

**UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE  
MÉXICO**

**COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**EVALUACIÓN DEL PAPEL FUNCIONAL DEL  
MIR-204 EN EL MIMETISMO VASCULOGÉNICO  
MEDIADO POR LAS CÉLULAS TRONCALES  
TUMORALES CD44+/CD24- DE CÁNCER DE  
MAMA**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

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

**ROGELIO CORONADO URIBE**

**D I R E C T O R**

**DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO**

**CODIRECTORA**

**M. EN C. MACRINA BEATRIZ SILVA CAZARES**

**POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS**

Ciudad de México, Enero del 2021.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

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

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

## INTEGRACIÓN DEL JURADO

**Presidente:** Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez  
**Secretario:** Dr. Mario César López Camarillo  
**Vocal:** Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Plantel de adscripción:  
PLANTEL DEL VALLE, UACM.

### **DIRECTOR:**

---

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

### **CODIRECTOR:**

---

M. en C. Macrina Beatriz Silva Cazares  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DIRECTOR**

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### **CODIRECTOR**

M. en C. Macrina Beatriz Silva Cazares, UASLP

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

### **ASESOR**

Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por ser mi casa de estudios y por todo lo que me brindó durante mi periodo académico dentro de su plantel del Valle. Agradezco a la institución CONACYT por otorgarme su beca con el número de CVU 929316.

Al Dr. Mario César López Camarillo por ser mi Director, por brindarme su apoyo, dedicación, tiempo y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Olga Hernández por guiarme en cada paso del proyecto así como en la realización de todos los análisis experimentales y por su apoyo moral. A mi codirectora M. en C. Macrina Silva Cazares por su tiempo y apoyo durante la realización de mi proyecto.

De igual manera quiero agradecer a la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez por su apoyo incondicional para liberar los cursos del posgrado y por dedicarme tiempo para leer mi tesis. A la Dra. Martha Yocupicio Monroy por el apoyo académico que me brindó y por tomarse el tiempo de leer mí de tesis y a la Dra. Elisa Azuara por el conocimiento compartido y por dedicarme tiempo para leer mí de tesis.

Un agradecimiento sincero a mis compañeros de generación y de cursos Quique, Iván, Jose, Darío, Sharon, Blanca y Andrés, por el apoyo y el tiempo convivido dentro y fuera de la universidad.

A mis compañeros de laboratorio que estuvieron conmigo y me apoyaron durante la realización del proyecto Marthita, Fanny, Fernando, Yareli, Karla e Iraiz.

Y a mis padres y hermanos Narciso, Teresa, Cristian y Citlale por estar conmigo siempre, los iloveyou.

## Contenido

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice de tablas .....                                                                      | 7  |
| Índice de figuras .....                                                                     | 8  |
| Abreviaturas .....                                                                          | 10 |
| Resumen.....                                                                                | 12 |
| Abstract .....                                                                              | 14 |
| I. Introducción .....                                                                       | 16 |
| 1.0 Antecedentes Generales .....                                                            | 16 |
| 1.1 Cáncer .....                                                                            | 16 |
| 1.2 Carcinogénesis .....                                                                    | 17 |
| 1.3 Cáncer de mama .....                                                                    | 19 |
| 1.4 Características distintivas del cáncer .....                                            | 23 |
| 1.5 Mimetismo vasculogénico .....                                                           | 29 |
| 1.6 Vías de señalización del mimetismo vasculogénico.....                                   | 31 |
| 1.7 Células madre.....                                                                      | 32 |
| 2.0 Antecedentes Particulares .....                                                         | 37 |
| 2.1 Células madre del cáncer .....                                                          | 37 |
| 2.2 Células madre del cáncer en mama .....                                                  | 40 |
| 2.3 CD44 .....                                                                              | 40 |
| 2.4 CD24 .....                                                                              | 41 |
| 2.5 CD133 .....                                                                             | 41 |
| 2.6 ALDH1.....                                                                              | 42 |
| 2.7 Nanog .....                                                                             | 42 |
| 2.8 Formación de esferoides.....                                                            | 43 |
| 2.9 Los miRNAS reguladores .....                                                            | 44 |
| 2.10 Los miRNAs en cáncer .....                                                             | 47 |
| 2.11 Función del miRNA-204 en diferentes tipos de cáncer.....                               | 49 |
| 2.12 Los miRNAs participan en la regulación del fenotipo troncal en células de cáncer ..... | 51 |
| II. Hipótesis.....                                                                          | 54 |
| III. Justificación.....                                                                     | 54 |
| IV. Objetivos .....                                                                         | 55 |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 Objetivo general.....                                                                                                                      | 55 |
| 4.2 Objetivos específicos.....                                                                                                                 | 55 |
| V. Estrategia experimental.....                                                                                                                | 56 |
| VI. Metodología.....                                                                                                                           | 57 |
| 6.1 Condiciones de cultivo de la línea celulares .....                                                                                         | 57 |
| 6.2 Sub-cultivo de la línea celular MDA-MB-231 .....                                                                                           | 57 |
| 6.3 Aislamiento de las células CD44+/CD24- mediante citometría de flujo .....                                                                  | 58 |
| 6.4 Transfección del precursor del miR-204 .....                                                                                               | 58 |
| 6.5 Formación de esferoides.....                                                                                                               | 59 |
| 6.6 Lisis y extracción de ARN total a partir de la línea celular .....                                                                         | 59 |
| 6.7 Transcripción reversa y reacción de la cadena polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....                                                     | 60 |
| 6.8 Diseño de oligonucleótidos.....                                                                                                            | 61 |
| 6.9 Ensayo de mimetismo vasculogénico .....                                                                                                    | 61 |
| 6.10 Análisis Bioinformáticos .....                                                                                                            | 62 |
| VII. Resultados.....                                                                                                                           | 63 |
| 7.1 Efecto del miR-204 en la formación de esferoides de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.....                                     | 63 |
| 7.2 Porcentaje de la subpoblación con fenotipo troncal CD44+/ CD24- en células MDA-MD-231 en condiciones control, scramble y miR-204. ....     | 67 |
| 7.3 Aislamiento de células con fenotipo troncal CD44+/ CD24- de la línea celular MDA-MB-231.....                                               | 69 |
| 7.4 Diseño de oligonucleótidos para el análisis del fenotipo troncal por medio de RT-qPCR.....                                                 | 70 |
| 7.5 El miR-204 inhibe la formación del mimetismo vasculogénico mediado por las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- de cáncer de mama..... | 72 |
| 7.6 Blancos del miR-204 que participan en el proceso del mimetismo vasculogénico asociado a las células de cáncer con fenotipo troncal .....   | 74 |
| 7.7 La alta expresión de los genes KRAS, PI3K, TGFBR2 y MAPK1 se correlacionan con una baja supervivencia en pacientes de cáncer de mama ..... | 76 |
| VIII. Discusión.....                                                                                                                           | 78 |
| IX. Conclusiones .....                                                                                                                         | 84 |
| X. Bibliografía .....                                                                                                                          | 85 |
| XI. Anexos.....                                                                                                                                | 95 |
| 11.1 Curso de citometría de flujo.....                                                                                                         | 95 |

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Características inmunohistoquímicas de los subtipos del cáncer de mama.

**Tabla 2.** Ejemplos de miRNAs desregulados en cáncer.

**Tabla 3.** Genes blanco del miR-204 en cáncer.

**Tabla 4.** Diseño de los oligonucleótidos para los genes CD24, CD44, CD133 y Nanog.

## Índice de figuras

**Figura 1.** Etapas de la carcinogénesis.

**Figura 2.** Anatomía del seno.

**Figura 3.** Características distintivas de las células del cáncer

**Figura 4.** Mimetismo vasculogénico.

**Figura 5.** Principales vías de señalización involucradas en el mimetismo vasculogénico.

**Figura 6.** Características generales de las células madre.

**Figura 7.** Clasificación de las células madre de acuerdo al potencial de diferenciación.

**Figura 8.** Hipótesis sugeridas sobre el origen de las células madre del cáncer.

**Figura 9.** Esferoides formados por las líneas celulares de cáncer de mama.

**Figura 10.** Biogénesis de miRNAs

**Figura 11.** miRNAs que participan en la regulación de las características distintivas de las células madre del cáncer.

**Figura 12.** Formación de esferoides con la línea celular MDA-MB-231.

**Figura 13.** Número de esferoides formados en la primer y segunda generación con células MDA-MB-231.

**Figura 14.** Tamaño de los esferoides en la primer generación.

**Figura 15.** Porcentajes del fenotipo troncal de la línea celular MDA-MB-231.

**Figura 16.** Subpoblaciones obtenidas a partir de la línea celular MDA-MB-231.

**Figura 17.** Análisis de la integridad de los oligonucleótidos empleados para analizar la expresión de los marcadores de pluripotencia.

**Figura 18.** El miR-204 inhibe la formación de estructuras tipo capilar en 3D inducidas por hipoxia en células con fenotipo troncal CD44+/CD24- en cáncer de mama.

**Figura 19.** Modelo de la regulación del mimetismo vasculogénico y del mantenimiento de la pluripotencia celular.

**Figura 20.** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia en pacientes con cáncer de mama según la expresión de PI3K, KRAS, MAPK1 y TGFBR2.

---

## Abreviaturas

|              |                                                        |
|--------------|--------------------------------------------------------|
| <b>AGO2</b>  | Proteína argonauta 2                                   |
| <b>AKT</b>   | Proteína cinasa B                                      |
| <b>ATF2</b>  | Factor de transcripción activador 2                    |
| <b>ATP</b>   | Adenosín trifosfato                                    |
| <b>ADN</b>   | Ácido desoxirribonucleico                              |
| <b>ARN</b>   | Ácido ribonucleico                                     |
| <b>ARNm</b>  | RNA mensajero                                          |
| <b>CDI</b>   | Cáncer ductal invasivo                                 |
| <b>CLI</b>   | Carcinoma lobular invasivo                             |
| <b>CLIS</b>  | Carcinoma lobular in situ                              |
| <b>CSC</b>   | Células madre del cáncer                               |
| <b>EDTA</b>  | Ácido etilendiaminotetraacético                        |
| <b>EPO</b>   | Eritropoyetina                                         |
| <b>ER</b>    | Receptor de estrógenos                                 |
| <b>FT</b>    | Factor de transcripción                                |
| <b>HER2</b>  | Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 |
| <b>HIF</b>   | Factor Inducible de hipoxia                            |
| <b>miRNA</b> | MicroRNA                                               |
| <b>MMP</b>   | Metaloproteinasa                                       |

|                               |                                             |
|-------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>MV</b>                     | Mimetismo vasculogénico                     |
| <b>OMS</b>                    | Organización Mundial de la Salud            |
| <b>PGE2</b>                   | Prostaglandina E2                           |
| <b>PI3K</b>                   | Fosfoinositol 3 Cinasa                      |
| <b>pRb</b>                    | Proteína retinoblastoma                     |
| <b>pb</b>                     | Pares de bases                              |
| <b>rpm</b>                    | Revoluciones por minuto                     |
| <b>RT</b>                     | Retro transcripción                         |
| <b>TA</b>                     | Temperatura ambiente                        |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Factor de crecimiento transformante beta    |
| <b>UTR</b>                    | Región no traducida                         |
| <b><math>\mu</math>L</b>      | microlitro                                  |
| <b>VEGF-A</b>                 | Factor de crecimiento endotelial vascular A |

## Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades provocado por un grupo de células que se multiplican sin control de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos. En nuestro grupo de investigación nos enfocamos en el cáncer de mama, el cual se forma en las células de la glándula mamaria. Cuando se realiza el diagnóstico de este cáncer se procede a brindar tratamiento como quimioterapia y radioterapia, los cuales no siempre tienen éxito ya que el tumor tiende a resurgir. Esto se le atribuye a la existencia de un grupo de células denominadas células madre del cáncer, las cuales resultan de gran interés, debido a que originan, mantienen y expanden los tumores. Los marcadores de superficie celular CD44+/CD24- se han establecido como biomarcadores mínimos para las células madre del cáncer de mama. Diversos mecanismos se han visto involucrados en el mantenimiento de los tumores y de las células madre del cáncer, en los cuales participan oncogenes y supresores de tumor. Uno de los participantes más importantes son los miRNAs, los cuales se han visto implicados en el desarrollo y la progresión de casi todos los tipos de tumor. El mir-204 es un miRNA que se encuentra reprimido en cáncer de mama y altera la proliferación celular, el crecimiento, la migración, la invasión y la formación de redes capilares de la angiogénesis y del mimetismo vasculogénico. Sin embargo, su papel funcional en el establecimiento y mantenimiento de las células troncales en cáncer de mama aún no ha sido estudiado, por lo que en nuestro grupo de trabajo nos preguntamos cuál es el papel funcional del miR-204 en la expresión de genes asociados al mantenimiento de las células troncales de cáncer de mama. Para responder a esta pregunta nos dimos a la tarea de obtener la subpoblación de células con fenotipo troncal de la línea celular MDA-MB-231 utilizando los marcadores de membrana CD24 y CD44, con esto obtuvimos un porcentaje superior al 83% de células con este fenotipo. Una vez obtenidas las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- restauramos la expresión ectópica del miR-204 y realizamos ensayos de mimetismo vasculogénico para conocer si este miRNA podría estar regulando esta característica distintiva de las células troncales tumorales del cáncer de mama. De manera interesante

encontramos que en las células donde se restauró la expresión del miR-204, la formación de los canales capilares y de los puntos de ramificación característicos del mimetismo vasculogénico se disminuyó significativamente en comparación con las células que no fueron transfectadas. En conjunto realizamos ensayos con la línea parental MDA-MB-231 donde logramos identificar que la sobreexpresión de este miRNA disminuye de un 83.6% a un 45.1% en el porcentaje de las células con fenotipo troncal CD44+/CD24-. De igual manera encontramos que el miR-204 tiene la capacidad de inhibir la formación de esferoides y de disminuir su tamaño de manera significativa, por lo que presentamos evidencia de que el miR-204 tiene un papel funcional importante en la regulación del surgimiento de las células con fenotipo troncal del cáncer de mama así como en sus características distintivas.

---

## **Abstract**

Cancer is a group of diseases caused by a group of cells that multiply autonomously uncontrolled, invades locally and remotely other tissues. In our research group we focus on breast cancer, which forms in the cells of the mammary gland. When the diagnosis of this cancer is made, treatment such as chemotherapy and radiotherapy is provided, which are not always successful since the tumor tends to reappear. This is attributed to the existence of a group of cells called cancer stem cells, which are of great interest, because they originate, maintain and expand tumors. The CD44+/CD24- cell surface markers have been established as minimal biomarkers for breast cancer stem cells. Various mechanisms have been involved in the maintenance of tumors and cancer stem cells, in which oncogenes and tumor suppressors participate. One of the most important participants are miRNAs, which have been implicated in the development and progression of almost all tumor types. Mir-204 is a miRNA that is repressed in breast cancer and alters cell proliferation, growth, migration, invasion and the formation of capillary networks of angiogenesis and vasculogenic mimicry. However, its functional role in the establishment and maintenance of stem cells in breast cancer has not yet been studied, so in our working group we asked ourselves what is the functional role of miR-204 in the expression of associated genes. to the maintenance of breast cancer stem cells. To answer this question, we undertook the task of obtaining the subpopulation of cells with a stem phenotype of the MDA-MB-231 cell line using the membrane markers CD24 and CD44, with this we obtained a percentage higher than 83% of cells with this phenotype. Once the cells with the CD44+/CD24- stem phenotype were obtained, we restored the ectopic expression of miR-204 and performed vasculogenic mimicry assays to determine if this miRNA could be regulating this distinctive characteristic of breast cancer tumor stem cells. Interestingly, we found that in cells where miR-204 expression was restored, the formation of capillary channels and branch points characteristic of vasculogenic mimicry was significantly decreased compared to cells that were not transfected. Together we carried out tests with the MDA-MB-231 parental line where we were able to identify that the overexpression of this miRNA

decreases from 83.6% to 45.1% in the percentage of cells with a CD44+/CD24- stem phenotype. Similarly, we found that miR-204 has the ability to inhibit the formation of spheroids and to decrease their size significantly, so we present evidence that miR-204 has an important functional role in regulating the emergence of spheroids. cells with the stem phenotype of breast cancer as well as their distinctive characteristics.

## I. Introducción

### 1.0 Antecedentes Generales

#### 1.1 Cáncer

De acuerdo al Instituto Nacional de Cáncer el cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas (<https://www.cancer.gov>), el cual es provocado por un grupo de células que se multiplican sin control de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos (Puente *et al.*, 2019). En los hombres, los porcentajes más altos ocurren en la próstata, pulmón, bronquios, colon, recto y vejiga urinaria, respectivamente. En las mujeres, la prevalencia es más alta en los senos, pulmones, bronquios, colon, recto, cuerpo uterino y tiroides, respectivamente (Hossein *et al.*, 2017). Las células cancerosas adquieren capacidades biológicas que las caracterizan, incluyendo la autonomía en la producción de señales de crecimiento, resistencia a la muerte celular, permiten la inmortalidad replicativa, evaden los supresores del crecimiento, inducen angiogénesis, activan la invasión, metástasis y la evasión de la respuesta inmune (Hanahan *et al.*, 2000; Hanahan *et al.*, 2011).

El cáncer se caracteriza por el aumento de volumen en un tejido, al cual se le denomina tumor y está formado por un grupo de células que proliferan de manera excesiva e incontrolada, capaces de invadir otros tejidos del cuerpo a través del sistema sanguíneo y del sistema linfático para proliferar en la nueva localización (Dolores *et al.*, 2008). Hay dos tipos generales de tumores: tumores benignos y tumores malignos. Un tumor benigno está compuesto por células que no invadirán otros tejidos u órganos del cuerpo, aunque puede seguir creciendo de forma anormal. Un tumor maligno está compuesto de células que invaden la membrana basal y se propagan a otras partes del cuerpo (Hanahan *et al.*, 2000; Hanahan *et al.*, 2011).

## 1.2 Carcinogénesis

El cáncer es de origen monoclonal, para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica deben ocurrir mutaciones genéticas en la mismas, las cuales modifican los productos codificados por el gen afectado y eventualmente produce cáncer (Martin *et al*, 2020). La carcinogénesis es un proceso de varias etapas en el cual las células normales sufren cambios genotípicos y fenotípicos a los que se les atribuye la transformación celular, mediante la cual adquieren capacidades para proliferar de manera incontrolada, así como la de invadir y formar metástasis en órganos distantes (Granados *et al*, 2012). Este proceso puede ser resultado de eventos endógenos, como errores en la replicación del ADN, intercambio de cromátides hermanas y cambios en la ploidía de las células (Nowell *et al*, 1986). También puede ser resultado de procesos exógenos como radiaciones ionizantes o exposiciones a carcinógenos químicos. Aunque las células tienen mecanismos para reparar las alteraciones producidas en el genoma, como sustituciones de una bases, inserciones o deleciones de segmentos pequeños o grandes de ADN, reordenamientos en los que el ADN se ha roto y luego se ha unido a un segmento de ADN de otra parte del genoma y reducciones en el número de copias que pueden resultar en la ausencia total de una secuencia de ADN, a veces hay errores en los mecanismos de reparación y los cambios introducidos en el genoma permanecen (Straton *et al*, 2009).

La carcinogénesis puede dividirse en 4 fases: iniciación tumoral, promoción tumoral, transformación maligna y progresión tumoral (Civetta M, 2011).

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 (Loeb 1991). Durante la iniciación del tumor los agentes carcinogénicos iniciadores (agentes químicos, agentes físicos o biológicos) provocan alteraciones genéticas o epigenéticas en las células normales que conducen a la activación de proto-oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores, dando lugar a células malignas (Williams 2001), esto ocurre

a nivel del genoma y las alteraciones pueden darse en los tumores benignos y malignos (Civetta M, 2011). La promoción consiste en la expansión clonal de las células iniciadas, representa la etapa de crecimiento tisular, participan los receptores y factores de crecimiento, se promueve la degradación de la matriz extracelular para dar inicio al proceso de angiogénesis (Civetta M, 2011), aumenta la tasa de proliferación celular facilitando la aparición de tumores benignos o lesiones pre malignas que serían reversibles en ausencia de nuevos promotores (Counts *et al.*, 1995; Counts *et al.*, 1995; Klaunig *et al.*, 2000). La transformación maligna consiste en la conversión de las células pre neoplásicas en células malignas y requiere de alteraciones genéticas adicionales que pueden resultar en errores durante el proceso de síntesis de ADN (Loeb *et al.*, 1990). Cuando una célula o un grupo de estas llegan a esta etapa, se considera que se pueden formar tumores pero que no tienen potencial de invasión (Leon *et al.*, 1990). 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, lo cual implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia (Robbins *et al.*, 1995). Durante este proceso pueden ocurrir alteraciones genéticas y epigenéticas adicionales que confieren una autonomía en el crecimiento celular (independiente del carcinógeno o promotor) y promueven la invasión y metástasis (Dixon *et al.*, 2004; Pitot *et al.*, 1991; Lutz 2000). Éstas finalmente otorgan al nuevo tumor mayor agresividad y la posibilidad de invadir nuevos tejidos u organos (Civetta M, 2011).

# CARCINOGENESIS



**Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.** La iniciación es la etapa en la que las células mutan y activan oncogenes o se inactivan los supresores de tumor. La promoción radica en la expansión clonal de las células que ya adquirieron mutaciones. En la transformación las células pre neoplásicas se convierten en células malignas. La progresión es la tendencia de las células malignas a adquirir un fenotipo más agresivo a lo largo del tiempo e implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia (Santos, 2010).

