein genes by microRNAs enriched within acute lymphoblastic leukemia-derived microvesicles. *funpecrp.com.br Genet. Mol. Res. Mol. Res* **14**, 11884–11895 (2015).
398. De Veirman, K. *et al.* Induction of miR-146a by multiple myeloma cells in mesenchymal stromal cells stimulates their pro-tumoral activity. *Cancer Lett.* **377**, 17–24 (2016).
399. Wang, G.-J., Liu, G.-H., Ye, Y.-W., Fu, Y. & Zhang, X.-F. The role of microRNA-1274a in the tumorigenesis of gastric cancer: Accelerating cancer cell proliferation and migration via directly targeting FOXO4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **459**, 629–635 (2015).
400. Zhou, C. *et al.* microRNA - 1274a , a modulator of sorafenib induced a disintegrin and metalloproteinase 9 ( ADAM9 ) down - regulation in

- hepatocellular carcinoma. (2011). doi:10.1016/j.febslet.2011.04.040
401. Madhavan, D. *et al.* Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis* **37**, 461–470 (2016).
402. Khan, F. H. *et al.* Reorganization of metastamiRs in the evolution of metastatic aggressive neuroblastoma cells. *BMC Genomics* **16**, 501 (2015).
403. Moltzahn, F. *et al.* Tumor and Stem Cell Biology Microfluidic-Based Multiplex qRT-PCR Identifies Diagnostic and Prognostic microRNA Signatures in the Sera of Prostate Cancer Patients. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1229
404. Kim, C. G. *et al.* Role of Forkhead Box Class O proteins in cancer progression and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* (2017). doi:10.1016/j.semcancer.2017.07.007
405. Su, L. *et al.* The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer* **14**, 378 (2014).
406. Li, H. *et al.* MiR-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4. *Sci. Rep.* **6**, 39001 (2016).
407. Xu, M.-M. *et al.* Low expression of the FoxO4 gene may contribute to the phenomenon of EMT in non-small cell lung cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 4013–8 (2014).
408. Kim, S. H., Miller, F. R., Tait, L., Zheng, J. & Novak, R. F. Proteomic and phosphoproteomic alterations in benign, premalignant and tumor human breast epithelial cells and xenograft lesions: Biomarkers of progression. *Int. J. Cancer* **124**, 2813–2828 (2009).
409. Bonnomet, A. *et al.* A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* **31**, 3741–3753 (2012).
410. Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to

- bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).
411. Sheridan, C. *et al.* CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* **8**, R59 (2006).
412. Holliday, D. L. & Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* **13**, 215 (2011).





# ANEXO





## ANEXO.

Artículos publicados durante la tesis doctoral por orden cronológico:

- **miR-99a reveals two novel oncogenic proteins E2F2 and EMR2 and represses stemness in lung cancer.**  
Feliciano A, Garcia-Mayea Y, Jubierre L, Mir C, Hummel M, Castellvi J, Hernández-Losa J, Paciucci R, Sansano I, Ramón y Cajal S, Kondon H3, Soriano A, Segura M, Lyakhovich A, LLeonart ME.  
Cell death and Disease. 2017. *In press (En prensa)*.
- **Disruption of the ribosomal P complex leads to stress-induced autophagy.** Artero-Castro A, Perez-Alea M, Feliciano A, Leal JA, Genestar M, Castellvi J, Peg V, Ramón Y Cajal S, Lleonart ME. *Autophagy*. 2015;11(9):1499-519.
- **miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, and MEGF9.**  
Feliciano A, Castellvi J, Artero-Castro A, Leal JA, Romagosa C, Hernández-Losa J, Peg V, Fabra A, Vidal F, Kondoh H, Ramón Y Cajal S, Lleonart ME. *PLoS One*. 2013 Oct 3;8(10):e76247. doi: 10.1371/journal.pone.0076247.
- **Stem cell microRNAs in senescence and immortalization: novel players in cancer therapy.**  
Feliciano A, Leal JA, Lleonart ME.  
*Med Res Rev*. 2013 Jan;33(1):112-38. doi: 10.1002/med.20246. Review.
- **MicroRNAs Regulate Key Effector Pathways of Senescence.**  
Feliciano A, Sánchez-Sendra B, Kondoh H, Lleonart ME.  
*J Aging Res*. 2011;2011:205378. doi: 10.4061/2011/205378. Review.





# AGRADECIMIENTOS



## AGRADECIMIENTOS.

Ha pasado ya bastante tiempo desde que vine a Barcelona para realizar la tesis doctoral. Siento que no soy la misma persona que llegó al laboratorio, aunque la esencia es algo que jamás se pierde. Durante estos años no solamente he adquirido experiencia investigadora, sino también una experiencia de vida que me ha brindado momentos únicos compartidos con mis compañeros de laboratorio. Durante este tiempo he tenido momentos maravillosos momentos buenos, momentos malos, momentos estresantes... en fin, un sí y un no de momentos que me han aportado una mayor madurez y a ser una persona más resolutiva. Quería dar las gracias a todos aquellos que me han acompañado y ayudado en este largo camino, y espero y estoy segura de que muchos de vosotros seguiréis formando parte de mi nuevo camino.

En primer lugar, quería agradecer a mi directora de tesis la Dra. Matilde Leonart su dedicación y el haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio. Así mismo, quiero dar las gracias al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebrón, en especial al Dr. Santiago Ramón y Cajal, Dr. Javier Hernández Losa, Dr. Josep Castellví y Dr. Vicente Peg por toda la ayuda y soporte prestado durante mi tesis. Del mismo departamento no puedo olvidarme de Rosa y Tere, gracias a las dos, no solamente por la ayuda técnica sino por sacarme una sonrisa cada vez que bajaba al departamento.

Quería agradecer al Dios de los doctorandos por haberme dado la oportunidad de conocer y compartir los mejores momentos dentro y fuera del laboratorio con mis pinchitos de la secta, Anita, Albitis, Berta, Roso, Bea, Laura Coch, Laura López... Siempre que he necesitado algo ahí habéis estado vosotras y no solamente quiero daros las gracias por la ayuda prestada sino también por vuestra amistad, por las risas, por el café-café, por los bailes en los pasillos, por las cenas maravillosas, por nuestro caga tío anual y muchas cosas más...

Albitis, creo que de todas las personas con las que más he compartido tiempo ha sido contigo, de hecho, Anita y tu me visteis llegar al lab un poco perdida jéje. Siempre he admirado tu positividad y la forma tan simple con la que ves la vida, me encanta y por eso

y muchas más cosas te quiero seguir teniendo en mi vida porque a parte de una excelente compañera eres una gran amiga.

Aníta, mi niña gracias por haber sido la mejor compí del mundo, por la alegría que desprendes alla donde vas y por consolarme cuando las cosas no han ido bien. Es más, cuando te fuiste del lab noté mucho tu ausencia. Por suerte seguimos siendo amigas y viéndonos siempre que podemos.

Crís Peula, mi locuela gracias por todos los momentos guays que hemos pasado dentro y fuera del lab, las cosas mas locas siempre contigo, nunca olvidaré nuestros días Off y nuestros festivales, te quiero perrí.

Quiero dar también las gracias a Marta Sesé por haberme ayudado siempre que he tenido alguna duda, y han sido unas cuantas. Eres una gran persona y te mereces todo lo bueno de la vida a nivel profesional y personal. Nos seguiremos viendo amiga.

Mily, pasaste aproximadamente un año en nuestro laboratorio, pero ese año fue intenso, gracias por toda la ayuda que me has dado durante mi tesis ya que siempre has estado disponible para mí cuando te he planteado cualquier duda. Te considero una persona extremadamente buena y además super inteligente, lo tienes todo hija, y ojalá que la ciencia tuviera a más personas como tu. Por todo, quiero darte las gracias.

Toca el turno a CUBA, Yoelsys vino a ritmo de son cubano al lab. Quería darte las gracias por todas las risas que nos hemos echado y echarme un cable siempre que lo he necesitado. Eres de los nuevos pero ya tienes un lugar en mi corazón. Sigue así, no cambies.

También quiero agradecer a Sergi y Anto los ratos vividos en el lab. Anto gracias también por apoyarme y ser un gran amigo fuera del lab.