## 1.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres de todo el mundo y es curable entre el 70 y el 80% de las pacientes con enfermedad no metastásica en estadio temprano (Harbeck *et al.*, 2019). Se origina en las células del tejido mamario, estas células en una mujer adulta se reemplazan continuamente durante su vida reproductiva, durante el embarazo y los ciclos menstruales, tal recambio se rige por las células madre mamarias, que proliferan y se diferencian en

progenitores bipotenciales y de linaje restringido, que finalmente generan las células epiteliales mamarias maduras (Bath *et al.*, 2019). En la mama pueden aparecer tumores benignos constituidos por células que se dividen en exceso pero no pueden dañar o invadir otras partes del organismo y tumores malignos los cuales están compuestos por células que se dividen sin control, son capaces de destruir tejidos y órganos cercanos o de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis) (Civetta M 2011). Aunque no se conoce el origen exacto, son varios los factores de riesgo que se relacionan con la aparición del cáncer de mama

- Edad. Aunque el cáncer de mama puede afectar a cualquier mujer, el riesgo de padecerlo aumenta con la edad y la mayor incidencia se concentra entre los 60 y los 70 años (Siegel *et al.*, 2017).
- Factores hormonales como la menarquia precoz (primera regla) y la menopausia tardía (Sun *et al.*, 2017).
- La ausencia de embarazo o tener el primer embarazo a una edad avanzada (después de los 30 años) son también factores de riesgo bien conocidos.
- Tratamiento hormonal sustitutivo, como la administración de estrógenos y progestágenos (hormonas sexuales femeninas) para tratar los síntomas de la menopausia (Lancet *et al.*, 2013).
- Los estilos de vida modernos, como el consumo excesivo de alcohol y de grasas en la dieta, pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama debido a que el consumo de alcohol puede elevar el nivel de hormonas relacionadas con el estrógeno en la sangre y desencadenar las vías del receptor de estrógeno (Sun *et al.*, 2017).

Aunque existen diferentes tipos de cáncer de mama, hay dos tipos principales (Tavassoli *et al.*, 2003) los carcinomas *in situ* y los carcinomas invasivos, los cuales pueden surgir principalmente en los lóbulos encargados de la producción de la leche o en los ductos que se encargan de llevar la leche al pezón (Figura 2).

El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) o lobular *in situ* (CLIS), no invasivo: se define como una proliferación de células epiteliales malignas dentro de las estructuras del parénquima mamario sin evidencia de invasión de la membrana basal, en el cual el crecimiento de células malignas, se limita en el conducto o lóbulos mamarios y no se propaga al tejido circundante ni a otras partes del cuerpo. Aunque algunas veces este tipo de cáncer puede volverse invasivo (Tavassoli *et al.*, 2003. Pinder *et al.*, 2003).

Carcinoma invasivo o infiltrante: las células malignas traspasan los límites de los ductos o lóbulos al tejido circundante y dependiendo de si el cáncer comienza en los lóbulos o en los ductos se llamará carcinoma ductal invasivo (CDI) (es el más frecuente); o carcinoma lobular invasivo (CLI). Ambos tienen la capacidad de extenderse a otras partes del cuerpo (Rosen *et al.*, 1979).

Las características clínicas e histológicas del cáncer de mama son utilizadas como elementos importantes para la definición de los diferentes factores del pronóstico y del tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, la identificación de las características inmunohistoquímicas del tumor nos permiten diferenciar alteraciones genéticas que proporcionan la posibilidad de clasificar el cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad en el tratamiento (Sorlie *et al.*, 2003, Perou *et al.*, 2000).

Analizado desde el punto de vista de la inmunohistoquímica el cáncer de mama se ha clasificado en cuatro grupos fundamentales, donde la presencia o ausencia de los receptores de estrógenos son definitivos para la esta clasificación (Uribe *et al.*, 2010, Piñero *et al.*, 2008), así tenemos:

1. Tumores con receptores de estrógenos positivos:

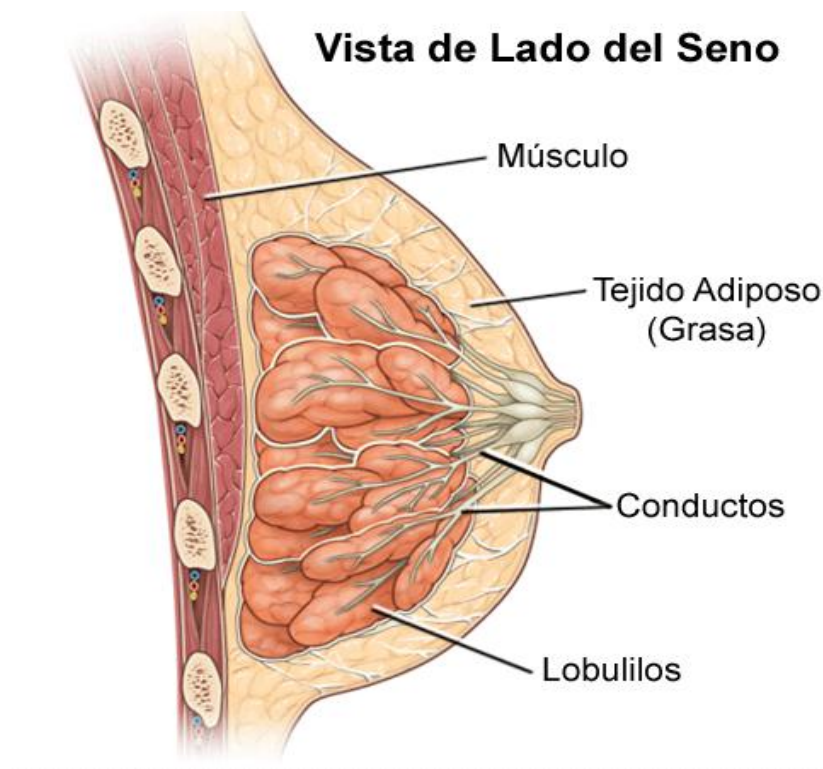
a. LUMINAL A: receptores de estrógeno positivos, receptor de progesterona positivos, HER2 negativos.

b. LUMINAL B: receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona negativos, HER2 negativos.

2. Tumores con receptores de estrógeno negativos:

a. HER 2 NEU: receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos, HER2 positivos.

b. Triple negativo: receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos, HER2 negativos.



**Figura 2. Anatomía del seno.** Figura representativa de la anatomía del seno femenino en la cual apreciamos los lóbulos productores de leche y los conductos que transportan la leche al pezón (Stanford Childrens Health).

**Tabla 1. Características inmunohistoquímicas de los subtipos del cáncer de mama.**

|                  | Luminal B | Mixto | Her2neu | Triple negativo |
|------------------|-----------|-------|---------|-----------------|
| <b>Luminal A</b> |           |       |         |                 |
| RE+              | RE+       | RE+/- | RE-     | RE-             |
| RP+              | RP-       | RP+/- | RP-     | RP-             |
| HER2-            | HER2-     | HER2+ | HER2+   | HER2-           |

#### 1.4 Características distintivas del cáncer

Las características distintivas del cáncer comprenden capacidades biológicas adquiridas por las células durante el desarrollo de los tumores, estas incluyen la capacidad de mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis (Figura 3), las cuales constituyen un principio para comprender las complejidades de la enfermedad neoplásica (Hanahan y Weinberg, 2000).

**Mantenimiento de la señalización proliferativa:** Los tejidos normales controlan la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento celular, regulando el ciclo de crecimiento y la división celular en cada órgano y tejido del cuerpo,

asegurando así una homeostasis del número celular y, por lo tanto, el mantenimiento de la arquitectura y función normal del tejido. Las células cancerosas logran desregular estas señales y se convierten en dueños de sus propios destinos (Hanahan y Weinberg, 2011). Estas señales se transmiten a la célula mediante receptores transmembranales que se unen a distintas moléculas de señalización como factores de crecimiento difusibles, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión/interacción de célula a célula (Hanahan y Weinberg, 2000). Si bien la mayoría de los factores de crecimiento son sintetizados por un tipo de célula para estimular la proliferación de otra (el proceso de señalización heterotípica), muchas células cancerosas adquieren la capacidad de sintetizar factores de crecimiento a las que responden ellas mismas, creando un circuito de señalización de retroalimentación positiva denominado estimulación autocrina (Fedi *et al.*, 1997).

**Evasión de los supresores del crecimiento:** En un tejido normal, múltiples señales antiproliferativas operan para mantener la quiescencia celular y la homeostasis del tejido; estas señales incluyen tanto inhibidores de crecimiento solubles como inhibidores inmovilizados incrustados en la matriz extracelular y en las superficies de las células cercanas. Estas señales inhibitoras del crecimiento, como sus contrapartes de acción positiva, son recibidas por los receptores de la superficie celular transmembranales acoplados a los circuitos de señalización intracelular (Hanahan y Weinberg, 2000). A nivel molecular las señales antiproliferativas se canalizan a través de la proteína de retinoblastoma (pRB), p107 y p130 cuando está en un estado hipofosforilado (Weinberg 1995). La proteína RB integra señales de diversas fuentes extracelulares e intracelulares y, en respuesta, decide si una célula debe o no pasar por su ciclo de crecimiento y división, por lo que la desregulación de esta proteína en tumores favorece la evasión de los supresores de crecimiento (Burkhart y Sage, 2008, Deshpande *et al.*, 2005).

**Evasión de la muerte celular:** La capacidad que tienen las células de expandirse está determinada por la tasa de proliferación y por la tasa de muerte celular, el concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer se ha establecido mediante estudios funcionales (Hanahan y Weinberg, 2011, Adams y cory, 2007). Sin embargo, las células tumorales evaden la apoptosis a través de la alteración del balance de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, como la disminución de la actividad de las caspasas y la alteración de la señalización de los receptores de muerte como TNFR1 y FasL (Wong 2011). Por otra parte muchas de las señales que provocan la apoptosis convergen en las mitocondrias, que responden a las señales proapoptóticas liberando citocromo C, un potente catalizador de apoptosis (Verde y Reed, 1998). Los tumores pueden evadir la muerte celular al aumentar la expresión de los reguladores antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W), o al reprimir la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim) las cuales actúan al regular la señalización mitocondrial de muerte a través de liberación de citocromo C (Hanahan y Weinberg, 2000).

**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 esto regulado por los telómeros, compuestos de múltiples repeticiones de hexanucleótidos en tándem, los cuales se acortan progresivamente en células no inmortalizadas, perdiendo finalmente la capacidad de proteger los extremos de los cromosomas formando cromosomas dicéntricos inestables cuya resolución resulta en una mezcla del cariotipo que amenaza la viabilidad celular. Llegado a este punto, las células detienen de forma irreversible su crecimiento por senescencia seguido de muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011). Únicamente, las células germinales son capaces de dividirse de forma indefinida, sin embargo, las células tumorales se immortalizan gracias a que sobre expresan la proteína telomerasa que adiciona segmentos repetitivos en los telómeros evitando su acortamiento. De hecho, el 85-90% de las células tumorales expresan telomerasa

(Hanahan *et al.*, 2011).

**Inducción de angiogénesis:** Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La neovasculatura asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, aborda estas necesidades (Hanahan y Weinberg, 2011). 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 (Carmeliet *et al.*, 2005). 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. Una estrategia común para cambiar el equilibrio implica una transcripción genética alterada. Muchos tumores evidencian una mayor expresión de VEGF y / o FGF en comparación con sus contrapartes de tejido normales y en otros, la expresión de inhibidores endógenos como la trombospondina-1 o el interferón  $\beta$  está regulada de manera negativa (Singh *et al.*, 1995).

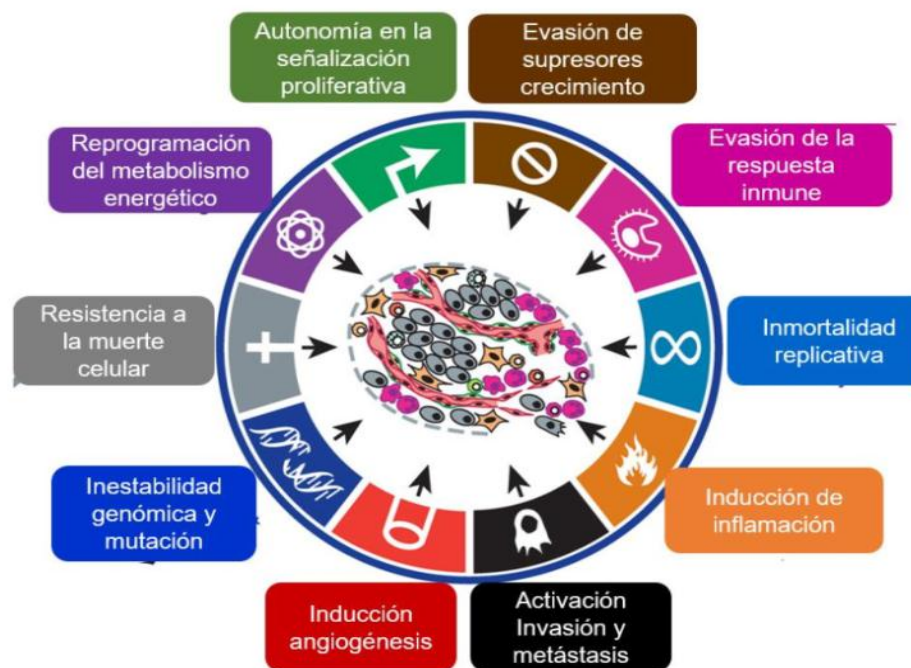
**Activación de la invasión y la metástasis:** La capacidad de invasión y metástasis permite a las células cancerosas escapar de la masa tumoral primaria y colonizar un nuevo terreno en el cuerpo donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no son limitantes (Hanahan y Weinberg, 2000). Está claro que a medida que los carcinomas evolucionan, adquieren capacidades de invasión local y metástasis a distancia, debido a que las células cancerosas generalmente desarrollan alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular (Hanahan y Weinberg, 2011). La alteración que ha sido caracterizada implica la pérdida de E-cadherina en células de carcinoma, una molécula clave en la adhesión de célula a célula. Al formar uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, la E-cadherina ayuda a ensamblar láminas de células epiteliales y a

mantener la quiescencia de las células dentro de estas láminas. El aumento de la expresión de E-cadherina estaba bien establecido como un antagonista de la invasión y la metástasis, mientras la reducción de su expresión potencia estos fenotipos (Berx y van Roy, 2009). Además de la pérdida de la expresión de E-cadherina diversos estudios han reportado que CD44 es sobre expresada 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 (McFarlane *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015).

**Reprogramación del metabolismo energético:** 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, en condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa, primero para piruvato a través de la glucólisis en el citosol y luego a dióxido de carbono en la mitocondria; en condiciones anaeróbicas, se favorece la glucólisis y se envía relativamente poco piruvato a las mitocondrias en donde su posterior metabolismo requiere de oxígeno (Warburg, 1930). Entre las adaptaciones metabólicas se encuentran la sobreexpresión de receptores de glucosa GLUT1, que aumenta sustancialmente la importación de glucosa del espacio extracelular al citoplasma (Jones y Thompson, 2009). Se ha demostrado que el suministro de combustible glucolítico está asociado con oncogenes activados (p. Ej., *RAS*, *MYC*) y supresores de tumores mutados (p. Ej., *TP53*) (De Berardinis *et al.*, 2008). La dependencia de glucólisis puede acentuarse más bajo las condiciones hipóxicas que operan dentro de muchos tumores: el sistema de respuesta a la hipoxia actúa pleiotrópicamente para aumentar los transportadores de glucosa y las múltiples enzimas de la vía glucolítica (Semenza 2010).

**Evasión de la respuesta inmune:** La antigua teoría de la vigilancia inmune propone que las células y los tejidos son monitoreados constantemente por un sistema

inmune siempre alerta, y que dicha vigilancia inmune es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células cancerosas incipientes y, por lo tanto, los tumores nacientes, según esta lógica, los tumores sólidos han logrado evitar ser detectados por los diversos brazos del sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la muerte inmunológica, evitando así la erradicación (Hanahan y Weinberg, 2011). Debido a la inestabilidad genómica, las células tumorales cambian constantemente su perfil antigénico y sobre expresan ciertas moléculas como citosinas y quimiocinas por ejemplo, las células cancerosas pueden paralizar las células CTL y NK infiltrantes, secretando TGF- $\beta$  u otros factores inmunosupresores (Yang *et al.*, 2010, Hanahan *et al.*, 2011).



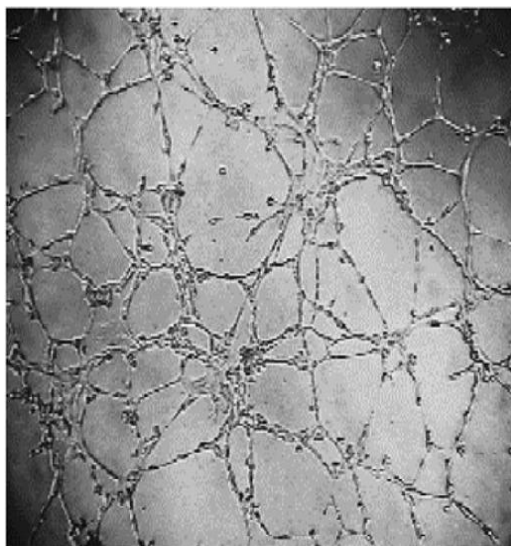
**Figura 3. Características distintivas de las células del cáncer.** Las características distintivas del cáncer son la señalización proliferativa, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

## 1.5 Mimetismo vasculogénico

El mimetismo vasculogénico es un sistema de suministro de sangre independiente de los vasos endoteliales en las células tumorales de diferentes orígenes (Figura 4) (Delgado *et al.*, 2017). El tumor requiere un suministro de sangre para su crecimiento, supervivencia y metástasis, estos mecanismos se han centrado en procesos dependientes de la angiogénesis y del mimetismo vasculogénico, que a diferencia de la angiogénesis tumoral clásica, el mimetismo vasculogénico proporciona la irrigación sanguínea a través de canales capilares conformados por las células tumores (Luo *et al.*, 2020). En el 2007 Zhang y colaboradores propusieron tres fenómenos implicados en el suministro de sangre en los tumores los cuales son 1) los vasos sanguíneos dependientes de células endoteliales (angiogénesis clásica) 2) los vasos sanguíneos mosaico y 3) los canales de mimetismo vasculogénico. En los vasos sanguíneos normales la lámina basal está presente, es continua, y entre las células se establecen uniones estrechas, adherentes y comunicantes, en el mimetismo vasculogénico las células tumorales forman canales para que lleguen los nutrientes al tumor. El mimetismo vasculogénico está asociado a un mal pronóstico clínico debido que facilita la metástasis del tumor y disminuye la sobrevivencia de los pacientes. Existen algunos factores necesarios para la formación de mimetismo vasculogénico como son la interacción de las células tumorales y la remodelación de la matriz extracelular con el microambiente tumoral, siendo la hipoxia el fenómeno más importante debido al gran consumo de energía y a la baja concentración de oxígeno (Zhang *et al.*, 2016, Maniotis *et al.*, 1999, Luo *et al.*, 2020). Este microambiente propicia la expresión estable del factor inducible de hipoxia, el cual es un complejo proteico que incrementa la expresión de genes específicos en presencia de bajas concentraciones de oxígeno (Lu *et al.*, 2013).

Las características del MV son: (1) Positivo para la tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff) y negativo para el receptor CD31, (2) células tumorales altamente invasivas, (3) presencia de células multipotenciales, (4) remodelación de la matriz extracelular y

(5) la conexión de las estructuras del mimetismo vascular con la microcirculación del tumor (Qiao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2007). Las vías de señalización que promueven la formación de VM, incluyen la endotelial vascular (VE), la vía de la E-cadherina, la eritropoyetina, fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), la vía de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), cinasa de adhesión focal (FAK) y el factor inducible por hipoxia (HIF) (Lu *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2017). Además, los ARNs no codificantes, como los lncRNA y los miRNA, desempeñan funciones críticas en la formación de VM en tumores malignos (Peng *et al.*, 2018, Langer *et al.*, 2018). Por ejemplo al restaurar la expresión del miR-200a se inhibe el MV a través de la modulación de la proteína Eph2A en cáncer de ovario (Sun *et al.*, 2014). Se ha observado que algunas vías de señalización implicadas en la migración, proliferación, invasión y remodelación de la matriz extracelular participan en la formación del mimetismo vasculogénico tales como las vías de señalización PI3k-AKT, MAPK, FAK (Flores *et al.*, 2016). En estudios recientes realizados por Salinas y colaboradores se demostró que el miRNA-204 inhibe la formación de MV en células de cáncer de mama a través de la regulación de la expresión de proteínas involucradas en estas vías (Salinas *et al.*, 2018).

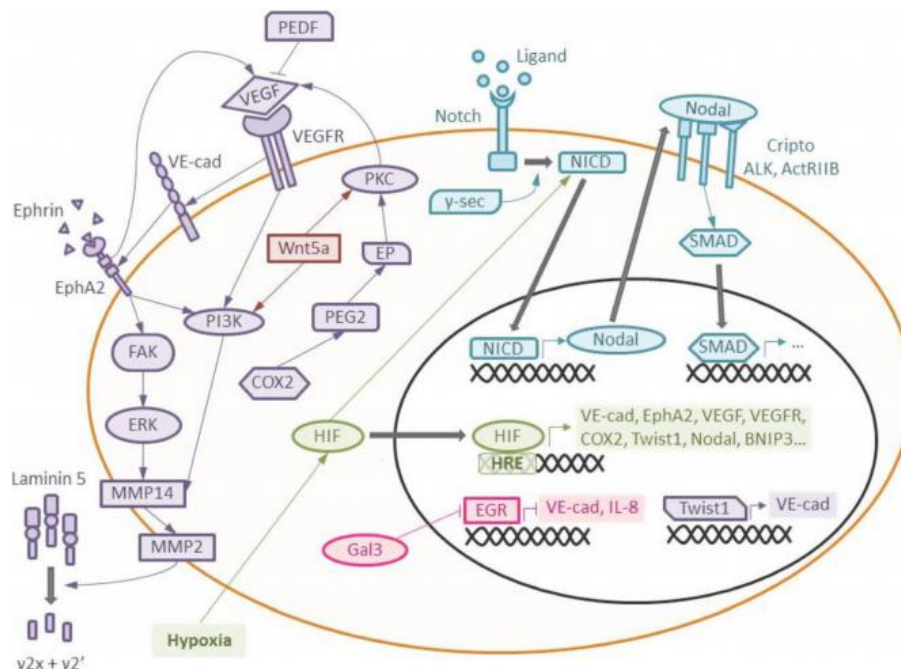


**Figura 4. Mimetismo vasculogénico.** Estructuras 3D tipo capilar

formadas por células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia en un cultivo *in vitro* (Salinas *et al.*, 2018).

### 1.6 Vías de señalización del mimetismo vasculogénico

El patrón distintivo de las redes del mimetismo vasculogénico parece recapitular los patrones de vasculogénesis embrionaria, esta semejanza sugiere que las células tumorales agresivas adquieren un fenotipo indiferenciado de tipo embrionario (Delgado *et al.*, 2017). VE-cadherina, Notch y el factor inducible hipoxia 1- $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) (Figura 5) están involucrados en las tres vías de señalización principales que controlan VM: vascular, hipoxia y embrionarias/células madre (Paulis *et al.*, 2010, Kirschmann *et al.*, 2012). En la señalización vascular participan VE-cadherina, EphA2 y VEGF los cuales conducen a la escisión de laminina 5 y liberación de fragmentos pro-migratorios  $\gamma 2x$  y  $\gamma 2'$  en la matriz extracelular. La señalización de células madre, controlada por Notch y Nodal, regula los genes para la pluripotencia y desdiferenciación. En la vía de hipoxia contribuyen todas las vías anteriores al mediar la expresión de algunas moléculas de señalización cruciales. Se ha reportado que las proteínas Wnt pueden promover el mimetismo vasculogénico a través de la activación de la señalización de PKC y PI3K, aunque podrían también desempeñar un papel en la supresión tumoral (Delgado *et al.*, 2017).



**Figura 5. Principales vías de señalización involucradas en el mimetismo vasculogénico.** En color púrpura podemos observar la representación de las vías de señalización vascular, en color azul las vías de la señalización de células madre y en color verde la vía de hipoxia, las cuales están participando en el proceso del mimetismo vasculogénico (Delgado *et al.*, 2017).

### 1.7 Células madre

Las células madre son células no especializadas del cuerpo humano, capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular de un organismo y tienen la capacidad de autorrenovarse, estas células existen tanto en embriones como en células adultas (Zakrzewski *et al.*, 2019). Estas células pueden generar más células madre u originar células comprometidas en la ruta de diferenciación (progenitores), que tras sucesivas divisiones celulares darán lugar a los tipos celulares diferenciados (Till y Mc, 1961). Se encargan de la repoblación de células en los tejidos dañados, así como tener el control del número de células madre, manteniendo la homeostasis celular (Figura 6) (Bixby *et al.*, 2002).

Las células madre embrionarias se encuentran en el blastocisto, el cual se forma después de la unión del espermatozoide y el óvulo, su pared interna está revestida con células madre de corta duración, estos blastocistos se componen de dos tipos de células distintas: la masa celular interna, que se convierte en epiblastos e induce el desarrollo del feto, y el trofoectodermo, el cual da origen a la placenta (Zakrzewki *et al*, 2019).

Las células madre somáticas o adultas son indiferenciadas y se encuentran entre las células diferenciadas en todo el cuerpo después del desarrollo. La función de estas células es permitir la curación, el crecimiento y el reemplazo de las células que se pierden cada día (Zakrzewki *et al*, 2019). Estas células se pueden obtener de muchos tejidos, incluyendo hueso, órganos dentales, tejido adiposo, cerebro, vasos sanguíneos y sangre (Awad *et al*, 2004).

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación (Figura 7) (Mata *et al*, 2013) en:

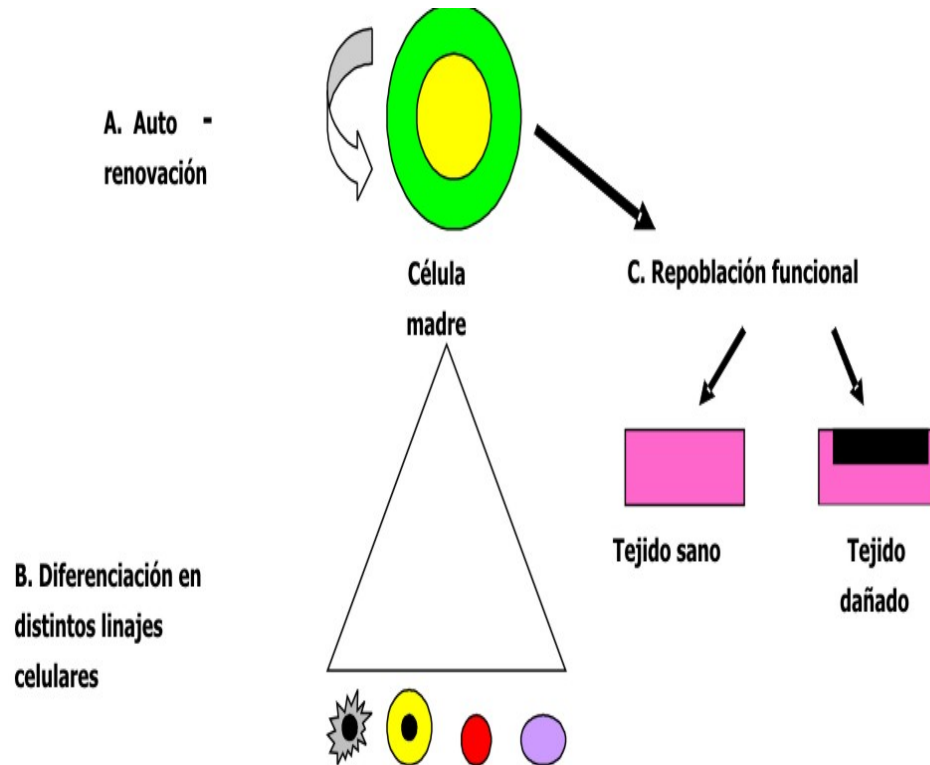
**Células totipotentes:** Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales, ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta, por lo que son capaces de generar un organismo completo (Mata *et al*, 2013).

**Células pluripotentes:** son las que tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias. Estas células por sí solas no pueden producir un individuo, ya que necesitan el trofoblasto, pero son capaces de originar todos los tipos de células y tejidos del organismo (Verfaillie *et al*, 2002). Se han identificado tres factores de transcripción, como factores reguladores de la pluripotencialidad: 1) Proteína de unión octamérica-4 (oct-4), 2) SRY-box que codifica para el gen 2 (sox-2) y 3) nanog (Donovan *et al*, 2001). Oct-4 se considera una proteína importante para la pluripotencialidad, debido a que es un factor

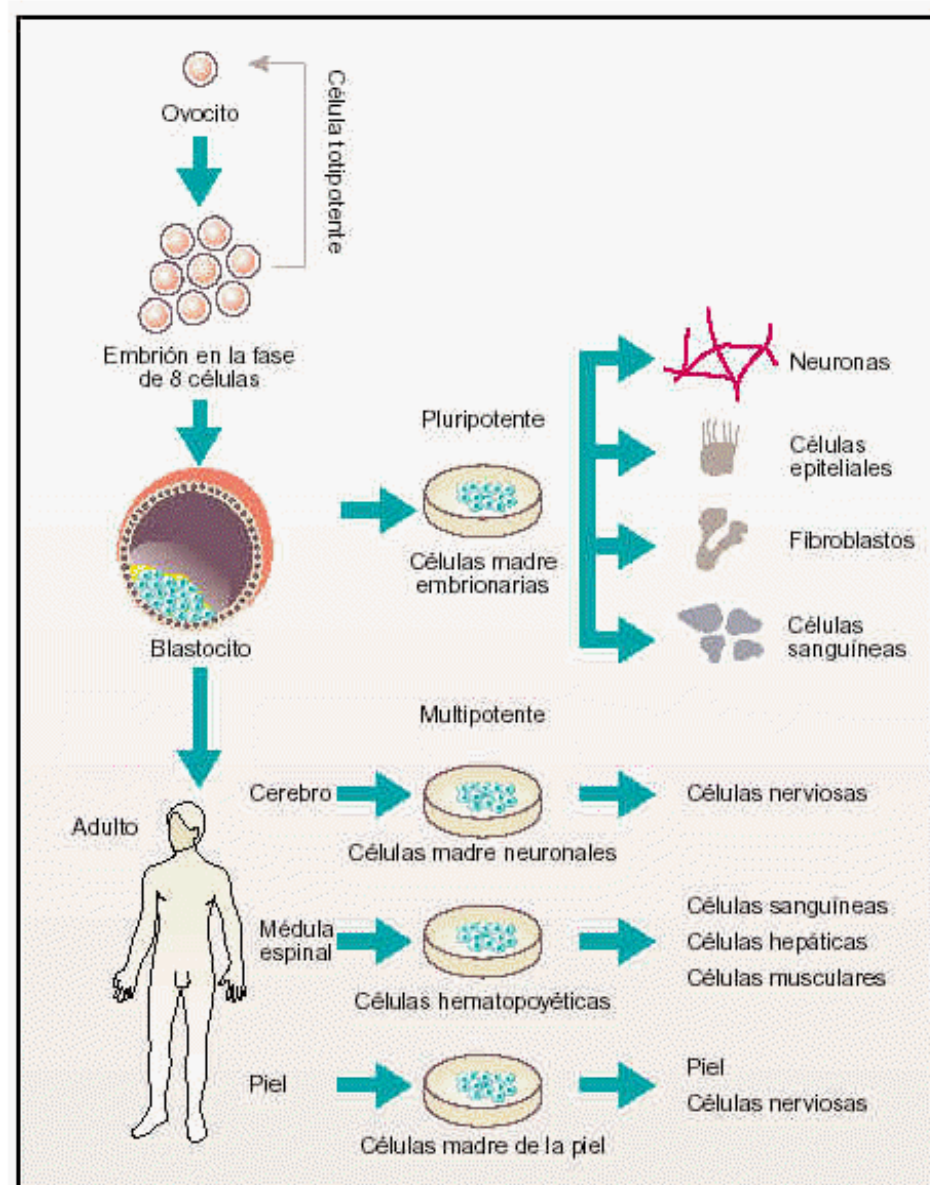
irreemplazable en la reprogramación de las células madre pluripotentes inducidas, es una proteína de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) que se expresa exclusivamente durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Mata *et al*, 2013). Sox-2 fue descubierto como un factor de transcripción que continuamente se unía a Oct-4, colaborando para activar a FGF-4, el cual es un gen que es expresado en las células de la masa celular interna del blastocisto y posteriormente en distintos tejidos embrionarios (Mata *et al*, 2013).

Células multipotentes: estas células pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos (Mata *et al*, 2013). Las células madre adultas se habían ubicado en esta etapa de la evolución celular. Sin embargo, en los últimos años, se ha hecho evidente que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas es mayor que la que habitualmente se les confería, pues se evidenció que podían diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias, señalándose como el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas (Jackson *et al*, 199, Wei *et al*, 2000).

Células madre unipotentes: son aquellas que solo se pueden diferenciar en un tipo celular (Hernandes y Dortyicos, 2004).



**Figura 6. Características generales de las células madre.** Las células madre tienen la capacidad de proliferar, autorrenovarse y diferenciarse. La diferenciación, es la capacidad de convertirse en distintos tipos de células especializadas para distintas funciones. La Auto-renovación es la habilidad para dividirse y dar nuevas células madre. La Proliferación es la capacidad de dividirse indefinidamente (Hernandez y Dortycos, 2004).



**Figura 7. Clasificación de las células madre de acuerdo al potencial de diferenciación.** Las células madre se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de diferenciarse, esta clasificación comienza con las células madre totipotentes las cuales son aquellas que en las condiciones apropiadas son capaces de formar un individuo completo. Las células madre pluripotentes son las que tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo. Las células madre multipotentes, que pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de las misma capa embrionaria.

Las células unipotentes son aquellas que solo se pueden diferenciar en un tipo celular (Torrades, 2003).

## **2.0 Antecedentes Particulares**

### **2.1 Células madre del cáncer**

Las células madre del cáncer (CSC) son una subpoblación de células tumorales que poseen una alta actividad tumorigénica y características de células madre de autorrenovación y de diferenciación no controlada. (Frank *et al*, 2010). En comparación con las células madre normales, se cree que las células madre del cáncer no tienen control sobre el número de divisiones que pueden llevar a cabo, por lo que son responsables del crecimiento de los tumores (Sagar *et al*, 2007). La acumulación de CSC en un tumor otorga resistencia a los medicamentos anticancerígenos, por lo que se correlacionan con las altas tasas de fracaso terapéutico observadas en pacientes con cáncer. Esto se ha observado en estudios, los cuales indican que la mayoría de los tumores humanos albergan una población de células que poseen propiedades biológicas características de las células madre normales, es decir, autorrenovación y diferenciación (Visvader *et al*, 2008).

Como se sabe, existen distintos tipos de tumores presentes en diferentes partes del organismo y en cada tumor existe heterogeneidad celular intratumoral, presentándose dentro de un tipo de tumor distintos subtipos de células (Lu *et al*, 2013). Por lo que las células que componen el tumor presentan heterogeneidad en la expresión de marcadores celulares, en morfología celular, en capacidad proliferativa, en modificaciones genéticas, y en respuesta terapéutica (Heppner and Miller, 1983). Las células madre tumorales tienen cuatro características clave: 1) autorrenovación, la subpoblación de CSC se puede proliferar en múltiples generaciones, lo que indica la capacidad de renovación autónoma. 2) Diferenciación, las CSC pluripotentes no solo pueden formar CSC hijas tumorigénicas por división

celular simétrica sino que también generan poblaciones masivas de células no tumorigénicas por división celular asimétrica. 3) Tumorigenicidad la subpoblación de CSC tiene un potencial tumorigénico cuando se trasplanta a animales inmunosuprimidos. 4) Presentan marcadores de superficie específicos, por los cuales la subpoblación de CSC se puede separar de las células que no tienen este fenotipo (Lu *et al*, 2013 *et al*, 2013, Huntly y Guilliland, 2005, Mannelli y Gallo, 2012)

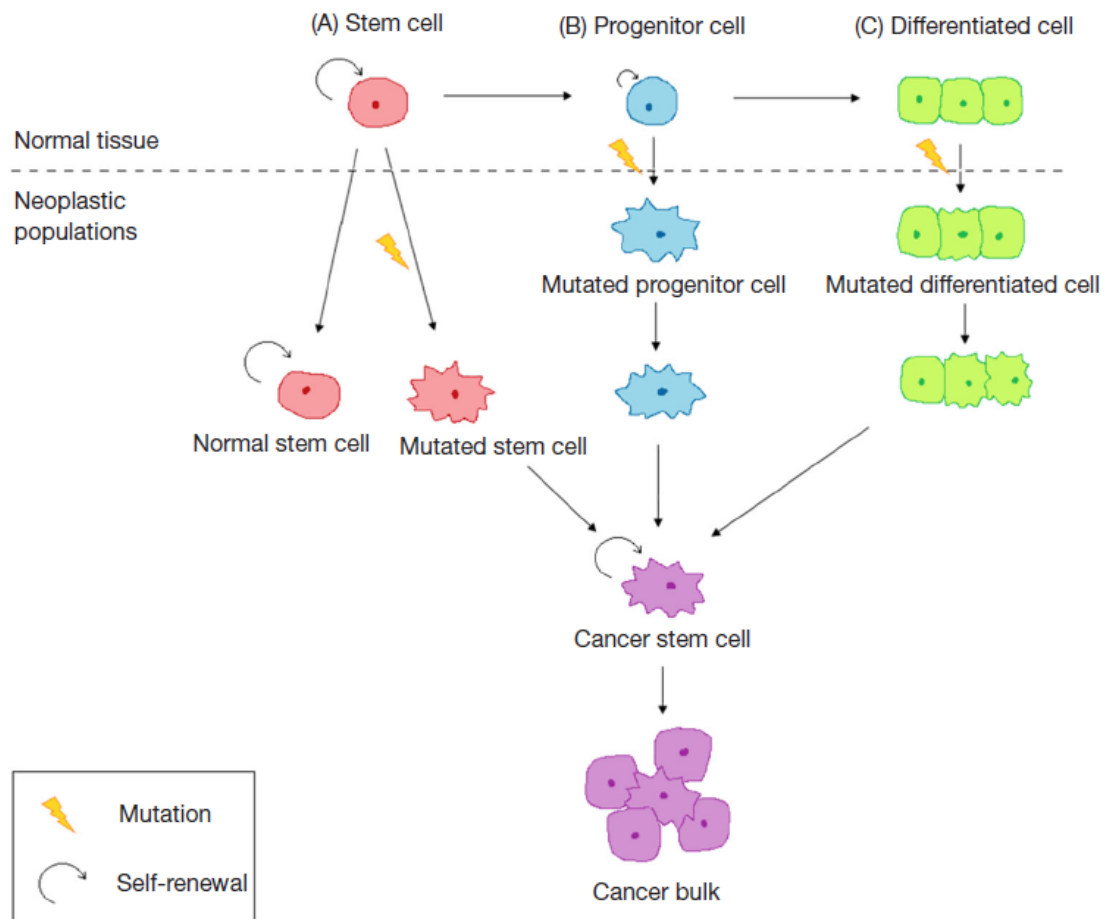
Los principales marcadores utilizados para el aislamiento, identificación y purificación de CSC incluyen moléculas de adhesión celular de superficie ( CD133, CD24, receptor de ácido hialurónico, CD44), enzimas citoprotectoras (como aldehído deshidrogenasa , ALDH), factores de transcripción (OCT-4, SOX-2) y bombas de eflujo de fármacos ( Transportadores de fármacos de casete de unión a ATP y transportador de resistencia a múltiples fármacos), teniendo diversas moléculas específicas en cada uno de los tipos de cáncer (Lu *et al*, 2013, Mannelli y Gallo, 2012).

Aunque se han caracterizado las células madre del cáncer y se conocen distintos marcadores para aislarlas, el origen de las células madre cancerosas aun genera controversia en los investigadores. Los factores que se requieren para el surgimiento de estas células son: 1) La acumulación de varias mutaciones para que una célula sea cancerosa y 2) una célula madre necesita superar cualquier restricción genética para adquirir las capacidades de autorrenovación y proliferación (Morrison 2002).

Hasta el momento la evidencia experimental permite proponer diferentes teorías sobre el origen de las CSC, en las cuales las células madre, las células progenitoras o las células diferenciadas pueden ser un modelo potencial para la formación de CSC (Sin y Lim, 2017).

Los modelos propuestos por Sin y Lim en el 2017 (Figura 8) incluyen los siguientes: 1) las CSC se originan a partir de células madre, donde varias mutaciones efectivas

que ocurrieron durante el estado de reposo de las células madre inician la transformación oncogénica. 2) las CSC se originan a partir de células progenitoras, mediante la acumulación de mutaciones múltiples en nivel de células progenitoras transitorias lo que conduce a la transformación de células neoplásicas. 3) las CSC se originan a partir de células diferenciadas, las cuales sufren mutaciones que provocan una dediferenciación para adquirir propiedades de células madre cancerosas (Sin y Lim, 2017).



**Figura 8. Hipótesis sugeridas sobre el origen de las células madre del cáncer.** Representación de los tres modelos del origen de las células madre cancerosas las

cuales inician la formación de tumores A) las CSC se originan a partir de células madre, B) las CSC se originan a partir de células progenitoras y C) las CSC se originan a partir de células diferenciadas (Sin y Lim, 2017).

## 2.2 Células madre del cáncer en mama

Las células madre del cáncer en mama comparten propiedades específicas muy similares a las células madre mamarias normales y a las células progenitoras mamarias parcialmente diferenciadas (Ma *et al*, 2014). Se caracterizan por la capacidad de someterse a la auto renovación, la diferenciación, la capacidad de iniciar tumores, la invasión y la resistencia a la terapia convencional que conducen a la generación de más células madre del cáncer y a la heterogeneidad celular (Luo *et al*, 2011). El estudio de los marcadores moleculares contribuye a la caracterización y al aislamiento de las subpoblaciones de células madre en cáncer (Zhou *et al*, 2019). Como se ha reportado en los tumores de cáncer de mama los marcadores para identificar las células madre tumorales son la CD44, CD24, CD133, CD49f, CXCL1, HMGCS, CD166, CD47, NANOG ALDH1 y ABCG2 (Al-Hajj *et al*, 2003, Ginestier *et al*, 2007, Leccia *et al*, 2013, Vasilopoulos *et al*. 2014, Wrigth *et al*, 2008, Zhou *et al*, 2019). Sin embargo, las proteínas celulares CD44 + / CD24- se han establecido como marcadores de superficie mínimos para las células madre del cáncer de mama (Al-Hajj *et al*, 2003).

## 2.3 CD44

CD44 es una glucoproteína transmembranal que interactúa con ligandos como osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de matriz, generalmente presentes en las células progenitoras, juega un papel importante en la adhesión, en la señalización intracelular, mejora la proliferación celular, participa en angiogénesis tumoral,

diferenciación, migración y propiedades invasivas en el cáncer de mama (Lagadec *et al*, 2012, Sin y Lim, 2017). CD44 interacciona con el ácido hialurónico para promover la invasividad celular y la metástasis, sin embargo, el mecanismo sigue siendo desconocido. CD44 mantiene la tumorigénesis y potencia el surgimiento de células con fenotipo troncal (Van *et al*, 2011). CD44 muestra una fuerte expresión en células madre de cáncer de mama por lo que se le han considerado como un marcador mínimo para estas (Sin y Lim, 2017).

## **2.4 CD24**

CD24 es una glicoproteína de la superficie celular que mejora las propiedades de adhesión, promueve la metástasis y la proliferación tumoral (Schabatt *et al*, 2006). Curiosamente diversos estudios han demostrado que la regulación positiva de CD24 es capaz de inhibir la potencia tumoral de las células madre del cáncer de mama (Schabatt *et al*, 2006, Sin y Lim, 2017) aunque CD24 se expresa en una amplia variedad de cánceres (Ahmed *et al*, 2012, Sin y Lim, 2017).

## **2.5 CD133**

Es un miembro de las glicoproteínas transmembranales de pentaspan, que se localizan específicamente en protuberancias celulares. La función fisiológica de CD133 en la biología normal y en la progresión del cáncer sigue siendo difícil de entender, se sabe que CD133 se localiza preferentemente en protuberancias y microvellosidades de la membrana plasmática, lo que sugiere su participación en la organización de la membrana (Glumaci y LeBeua., 2018). La localización sub celular de CD133 le permite unirse directamente a balsas de lípidos que contienen colesterol, donde puede participar en varias cascadas de señalización (Glumaci y LeBeua., 2018).

## 2.6 ALDH1

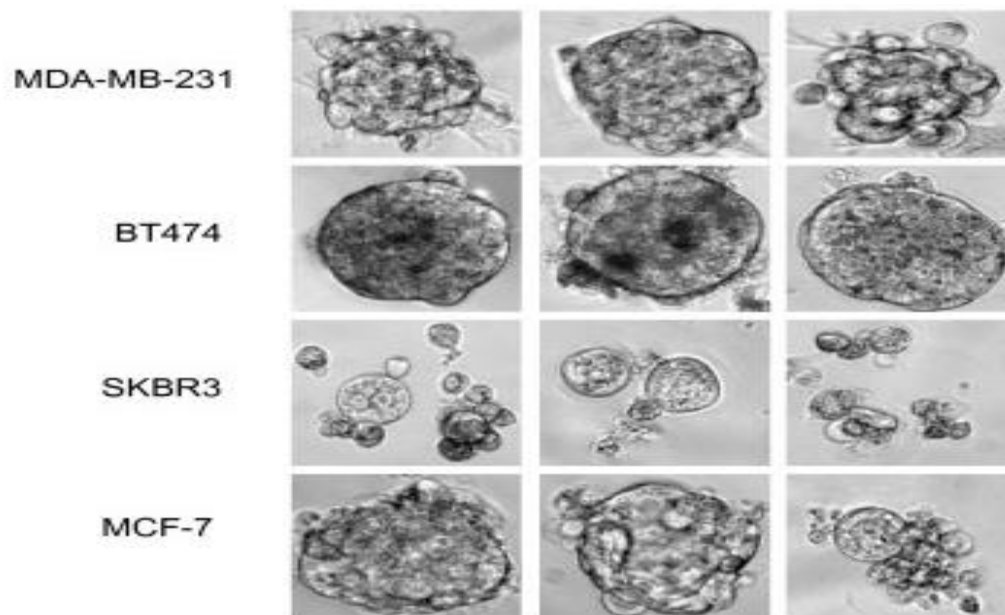
La aldehído deshidrogenasa (ALDH) es una enzima que cataliza la oxidación de aldehídos intracelulares y medía la conversión de retinol en ácidos retinoicos, que luego actúan como moduladores de la proliferación celular (Sin y Lim, 2017). Se ha visto que ALDH exhibe un papel funcional en la proliferación, diferenciación y autoprotección celular y que la sobreexpresión de ALDH1 conduce a una quimiorresistencia en diversos tipos de cáncer (Moreb *et al.*, 2012, Sin y Lim, 2017).

## 2.7 Nanog

Es un factor transcripcional encargado de regular la transcripción de genes implicados en la proliferación y en la autorrenovación de la masa celular interna y de las células madre embrionarias (ES). Este factor está implicado en el mantenimiento de la pluripotencia de células madre embrionarias y previene su diferenciación hacia linajes de trofotodermo y endodermo extraembrionario (Kim *et al.*, 2005, Hyslop *et al.*, 2005, Hayashi *et al.*, 2015). Bloquea la diferenciación del mesodermo inducida por proteínas morfogenéticas óseas de las células madre embrionarias interactuando con SMAD1 e interfiriendo con el reclutamiento de coactivadores para los complejos transcripcionales SMAD activos (Kim *et al.*, 2005, Hyslop *et al.*, 2005, Hayashi *et al.*, 2015). Actúa como represor transcripcional capaz de autorreprimir su expresión en células diferenciadoras (ES), se une a su propio promotor después de la interacción con ZNF281/ZFP281, lo que conduce al reclutamiento del complejo NuRD y la posterior represión de la expresión. Cuando se sobreexpresa, promueve que las células entren en la fase S y que comiencen su ciclo de proliferación (Kim *et al.*, 2005, Hyslop *et al.*, 2005, Hayashi *et al.*, 2015).

## 2.8 Formación de esferoides

Una propiedad importante de las células madre del cáncer como de las células madre normales, es formar esferas y crecer en colonias en medio sin suero o en medio de agar blando. La agregación y proliferación de células madre *in vitro* se ha demostrado en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y factor B27, con lo que se forman estructuras tridimensionales esféricas con variantes dependientes de las líneas celulares (Figura 9) (Qiu *et al*, 2012, Han *et al*, 2013). El cultivo de los esferoides tumorales multicelulares ha cobrado relevancia en los últimos años como modelo *in vitro* de los tumores sólidos (Gallardo *et al*, 2006). La estructura general de los esferoides mimetiza las etapas iniciales de los micro tumores sólidos *in vivo* antes de la vascularización. Por lo anterior han sido utilizados en el estudio de la biología tumoral incluyendo migración, invasión, angiogénesis, además que la resistencia a diferentes fármacos antineoplásicos de los esferoides es similar a la del tumor sólido por lo que empiezan a ser incluidos en pruebas fármaco-toxicológicas y en la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer como paso previo a su aplicación en los tumores sólidos *in vivo* (Gallardo *et al*, 2006).



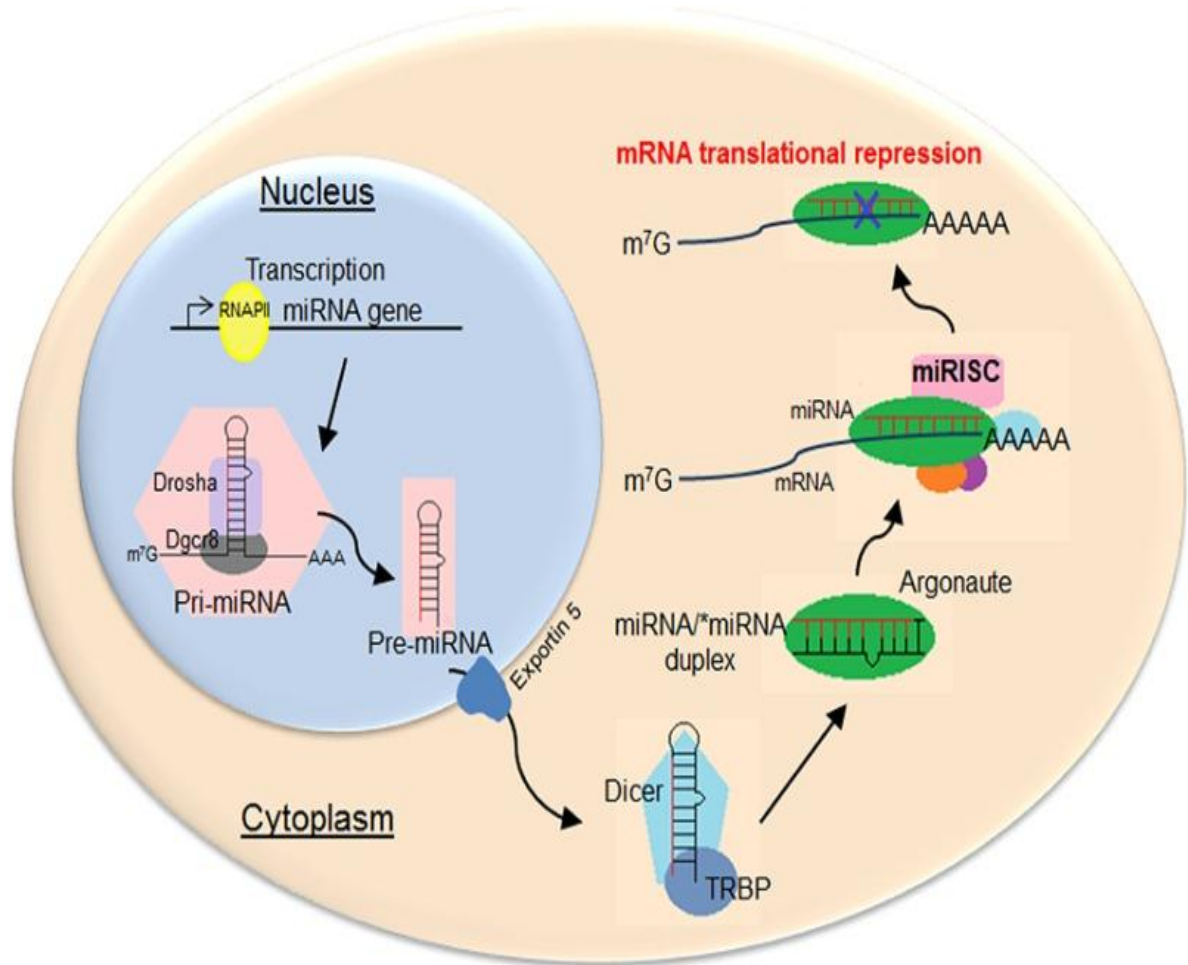
**Figura 9. Esferoides formados por las líneas celulares de cáncer de mama.** Imágenes capturadas de la formación de los esferoides con las líneas celulares MDA.MB-231, BT474, SKBR3 y MCF7 (Froehlich *et al*, 2016).

## 2.9 Los miRNAS reguladores

Los miRNAs son una clase de ARN no codificantes de 22 pares de bases que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, los miRNAs se transcriben de secuencias de ADN en miRNAs primarios, se procesan en miRNAs precursores y finalmente miRNAs maduros (O'brien *et al*, 2018). En la mayoría de los casos, los miRNA interactúan con la región no traducida 3' UTR de los ARNm diana para inducir la degradación del ARNm y la represión traduccional (O'brien *et al*, 2018) también se ha informado de la interacción de miRNAs con otras regiones, incluida la 5' UTR y los promotores de genes (Broughton *et al* 2016).

La mayoría de los miRNAs se transcriben mediante RNA Pol II y llevan un extremo de 7-metil-guanilato en el extremo 5' y la cola poli (A) característica del extremo 3' de los

Mrna (Figura 10) (Leuu *et al*, 2003). 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 (Ha y Kim 2014, O'brien *et al*, 2018). 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) (Denli *et al*, 2004), el cual es translocado desde el núcleo al citoplasma por el sistema Exportina5-Ran-GTP (Leuu *et al*, 2003). 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, este procesamiento implica la eliminación del bucle terminal, lo que resulta en un dúplex miRNA maduro (Denli *et al*, 2004, O'brien *et al*, 2018). La direccionalidad de la cadena de miRNA determina el nombre de la forma madura de miRNA, la cadena 5p surge del extremo 5' de la horquilla pre-miRNA, mientras que la cadena 3p se origina en el extremo 3' (O'brien *et al*, 2018). Finalmente, ambas cadenas derivadas del dúplex del miRNA maduro pueden cargarse en la familia de proteínas Argonauta (AGO1-4 en humanos) de una manera dependiente de ATP (Yoda *et al*, 2010, O'brien *et al*, 2018). La selección de la cadena que formará parte del complejo RISC se basa en parte en la estabilidad termodinámica en los extremos 5' del dúplex del miRNA o en una U 5' en la posición de nucleótido 1 ( Khvvorova *et al*, 2003, O'brien *et al*, 2018). La cadena guía del RNA de 22 nt como un miRNA maduro tiene la función de guiar al complejo RISC hacia las regiones 3'UTR de los RNAs, la asociación de miRNA-RISC en la represión del gen diana promueve la degradación de mRNA y/o la inhibición de la traducción dependiente de la complementariedad existente entre la secuencia semilla del miRNA y del fragmento 3'-UTR del RNAm (Dusenbery y Hata, 2010, O'brien *et al*, 2018).



**Figura 10. Biogénesis de miRNAs.** Biogénesis de los miRNA por la polimerasa II en el núcleo, mecanismos hasta la maduración de miRNAs y su unión con el complejo miRISC para silenciar o degradar los mRNA (Hajarnis *et al*, 2015).

## 2.10 Los miRNAs en cáncer

Los miRNA desempeñan un papel importante que determina el destino celular, participando principalmente en las vías de señalización implicadas en la proliferación y muerte celular, además de estos procesos vitales, los miRNA están implicados en diversas actividades celulares, como la respuesta inmune, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Gntier *et al*, 2007). Los miRNAs se expresan de manera aberrante en distintos tipos de cáncer y dichos cambios se han asociado a alteraciones en el números de copias, cambio de ubicaciones, amplificación, deleción o translocación de los genes que codifican para éstos (Peng y Croce, 2016). El primer caso reportado de la expresión anormal de un miRNA fue el miR-15a y el miR-16, que se agrupan en el cromosoma 13q14, una región frecuentemente eliminada en la leucemia linfocítica crónica (CLL) de células B y otros tipos de cáncer (Lee y Dutta, 2009).

En cáncer de colon se ha demostrado que varios miRNAs se encuentran desregulados debido a la pérdida del supresor tumoral p53, dónde los niveles de expresión de hsa-let-7g, hsa-miR-181b y hsa-miR-200c se sobre expresan en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales por lo que pueden estar asociados con la tumorigénesis en este tipo de cáncer (Nakajima *et al*, 2006).

En neuroblastoma el cual es un tumor pediátrico altamente maligno que surge por el desarrollo de células aberrantes embrionarias en la cresta neural, se demostró un mecanismo regulador que involucra al miR-9, miR-125a y al miR-125b, los cuales desempeña un papel importante en el control de la proliferación celular de la línea celular de neuroblastoma SK-N-BE al modular la expresión del receptor trkC de neurotrofina, el cual es fundamental para regular el crecimiento celular del neuroblastoma por lo que se les ha atribuido un papel de oncosupresores (Laneve *et al*, 2007).

De igual manera, en perfiles de expresión de miRNAs en adenocarcinoma ductal pancreático identificaron un gran número de miRNA que se expresan de manera aberrante, los cuales incluyen al miR-221, miR-100, miR-125b y miR-21 (Lee *et al*, 2007).

En tejidos de cáncer de mama el miR-204 se encuentra reprimido en comparación con los tejidos de mama normales (Flores *et al*, 2016), la disminución de la expresión de miR-204 se asocia con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Salinas *et al*, 2018). En estudios realizados por Salinas y colaboradores en el 2018 se demostró que la migración e invasión de las células cancerosas se redujo significativamente al restaurar la expresión ectópica de miR-204 en células de cáncer de mama (Salinas *et al*. 2018).

**Tabla 2. Ejemplos de miRNAs desregulados en cáncer.** Diferentes miRNAs se encuentran sobre expresados o reprimidos en diversos tipos de cáncer.

| Cáncer                  | Expresión       | miRNA involucrado | Referencia                   |
|-------------------------|-----------------|-------------------|------------------------------|
| Neuroblastoma           | Reprimido       | miR-9             | Laneve <i>et al.</i> , 2007  |
| Glioblastoma            | Sobre expresado | miR-10            | Ciafre <i>et al</i> , 2005   |
| Carcinoma Hepatocelular | Sobre expresado | miR-18            | Murakami <i>et al</i> , 2006 |
| Cáncer de mama          | Reprimido       | miR-204           | flores <i>et al.</i> , 2016  |
| Cáncer de páncreas      | Sobre expresado | miR-21            | Lee <i>et al</i> , 2007      |

|                    |           |        |                            |
|--------------------|-----------|--------|----------------------------|
| Cáncer pulmonar    | Reprimido | miR-34 | Bommer <i>et al</i> , 2007 |
| Cáncer en tiroides | Reprimido | miR-30 | Visone <i>et al</i> , 2007 |

## 2.11 Función del miRNA-204 en diferentes tipos de cáncer

Varios miRNAs desempeñan funciones críticas en el desarrollo y la progresión de tumores sólidos (Li *et al*, 2016). El primer estudio sobre el miR-204 en cáncer fue reportado por Rolda y colaboradores en el 2007, quienes observaron que este está disminuido en los insulinomas el cual es un tipo de tumor del páncreas. Diversos estudios en diferentes tipos de tumores sólidos, incluidos melanomas primarios, glioma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor de cabeza, cuello y cáncer endometrial han revelado que el miR-204 juega un papel importante como supresor de tumor (Li *et al*, 2016).

Se ha reportado que en carcinoma renal de células claras el nivel de expresión del miR-204 disminuyó significativamente en comparación con el tejido renal normal, al restaurar su expresión en células 786-0 se observó una disminución significativa en el crecimiento tumoral (Mikhaylova *et al* 2012).

En un estudio de neuroblastoma el cual es un tipo de cáncer que causa un alta mortalidad en niños, se observó que la expresión del miR-204 está reprimida y al restaurar su expresión ectópica aumentó significativamente la sensibilidad al cisplatino y al etopósido *in vitro*, asimismo se determinó que el miR-204 reprime a NTRK2, un potente oncogén involucrado con la resistencia a los medicamentos de quimioterapia en el neuroblastoma (Ryan *et al*, 2012).

Sun y colaboradores en el 2015 identificaron una correlación inversa entre el nivel de expresión del miR-204 con la invasión y el fenotipo epitelio mesenquimal de las

células de cáncer de esófago, donde al restaurar la expresión del miR-204 estos eventos se veían significativamente disminuidos, además, demostraron que la proteína FOXM1 es un gen objetivo directo del miR-204, el cual se ha visto implicado en la invasión y la transición epitelio mesenquimal en cáncer de esófago, por lo que el miR-204 regula estos eventos al actuar directamente sobre la región 3'UTR del ARNm de FOXM1 y suprimir su expresión (Sun *et al*, 2015).

En un estudio de corte realizado por Flores y colaboradores en el 2016, identificaron que la expresión del miR-204 en células de cáncer de mama fue significativamente baja en comparación con los tejidos adyacentes normales, al igual que en las líneas celulares de cáncer de mama en comparación con líneas de mama sanas. Se ha demostrado que al restaurar la expresión ectópica de miR-204 en células de cáncer de mama se reduce la proliferación y la angiogénesis a través de la regulación de la ANGPT1 y TGFβR2 (Flores *et al*, 2016) así como la formación de los tubos del mimetismo vasculogénico (Salinas *et al*, 2018).

**Tabla 3. Genes blanco del miR-204 en cáncer.** Blancos validados del miR-204 en diferentes tipos de cáncer.

| Cáncer                 | Expresión | Blancos validados | Referencia                  |
|------------------------|-----------|-------------------|-----------------------------|
| Carcinoma nasofaríngeo | Reprimido | CDC42             | Ma L <i>et al.</i> , 2014   |
| Retinoblastoma         | Reprimido | CYCLIN D2         | Wu X <i>et al.</i> , 2015   |
| Glioma                 | Reprimido | EPHB2             | Ying Z <i>et al.</i> , 2013 |

|                    |                 |        |                                |
|--------------------|-----------------|--------|--------------------------------|
| Cáncer endometrial | Reprimido       | FOXC1  | Chung TK <i>et al.</i> , 2012  |
| Cáncer de próstata | Sobre expresado | PDEF   | Turner DP <i>et al.</i> , 2011 |
| Nefroblastoma      | Reprimido       | MEIS1  | Koller K <i>et al.</i> , 2014  |
| Cáncer de mama     | Reprimido       | ANGPT1 | Flores <i>et al.</i> , 2016    |

## 2.12 Los miRNAs participan en la regulación del fenotipo troncal en células de cáncer

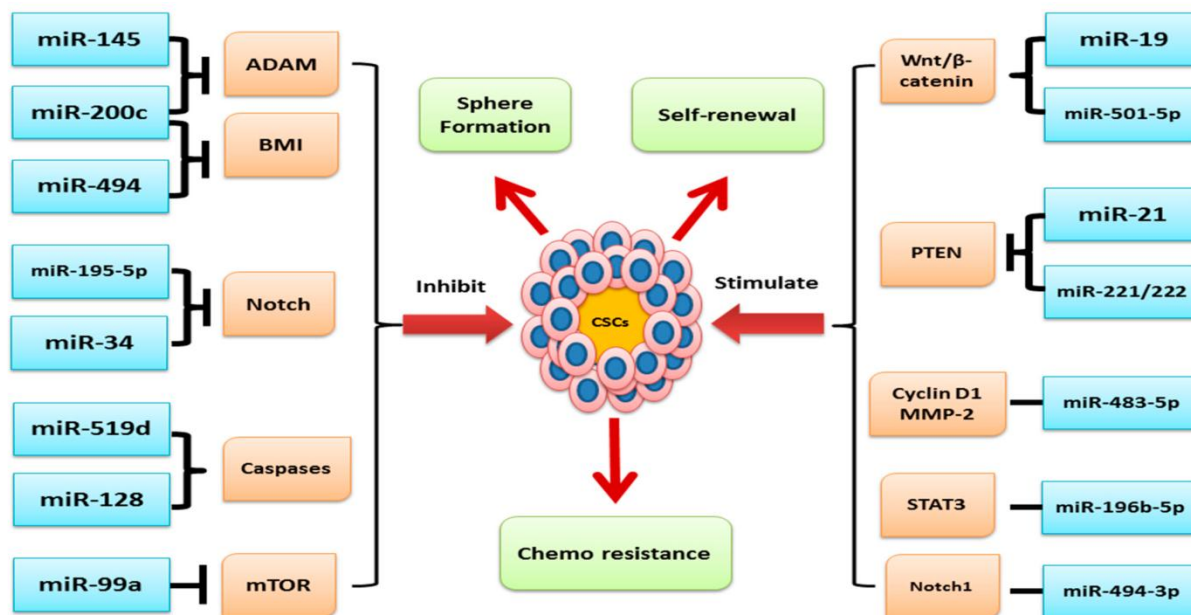
Los miRNAs participan en diversos mecanismos celulares, uno de estos es la reprogramación celular la cual se refiere al proceso de reprogramación de una célula somática diferenciada a un estado pluripotente (Li *et al.*, 2017). Las células madre pluripotentes inducidas en humanos se generan por transducción de las combinaciones alternativas de Oct3 / 4, Sox2, Nanog y Lin28 (Yu *et al.*, 2007). Se ha observado que ciertos miRNAs regulan la reprogramación de las células madre pluripotentes, por ejemplo, la sobreexpresión del miR-291-3p, miR-294 y miR-295 mejoraron la eficiencia de la pluripotencia inducida por Klf4, Oct4 y Sox2, lo cual se ve aumentado en presencia de cMyc el cual se une al promotor de estos miRNAs, lo que sugiere que son potenciadores de la pluripotencia promovida por cMyc (Judson *et al.*, 2009). Además, los miRNAs participan en el proceso de reprogramación regulando los factores del ciclo celular. Por ejemplo, la familia miR-25 y la familia miR-130/301/721 tienen como blanco a p21, un inhibidor del ciclo celular el cual promueve la eficiencia de la reprogramación celular (Li *et al.*, 2017). En células madre

embrionarias algunos de los miRNAs involucrados en la pluripotencia son el miR-145 el cual reprime la expresión de Oct4, Sox2 y Klf4 (Xu *et al*, 2009), de igual manera los miR-134, miR-296 y miR-470 que tienen como blanco los RNAm de Sox2, Nanog y Oct4 para regular la pluripotencia (Tay *et al*, 2008). Cada una de las células madre poseen perfiles de expresión de miRNAs específicos que modulan el destino de las células madre, este mecanismo podría usarse con el fin de tratar diversas enfermedades como el cáncer y su mantenimiento de las células madre (Li *et al*, 2017).

Los miRNAs pueden inhibir o estimular el desarrollo y las características de las CSC, como la capacidad de autorrenovación, la formación de esferas y quimiorresistencia a través de vías de señalización que participan en supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC (Khan *et al.*, 2019).

De acuerdo a diversos trabajos de investigación se ha demostrado que muchos miRNAs regulan las CSC (Figura 11). Algunos de los miRNAs que inhiben el surgimiento y las características distintivas de las células madre del cáncer son el miR-145 y el miR-200c, los cuales actúan inhibiendo las proteínas ADAM, el miR-494 mediante el control de la expresión de BMI, el miR-195-5p y el miR-34 mediante la involucrado en la vía Notch1 y el miR-99a mediante la inhibición de la diana de la rapamicina en los mamíferos (mTOR) (Khan *et al.*, 2019), el miR-519d y el miR-128 inhiben las CSC mediante la activación de caspasas.

Por otro lado, los miRNAs que pueden estimular el desarrollo de CSC son el miR-19 y el miR-501-5p mediante la activación de la vía de señalización de WNT/ $\beta$ -catenina, el miR-21 y el miR-221/222 mediante inhibición de PTEN y el miR-196b-5p al activar la vía de señalización de STAT3; lo que en conjunto puede aumentar la quimiorresistencia, la renovación celular y la formación de esferoides (Khan *et al.*, 2019),



**Figura 11. miRNAs que participan en la regulación de las características distintivas de las células madre del cáncer.** Representación de las características distintivas de las células madre del cáncer con los diversos miRNAs que participan en la regulación de estos procesos, la participación que tienen puede ser de oncogenes o de supresores de tumor (Khan *et al.*, 2019).

## **II. Hipótesis**

Si el miR-204 modula genes involucrados en el mantenimiento de las propiedades troncales en células de cáncer de mama, entonces su sobreexpresión inhibirá el mimetismo vasculogénico asociado al fenotipo troncal.

## **III. Justificación**

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial. Las células troncales de cáncer de mama son capaces de renovar el tumor, presentan mayor resistencia a la quimioterapia y mayor metástasis. El miR-204 es un supresor de tumor que inhibe los hallmarks del cáncer, sin embargo no se conoce su función en el mimetismo vasculogénico mediado por las células troncales de cáncer de mama, por lo que su estudio podría representar una nueva alternativa terapéutica en cáncer de mama.

## **IV. Objetivos**

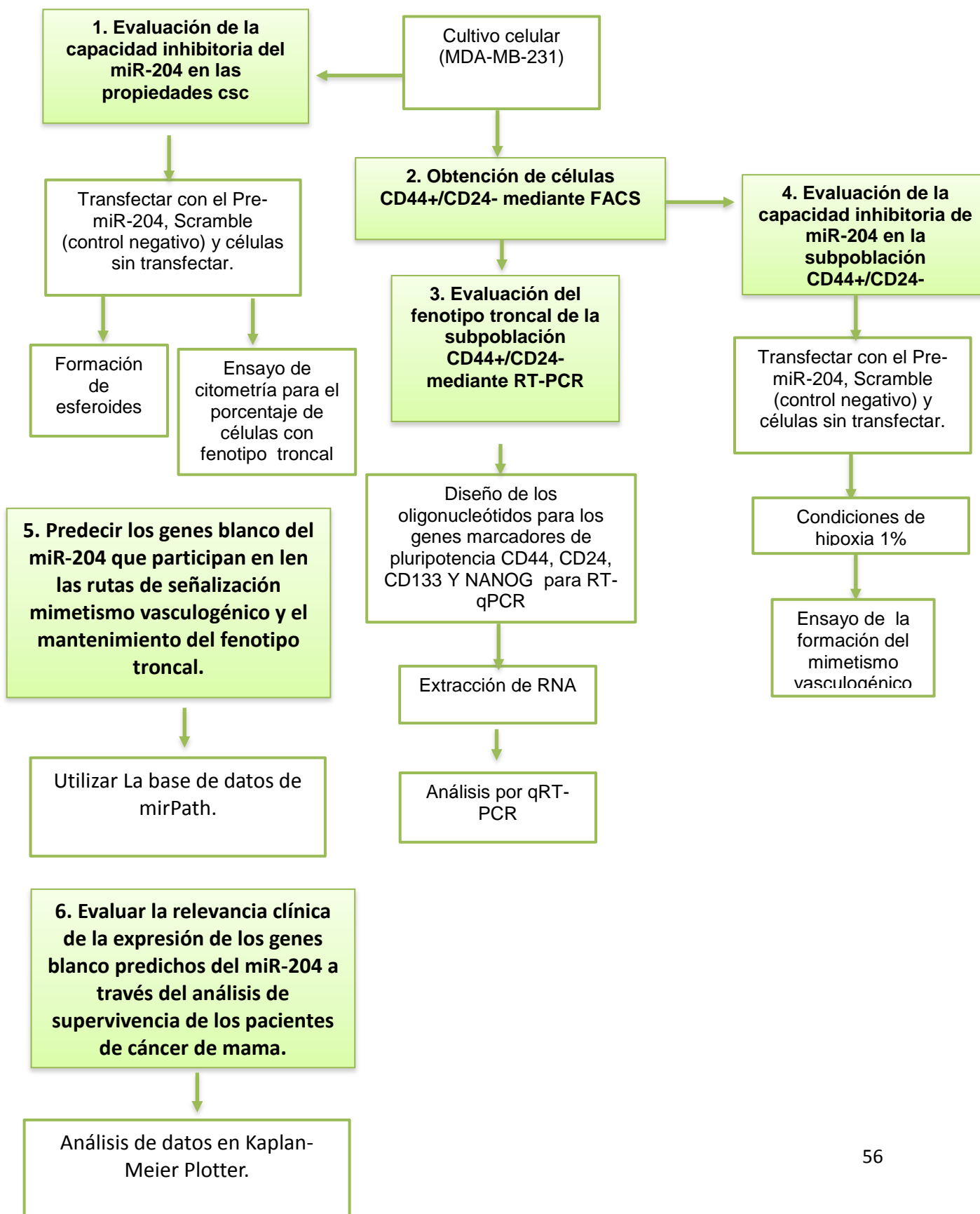
### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el papel funcional del miR-204 en el mimetismo vasculogénico en las células troncales CD44+/CD24- de cáncer de mama.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del miR-204 en las propiedades troncales (porcentaje de células CD44+/CD24- y formación de mamosferas en la línea células MDA-MB-231).
2. Aislar la subpoblación de células troncales CD44+/CD24- a partir de la línea celular metastásica MDA-MB-231 de cáncer de mama.
3. Evaluar el fenotipo troncal de la subpoblación CD44+/CD24- mediante el análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia CD44, CD24, CD133 y nanog.
4. Determinar la capacidad del miR-204 para inhibir el fenotipo troncal de las CSC (CD44+/CD24-) mediante el análisis de los efectos inhibitorios en:
  - Mimetismo vasculogénico
5. Predecir los genes blanco del miR-204 que participan en las rutas de señalización del mimetismo vasculogénico y en el mantenimiento del fenotipo troncal.
6. Evaluar la relevancia clínica de la expresión de los genes blanco predichos del miR-204 a través del análisis de supervivencia de los pacientes de cáncer de mama.

## V. Estrategia experimental



## **VI. Metodología**

### **6.1 Condiciones de cultivo de la línea celulares**

La línea celular adherente de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC: HTB-126), se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gluta-MAX-I, bajo en glucosa y glutamina (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 % (Gibco, Life Technologies), penicilina y estreptomina (0.5 %). Se incubó a 37 °C con una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>.

### **6.2 Sub-cultivo de la línea celular MDA-MB-231**

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

### **6.3 Aislamiento de las células CD44+/CD24- mediante citometría de flujo**

Se sembraron 250,000 células en placa de 6 pozos y durante 24–48 horas hasta obtener una confluencia del 80%. Se preparó el medio para la transfección con lipofectamina, optimen, DMEM y el miR-204 5p, de igual manera para el scramble a 30  $\mu\text{m}$  y 60  $\mu\text{m}$ . Se retiró el medio de los pozos, y se lavó con PBS para agregar el medio para la transfección, se dejó incubando por 48 horas. Se retiró el medio, se lavó con PBS y se despegaron las células con PBS-EDTA y tripsina. Se cuantificaron las células con azul de tripano en cámara de Neubauer. Se tiñeron con 1  $\mu\text{L}$  de anticuerpo para cada millón de células resuspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de medio, durante 10 minutos a 4° C en aislamiento de luz, posteriores a esto se realizaron 3 lavados con buffer PBS para eliminar el anticuerpo. Se tiñeron células con anticuerpos CD44, CD24 y CD24/CD44 para llevar al citómetro y como control se llevaron un millón de células sin teñir.

### **6.4 Transfección del precursor del miR-204**

Las líneas celulares de cáncer de mama subpoblación CD44+/CD24- se transfectaron con la molécula precursora del miR-204-5p, así como con la secuencia scramble. Un día previo a la transfección, se sembraron 250,000 células por pozo en placas de 6 pozos. Al día siguiente, en un tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de medio reducido OptiMem con 5  $\mu\text{L}$  del agente de transfección siPORT™ Amine (Applied Biosystems) para cada pozo a transfectar, al mismo tiempo, en otro tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de medio reducido OptiMem con 7.5  $\mu\text{L}$  del precursor pre-miR-204 o del premiR-Neg-Ctrl (scramble) a una concentración de 30 y 60 nM y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente durante 10 min, transcurrido el tiempo, se pasó la mezcla de un tubo eppendorf al otro y se

---

homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 min a T.A. Consecutivamente, esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente suplementado (con un volumen final 2.5 mL/pz). Se agitó suavemente y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su análisis. La expresión relativa del miR-204 expresado se evaluó a las 48 h, mediante qRT-PCR con sondas TaqMan. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de ct ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ).

### **6.5 Formación de esferoides**

Se sembraron 250,000 células en placa de 6 pozos, se esperó durante 24–48 horas hasta obtener una confluencia del 80%. Se retiró el medio de los pozos, se lavó con PBS y se agregó el medio para la transfección, se incubó por 48 hrs. Se lavó con PBS y despegaron las células con PBS-EDTA y tripsina. Posterior a esto se sembraron las células transfectadas en placa de 6 pozos de baja adherencia con medio DMEM, FGF, EGF y B27 con un volumen de 2.5 mL, agregando 1000 células por cada mililitro. Cada 3 días se realizó cambio de medio, colocando durante 15 minutos la placa a 45° para que los esferoides se movieran al fondo y así retirar el medio de la parte superior. Se tomaron fotos a las 0 hrs, 3, 6, 9, 12 y 14 días.

### **6.6 Lisis y extracción de ARN total a partir de la línea celular**

Para la extracción del ARN total de la línea celular MDA-MB-231 transfectada y sin transfectar y de las subpoblación con fenotipo troncal transfectada y sin transfectar. Primeramente, se despegaron las células, para eso se le colocarán 0.75 mL de PBS-EDTA pH 7.0 y 32 µL de tripsina 0.25 % (Gibco) por pozo y se incubaron durante 5 min a 37 °C, pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1,200 r.p.m a 4 °C durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 mL de PBS pH 7.0 , se centrifugó nuevamente a 1,200 r.p.m a 4 °C

durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Se obtuvo una pastilla de células, a las que se les agregó 1 mL de trizol y se mezcló por pipeteo, se recuperó el lisado celular en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se incubó durante 5 min a T.A, se agregó 200 µL de cloroformo por cada mL de trizol utilizado y se mezcló por agitación vigorosa durante 15 segundos, se incubó el tubo eppendorf durante 3 min a T.A y se centrifugó a 12,500 r.p.m por 25 min a 4°C. Posterior a la centrifugación, se recuperó la fase acuosa cuidando de no mezclar las otras fases, y se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL, se le adicionaron 500 µL de isopropanol para precipitar el ARN y se incubó en hielo durante 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12,500 r.p.m durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1mL de etanol al 75 % y se dejó secar durante 5 min. Posteriormente, se re-suspendió en 20 µL de agua libre de RNAsas. Finalmente el ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1% la integridad.

### **6.7 Transcripción reversa y reacción de la cadena polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)**

Para la realización de la RT-PCR se utilizó 1 ug de RNA de las células MDA-MB-231 y de la subpoblación con fenotipo troncal CD44+/CD24-. El volumen final para la reacción fue de 50 µl donde agregamos 1µl de SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix, 25 µl de 2x reacción mix, de los primers para CD24, CD44, CD133 y Nanog se agregó 1 µl de los primers sentido (10 µm) y 1 µl anti sentido (10 µm), 0.5 µl de la sonda fluorogénica (10 µm) y se aforó con agua libre de RNAsa. La reacción se realizó de la siguiente manera: 50 ° C durante 5 min, 95 50 ° C durante 2 min y 40 ciclos a 95 ° C durante 15 segundos, 60 ° C durante 30 segundos. Las pruebas se normalizaron usando GAPDH como control.

## **6.8 Diseño de oligonucleótidos**

Se descargaron las secuencias del mRNA de cada uno de los marcadores de pluripotencia CD24, CD44, CD133 y NANOG en Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para aquellos que presentan isoformas se realizó un alineamiento en clustalw (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), para seleccionar las secuencias conservadas. En primer3 input (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) se colocaron las características de los oligonucleótidos deseados así como las secuencias alineadas para obtener los primers candidatos, posterior a esto se seleccionaron los primers más aptos y enviaron a sintetizar.

## **6.9 Ensayo de mimetismo vasculogénico**

El ensayo de mimetismo vasculogénico se realizó a través de un cultivo en 3D. En primer lugar las células fueron transfectadas de acuerdo al protocolo explicado anteriormente en las condiciones de control, scramble y miR-204 incubándolas a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> y 1% de O<sub>2</sub> por 48 horas. Transcurridas las 48 horas se despegaron las células con PBS-EDTA y tripsina. Se colocaron 50 µL de matrigel preparada (900 µL + 100 µL de PBS) por pozo (matriz geltrex) en una placa de 96 pozos y se incubó por 1 ha 37 ° C. Posteriormente de las células obtenidas de la transfección y sometidas a hipoxia se agregaron 30,000 células por pozo para cada condición por duplicado, las cuales fueron adicionadas con medio DMEM sin suplementar. Las

cuales se monitorearon y documentaron con evidencia fotográfica a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas. Posterior a esto se realizó la cuantificación de nodos y capilares en cada una de las horas evaluadas y se realizó un análisis estadístico en GraphPad Prims versión 6.01.

## **6.10 Análisis Bioinformáticos**

Los blancos de miR-204 se identificaron utilizando los softwares TarBase (<http://www.tarbase.org/>), TargetScan 7.0 ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)), y mirPath (<http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/>). Los genes diana que fueron predichos por los algoritmos que se encuentran en las vías de señalización del mimetismo vasculogénico y en el mantenimiento de las células pluripotentes se seleccionaron para un análisis adicional en la base de datos de Kaplan-meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>).

---

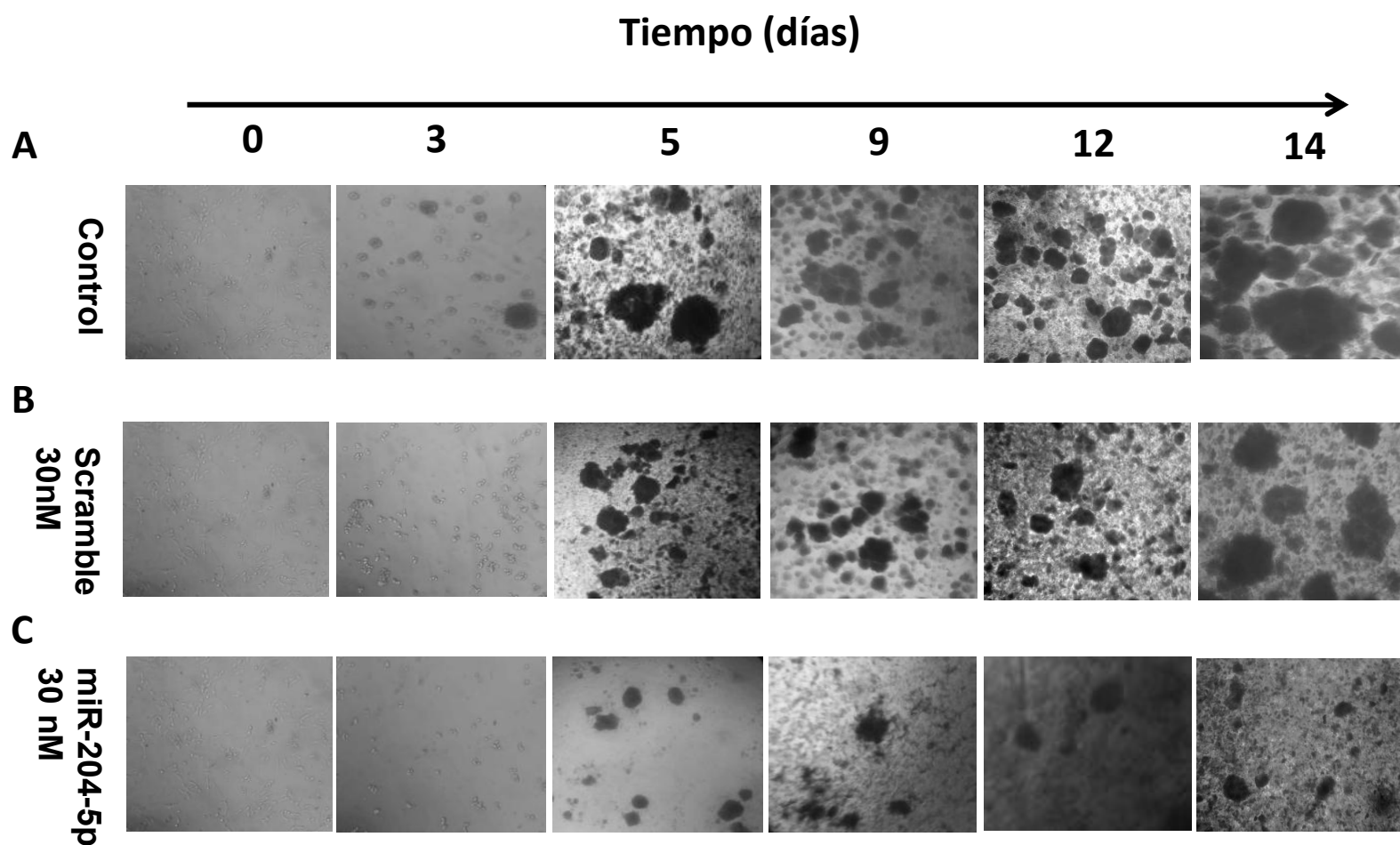
## VII. Resultados

### 7.1 Efecto del miR-204 en la formación de esferoides de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231

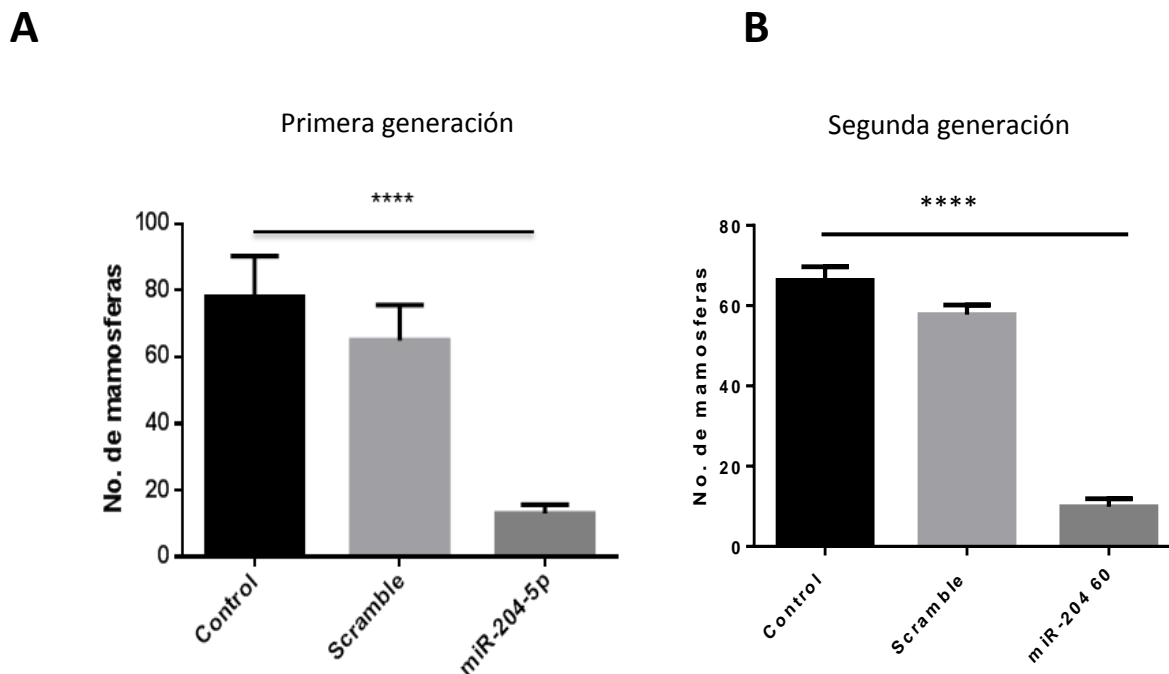
Con el fin de evaluar si la restauración del miR-204 era capaz de inhibir la formación de esferoides en las células MDA-MB-231, se transfectó el precursor del miR-204 a una concentración de 30 nM, posteriormente se llevó a cabo el ensayo de formación de esferoides bajo las condiciones control (sin transfectar), scramble (30 nM) y miR-204-5P (30 nM) en placas de baja adherencia, monitoreando el ensayo durante 14 días en un microscopio de campo claro.

Los resultados muestran que en la condición control sin transfectar (Fig. 12A) los esferoides se formaron a partir del tercer día y conforme pasa el tiempo el número de éstos aumenta considerablemente, así como el tamaño de los mismos, observando estas estructuras tridimensionales con su forma esférica característica en el sobrenadante del medio. En la condición scramble (Fig. 12B) se tuvo un comportamiento similar al del control, los esferoides se observan desde el tercer día y por consiguiente el número y tamaño de los mismo va en aumento. De manera interesante en la condición transfectada con el miR-204 (Fig. 12C) la formación de esferoides se observó hasta el quinto día, retrasando la aparición de estas estructuras, además, durante el tiempo de monitoreo el número y tamaño de los esferoides era menor en comparación con los registrados en las condiciones de control y scramble (Figura 13 y 14). Los resultados indican que la restauración del miR-204 en la línea celular MDA-MB-231 disminuye significativamente el número de esferoides formados hasta los 14 días con respecto a las células control y transfectadas con scramble (Fig. 13A). Después de los 14 días los esferoides se disgregaron con el fin de evaluar si la transfección con el mir-204 podía inhibir la autorrenovación de estas estructuras tridimensionales, por lo que se procedió a resembrar las células disueltas en las mismas condiciones que las células iniciales.

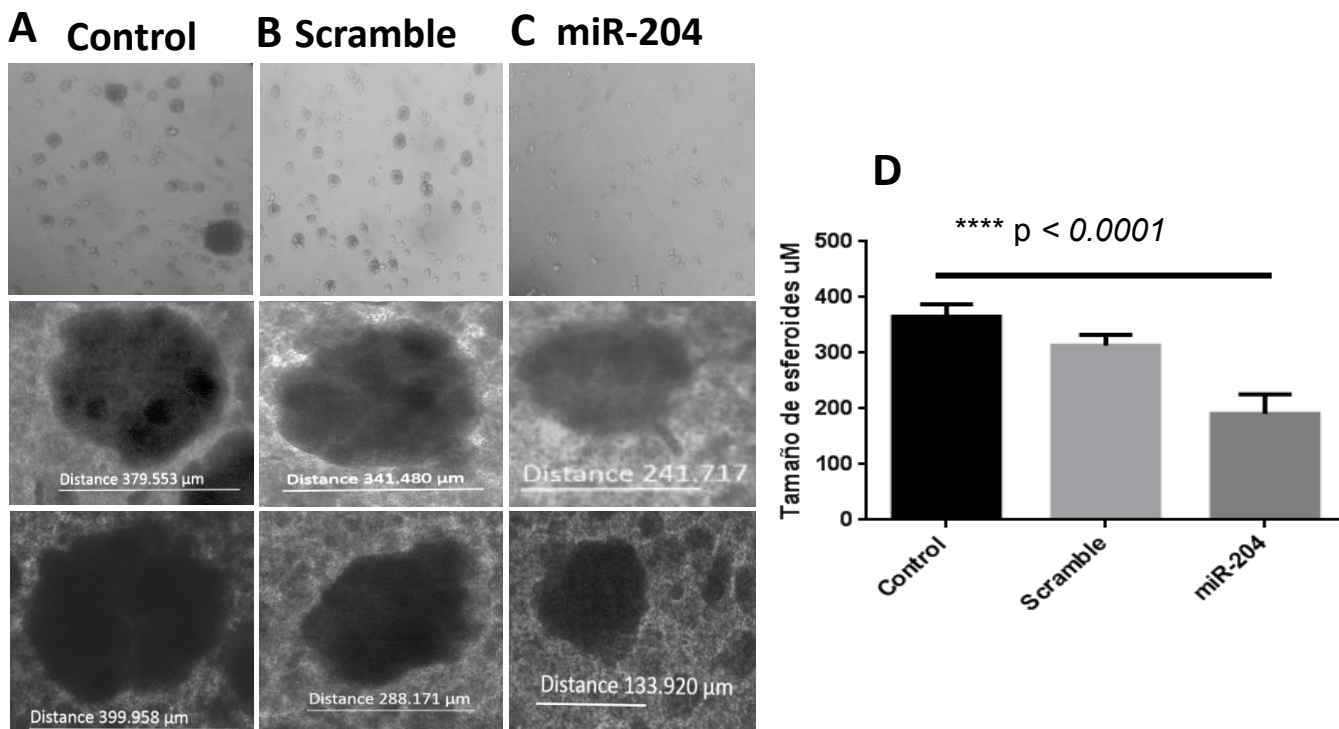
Como se esperaba las células que fueron transfectadas con el miR-204 presentaron un menor número en la reaparición de las esferoides en comparación con el control y scramble (Fig. 13B). Lo anterior sugiere que el mir-204 inhibe la formación de esferoides y la autorrenovación en células de cáncer de mama MDA-MB-231.



**Figura 12. Formación de esferoides de la línea celular MDA-MB-231.** Imágenes obtenidas durante el monitoreo de la formación de esferoides con la línea celular MDA-MB-231 en las condiciones de transfección (A) control, (B) scramble y (C) miR-204 durante 14 días.



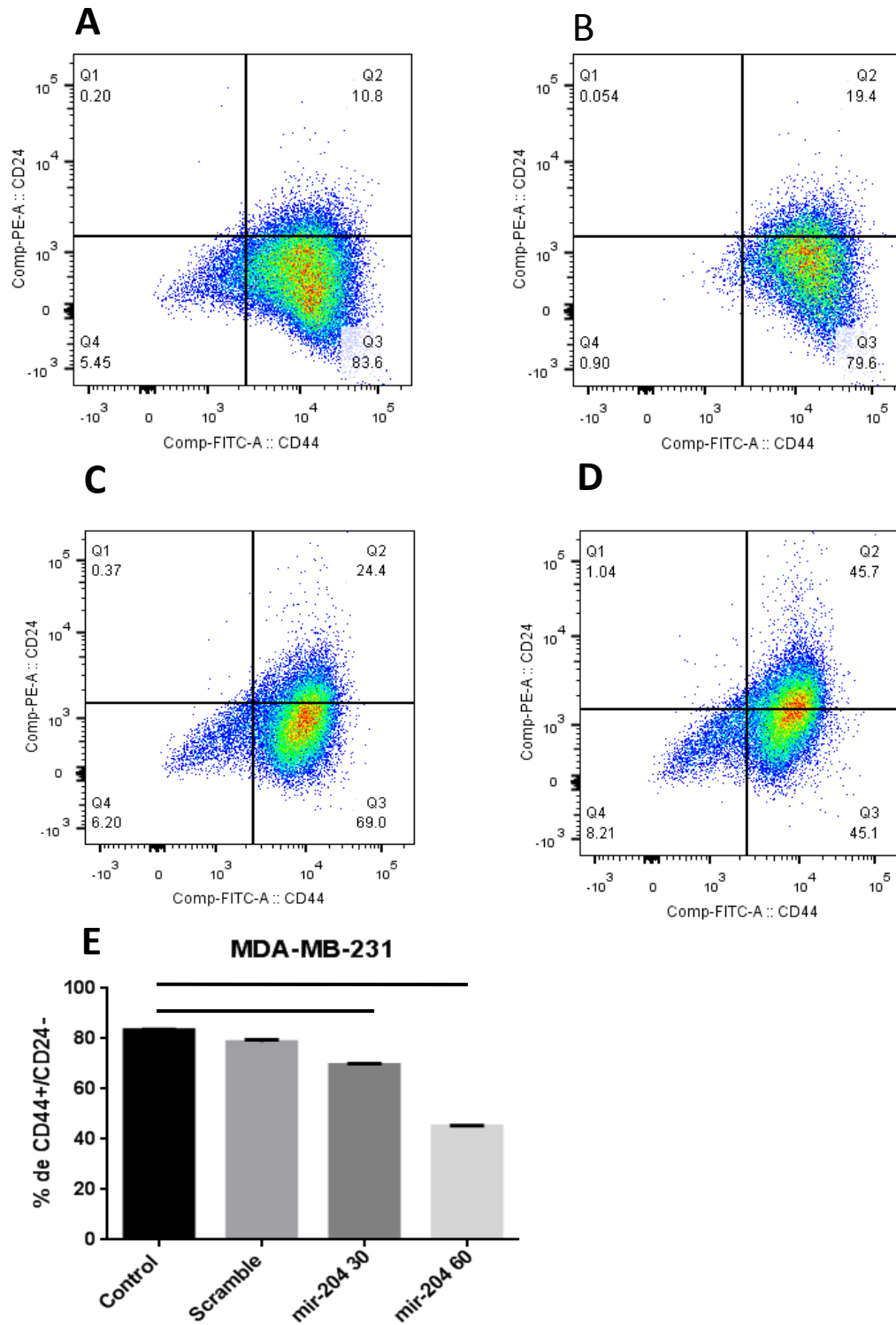
**Figura 13. Número de esferoides formados en la primer y segunda generación con células MDA-MB-231.** Gráfica de la cuantificación del número de esferoides en las condiciones Control, Scramble y miR-204-5P a los 14 días en la primer (A) y segunda (B) generación, donde podemos observar una disminución significativa en la condición del miR-204 en comparación con el control y scramble. Los resultados fueron representados como media  $\pm$  S.D. Las diferencias significativas se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.



**Figura 14. Tamaño de los esferoides en la primer generación.** Las imágenes de los esferoides formados a los 14 días de la primer generación en las condiciones (A) Control, (B) Scramble y (C) miR-204 fueron analizadas en el software ZEN para conocer el diámetro de cada uno de estos. (D) Representación gráfica del tamaño de los esferoides de las 3 condiciones. Los resultados fueron representados como media  $\pm$  S.D. Las diferencias significativas se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## 7.2 Porcentaje de la subpoblación con fenotipo troncal CD44+/ CD24- en células MDA-MD-231 en condiciones control, scramble y miR-204.

Con el propósito de determinar si el mir-204 inhibe el fenotipo troncal CD44+/CD24- en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 la cual presenta un porcentaje de células con el fenotipo troncal del 85 +/- 5% de acuerdo a lo reportado en la literatura, realizamos un ensayo de citometría de flujo en el cual marcamos las células con los anticuerpos para las proteínas de membrana CD44 y CD24, proteínas que se utilizan para aislar la subpoblación celular con fenotipo troncal en células de cáncer de mama. Se pasaron las células MDA-MD-231 a través del citómetro para cuantificar el porcentaje de la subpoblación CD44+/CD24- en las condiciones control, scramble (30 nM) y miR-204 a dos concentraciones 30 nM y 60 nM. Los resultados (Fig. 15A) mostraron que las células control presentan un 83.6 % de células CD44+/CD24-, un porcentaje que se relaciona con lo que ya ha sido reportado por diversos autores para esta línea celular. En la condición de Scramble (Fig. 15B) obtuvimos un 79.6% porcentaje similar a la condición control y a lo que se ha reportado en la literatura para esta línea celular. Para el resultado correspondiente a la condición donde las células fueron transfectadas con el miR-204 a 30 nM (Fig. 15C) obtuvimos un porcentaje del 69% observando una disminución significativa de la subpoblación CD44+/CD24- con un valor de  $p < 0.0001$  en comparación con la condición control y scramble (Fig. 15 E). De manera interesante en la condición donde las células fueron transfectadas con el miR-204 a 60 nM (Fig. 15D) se obtuvo un 45.1% de células con el fenotipo troncal, porcentaje aún menor que la transfección a 30 nM, teniendo de igual manera una disminución significativa con respecto al control y el scramble (Fig. 15E), lo que indica que el mir-204 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 inhibe el fenotipo troncal CD44+/ CD24- ya que disminuye de manera importante el porcentaje de esta subpoblación.



**Figura 15. Porcentajes del fenotipo troncal de la línea celular MDA-MD-231.** Análisis de las subpoblaciones obtenidas a partir de la línea celular MDA-MD-231 en las condiciones Control (A), Scramble (B) y

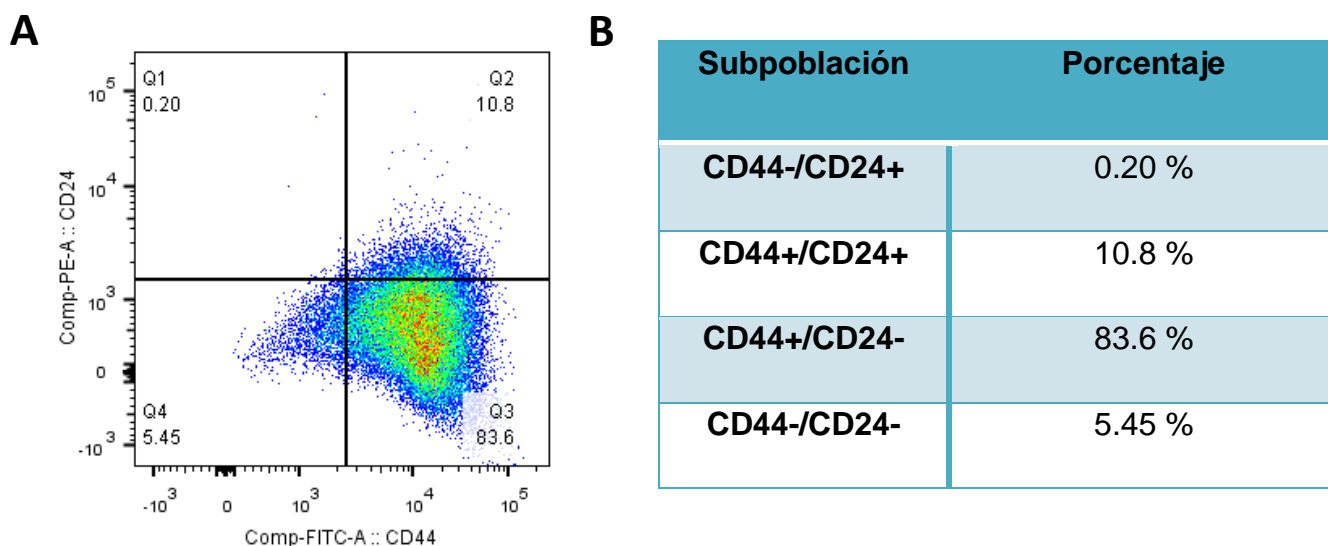
miR-204 a 30 nM (C) y 60 nM (D). (E) Análisis de los porcentajes de células con fenotipo troncal CD44+/ CD24- de cada una de las condiciones, los resultados obtenidos muestran una disminución significativa entre las condiciones control y miR-204 a 30 y 60 nM. Los resultados fueron representados como media  $\pm$  S.D. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### **7.3 Aislamiento de células con fenotipo troncal CD44+/ CD24- de la línea celular MDA-MB-231.**

Para determinar si el miR-204 tiene un papel funcional en las células con fenotipo troncal CD44+/CD24-, se realizaron cultivos masivos de células MDA-MB-231 con el propósito de aislar la cantidad suficiente de células madre de cáncer de mama y llevar a cabo los análisis correspondientes sin necesidad de realizar pases con estas células.

Las células con el fenotipo troncal fueron aisladas utilizando marcadores de superficie CD44 y CD24, seleccionando aquellas células que fueron positivas para CD44 y negativas para CD24, obteniendo un 83.6% (Fig. 16A) de células con este fenotipo, las cuales fueron transportadas al laboratorio y se conservaron en medio DMEM suplementado con los factores FGF, FGE y B27.

De igual manera se determinaron los porcentajes de las subpoblaciones celulares para las 3 subpoblaciones restantes que se obtienen a partir de los dos marcadores utilizados (Fig. 16B), aunque cabe mencionar que estas células no fueron aisladas debido a que solo utilizamos las células con el fenotipo troncal.



**Figura 16. Subpoblaciones obtenidas a partir de la línea celular MDA-MB-231.**

(A) Gráfica de puntos obtenida en la separación de las células con fenotipo troncal.

(B) Tabla con los porcentajes de las 4 subpoblaciones posibles con los dos marcadores utilizados en las células MDA-MB-231.

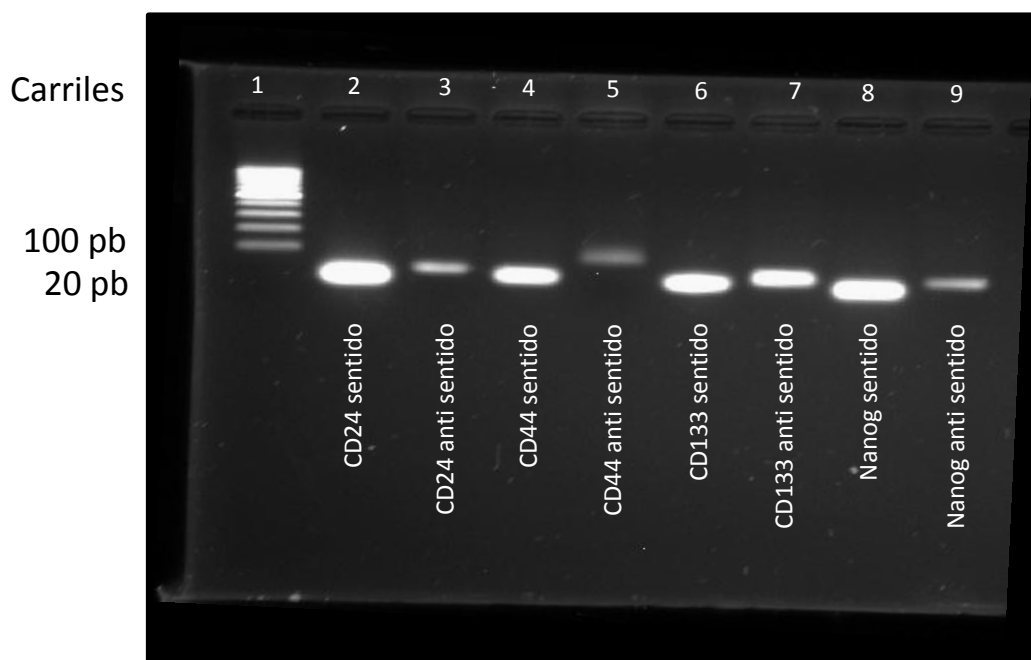
#### 7.4 Diseño de oligonucleótidos para el análisis del fenotipo troncal por medio de RT-qPCR

Los oligonucleótidos necesarios para la evaluación del fenotipo troncal de las células CD44+/CD24-, se diseñaron en el software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), en el cual colocamos la secuencia que obtuvimos, a partir de los alineamientos obtenidos de las variantes de cada uno de los genes de nuestro interés, para CD24 se diseñó un oligonucleótido sentido y un anti sentido de 20 nucleótidos el cual otorga un amplicón de 142 pb, para CD44 obtuvimos un oligonucleótido sentido y anti sentido de 20 nucleótidos que da un amplicón de 203 pb, para CD133 obtuvimos un oligonucleótido sentido y un anti sentido de 20 nucleótidos que otorga un amplicón de 162 pb y para Nanog obtuvimos un oligonucleótido sentido y anti sentido de 20 nucleótidos el cual amplifica un amplicón

de 149 pb. En la siguiente tabla mostramos cada uno de los oligonucleótidos para los genes CD24, CD44, NANOG y CD133, así como la prueba de integridad en gel de agarosa al 3% (Figura 17).

**Tabla 4. Diseño de los oligonucleótidos para los genes CD24, CD44, CD133 y Nanog.**

| Marcador       | Tamaño (nt) | Secuencia                   |
|----------------|-------------|-----------------------------|
| CD44sense      | 20          | 5'-GCAATGCTTCTCAGACCACA-3'  |
| CD44antisense  | 20          | 5'-GAGGGGAGAGGGGTAGACAGG-3' |
| CD24sense      | 20          | 5'-GCCAGTCTCTTCGTGGTCTC-3'  |
| CD24antisense  | 20          | 5'-CCTGTTTTTCCTTGCCACAT-3'  |
| NANOGsense     | 20          | 5'-CAGTCTGGACACTGGCTGAA-3   |
| NANOGantisense | 20          | 5'-CTCGCTGATTAGGCTCCAAC-3'  |
| CD133sense     | 20          | 5'-TTGTGGCAAATCACCAGGTA-3   |
| CD133antisense | 20          | 5'-TCAGATCTGTGAACGCCTTG-3'  |



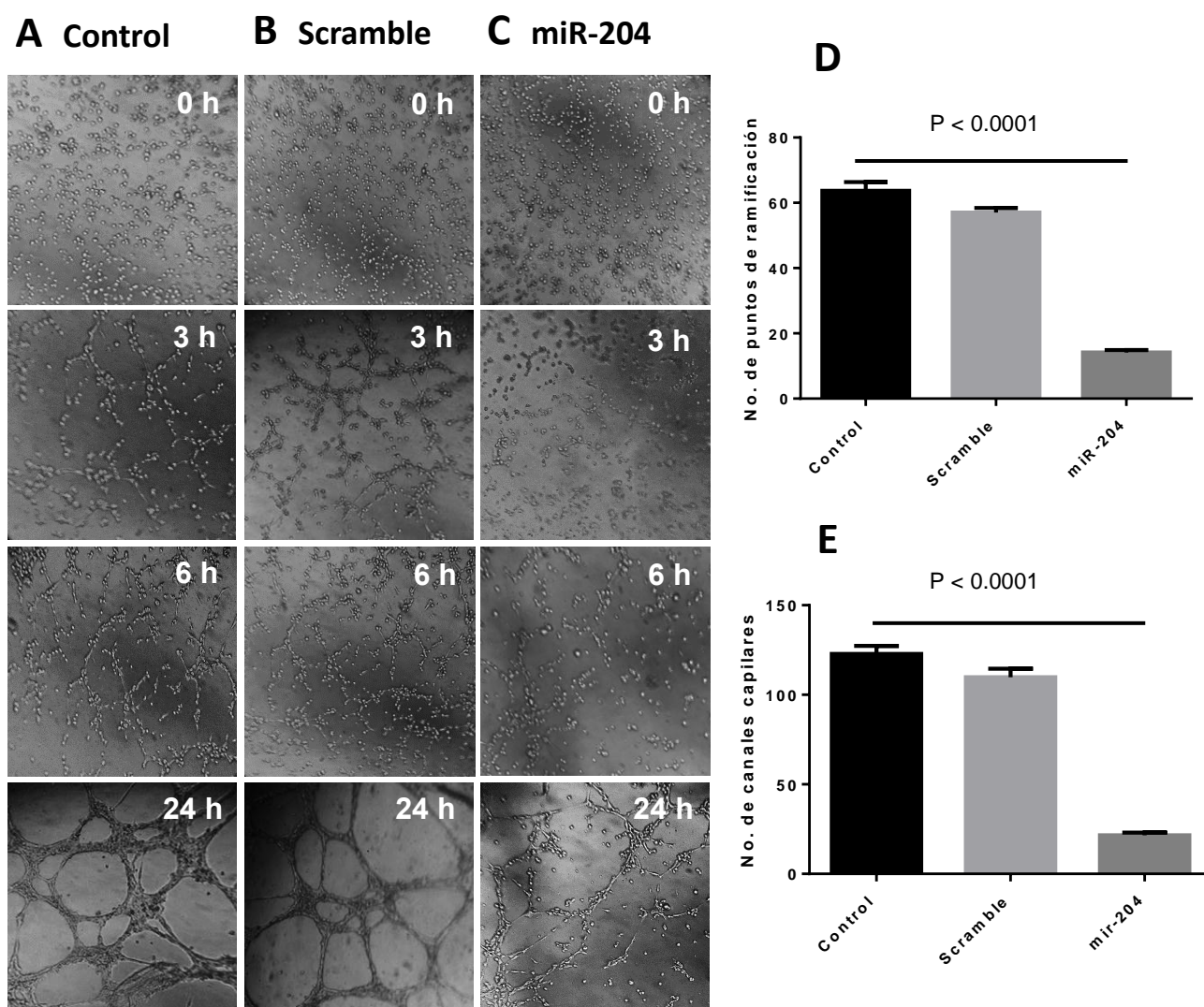
**Figura 17. Análisis de integridad de los oligonucleótidos empleados para analizar la expresión de los marcadores de pluripotencia.**

En el siguiente gel de agarosa al 3% se muestra el ensayo de integridad de los oligonucleótidos sentido y anti sentido de los genes de CD24 (2 y 3), CD44 (4 y 5), CD133 (6 y 7) y Nanog (8 y 9), en el cual se agregaron 150 ng de cada uno de los oligonucleótidos en cada carril.

**7.5 El miR-204 inhibe la formación del mimetismo vasculogénico mediado por las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- de cáncer de mama**

Para evaluar el papel funcional del miR-204 en la formación de redes de los canales 3D del mimetismo vasculogénico, restauramos su expresión en las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- de la línea celular MDA-MB-231. Posteriormente inducimos la formación de los canales 3D, llevando las células por 48 horas de hipoxia como se describió anteriormente. Incluimos como controles células no transfectadas y transfectadas con scramble para evaluar que el efecto observado sea por la restauración del miR-204 y no por realizar un proceso de transfección a las células. Una vez transcurrido el tiempo de hipoxia las células se colocaron sobre matrigel para observar la formación de las redes del mimetismo vasculogénico. Como podemos observar a las 3 horas en la condición control (Figura 18A) se comienzan a notar los puntos de ramificación los cuales son puntos clave en la formación de las redes, a las horas 6 se observan varios tubos capilares que unen los puntos de ramificación característicos del mimetismo vasculogénico y a las 24 horas podemos apreciar claramente las redes de tubos capilares y puntos de ramificación del mimetismo vasculogénico formados por las células con fenotipo troncal CD44+/CD24-, en la condición donde las células fueron transfectadas con scramble (Figura 18B) se aprecia un comportamiento casi idéntico a la condición control teniendo a las 24 horas los tubos capilares y los puntos de ramificación del mimetismo vasculogénico. Curiosamente la restauración ectópica del miR-204 dio como resultado la inhibición de la formación de redes capilares y de puntos de

ramificación de los canales 3D del mimetismo vasculogénico (Figura 18C), notando que los puntos de ramificación se observan hasta las 6 horas y que conforme pasa el tiempo la formación de los capilares es muy escasa. Al cuantificar el número de los puntos de ramificación (Figura 18D) y de los tubos capilares (Figura 18E) que se formaron a las 24 horas, encontramos que existe una reducción significativa de estas estructuras en las células transfectadas con miR-204 en comparación con las células control.



**Figura 18. El miR-204 inhibe la formación de estructuras tipo capilar en 3D inducidas por hipoxia en células con fenotipo troncal CD44+/CD24- en cáncer de mama.** Formación del mimetismo vasculogénico mediado por las células con fenotipo troncal de cáncer de mama en las condiciones (A) Control, (B) Scramble y (C) miR-204. Representación gráfica del número de puntos de ramificación (D) y canales capilares (E) para cada una de las condiciones cuantificados a las 24 horas. Las diferencias significativas se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

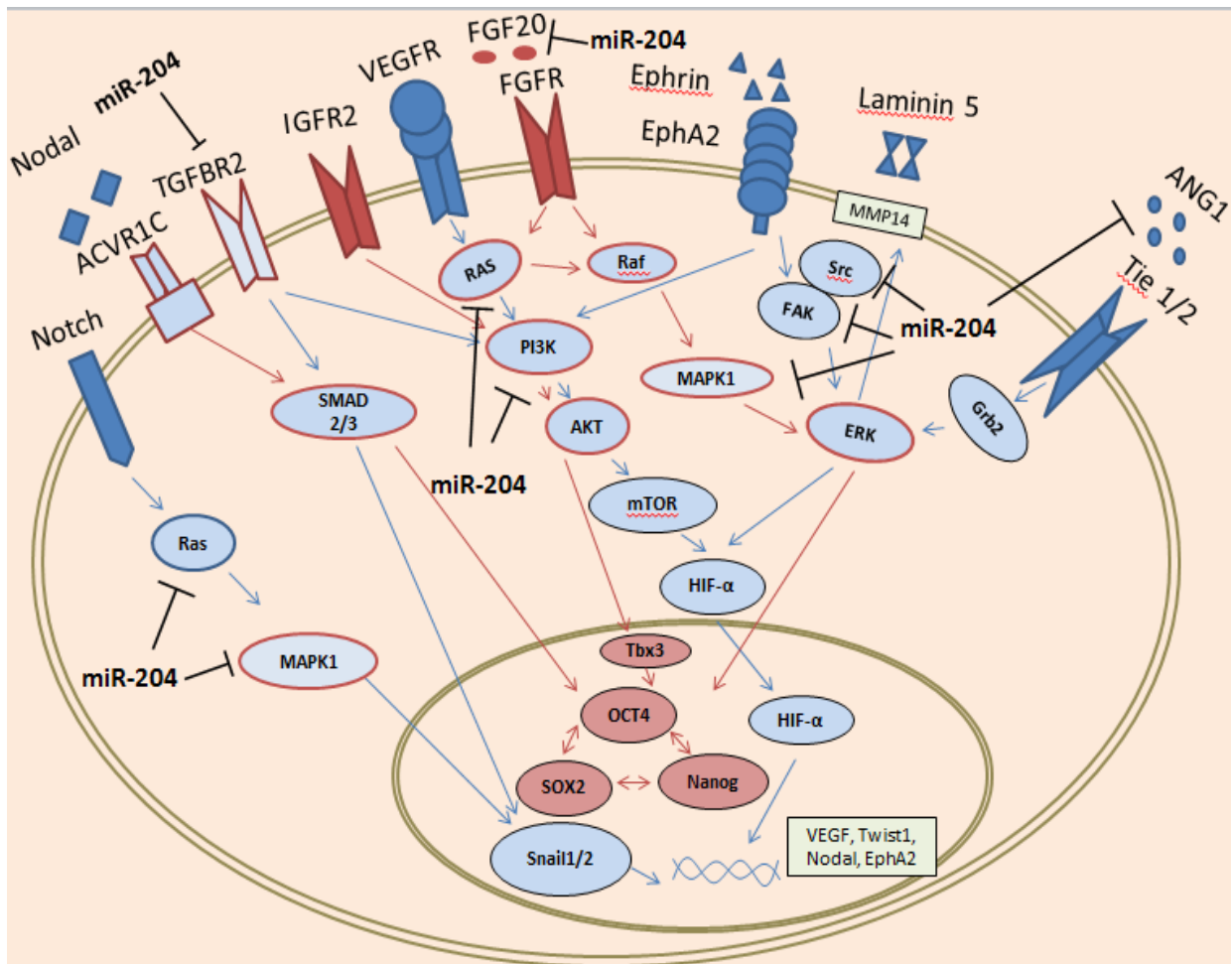
### **7.6 Blancos del miR-204 que participan en el proceso del mimetismo vasculogénico asociado a las células de cáncer con fenotipo troncal**

Para identificar los blancos probables del miR-204 que están involucrados en el mimetismo vasculogénico asociado a las células de cáncer de mama con fenotipo troncal, realizamos predicciones en bases de datos en las cuales logramos identificar diversos genes involucrados en la vías de señalización del mantenimiento del fenotipo troncal, tales como TGBR2, PI3K, FGFR2, KRAS, MAPK1, FZD5, GSK3B y IGFR2 los cuales participan la vía de factor de crecimiento de fibroblastos, la vía del factor de crecimiento transformante, la vía de Nodal, la vía de factor de crecimiento insulínico.

Los genes blanco predichos del miR-204 involucrados en el proceso de mimetismo vasculogénico son FAK, SRC, PI3K, KRAS, SHC, MAPK1, TGFBR2 y SMAD6 los cuales participan en las vías de señalización de Notch, Nodal, TFG, VEGF y Ephrin implicadas en la formación de los canales capilares y puntos de ramificación de las redes 3D del mimetismo vasculogénico.

Con base en estos resultados identificamos los genes blanco del miR-204 que están involucrados en las vías de señalización del mantenimiento de la pluripotencia células y del mimetismo vasculogénico los cuales fueron KRAS con 3 sitios de unión, PI3K con un sitio de unión, TGFBR2 con 3 sitios de unión y MAPK1 con 3 sitios de unión.

Los resultados obtenidos del análisis bioinformático de predicción se utilizaron para realizar un modelo que representa tanto las vías de señalización involucradas en el mantenimiento del fenotipo troncal como las vías que regulan el mimetismo vasculogénico, en donde se muestran todos genes blanco del miR-204 en estas vías señalados con una línea de color negro (Figura 19). Teniendo el panorama de los genes blanco del miR-204 involucrados en ambas vías de señalización, permite proponer que este miRNA puede estar modulando la formación del mimetismo vasculogénico en las células con fenotipo troncal mediante la regulación de la expresión postranscripcional de los genes KRAS, PI3K, TGFBR2 y MAPK1.

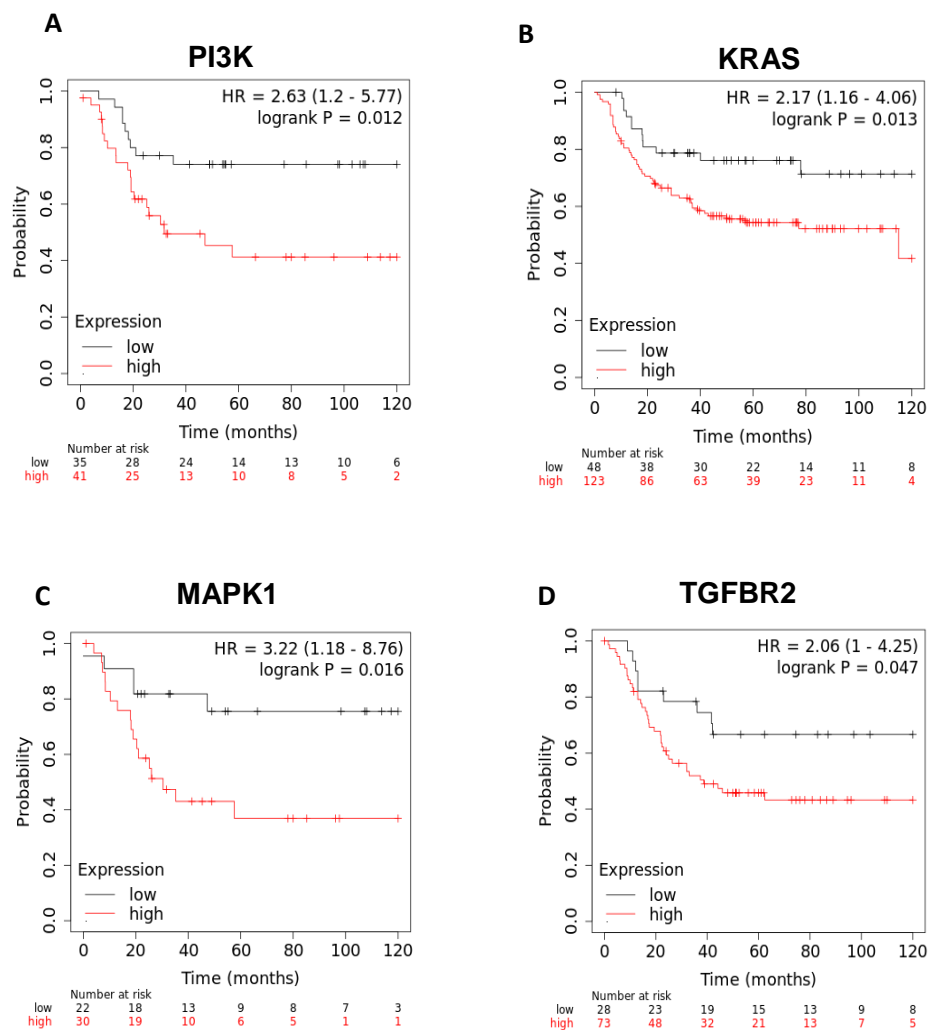


**Figura 19. Modelo de la regulación del mimetismo vasculogénico y del mantenimiento de la pluripotencia celular.** Representación de los blancos del miR-204 en diversas vías de señalización, en color rojo se muestran las vías de señalización que se encargan del mantenimiento de la pluripotencia celular y en color azul se muestran las vías de señalización para el proceso del mimetismo vasculogénico. Los círculos azules con contorno rojo muestran los genes que se encuentran involucrados en ambas vías, con una línea de color negro mostramos los blancos que fueron predichos para el miR-204.

### **7.7 La alta expresión de los genes KRAS, PI3K, TGFBR2 y MAPK1 se correlacionan con una baja supervivencia en pacientes de cáncer de mama**

Una vez identificados los genes blanco del miR-204 que participan en las vías de señalización del mimetismo vasculogénico y en el mantenimiento de la pluripotencia celular nos preguntamos si la expresión de estos genes está correlacionada con la supervivencia de los pacientes de cáncer de mama. Para responder a esta pregunta, realizamos un análisis de supervivencia general utilizando el trazador Kaplan Meier Plotter el cual utiliza datos del transcriptoma e información clínica de supervivencia general de una gran cohorte de pacientes con cáncer de mama ( $n = 1809$ ) con un seguimiento de 120 meses. Obtuvimos gráficas de supervivencia en las cuales se compararon dos cohortes de pacientes y se calculó el cociente de riesgos con intervalos de confianza del 95% y el valor de  $P$  de rango logarítmico.

Los resultados mostraron que una alta expresión de los genes PI3K (HR = 2.63, rango logarítmico  $P = 0.012$ ), KRAS (HR = 2.17, rango logarítmico  $P = 0.013$ ), MAPK1 (HR = 3.22, rango logarítmico  $P = 0.016$ ) y TGFBR2 (HR = 2.06 rango logarítmico  $P = 0.047$ ) se asocian a una baja supervivencia y con un mal pronóstico de vida en pacientes de cáncer mama (Figura 20).



**Figura 20. Graficas de Kaplan-Meier de supervivencia en pacientes de cáncer de mama según la expresión de PI3K, KRAS, MAPK1 y TGFBR2.** Análisis de supervivencia global utilizando un trazador de Kaplan Meier para cáncer de mama en base a la expresión de los genes (A) PI3K, (B) KRAS, (C) MAPK1 y (D) TGFBR2. La herramienta KM plotter para cáncer de mama utilizó todo el genoma para datos de expresión del ARNm e información clínica de supervivencia general de pacientes con cáncer, que se descargaron de Gene Expression Omnibus GEO y The Cancer Genome Atlas TCGA y se calculó el cociente de riesgos con intervalos de confianza del 95% y el valor de P de rango logarítmico.

## VIII. Discusión

El cáncer de mama es el tumor maligno más prevalente en mujeres en todo el mundo. Aproximadamente 2.1 millones de casos se diagnosticaron en 2018 y es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (Bray *et al.*, 2018).

A pesar de que existen diversos tratamientos como quimioterapia y radioterapia, estos no siempre tienen éxito ya que el tumor tiende a resurgir. Esto se le atribuye a la existencia de un grupo de células denominadas células madre del cáncer, las cuales son una subpoblación de células tumorales que poseen una alta actividad tumorigénica y características de células madre como la autorrenovación y diferenciación no controlada (Frank *et al.*, 2010).

En cáncer de mama se han reportado los marcadores para identificar las células madre tumorales CD44, CD24, CD133, CD49f, CXCL1, HMGCS, CD166, CD47, NANOG ALDH1 y ABCG2 (Al-Hajj *et al.*, 2003, Ginestier *et al.*, 2007, Leccia *et al.*, 2013, Vasilopoulos *et al.*, 2014, Wrigth *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2019). Sin embargo, los marcadores celulares CD44 + / CD24 - se han establecido como marcadores de superficie mínimos para las células madre del cáncer de mama (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Anteriormente se ha demostrado que el miR-204 es un miRNA que se encuentra reprimido en tumores y en líneas celulares de cáncer de mama y esta desregulación induce la exacerbación de distintos hallmarks del cáncer (Flores *et al.*, 2016, Salinas *et al.*, 2018). Además se han realizado análisis de transcriptoma de las células de cáncer de mama que fueron transfectadas con el miR-204 en donde se reportó que este miRNA modula alrededor de 500 genes de los cuales algunos están involucrados en distintos hallmarks del cáncer y en algunas vías de señalización del mantenimiento del fenotipo troncal (Flores *et al.*, 2016).

Con el fin de identificar si el miR-204 podría estar modulando el porcentaje de células con fenotipo troncal en base a que este miRNA modula genes involucrados en las vías de señalización de la pluripotencia celular, realizamos un ensayo de citometría

de flujo en el cual pudimos observar que al restaurar la expresión del miR-204 en las células MDA-MD-231, la expresión de proteínas de membrana que están involucradas en la troncalidad de las células tumorales de cáncer de mama como CD44 y CD24 se ve modificada y el porcentaje de las células con fenotipo troncal disminuye de manera significativa de un 83.6% en el control a un 69% y 45% en las condiciones donde se restaura la expresión del miR-204. De manera interesante notamos que al aumentar la concentración de la restauración del miR-204 de 30 nM a 60 nM en las células de cáncer de mama, el porcentaje de las células con fenotipo troncal disminuye aún más ya que obtuvimos resultados de 69% y 45% respectivamente, por lo que creemos que la expresión de este miRNA es de gran importancia en la resistencia y resurgimiento de tumores, las cuales son características del cáncer que se asocian a las células con el fenotipo troncal, es importante señalar que se deben realizar ensayos más finos para identificar de qué manera este miRNA modula el set de genes que otorgan la pluripotencia celular en este tipo de cáncer, pero este resultado puede dar indicios de que estamos frente a un miRNA que tiene un papel importante en la aparición y en el mantenimiento de células con fenotipo troncal en cáncer de mama.

Otra característica importante de las células madre del cáncer como de las células madre normales, es la habilidad de formar esferas o crecer en colonias en medio sin suero o en medio de agar blando (Qiu *et al*, 2012, Han *et al*, 2013).

El cultivo de los esferoides tumorales multicelulares ha cobrado relevancia en los últimos años como modelo *in vitro* de los tumores sólidos (Gallardo *et al*, 2006). Por lo que este tipo de ensayo se utiliza para evaluar a las células madre del cáncer ya que la estructura general de los esferoides mimetiza las etapas iniciales de los micro tumores sólidos *in vivo* antes de la vascularización (Gallardo *et al*, 2006).

En el presente trabajo demostramos que al restaurar la expresión de miR-204 en células de cáncer de mama la formación de esferoides disminuye de manera significativa y el tamaño de los mismos es menor en comparación con la condición control, tanto en la primer como en la segunda generación, por lo que pensamos que

este miRNA tiene un papel funcional importante en la autorrenovación de los tumores en células de cáncer de mama, siendo un posible tratamiento para evitar el resurgimiento de los tumores después de que han sido removidos de manera quirúrgica o por algún tratamiento con quimioterapia o radioterapia, puesto que se hizo evidente la disminución del resurgimiento de estas estructuras las cuales tiene diversas características que le brindan agresividad a los tumores incluyendo migración, invasión, angiogénesis y la resistencia a diferentes fármacos antineoplásicos (Gallardo *et al*, 2006).

Una característica importante de las células de cáncer es su capacidad para formar el mimetismo vasculogénico (MV) en el cual se forman canales vasculares que carecen de células endoteliales para permitir el paso de sangre que lleva los nutrientes necesarios para el mantenimiento del tumor, lo que brinda un aumento en los hallmarks del cáncer (Ge *et al.*, 2018). Desde el descubrimiento del mimetismo vasculogénico por Maniotis y colaboradores, se han descrito varios factores involucrados en la formación de estos vasos y diversos mecanismos por los cuales se regula este proceso. En líneas celulares derivadas de carcinoma de esófago, se observó que la inhibición de HIF1 alfa inhibe la formación de VM y disminuye los niveles de proteínas involucradas en la creación de estos vasos, como VE-cadherina, EPHA2 (efrina A2) y Laminina 5gamma2 (Tang *et al.*, 2014). VE-cadherina es una proteína relevante en mimetismo vasculogénico, dirige la ubicación de EPHA2 a las uniones intercelulares entre las células que forman los tubos característicos de VM. EPHA2 es una quinasa que activa dos vías esenciales en VM: PI3K (fosfoinositido 3-quinasa) y ERK1 / 2 (quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares a través de la quinasa FAK) que están asociadas con la supervivencia, proliferación y migración (Paulis *et al.*, 2010).

Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha reportado que al restaurar la expresión del miR-204 en células de cáncer de mama se inhibe de manera significativa las formación del mimetismo vasculogénico y la angiogénesis (Flores *et al.*, 2016, Salinas *et al.*, 2018), pero no hay reportes acerca de la función mir-204 en

el mimetismo vasculogénico mediado por células con fenotipo troncal en cáncer de mama, por lo que nos dimos a la tarea de aislar la subpoblación celular con fenotipo troncal de la línea celular MDA-MB-231 y realizamos el ensayo de mimetismo vasculogénico. De manera interesante observamos que la restauración ectópica de miR-204 resultó en la inhibición de la formación de los puntos de ramificación y tubos capilares en comparación con las células de control. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Salinas y colaboradores en el 2018 donde realizaron ensayos de mimetismo vasculogénico con la línea parental MDA-MD-231, aunque ahora sabemos que el miR-204 actúa como supresor de tumor en esta línea celular de cáncer de mama como en la subpoblación que tiene el fenotipo troncal.

Como demostramos con nuestros resultados el miR-204 inhibe el proceso del mimetismo vasculogénico en células con el fenotipo troncal de cáncer de mama, pero nos preguntamos cuáles son los genes mediante los que este miRNA podría estar llevando a cabo esta regulación, por lo que realizamos análisis *in silico* que nos permitieron predecir los genes blanco del miR-204. De manera interesante logramos predecir distintos genes blanco del miR-204 que están involucrados en las vías de señalización del mimetismo vasculogénico y en las vías de señalización del mantenimiento del fenotipo troncal, de los cuales identificamos 4 blancos que convergen en ambos procesos, los cuales son KRAS, PI3K, TGFBR2 y MAPK1.

KRAS es una proteína que está involucrada en las vías de señalización de Notch, VEGF, FGF y participa en los procesos de crecimiento, maduración y muerte celular (Kranenburg *et al.*, 2005). PI3K es un factor involucrado en las vías de señalización de TGF, IGF, VEGF, FGF y Ephrin, además de que participa en el crecimiento, proliferación, movilidad y supervivencia celular (Fiona *et al.*, 2003). TGFBR2 es una proteína involucrado en la vía de señalización de TGF y participa en los procesos de apoptosis, angiogénesis, proliferación, migración y diferenciación celular (Zhang *et al.*, 2009). MAPK1 está involucrada en las vías de señalización de Notch, VEGF, FGF y participa en los procesos de proliferación y diferenciación celular (Owaki *et al.*, 1992).

Con estos resultados podemos proponer que el mimetismo vasculogénico mediado por las células con fenotipo troncal podría ser regulado por el miR-204 a través del control de la expresión de los genes KRAS, PI3K, TGFBR2 y MAPK1, aunque se tendrían que realizar ensayos adicionales para realizar la validación de dichos factores como blancos de este miRNA. De los 4 genes propuestos el único blanco validado es el TGFBR2 en un trabajo realizado por Flores Pérez y colaboradores, quienes demostraron que la expresión de esta proteína es importante para modular el proceso de la angiogénesis y que se trataba de un blanco directo del miR-204, por lo que al restaurar la expresión de este miRNA el proceso se ve inhibido.

Finalmente obtuvimos las gráficas del trazador de supervivencia de Kaplan Meier para cada uno de los genes KRAS, PI3K, TGFBR2 y MAPK1 los cuales están involucrados en las vías de señalización del mimetismo vasculogénico y del mantenimiento de la pluripotencia celular, de manera interesante encontramos que la alta expresión de estos genes, se asocia con una supervivencia general baja, lo que sugiere un mal diagnóstico clínico en pacientes con cáncer de mama debido a que estos genes tienen funciones importantes en las características distintivas del cáncer que brindan agresividad tumoral.

Sin embargo, no podemos establecer una conexión sólida, ya que hemos recopilado los datos clínicos de la base de datos Kaplan Meier Plotter en la cual no existe la posibilidad de seleccionar datos de pacientes con presencia de mimetismo vasculogénico, pero si podemos proponer la existencia de la correlación entre la expresión de estos 4 genes y la tasa de supervivencia, lo cual podría servir como base para nuevos proyectos de investigación que tengan como objetivo validar los blancos propuestos e identificar la tasa de supervivencia en pacientes que presenten un alta expresión de estos genes así como el proceso del mimetismo vasculogénico.

En conjunto los resultados obtenidos en este proyecto son importantes para fundamentar que el miR-204 puede regular las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- de cáncer de mama, mismas que exacerban los hallmarks del cáncer, el mimetismo vasculogénico y brindan el resurgimiento y la resistencia al tratamiento

del tumor. Por lo que proponemos que la inducción de la restauración de este miRNA en tumores de cáncer de mama podría ser una alternativa terapéutica importante para mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes.

## IX. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en este proyecto de investigación podemos llegar a las conclusiones:

- El miR-204 está involucrado en la autorrenovación tumoral, lo cual se ha evidenciado mediante el ensayo de formación de esferoides, donde apreciamos que al restaurar la expresión ectópica de este miRNA el tamaño y número de esferoides es considerablemente menor en comparación con el control.
- Encontramos que el miR-204 está modulando el fenotipo de células madre cancerosas, ya que al restaurar la expresión del miR-204 en células MDA-MD-231 el porcentaje disminuye significativamente en comparación con las células control.
- La restauración ectópica del miR-204 en las células con el fenotipo troncal CD44+/CD24- de cáncer de mama inhibe la formación de los puntos de ramificación y de los canales capilares que forman las redes 3D del mimetismo vasculogénico.
- El miR-204 tiene como blancos puntuativos los genes PI3K, KRAS, MAPK1 y TGFBR2 involucrados en el mantenimiento del fenotipo troncal y el MV, por lo que podríamos proponer que mediante la regulación de estos genes se inhibirá el proceso del MV mediado por las células troncales tumorales.
- La expresión de los genes PI3K, KRAS, MAPK1 y TGFBR2 correlacionan con una mala supervivencia de los pacientes con cáncer de mama triple negativo, por lo que creemos que si se restaura la expresión del miR-204 dichas proteínas se expresarían menos y mejoraría la supervivencia de los pacientes significativamente.

## X. Bibliografía

1. Adams J.M., Cory S. the Bcl.2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26: 1324-1337.
2. Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* (2015) 519:482–5.
3. Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, Morrison S, Clarke M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003) 100:3983–8.
4. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F: Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 2004, 25: 3211-3222.
5. Barabe, F., Kennedy, J.A., Hope, K.J., and Dick, J.E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* (New York, NY 316, 600-604.
6. Beckmann, M., Niederacher, D., Schnürch, H. y col. Carcinogénesis de múltiples pasos del cáncer de mama y heterogeneidad tumoral. *J Mol Med* 75, 429-439 (1997).
7. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–97 (2004).
8. 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).
9. Bhat, V., Allan, A. L., & Raouf, A. (2019). Role of the Microenvironment in Regulating Normal and Cancer Stem Cell Activity: Implications for Breast Cancer Progression and Therapy Response. *Cancers*, 11(9), 1240.
10. Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, Joseph NM, Morrison SJ: Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron*. 2002, 35: 643-656.

11. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, *et al.* *Curr Biol.* 2007; 17 : 1298–307.
12. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell.* (2016) 64:320–33.
13. Burkhart D.L., Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. rev. cancer.* 2008; 8:671-682.
14. B.J.P. Huntly, D.G. Gilliland. Leukemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research *Nat Rev Cancer*, 5 (2005), pp. 311-321.
15. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936 (2005).
16. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, *et al.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334 : 1351–8.
17. Civetta, María Teresa Martín de, & Civetta, Julio Domingo. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53(5), 405-414.
18. Collina F, Di Bonito M, Li Bergolis V, *et al.* Prognostic Value of Cancer Stem Cells Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Biomed Res Int* 2015;2015.
19. Delgado-Bellido, D., Serrano-Saenz, S., Fernández-Cortés, M., & Oliver, F. J. (2017). Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Molecular cancer*, 16(1), 65.
20. Deshpande A., Sicinski P., Hinds P.W. Cyclis and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* 2005; 24: 2909-2915.
21. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (2004) 432:231–5.
22. Dolores Utrera-Barillas M., Castro-Manreza M. E., Gutiérrez-Rodríguez M., Benítez-Bribiesca L., Linfagenesis en el cáncer y su papel en la diseminación metastásica. *Gac Méd Méx Vol.* 145 No. 1, 2009.
23. Donovan P, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.* 2001; 414: 92-7.
24. Flores-Pérez, A., Marchat, L. A., Rodríguez-Cuevas, S., Bautista-Piña, V., Hidalgo-Miranda, A., Ocampo, E. A., Martínez, M. S., Palma-Flores, C., Fonseca-

- Sánchez, M. A., Astudillo-de la Vega, H., Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* (2003) 115:209–16.
25. Flores-Pérez, A., Marchat, L., Rodríguez-Cuevas, S. *et al.* Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep* 6, 34504 (2016).
  26. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* (2007) 1:555–67.
  27. Ruíz-García, E., González-Barrios, J. A., Pérez-Plasencia, C., Streber, M. L., & López-Camarillo, C. (2016). Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Scientific reports*, 6, 34504.
  28. Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of biochemistry*, 148(4), 381–392.
  29. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (2004) 432:231–5.
  30. Endogenous H, Breast Cancer Collaborative G, Key TJ. *et al.* Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* 2013;14:1009–1019.
  31. Frank NY, Schatton T, Frank MH: The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120: 41-50, 2010.
  32. García, Martín Granados; Rodríguez, Oscar Arrieta; León, David Cantú de (16 de noviembre de 2012). *Oncología y cirugía. Bases y principios*. Editorial El Manual Moderno.
  33. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:458–62.
  34. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:509–24.
  35. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell* 100, 57–70 (2000).

- 
36. Hanahan, D. & Weinberg, R. A.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646– 674 (2011).
  37. Hammond SM. MicroARN como oncogenes. *Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16 : 4–9.
  38. Hernández Ramírez, Porfirio, & Dorticós Balea, Elvira. (2004). Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20 (3).
  39. Hirohashi, S. & Kanai, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* 94, 575–81 (2003).
  40. Holliday, DL y Speirs, V. (2011). Elegir la línea celular correcta para la investigación del cáncer de mama. *Investigación sobre el cáncer de mama: BCR* , 13 (4), 215.
  41. Hossein H.S. & Dehghami M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice.* 4 127-129 (2017).
  42. 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).
  43. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14482-6.
  44. Judson, R. L, Babiarz, J. E., Venere, M., & Blueloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature biotechnology*, 27(5), 459–461.
  45. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* (2003) 115:209–16.
  46. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.*
  47. Laneve, P., Di Marcotullio, L., Gioia, U., Fiori, M. E., Ferretti, E., Gulino, A., Bozzoni, I., & Caffarelli, E. (2007). The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human

- neuroblastoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(19), 7957–7962
48. Langer EM, Kendersky ND, Daniel CJ, Kuziel GM, Pelz C, Murphy KM, *et al.* ZEB1-repressed microRNAs inhibit autocrine signaling that promotes vascular mimicry of breast cancer cells. *Oncogene*. 2018;37(8):1005–19.
  49. Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, *et al.* Radiation-Induced Reprogramming of Breast Cancer Cells. *Stem Cells* 2012;30:833-44.
  50. Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 4, 199–227.
  51. Leccia F, Del Vecchio L, Mariotti E, Di Noto R, Morel A, Puisieux A, *et al.* . ABCG2, a novel antigen to sort luminal progenitors of BRCA1- breast cancer cells. *Mol Cancer*. (2014) 13:213.
  52. Lee Y, Ahn C, Han JJ, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415–419.
  53. Lee, E. J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G. J., Lerner, M. R., Frankel, W. L., Morgan, D. L., Postier, R. G., Brackett, D. J., & Schmittgen, T. D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 120(5), 1046–1054.
  54. Leon, J. y col. Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos”. *Invest. y Ciencia*, 143. Ago/88. 20-34.
  55. Li, T., Pan, H., & Li, R. (2016). The dual regulatory role of miR-204 in cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11667–11677.
  56. 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).
  57. Luo, Q., Wang, J., Zhao, W. *et al.* Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J Hematol Oncol* 13, 19 (2020).

- 
58. Lu Han, Sanjun Shi, Tao Gong, Zhirong Zhang, Xun, Sun. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. Review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Volume 3, Issue 2, April 2013, Pages 65-75.
59. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM *et al*. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999 Sep; 155(3):739-52.
60. Mikhaylova, O., Stratton, Y., Hall, D., Kellner, E., Ehmer, B., Drew, A. F., Gallo, C. A., Plas, D. R., Biesiada, J., Meller, J., & Czyzyk-Krzeska, M. F. (2012). VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer cell*, 21(4), 532–546.
61. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, *et al*. *Oncogene* 2006; 25 : 2537–45
62. Van Phuc P, Nhan PL, Nhung TH, *et al*. Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44CD24 breast cancer cells. *Onco Targets Ther* 2011;4:71-8.
63. Ma R, Bonnefond S, Morshed SA, *et al*. Stemness is Derived from Thyroid Cancer Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:114.
64. Mata-Miranda, Maribel, Vázquez-Zapién, Gustavo J, & Sánchez-Monroy, Virginia. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194-199.
65. Mannelli G., Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers *Cancer Treat Rev*, 38 (2012), pp. 515-539.
66. Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*. (2014) 42:1135–40.
67. Moreb JS, Ucar D, Han S, *et al*. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact* 2012.

- 
68. Morrison SJ, Qian D, Jerabek L, Thiel BA, Park IK, Ford PS, Kiel MJ, Schork NJ, Weissman IL, Clarke MF: A genetic determinant that specifically regulates the frequency of hematopoietic stem cells. *J Immunol.* 2002, 168: 635-642.
69. Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., & Ju, J. (2006). Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer genomics & proteomics*, 3 (5), 317–324.
70. Ng PM, Lufkin T. Embryonic stem cells: proteins interaction networks. *Biomol Concepts.* 2011; 2: 13-25.
71. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
72. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H: Reconstitución linfohematopoyética a largo plazo por una sola célula madre hematopoyética CD34-baja / negativa. *Ciencias.* 1996, 273: 242-245.
73. Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta.* 1806;2010:18–28.
74. Peng Z, Wang J, Shan B, Li B, Peng W, Dong Y, *et al.* The long noncoding RNA LINC00312 induces lung adenocarcinoma migration and vasculogenic mimicry through directly binding YBX1. *Mol Cancer.* 2018;17(1):167.
75. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000.
76. Peng Y., Croce C.M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy* 1, article number: 15004 (2016).
77. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406,747–752 (2000).

- 
78. Pinder SE, Ellis IO. The diagnosis and management of preinvasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)--current definitions and classification. *Breast Cancer Res.* 2003;5:254–7.
  79. Plummer P. N. *et al.* MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res.* 73, 341–352 (2013).
  80. Puente J, Del velasco G., ¿Qué es el cáncer y como se desarrolla?. Sociedad española de oncología media. 2019.
  81. Qiu X., Wang Z., Li Y., Miao Y., Ren Y., Luan Y. Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446 *Cancer Letter* 323 (2012), pp. 161-170.
  82. Robbins S y col: “Patología estructural y funcional” Capítulo VI “Trastornos de la Inmunidad” Capítulo VII “Neoplasia” 5ª Edición 1995.
  83. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci.* 1979 Mar-Apr;9(2):144–156.
  84. Russo J, Russo I.H. development of the human breast. *Maturitas*, 49 (2004), pp. 2-15.
  85. Ryan, J., Tivnan, A., Fay, J., Bryan, K., Meehan, M., Creevey, L., Lynch, J., Bray, I. M., O'Meara, A., Tracey, L., Davidoff, A. M., & Stallings, R. L. (2012). MicroRNA-204 increases sensitivity of neuroblastoma cells to cisplatin and is associated with a favourable clinical outcome. *British journal of cancer*, 107(6), 967–976.
  86. Salinas-Vera YM, Marchat LA, García-Vázquez R, González de la Rosa CH, Castañeda-Saucedo E, Tito NN, Flores CP, Pérez-Plasencia C, Cruz-Colin JL, Carlos-Reyes Á, López-González JS, Álvarez-Sánchez ME, López-Camarillo C. Cooperative multi-targeting of signaling networks by angiomiR-204 inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2018 Sep 28;432:17-27.
  87. Sagar, J., Chaib, B., Sales, K., Winslet, M., & Seifalian, A. (2007). Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer cell international*, 7, 9.

- 
88. Sin, W. C., & Lim, C. L. (2017). Breast cancer stem cells-from origins to targeted therapy. *Stem cell investigation*, 4, 96.
89. Schabath H. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 2006;119:314-25.
90. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* 458, 719–724 (2009).
91. Sun, YS, Zhao, Z., Yang, ZN, Xu, F., Lu, HJ, Zhu, ZY, Shi, W., Jiang, J., Yao, PP y Zhu, HP (2017). Factores de riesgo y prevenciones del cáncer de mama. *Revista internacional de ciencias biológicas* , 13 (11), 1387–1397.
92. Schabath H. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 2006;119:314-25.
93. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017.
94. Sgroi D. C. (2010). Preinvasive breast cancer. *Annual review of pathology*, 5, 193–221.
95. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al*. Repeated observation of breast tumors subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418-842
96. Sun, Y., Yu, X., & Bai, Q. (2015). miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(10), 12775–12783.
97. Tavassoli FA, Devilee P. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press; 2003.
98. Tay Y, *et al*. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008;455(7216):1124–8.
99. Uribe, Jorge R, Hernández, Carlos A, Menolascino, Francisco, Rodríguez, Joel E, Istúriz, Linda M, Márquez, María E, Rodríguez, Ramón E, & Uribe, Jorge L. (2010). Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Revista Venezolana de Oncología*, 22(2), 109-116.

- 
100. Van Phuc P, Nhan PL, Nhung TH, y col. La regulación a la baja de CD44 reduce la resistencia a la doxorubicina de las células de cáncer de mama CD44CD24. *Objetivos Onco Ther* 2011.
  101. Vassilopoulos A, Chisholm C, Lahusen T, Zheng H, Deng CX. A critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brca1-associated mouse model of breast cancer. *Oncogene*. (2014) 33:5477–82.
  102. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002;1:369-91.
  103. Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, *et al.* *Oncogene* 2007
  104. Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer*, 8(10), 755–768.
  105. Wei G, Schubiger G, Harder F, Müller AM. Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes?. *Stem Cells* 2000;18:409-14.
  106. Weinberg RA La proteína retinoblastoma y el control del ciclo celular. *Célula*. 1995; 81 : 323-330.
  107. Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 87 (2011).
  108. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* (2008) 10:R10
  109. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regula OCT4, SOX2 y KLF4 y reprime la pluripotencia en las células madre embrionarias humanas. *Célula*. 2009; 137 : 647-658.
  110. Xu N, *et al.* MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 2009;137(4):647–58.
  111. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, *et al.* . ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol.* (2010) 17:17–23. 10.1038/nsmb.1733.

112. Yu J, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917–20.
113. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1).
114. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III.
115. Zhou, J., Chen, Q., Zou, Y., Chen, H., Qi, L., & Chen, Y. (2019). Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications. *Frontiers in oncology*, 9, 820.

## **XI. Anexos**

### **11.1 Curso de citometría de flujo**

Durante el desarrollo del presente proyecto de maestría asistí al curso básico en citometría de flujo para usuarios del centro de instrumentos de citometría de flujo de la coordinación de investigación en salud en las instalaciones del centro médico nacional siglo XXI.



## CONSTANCIA a

**Rogelio Coronado Uribe**

por haber asistido y aprobado el

**Curso Básico en Citometría de Flujo para Usuarios del  
Centro de Instrumentos de Citometría de Flujo de la  
Coordinación de Investigación en Salud**

13 al 17 de enero, 2020

Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano

Asesor Académico en Citometría de Flujo  
Investigador Asociado D, UIMI-Q-IMSS

M. en C. Jessica Lakshmi Prieto Chávez

Especialista en Citometría de Flujo  
Coordinación de Investigación en Salud