Quería agradecer a Ray y Tao la ayuda prestada durante mi tesis, en especial cuando había líos con el congelador o el nitrógeno, gracias por aguantarme chicos y por todas las risas que nos hemos pegado cuando salíamos a fumar. También quiero agradecer a Pilar su disposición siempre que lo he necesitado.

Quiero agradecer a Natalia, Sara Sanchez y a la Canaria los ratos tan buenos que hemos pasado en cultivos, en nuestra cueva donde hemos pasado la mayor parte del tiempo. Nunca olvidaré los cafés con Sara, te guardo en mis recuerdos querida.

Gracias Patri por los buenos momentos vividos dentro y fuera del lab.

No puedo irme de Vall del Bronx, como cariñosamente le llamo sin dar las gracias a mi amigo Raul. En un año y poco que te conozco, te has convertido en uno de mis amigos más cercanos, tu me entiendes, yo te entiendo, tenemos formas de ver las cosas parecidas y te quería agradecer tu amistad. Aunque estos últimos meses no nos hayamos visto lo suficiente debido a que he estado muy ocupada con la tesis quiero que sepas que siempre estás en mi corazón.

Yara, te conocí a mitad de mi tesis pero te has convertido en una gran amiga, gracias por serlo y por las salidas y viajes que nos hemos marcado.

Quiero agradecer a mi mejor amigo, Fran los ánimos que siempre me ha dado cuando he tenido algún problema y por estar siempre al pie del cañon en las buenas y en las malas. No olvidaré nunca que siempre has estado conmigo cuando he tenido problemas de salud, cuando has tenido que llevarme a urgencias madrugada sí y otra también, y te has quedado conmigo. Quiero dedicarte este trabajo que tu viste comenzar. Tu fuiste la primera persona que me conoció en Barcelona y te has convertido en la más importante. Te quiero amigo siempre en mi vida.

Gracias Marta Cillero por ser de mis mejores amigas, entenderme y tener las palabras justas que decirme cuando he estado desanimada. También gracias por tantas aventuras vividas juntas y por las que nos quedan aún por vivir.

Victor, quería agradecer tu amistad sincera y tu disposición cuando la he necesitado. Gracias amigo.

Juan, muchísimas gracias por ser como has sido siempre conmigo. Si he llegado hasta aquí también es culpa tuya. Gracias por ser el amigo que jamás imaginé que podrías ser allá por el Otoño del 2009. Gracias por la ayuda que me has dado en todos estos años, a tus buenos consejos y a ser mi pañuelo de lágrimas, pero también de alegrías. Tenemos mucho recorrido juntos y lo que nos queda aún.

Mi amiga del alma Yeny, gracias por nuestra infinita amistad, desde niña aguantándome. Lo hemos vivido todo, y jolines como pasa el tiempo y para mí es como si fuese ayer. Te quiero.

Quería darles las gracias a mis compañeros de mi primer laboratorio en Madrid, Yurena, Gelen, Clarita, Ricardo, Esther y Eva por contagiarme las ganas de hacer ciencia. Con vosotros me inicié en la ciencia y en dos años aprendí un montón de cosas, entre ellas la de trabajar en equipo. Gracias por vuestra amistad y por todo lo que me habéis enseñado. Nos veremos pronto chicos.

Por último y de forma más importante, quería darle las gracias a mi madre, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por ser la mejor madre del mundo. Siempre me animaste a estudiar lo que más me gustase y me animaste en todas las decisiones que he ido tomando. Sinceramente, no sabía si me íbas a ver doctorarme, ya que no has tenido suerte en cuestión de salud, pero si mamá sigues en la lucha, lo he conseguido y lo vas a ver. Se que estás orgullosa de esto y gracias a tí ha podido ser posible. Te quiero.

Gracias a mi hermano Chris, hemos crecido juntos y te quiero un montón.

Penélope, gracias hermana por estar ahí siempre que has podido, y aunque no nos podamos ver todo lo que queramos porque vivimos lejos, siempre te tengo presente en mi alma y mi corazón. Gracias por todo.

A mi hermana gemela Ale, aunque ya no estés entre nosotros sí lo estás en mi corazón, y se que estarías orgullosa de mí. Te dedico este trabajo. Te quiero y nunca te olvidaré.









**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Universidad Autónoma de Barcelona**

**Departamento de Bioquímica y Biología molecular**



**Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron**