



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**DOCTORADO INSTITUCIONAL**  
**EN INGENIERÍA Y CIENCIA DE MATERIALES**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL microRNA-204-5p ACOPLADO A UN  
ACARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUCTURADO EN LAS PROPIEDADES  
TRONCALES EN CÁNCER DE MAMA**

**PRESENTA**

MC. Macrina Beatriz Silva Cázares

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. María Zenaida Saavedra Leos  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**CODIRECTOR DE TESIS**

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

**COMITÉ ACADEMICO**

Dra. Claudia Álvarez Salas  
Dra. María Cruz del Rocío Terrones Gurrola  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**TUTOR**

Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**ASESOR EXTERNO**

Dr. César Leyva Porras  
Centro de Investigación de Materiales Avanzados

San Luis Potosí, SLP., 1 de marzo de 2021



Evaluación del efecto del microRNA-204-5p acoplado a un acarreador lipídico nanoestructurado en las propiedades troncales en cáncer de mama por Macrina Beatriz Silva Cázares se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.1 Cáncer.....	5
1.2 Hallmarks del cáncer .....	5
1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento .....	6
1.2.2 Insensibilidad a las señales de anti-crecimiento.....	6
1.2.3 Resistencia a la muerte celular programada (Apoptosis) .....	6
1.2.4 Ilimitado potencial replicativo.....	6
1.2.5 Angiogénesis.....	7
1.2.6 Metástasis .....	7
1.2.7 Inestabilidad genómica.....	7
1.2.8 Inflamación .....	8
1.2.9 Desregulación metabólica y energética.....	8
1.2.10 Evasión a la destrucción por el sistema inmune.....	8
1.3 CÁNCER DE MAMA.....	9
1.3.1 Epidemiología.....	11
1.3.2 Factores de riesgo.....	12
1.3.3 Clasificación del cáncer de mama.....	12
1.4 BIOGÉNESIS DE LAS CÉLULAS TRONCALES .....	13
1.4.1 Células troncales tumorales .....	16
1.5 microRNAs .....	19
1.5.1 Biogénesis de los microRNAs .....	20
1.5.2 microRNAs y cáncer: oncomiRs.....	23



1.5.3 Funciones de los microRNAs en cáncer de mama.....	23
1.5.4 Papel de los microRNAs en tumorigénesis de mama.....	25
1.6 NANOTECNOLOGÍA EN TERAPIA ONCOLÓGICA .....	28
1.6.1 Transportadores lipídicos .....	30
1.6.2 Usos y aplicaciones en cáncer .....	31
1.6.3 Acarreadores lipídicos nanoestructurados de RNAs no codificantes.....	32
<b>2.- ANTECEDENTES PARTICULARES .....</b>	<b>34</b>
2.1 Células madre de cáncer de mama.....	34
2.2 El papel del microRNA-204-5p en el cáncer de mama.....	35
2.3 Formación de mamosferas.....	35
2.4 Mimetismo vasculogénico .....	37
2.5 Vías del mimetismo vasculogénico .....	38
2.6 Acarreadores lipídicos .....	40
<b>3.- JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>42</b>
<b>5.- OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 Objetivo general .....	43
5.2 Objetivos particulares .....	43
<b>6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>44</b>
<b>7.- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
7.1 Cultivo de la línea celular Hs-578T.....	45
7.2 Transfección transitoria de <i>microRNA-204-5p</i> .....	45
7.3 Aislamiento de la población de células troncales tumorales (CSC) mediante citometría de flujo (FACS). .....	46
7.4 Extracción de RNA total .....	46
7.5 Evaluación de la migración celular por ensayo de la herida.....	47
7.6 Formación de mamosferas.....	48



7.7 Ensayo de mimetismo vasculogénico .....	48
<b>8. RESULTADOS</b> .....	50
8.1 Análisis de la integridad del RNA total .....	48
8.2 Identificación de la subpoblación CD44 +/CD24-.....	50
8.3 Aislamiento de células troncales tumorales.....	52
8.4 Efecto del microRNA-204-5p en la migración celular de la subpoblación CD44+/CD24.....	54
8.5 Efecto del microRNA-204-5p en la generación de mamíferas de las células troncales .....	56
8.6 El microRNA-204-5p inhibe la formación de mimetismo vasculogénico <i>in</i> <i>vitro</i> .....	58
<b>9.- DISCUSIÓN</b> .....	62
<b>10.- CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>11.- PRODUCTIVIDAD</b> .....	67
<b>12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	83
<b>13.- APÉNDICE</b> .....	104



## **AGRADECIMIENTOS**

Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Coordinación Académica Región Altiplano de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Unión de Asociaciones del Personal Académico de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Proyecto realizado en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México CONACyT Ciencia básica número A1-S-1-13656

Laboratorio de Oncogénica y Proteómica del Cáncer del Posgrado de Ciencias Genómicas de la UACM.

Laboratorio de Medicina Transnacional del Instituto de Cancerología. CDMX.

Laboratorio de Citometría de Flujo. Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ago2</b>	Argonauta 2
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B
<b>ATCC</b>	Del inglés, American Type Culture Collection
<b>ATF2</b>	Factor de transcripción activador 2
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CM</b>	Cáncer de mama
<b>CT</b>	Células Troncales
<b>CSC</b>	Células Troncales Tumorales
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>EF</b>	Factores de transcripción
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos
<b>FACS</b>	Clasificación celular activada por fluorescencia
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HER2</b>	Receptor epitelial humano
<b>HIF</b>	Factor Inducible de hipoxia
<b>IDC</b>	Cáncer ductal invasivo
<b>ILC</b>	Carcinoma lobular invasivo
<b>ILCIS</b>	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
<b>ICM</b>	Masa celular interna
<b>IPS</b>	Pluripotente inducida
<b>ml</b>	mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>MV</b>	Mimetismo vasculogénico
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PAS</b>	Ácido peryódico de Schiff
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3- Cinasa



<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Retro transcripción
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TSP-1</b>	Trombospondina 1
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento de RNA
<b>pRb</b>	Proteína retinoblastoma
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>VEGF-A</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hallmarks del cáncer.....	7
<b>Figura 2.</b> Anatomía de la glándula mamaria .....	9
<b>Figura 3.</b> Biogénesis de las células troncales tumorales .....	12
<b>Figura 4.</b> Modelos representativos de la heterogeneidad y tumorigenicidad de las células .....	15
<b>Figura 5.</b> Biogénesis de los microRNAs .....	20
<b>Figura 6.</b> Papel de los microRNAs en cáncer .....	22
<b>Figura 7.</b> Principales microRNAs implicados en la regulación de las características intrínsecas del cáncer de mama .....	24
<b>Figura 8.</b> Regulación de los genes y las vías de señalización por el microRNA-204-5p para el mantenimiento de las características de células troncales .....	25
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de diferentes mecanismos por los cuales los nano vehículos pueden liberar drogas a los tumores .....	27
<b>Figura 10.</b> Representación gráfica de tipos comunes de nanoparticulas compuestas.....	31
<b>Figura 11.</b> 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, BT-474, SKBR-3 y MCF-7 .....	35
<b>Figura 12.</b> Mimetismo vasculogénico. Estructuras tipo capilar formadas por células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia en un cultivo <i>in vitro</i> .....	37
<b>Figura 13.</b> Principales vías de señalización involucradas en el mimetismo vasculogénico .....	38
<b>Figura 14.</b> Restauración ectópica del microRNA-204-5p en la línea celular HS578t .....	49
<b>Figura 15.</b> Gráfico de puntos de las subpoblaciones obtenidas a partir de la línea celular HS578t .....	51
<b>Figura 16.</b> Identificación de la subpoblación celular CD44+/CD24- mediante citometría de flujo mediante anticuerpos específicos .....	53
<b>Figura 17.</b> Generación de mamosferas en la línea celular HS578t y la subpoblación	



celular troncal tumoral CD44+/CD24- .....	55
<b>Figura 18.</b> Expresión ectópica del microRNA-204-5p en la subpoblación CD44+/CD24- inhibe la migración celular .....	57
<b>Figura 19.</b> El microRNA-204-5p inhibe la formación de estructuras tipo capilar en 3D inducidas por hipoxia en células con fenotipo troncal CD44+/CD24- en cáncer de mama .....	59



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial y en México 2019 .....	10
<b>Tabla 2.</b> Clasificación molecular del cáncer de mama .....	11



## RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad compleja con características clínicas y moleculares diversas que requiere un enfoque terapéutico integrado. Hallazgos recientes sugieren que una estrategia terapéutica prometedora es la de dirigirse a la destrucción de las células troncales tumorales (o Cancer Stem Cells por sus siglas en inglés CSC) que son responsables de la autorenovación del tumor, formación de esferoides resistentes a la quimioterapia, aumento en la migración e invasión celular y exacerbación del mimetismo vasculogénico contribuyendo así en la progresión del cáncer. Los microRNAs son pequeños RNAs no codificantes de 25 nt en longitud que regulan de manera negativa la expresión genética al unirse a múltiples mRNAs mensajeros induciendo su degradación o inhibición de la traducción. En cáncer, la expresión de los microRNAs se encuentra alterada de manera aberrante por lo que contribuyen de manera importante en la carcinogénesis actuando como oncogenes o supresores de tumor. El microRNA-204-5p actúa como un supresor de tumores por lo que su expresión se encuentra reprimida en diversos tipos de neoplasias humanas incluyendo el cáncer de mama. Diversos estudios sugieren que la expresión de los microRNAs puede ser reconstituida en las células tumorales a través de su administración ectópica, revirtiendo potencialmente así el fenotipo troncal y la resistencia a la quimioterapia. En este trabajo se evaluó la factibilidad de utilizar nanopartículas lipídicas como un agente acarreador del microRNA-204-5p para su liberación terapéutica en las células HS578t de cáncer de mama triple negativo. Para ello, primero aislamos la subpoblación celular troncal que presenta el inmunofenotipo CD44+/CD24- a partir de las células HS578t utilizando citometría de flujo; para posteriormente transfectarlas con el microRNA-214-5p acoplado a un nanoacarreador lipídico. Los datos experimentales muestran que la transfección del microRNA-204-5p resultó en una disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) en el porcentaje de células CD44+/CD24- indicando un efecto positivo en la disminución de la troncalidad de las células tumorales. De manera interesante, también encontramos una disminución significativa en el tamaño y número de esferoides tumorales en comparación con el control de células no transfectadas. Mediante la



de ensayos funcionales, determinamos que el microRNA-204-5p también fue capaz de disminuir significativamente ( $p < 0.0001$ ) la migración celular aberrante y la formación de los puntos de ramificación y canales que conforman las redes en 3D representativas del mimetismo vasculogénico en las células HS578t de cáncer de mama CD44+/CD24-. Con los datos obtenidos concluimos que el microRNA-204-5p tiene una función importante en la inhibición de algunos hallmarks del cáncer asociados al fenotipo troncal, por lo que su restauración en los tumores deficientes en microRNA-204-5p podría representar una herramienta útil en la terapia del cáncer de mama.

**PALABRAS CLAVE:** cáncer de mama, células madre tumorales, microRNA-204-5p, nano acarreador.



## ABSTRACT

Breast cancer is a complex disease with diverse clinical and molecular characteristics that requires an integrated therapeutic approach. Recent findings suggest that a promising therapeutic strategy is to target the destruction of Cancer Stem Cells (CSCs) that are responsible for tumor self-renewal, formation of chemotherapy-resistant spheroids, increased cell migration, and exacerbation of vasculogenic mimicry thus contributing to cancer progression. MicroRNAs are small non-coding RNAs of 25 nt in length that negatively regulate gene expression by binding to multiple messenger mRNAs inducing their degradation or inhibition of translation. In cancer, the expression of microRNAs is aberrantly altered so that they contribute significantly to carcinogenesis by acting as oncogenes or tumor suppressors. MicroRNA-204-5p acts as a tumor suppressor and its expression is repressed in several types of human neoplasms including breast cancer. Several studies suggest that the expression of microRNAs can be reconstituted in tumor cells through their ectopic administration, thus potentially reversing the stem phenotype and resistance to chemotherapy. In this work, we evaluated the feasibility of using lipid nanoparticles as a carrier agent of microRNA-204-5p for its therapeutic delivery into HS578t triple-negative breast cancer cells. To this end, we first isolated the stem cell subpopulation displaying the CD44+/CD24- immunophenotype from HS578t cells using flow cytometry; and subsequently transfected them with microRNA-214-5p coupled to a lipid nanocarrier. Experimental data show that transfection of microRNA-204-5p resulted in a significant decrease ( $p < 0.0001$ ) in the percentage of CD44+/CD24- cells indicating a positive effect in decreasing tumor cell stemness. Interestingly, we also found a significant decrease in the size and number of tumor spheroids compared to the control untransfected cells. Using functional assays, we determined that microRNA-204-5p was also able to significantly decrease ( $p < 0.05$ ) the number of tumor spheroids ( $p < 0.05$ ) to significantly ( $p < 0.0001$ ) decrease aberrant cell migration and the formation of branch points and channels that form the 3D networks representative of vasculogenic mimicry in HS578t CD44+/CD24- breast cancer cells. With the data obtained we conclude that microRNA-204-5p has an important role in inhibiting some cancer hallmarks associated with the stem



phenotype, so its restoration in microRNA-204-5p-deficient tumors could represent a useful tool in breast cancer therapy.

**KEY WORDS:** breast cancer, cancer stem cells, microRNA-204-5p, nanocarrier.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 CÁNCER

El cáncer es un complejo grupo de enfermedades, en la cual las células tienen un potencial replicativo ilimitado y tienen bloqueada la capacidad de destruirse automáticamente cuando presentan un daño considerable al DNA (apoptosis), a diferencia de las células normales que mueren para que otras células nuevas tomen su lugar evitando así propagar mutaciones, lo que a largo plazo generan un tumor maligno. El cáncer puede originarse en cualquier parte del cuerpo y es causado por diferentes factores, entre los más comunes están: la acumulación de mutaciones que no pueden ser reparadas en genes que participan en diversos procesos como, por ejemplo, el crecimiento celular y apoptosis o en genes que participan como reguladores genéticos. También los cambios epigenéticos, los factores hereditarios, la exposición prolongada y continua a factores ambientales como la radiación, infección por virus o bacterias e incluso el estilo de vida que lleve el organismo incluyendo fumar, obesidad, exposición excesiva a estrógenos y falta de ejercicio entre otros representan factores de riesgo importantes para el desarrollo de cáncer (Takashi *et.al* 2012)

### 1.2 HALLMARKS DEL CÁNCER

A medida que las células cancerosas se dividen, van acumulando una gran diversidad de mutaciones que le permiten evolucionar y por tanto adquirir diferentes capacidades distintivas que le confieren heterogeneidad a este tipo de células. Estas capacidades distintivas les permiten a las células cancerosas seguir desarrollándose y transformándose obteniendo así nuevas funciones biológicas para su crecimiento exacerbado en el micro ambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011). Los investigadores Hanahan y Robert A. Weinberg describieron a inicios del 2011 las diez características distintivas del cáncer las cuales se muestran en la Figura 1 y se describen a continuación:



### 1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento

En condiciones normales un tipo particular de célula produce factores de crecimiento para desencadenar la proliferación celular el cual puede afectar a otro tipo de célula, pero las células cancerosas no dependen de esta estimulación exógena, sino más bien ellas sintetizan sus propios factores de crecimiento para inducir su auto proliferación de forma autocrina y paracrina.

### 1.2.2 Insensibilidad a las señales de anti-crecimiento

Las células normales tienen un mecanismo para limitar su crecimiento, este mecanismo está regulado por diversas proteínas, por ejemplo, las proteínas retinoblastoma RB y TP53. La función de RB es determinar si una célula puede o no inducir el crecimiento celular y su división; mientras que TP53 detiene el ciclo celular si se detecta un daño en el genoma y puede inducir la apoptosis si este daño no es reparado. Sin embargo, las funciones de RB así como TP53 se encuentran defectuosas en las células cancerosas lo que conlleva la evasión de señales anti proliferativas y la evasión de la apoptosis.

### 1.2.3 Resistencia a la muerte celular programada (Apoptosis)

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se desencadena cuando la célula sufre un daño que no puede ser reparado. Este proceso está alterado en cáncer debido a que se activan proteínas anti-apoptóticas que interrumpen dicho proceso (Hanahan y Weinberg, 2011). La pérdida de la función de P53 promueve la participación de genes como BCL2, los cuales impulsan la supervivencia de las células cancerosas produciendo proteínas que intervienen en la inducción de la apoptosis.

### 1.2.4 Ilimitado potencial replicativo

El estado replicativo de una célula normal es alrededor de 60 a 70 duplicaciones, después de cada duplicación los telómeros se van acortando dejando desprotegido al DNA de los extremos terminales de los cromosomas, conduciendo la detención del crecimiento celular seguido de la muerte celular programada. Sin embargo, las



células tumorales tienen un ilimitado potencial replicativo debido a que tienen una alta tasa de regeneración telomérica esto quiere decir que los telómeros no se acortan sino más bien recuperan su longitud debido a la sobreexpresión de la telomerasa o a la activación de la ruta alterna de mantenimiento de los telómeros denominada ruta ALT.

### 1.2.5 Angiogénesis

Como cualquier célula, las células tumorales requieren de la obtención de alimento y oxígeno, para ello, las células cancerosas promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, procesos denominados como neo angiogénesis o neo vascularización que se realizan a partir de las células endoteliales. Los nuevos vasos sanguíneos endoteliales transportaran los suplementos necesarios que se encontraban distantes para las células tumorales. Durante el desarrollo embrionario la neovascularización es fundamental para el origen de las células endoteliales las cuales se asocian para recubrir y formar los primeros vasos sanguíneos. En etapas adultas las células normales de diversos tejidos activan temporalmente la angiogénesis en respuesta a procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, en las células tumorales el proceso de angiogénesis continúa siempre activado de manera aberrante (Hanahan y Weinberg, 2011).

### 1.2.6 Metástasis

La metástasis es la formación de un nuevo tumor en otra parte del cuerpo a partir del tumor primario original. Las células tumorales se liberan de la interacción célula – célula penetrando tejido circundante a través de circulación sanguínea para invadir tejidos locales y distantes y adherirse en un nuevo sitio para proliferar y generar un nuevo tumor secundario el cual es en general más agresivo y resistente a la quimioterapia convencional.

### 1.2.7 Inestabilidad genómica

Las células tumorales presentan dos tipos de inestabilidad genómica que le



confieren a la célula tumoral variabilidad genética que dará lugar a la proliferación celular. Estas son: i) La inestabilidad a nivel cromosómico; la cual está relacionada con translocaciones, deleciones, duplicaciones y aneuploidías; ii) La inestabilidad a nivel de secuencia del DNA la cual involucra a las mutaciones puntuales y deleciones/inserciones.

#### 1.2.8 Inflamación

Durante el proceso inflamatorio las células liberan factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos y otros factores que promueven la proliferación celular entre otros factores que benefician a las células tumorales ya que le confieren el microambiente necesario para su progresión y desarrollo.

#### 1.2.9 Desregulación metabólica y energética

Las células tumorales tienen la capacidad de reprogramar el metabolismo de la glucosa aun en presencia de oxígeno (en condiciones normales el proceso de glicolisis se favorece en ausencia de oxígeno) y obtienen energía a través del glucolisis anaeróbico suidas por un proceso de fermentación láctica; proceso denominado como el “efecto Wartburg”.

#### 1.2.10 Evasión del sistema inmune

Durante el desarrollo del cáncer hay un proceso llamado “inmuno-edición tumoral” el cual es llevado a cabo en diversas etapas. En la primera etapa, el sistema inmune destruye a las células tumorales en un proceso llamado eliminación, sin embargo, algunas logran sobrevivir y pasan a la etapa de equilibrio en donde las células tumorales comienzan a proliferar y el sistema inmune destruye nuevamente a las células tumorales, pero ahora teniendo prioridad a aquella que presentan antígenos tumorales y aguantando el ataque de las células tumorales con baja expresión de antígenos. Posteriormente, las células que sobrevivieron al ataque del sistema inmune comienzan a proliferar generando un microambiente inmunosupresor favorable para el crecimiento tumoral proceso denominado como escape (Hanahan y Weinberg, 2011).



**Figura 1. Hallmarks del cáncer.** Se esquematizan las 10 alteraciones celulares que ocurren en los tumores malignos. Tomada y modificada de Hanahan and Weinberg, 2011.

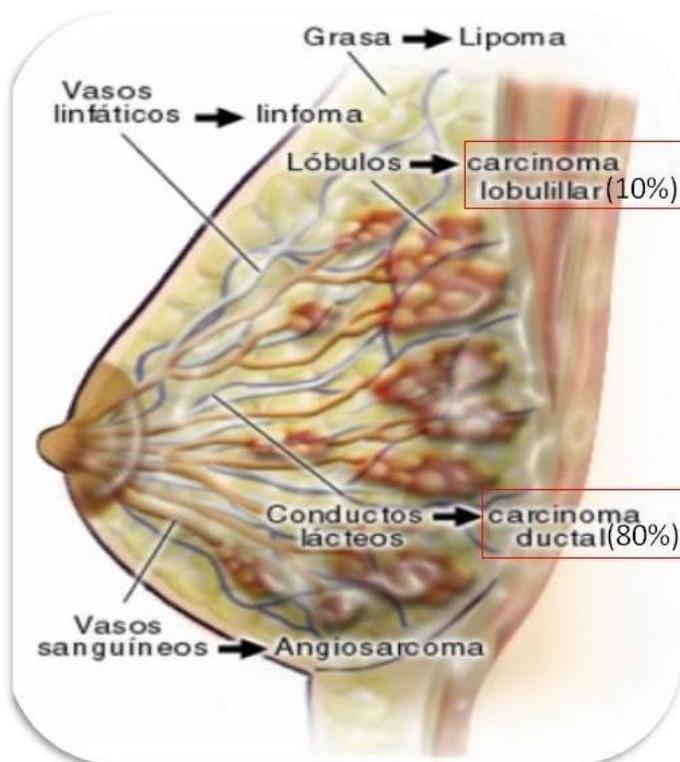
### 1.3 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se refiere a aquel cáncer que se originan en el tejido mamario, más comúnmente en el revestimiento interno de los conductos galactóforos o en los lóbulos que irrigan los conductos con leche (Sharma G. *et. al.*, 2010). Existen varios tipos de tumores que pueden desarrollarse en diferentes áreas de la mama. La mayoría de los tumores son el resultado de cambios benignos (no cancerosos) dentro del seno. Por ejemplo, el cambio fibroquístico es una afección no cancerosa en la que las mujeres desarrollan quistes (paquetes acumulados de líquido), fibrosis (formación de tejido conectivo cicatricial), bultos y áreas de engrosamiento, sensibilidad o dolor en los senos. La mayoría de los casos con cáncer de mama comienzan en las células que recubren los conductos (cánceres ductales). Algunos



lo hacen en las células que recubren los lóbulos (cánceres lobulares), mientras que un pequeño número comienza en los otros tejidos. El sitio las células de cáncer de mama no invasivas son aquellas confinadas a los conductos y no invaden los tejidos adiposos y conectivos circundantes de la mama. El carcinoma ductal *in situ* es la forma más común de cáncer de mama no invasivo (90%). El carcinoma lobular *in situ* es menos común y se considera un marcador de aumento de riesgo de cáncer de mama. Por otro lado, células invasoras son aquellas que sobrepasan a través del conducto y la pared lobular e invaden los tejidos adiposos y conectivos circundantes de la mama. Sin embargo, el cáncer de mama también puede ser invasivo sin ser metastásico (propagación) a los ganglios linfáticos u otros órganos (Sin *et. al* 2017).

El cáncer de mama se origina cuando las células del tejido mamario comienzan a crecer en forma descontrolada (Giordano *et. al.*, 2004) puede originarse en diferentes partes del seno, como son en los ductos que llevan leche al pezón, denominado cáncer ductal, siendo este el más común alrededor del 80 % de los casos y en los lobulillos que representan las glándulas donde se produce la leche, denominado cáncer lobulillar. Entre el 15 al 30% corresponden a carcinomas *in situ* y el resto son infiltrantes (Kumar *et. al.*, 2015) (Figura 2).



**Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria.** Tomada y modificada de (Cotran *et. al.*, 1999).

### 1.3.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en mujeres de todo el mundo. Información sobre la incidencia y la mortalidad del cáncer de mama es esencial para planificar medidas de salud. La incidencia de cáncer de mama en los países desarrollados es más alta, mientras que la mortalidad relativa es mayor en los países menos desarrollados (Ferlay *et. al.*, 2016) (Tabla 1)



**Tabla 1.** Número estimado de incidencia y mortalidad en 2018. sexo femenino, todas las edades.

<b>Cáncer de mama</b>	<b>Mundial</b>		<b>Latinoamérica y el Caribe</b>		<b>México</b>	
	Incidencia	Mortalidad	Incidencia	Mortalidad	Incidencia	Mortalidad
	2 088 849	626 679	199 734	52 588	27 283	6 884

Fuente: Agencia Internacional de Investigación en Cáncer y Organización Mundial de la Salud. Tasa AJS: Tasa por 100.000 mujeres estandarizada por edad (todas las edades).

### 1.3.2 Factores de riesgo

Hasta el momento no existe una causa específica para desarrollar CM; sin embargo, se conocen varios factores de riesgos involucrados y relacionados directa o indirectamente con las hormonas reproductivas, en particular con la exposición prolongada a los estrógenos y progesterona. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado asociación entre el CM y la menarca temprana antes de los 12 años, nuliparidad o paridad a edades tardías después de los 35 años, menopausia tardía, alta densidad del seno en la mastografía, terapias hormonales de reemplazo, y el uso reciente de anticonceptivos orales (Qui *et. al.*2012) El antecedente de abultamientos benignos en mama aumenta cinco veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres sin cambios benignos en la mama (McPherson *et. al.*, 2000). Ha sido encontrado también que la obesidad en la mujer, post menopáusica, estatura alta, exposición a las radiaciones, consumo excesivo de alcohol, tabaco y falta de ejercicio físico son factores de riesgo para el desarrollo del CM (Gómez *et. al.*, 2012).

### 1.3.3 Clasificación del cáncer de mama.

El CM se clasifica con base al estadio clínico, la morfología celular y el análisis inmunohistoquímico. Son necesarios factores pronósticos más precisos que ayuden en las decisiones terapéuticas. Utilizando microarreglos de ADNc se determinó que existen varios subtipos de CM con diferentes patrones de expresión genética y



pronóstico. Confirmando así las diferencias en el fenotipo y agregaron nuevos conocimientos sobre la biología del CM. El CM se divide en dos grupos principales basados en la presencia o ausencia de expresión del receptor de estrógeno (RE). El perfil de expresión genética reveló que dentro de los tumores RE+ existen dos subtipos: luminal A y luminal B. Los tumores RE- comprenden también dos subtipos: HER2 y tipo basal. Estos subtipos muestran periodos cortos libres de enfermedad luego de su tratamiento y un mal pronóstico. Pero también se puede dividir basados en la presencia o ausencia del receptor progesterona (RP), factor de crecimiento epidermal 2 (HER2), o bien la ausencia de los tres receptores (RE-, RP- y HER2-) denominados triple negativo (Eroles *et. al.*, 2010). Perou y colaboradores, fueron los primeros en clasificar el CM con base en la expresión génica a nivel genoma completo determinando cinco subtipos: luminal (A y B), HER2+, tipo basal y normal (Wallden *et. al.*, 2015) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación molecular del cáncer de mama

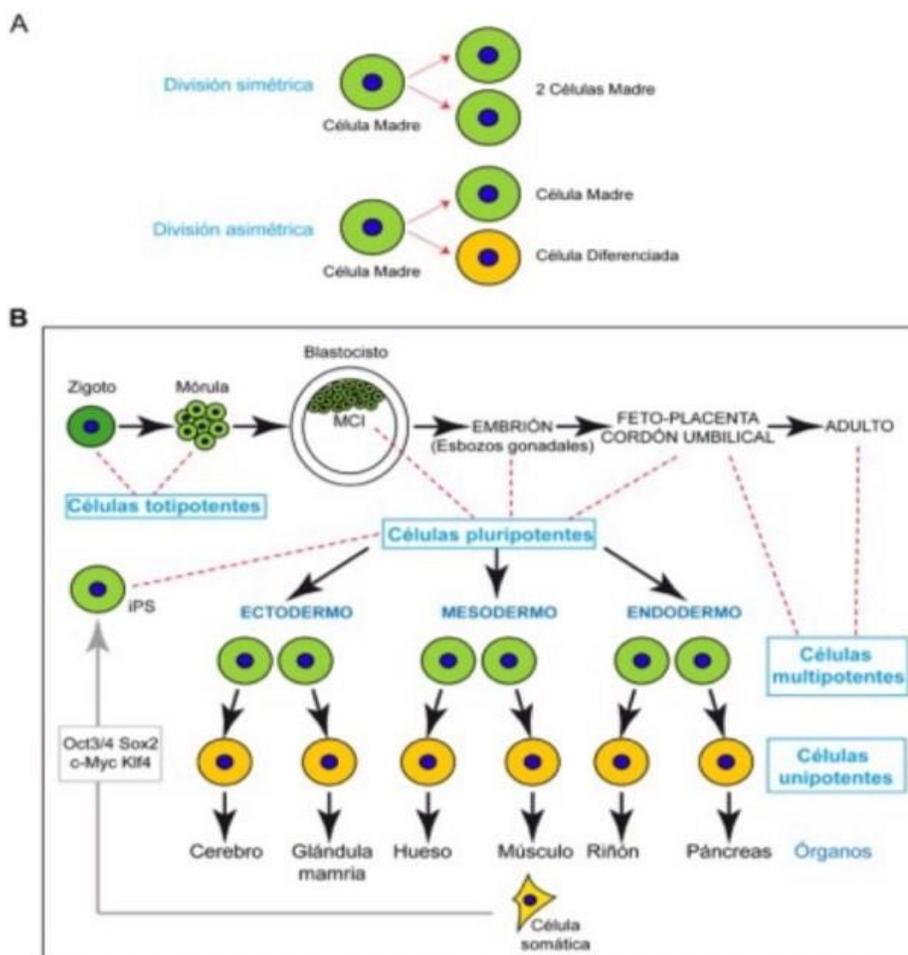
<b>Clasificación</b>	<b>Inmuno-perfil</b>	<b>Características</b>
Luminal A	RE+,RP+/-, HER2-	Bajo Ki-67(< 14 %), respuesta endocrina
Luminal B	RE+,RP+/-, HER2+	Alto Ki-67, respuesta endocrina
HER2+	RE-, RP-, HER2+	Alto Ki-67, respuesta a quimioterapia.
Basal	RE-, RP-, HER2-	Alto Ki-67, expresión de EGFR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

EGFR, receptor de factor de crecimiento epidermal; RE, receptor de estrógeno; HER2, receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2; RP, receptor de progesterona, Ki-67 marcador de proliferación. Tomada de (Wallden *et. al.*, 2015).

#### 1.4 BIOGÉNESIS DE LAS CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales son células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación, es decir, producir más células madre, y de originar células más comprometidas en la ruta de diferenciación (progenitores), que tras sucesivas

divisiones celulares darán lugar a los tipos celulares diferenciados (Zakrzewski *et al.*, 2019). Cada célula madre al dividirse simétricamente genera dos células nuevas con características idénticas a la original, asurando una expansión exponencial de la población de células madre (Boone y Doe, 2008; Caussinus y Hirth, 2007). Sin embargo, la división asimétrica de la célula madre genera una célula madre idéntica a la original y un progenitor comprometido en la diferenciación, manteniéndose así



la población de células madre constante (Morrison y Kimble, 2006) (Figura 03).

**Figura 3. Biogénesis de las células troncales.** (A) Las CT se puede dividir simétricamente, generando dos células idénticas entre sí e idénticas a la CT de origen, y se puede dividir asimétricamente, generando dos células diferentes; una SC similar a la CT de origen, y una célula más comprometida con la diferenciación.



## (B) Clasificación de las CT.

Las células madre se pueden clasificar según su origen en células madre embrionarias y células madre adultas (Figura 3). Además, también se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en: i) Células totipotentes: Células madre capaces de generar un organismo completo. El único ejemplo de célula madre totipotente es el cigoto, sin embargo, el conjunto de células que componen la mórula temprana también tiene esta capacidad (Mitalipov y Wolf, 2009). ii) Células pluripotentes: Células madre capaces de dar lugar a las tres capas germinales que forman un embrión (ectodermo, mesodermo, endodermo) aunque no son capaces de generar las estructuras extraembrionarias (trofoblasto y placenta) (Thomson *et al.*, 1998).

Las células que se aíslan de la masa celular interna del blastocisto (Mitalipov y Wolf, 2009), y las células germinales que derivan de los esbozos gonadales del embrión (Moreno-Ortiz *et al.*, 2009) son células madre pluripotentes. Asimismo, se ha demostrado que una célula somática puede ser reprogramada por la sobreexpresión transitoria de una combinación de genes (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4), los cuales son capaces de diferenciar y convertir a la célula somática en una célula madre pluripotente, denominada célula madre pluripotente inducida. (Takahashi y Yamanaka, 2006). También podemos encontrar células madre pluripotentes en el feto, cordón umbilical y placenta (Weiss y Troyer, 2006).

Células multipotentes: Células madre capaces de generar exclusivamente los tipos celulares que conforman un tejido determinado (Wiseman y Werb, 2002), también denominadas células madre adultas.

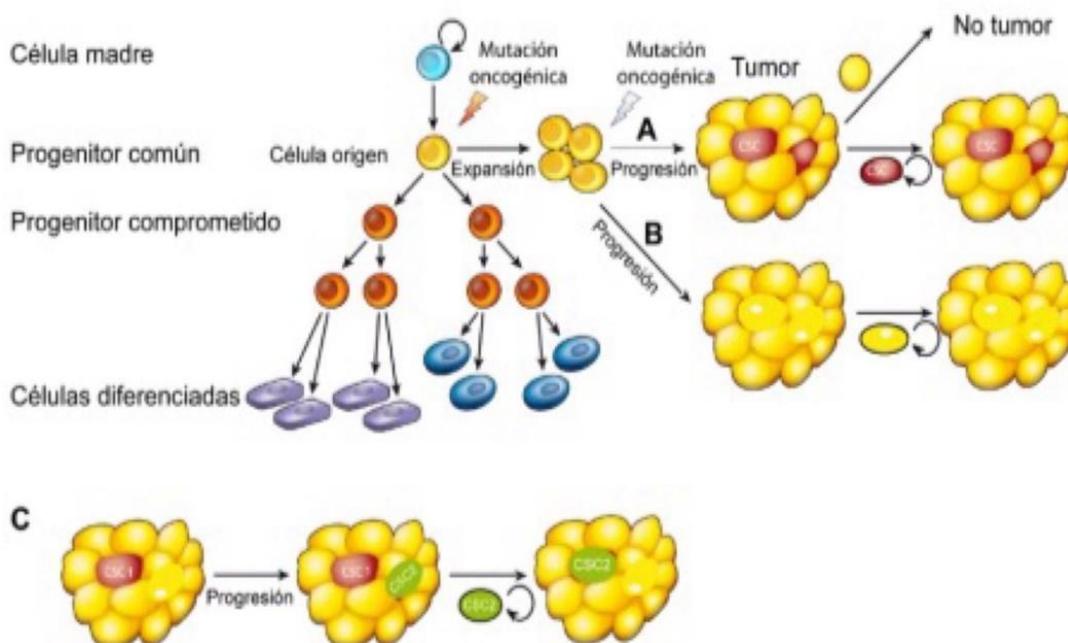
Células tumorales unipotentes: Células que tienen la capacidad de diferenciarse en sólo un tipo celular, también denominadas células progenitoras (Hsu y Fuchs, 2012) (Figura 3).



#### 1.4.1 Células troncales tumorales

Los diferentes tumores que se originan en el organismo son generalmente caracterizados clínicamente mediante análisis histológicos y expresión de marcadores específicos. Además de existir heterogeneidad entre los distintos tipos de tumores, también existe heterogeneidad intertumoral, habiendo dentro de un tipo tumoral distintos subtipos. Asimismo, las células que componen el tumor presentan heterogeneidad en expresión de marcadores celulares, en morfología celular, en capacidad proliferativa, en modificaciones genéticas, y en respuesta terapéutica (Heppner y Miller, 1983). Se han propuesto dos modelos para explicar la heterogeneidad y la diferente tumorigenicidad (adquisición de la capacidad de formar tumores) de las células dentro de un tumor: el modelo de la evolución clonal y el modelo de la célula madre del cáncer (CSC) (Figura 4). El modelo de evolución clonal presupone que todas las células cancerosas son tumorigénicas. En este caso, la heterogeneidad característica de los tumores se explica como una consecuencia de la variabilidad en el patrón de expresión genética entre cada una de las células que forman el tumor, así como de la capacidad de éstas para promover la formación de vasos sanguíneos y crear un microambiente favorable para su supervivencia (Campbell y Polyak, 2007; Islam *et. al.*, 2019; Nowell, 1976).

El modelo de la CSC relaciona la actividad proliferativa y metastática de los tumores con la existencia de una subpoblación de células con propiedades semejantes a las de las células madre, las células madre del cáncer. Se denominan CSCs a las células tumorales con características de células madre; capaces de autorrenovarse mediante divisiones simétricas, y capaces de dividirse asimétricamente produciendo una célula madre y una célula progenitora, encargada de producir las células con distinto fenotipo que componen el tumor (Bonnet y Dick, 1997; Reya *et. al.*, 2001; S. K. Singh *et. al.*, 2004). Este modelo implica la organización jerárquica de los tumores, mantenida por la CSC (Bonnet y Dick, 1997) (Figura 4).



**Figura 4. Modelos representativos de la heterogeneidad y la diferente tumorigenicidad** (adquisición de la capacidad de formar tumores) de las células dentro de un tumor. (A) Modelo de la Células troncales tumorales. (B) Modelo de Evolución Clonal. (C) Modelo que combina ambas teorías. Adaptado de (Visvader, 2011)

En 1994 fue identificada la primera CSC humana en muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda; la célula madre de la leucemia (Lapidot *et. al.*, 1994). Sólo un pequeño porcentaje de células de la leucemia, con el mismo fenotipo que las células madre hematopoyéticas, CD34+CD38-, eran las responsables de la transmisión de la enfermedad cuando se trasplantaron en ratones inmunodeficientes (Bonnet y Dick, 1997). Sin embargo, las primeras evidencias que confirmaban la existencia de CSC en tumores humanos sólidos no se dieron hasta 2003, cuando se demostró que la población celular procedente de un tumor de mama humano caracterizada por los marcadores de superficie linaje (CD19-, CD20-, CD23-, CD5-) y ESA+CD44+CD24-/baja, era altamente tumorigénica. Apenas 200 células de esta población eran capaces de generar tumores en xeno-transplantes



llevados a cabo en animales inmunodeficientes, mientras que, para generar tumores a partir de la población total del tumor, se necesitaban al menos 50.000 células. Los tumores que se generaban eran heterogéneos, al igual que los tumores iniciales, y contenían células tumorigénicas y no tumorigénicas con diversidad en la expresión de los marcadores de superficie ESA, CD44 y CD24 (Al-Hajj *et. al.*, 2003).

Posteriormente, se demostró que el marcador ALDH podía subdividir la población ESA+/CD44+/CD24- del tumor en fracciones con distinto grado de tumorigenicidad, siendo la población con el fenotipo ALDH Linaje ESA+/CD44+/CD24 la población enriquecida en CSCs (Croker *et. al.*, 2009). Además, se demostró que las células de la población CD44+/CD24- del tumor eran capaces de formar esferas (en condiciones de cultivo de mamosferas), enriquecidas en células madre de cáncer de glándula mamaria (Charafe-Jauffret *et. al.*, 2009; Ponti *et. al.*, 2005; Wang *et. al.*, 2014).

Las células que forman las mamosferas tienen el fenotipo CD44+/CD24-, y además, son células indiferenciadas, ya que no expresan los marcadores CK14, marcador de célula mioepitelial, ni CK18, marcador de célula ductal. Asimismo, estas células son capaces de generar tumores cuando se trasplantan (al menos 1.000 células) en mamas de ratones inmunodeficientes (Grimshaw *et. al.*, 2008; Ponti *et. al.*, 2005; Velasco-Velázquez *et. al.*, 2012).

Los dos modelos que se proponen para explicar la propagación de los tumores no son incompatibles. Se ha propuesto un modelo que combina ambas teorías para explicar el cambio de fenotipo que sufren algunos tumores durante la progresión del tumor, mediante el cual se vuelven más agresivos (Carrasco *et. al.*, 2014)), aunque la mayoría de los tumores se mantienen estables en los últimos estadios de la enfermedad e incluso durante la metástasis (Kyle *et. al.*, 2003; Weigelt *et. al.*, 2010). En dicho modelo, al principio, el crecimiento del tumor sería llevado a cabo por una CSC1, y con la progresión del tumor, otra distinta CSC2 surgiría debido a la



evolución clonal de la CSC1, como resultado de la adquisición de una mutación adicional o una modificación epigenética. (Barabe *et. al.*, 2007; Faridi *et. al.*, 2013).

#### 1.4.1.1 Funciones de la proteína CD44 en el fenotipo troncal.

La proteína CD44 es una glucoproteína transmembranal, interactúa con ligandos como osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de matriz, generalmente presente en las células progenitoras, juega un papel importante en la adhesión, señalización intracelular, mejora de la proliferación celular, angiogénesis tumoral, diferenciación, migración moduladora y propiedades invasivas en el cáncer de mama, (Lagadec *et al*, 2012, Sin y Lim, 2017). La proteína CD44 interactúa con el ácido hialurónico para promover la invasividad celular y la metástasis, sin embargo, el mecanismo sigue siendo desconocido. CD44 actúa para mantener la tumorigénesis y la potencia múltiple de la población (Van *et al*, 2011). Además, CD44 muestra una fuerte expresión en células madre de cáncer de mama, así como en numerosos cánceres humanos (Sin y Lim, 2017).

#### 1.4.1.2 Funciones de la proteína CD24 en el fenotipo troncal

La proteína CD24 es una glucoproteína de la superficie celular que mejora las propiedades de adhesión y promueve la metástasis y la proliferación tumoral (Schabatt *et al*, 2006). Por el contrario, un estudio demostró que la regulación positiva de CD24 era capaz de inhibir la potencia de las células de cáncer de mama (Schabatt *et al*, 2006, Sin y Lim, 2017). Se descubrió que CD24 se expresa en una amplia variedad de cánceres, pero se ha demostrado que la expresión de CD24 no se asoció con una subpoblación agresiva de cáncer de mama (Ahmed *et al*, 2012, Sin y Lim, 2017).

### 1.5 Los microRNAs: reguladores la expresión genética

Los microRNAs pertenecen a una familia RNA pequeños monocatenarios no codificantes de alrededor de 19-25 nucleótidos (nt) de largo, se pueden encontrar tanto en animales como en plantas y están involucrados en la regulación post-transcripcional (Catalanotto *et. al.*, 2016; Oliveto *et. al.*, 2017). En 1993 fueron



descritos por primera vez Ambros y colaboradores, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. El grupo de investigadores estaba trabajando con el gen *lin-4* el cual es esencial para el desarrollo post-embriónico del nematodo. Lo único que sabían en ese tiempo era que, en la etapa larvaria, *lin-4* regula negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Ellos encontraron que, *lin-4* no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos RNAs: uno de 22 nt y otro de aproximadamente 60 nt, el cual podría formar una estructura de tallo y burbuja y ser el precursor del RNA más corto (Lee *et. al.*, 1993).

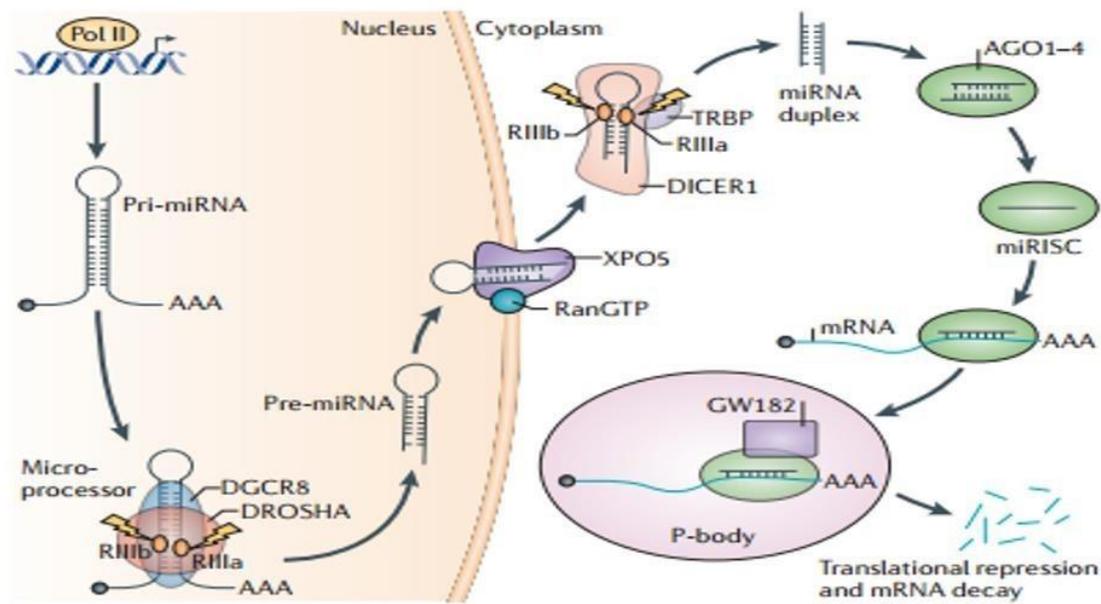
Posteriormente, se descubrió que la manera en la que el *lin-4* regula la producción de la proteína LIN-14 es mediante la unión de la región 3' no traducida (UTR, del inglés untranslated region) del RNA mensajero (RNAm) de *lin-14* por complementariedad de bases, evitando así su traducción (Lagos-Quintana *et. al.*, 2001; R. C. Lee, 2001). Estos datos sugirieron que los microRNAs reprimen la expresión génica al unirse directamente a la región 3'UTR de un RNAm blanco e inducen su degradación o inhiben la traducción del transcrito de manera específica (Catalanotto *et. al.*, 2016; Eroles *et. al.*, 2016; R. Singh y Mo, 2013).

### 1.5.1 Biogénesis de los microRNAs

La biogénesis de los microRNAs se puede englobar en cinco pasos: (1) Los microRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II (RNA pol II), que inicialmente produce un precursor largo. Durante la transcripción se forman regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla mediante apareamiento de secuencias complementarias, generando así un microRNA primario de alrededor de 100 nt que poseen una estructura de CAP en su extremo 5' UTR y son poliadenilados en su extremo 3' UTR, tal como ocurre con los RNAm celulares (Y.Lee *et. al.*, 2004). (2) El pri-miRNA es procesado por el complejo microprocesador conformado por la enzima Drosha y la proteína DGCR8. La estructura secundaria de tallo-burbuja del pri-miRNA es reconocida y procesada por la enzima Drosha, la cual posee actividad de RNAsa III, generando precursores de 70-100 nt llamados microRNAs precursores (pre-miRNA). El pre-miRNA es una secuencia que se conforma de una



estructura tallo-burbuja con una prolongación de dos uracilos en su extremo 3', esta estructura funciona como un motivo de reconocimiento por la exportina 5 (3) la exportina 5, la cual interviene directamente en el transporte del pri-miRNA del núcleo al citoplasma en un proceso dependiente de Ran-GTP (Lin y Gregory, 2015). (4) Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por DICER otra enzima del tipo RNasa III, que en conjunto con la proteína TRBP, recorta por fuera de la horquilla y genera un RNA de doble cadena imperfecto denominado microRNA/microRNA\*. Posteriormente, TRBP recluta a la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2) al complejo microRNA/microRNA\*-DICER y forma el complejo de silenciamiento inducido por RNA. La cadena complementaria del dúplex microRNA/microRNA\* es liberada y degradada por AGO2. La proteína AGO2 guía al microRNA a la región 3' UTR del RNAm blanco donde se une de manera específica mediante complementariedad de la secuencia (Ha y Kim, 2014; Murphy *et. al.*, 2008). Si la complementariedad del microRNA con la secuencia del transcrito es perfecta se reclutarán las proteínas de desadenilación para iniciar la degradación del RNAm. De manera alternativa, si la complementariedad del microRNA con su RNAm blanco es casi perfecta se inhibirá la traducción del transcrito (Croce, 2009; Ha y Kim, 2014; Lin y Gregory, 2015) (Figura 5).



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

**Figura 5. Biogénesis de los microRNAs.** . Representación esquemática de la biogénesis y modo de acción de los miRNAs de mamíferos. Los miRNAs van a ser transcritos por la RNA Pol II para generar el pri-miRNA.. Canónicamente este pri-miRNA va a ser procesado por la endoribonucleasa Drosha en conjunto con la proteína DGCR8 la cual reconoce y se une al RNA de doble hebra, y facilita el corte mediado por Drosha; los mirtrones van a ser procesados mediante la maquinaria del espliceosoma de generando en ambas vías a el pre-miRNA el cual va a unirse a la exportina 5 mediante la cual el pre-miRNA es conducido al citoplasma donde será procesado por el complejo formado por Dicer,y TRBP para generar el miRNA maduro (21-23 nts) existen miRNAs que no son generados por Dicer sino que son procesados por la proteína AGO2. El miRNA maduro entonces se une a AGO1-4 formando el complejo RISC al cual se le puede unir la proteína GW182. Una vez formado el complejo RISC este puede generar desestabilización del mRNA inhibiendo la traducción y/o puede promover la degradación del mRNA mediado por AGO2 . Por otra parte se ha descrito que la expresión de los miRNAs puede ser inducida o activada por la estimulación de factores de crecimiento como son PDGF y TGF $\beta$  seguido de la secuencial activación y fosforilación de los receptores tipo I y tipo II los cuales promoverán la fosforilación del factor de trascricpción Smad el cual



vijara al núcleo regulando la transcripción de los transcritos primarios de los miRNAs (López Camarillo intech 2013)

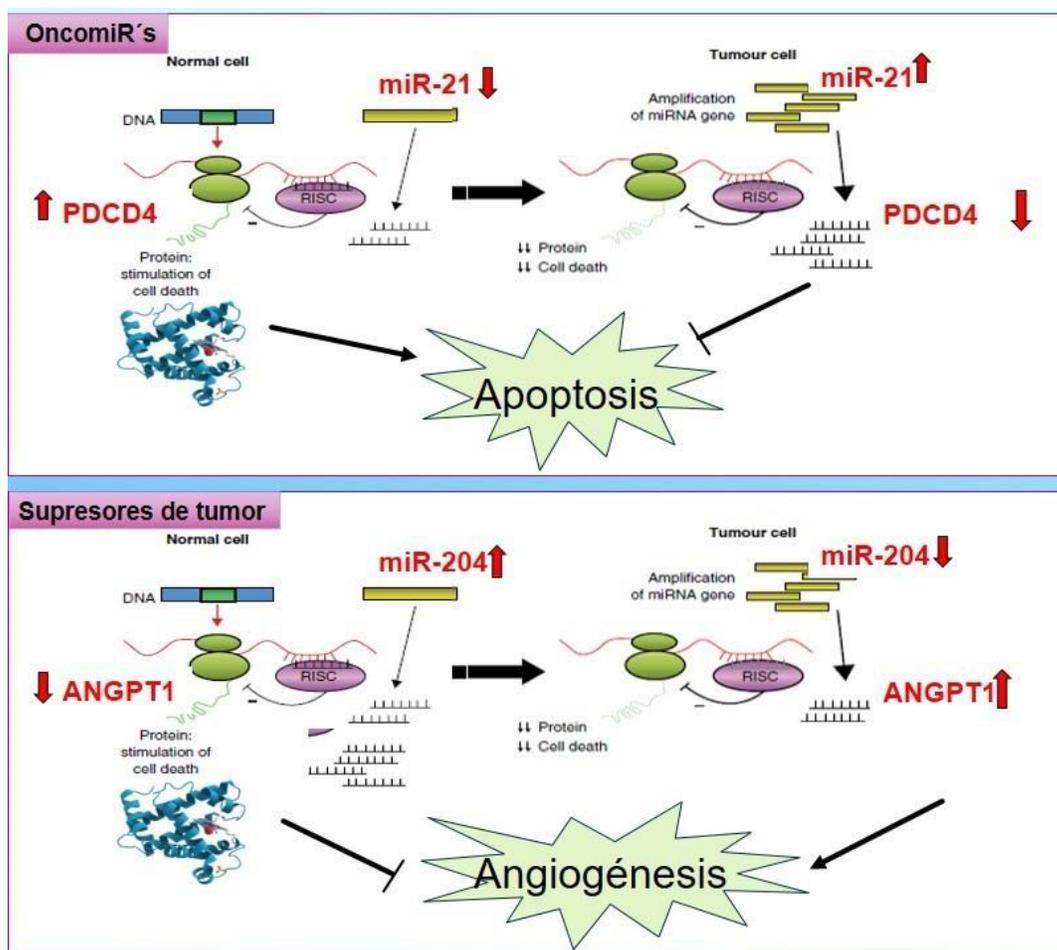
### 1.5.2 Funciones de los microRNAs en cáncer: oncomiRs

En cáncer la expresión genética se encuentra dramáticamente desregulada y la expresión de los microRNAs esta correlacionada con diversos tipos de cáncer. Los microRNAs afectan todos los pasos de la progresión tumoral como son el crecimiento del tumor, angiogénesis y la capacidad de invadir y generar metástasis ( Oliveto *et. al.*, 2017). Los microRNAs pueden actuar como oncomiR's o como supresores de tumor (Esquela-Kerscher y Slack, 2006). Los oncomiR's modulan la expresión de genes supresores de tumores, se encuentran sobre-expresados en diversos tipos de cáncer, promoviendo la tumorigénesis, por otro lado, los microRNAs supresores de tumor modulan la expresión de oncogenes y se encuentran reprimidos en diversos tipos de cáncer (Esquela-Kerscher y Slack, 2006). La primera evidencia de microRNAs involucrados en el cáncer fue en un estudio molecular caracterizando la delección 13q14 en leucemia linfocítica crónica (LLC), donde revelan que dos microRNAs, el miR-15a y el miR-16-1 se encuentran dentro de la pequeña región con delección por lo tanto, se encuentra reprimidos en el 60% de los casos de LLC (Calin *et. al.*, 2002). Tras este hallazgo, la expresión desregulada de microRNAs en cáncer se ha demostrado en otros tipos. Por ejemplo, el miR-143 y el miR-145 se encuentran reprimidos en cáncer de colon (Michael *et. al.*, 2003). Let- 7 se encuentra reprimido en cáncer de pulmón, y al restaurar su expresión en la línea celular A549 de cáncer de pulmón inhibe el crecimiento celular (Takamizawa *et. al.*, 2004).

### 1.5.3 Funciones de los microRNAs en cáncer de mama.

Existen diferentes estudios donde identificaron microRNAs desregulados entre el tumor y el tejido mamario normal sugiriendo su uso potencial como clasificadores del cáncer de mama y para la generación de herramientas pronosticas. En un estudio donde se analizaron 76 tumores de mama y 34 tejidos normales, se identificaron 29 microRNAs, expresados diferencialmente en el tejido tumoral en

comparación con el normal. Además, reportaron la expresión de microRNAs correlacionados con características patológicas tales como la expresión del receptor de estrógenos y progesterona (miR-30), el estadio tumoral (miR-213 y miR-203) y la expresión diferencial de varias isoformas de let-7 que se asociaron con la expresión del receptor de progesterona (let-7c) y metástasis en los ganglios linfáticos (let-7f-1, let-7a-3, let-7a-2) (Li *et. al.*, 2015). (Figura 6).



**Figura 6. Papel de los microRNAs en cáncer.** Los microRNAs suprimen la expresión de sus genes blancos. Un microRNA oncogénico, denominado oncomiR, puede reprimir la traducción de un gen supresor de tumores, estimulando la tumorigénesis y conduciendo a la formación de tumores. Por el contrario, un microRNA supresor de tumores es capaz de inhibir la expresión de oncogenes, bloqueando el proceso de tumorigénesis y consecuentemente el desarrollo de

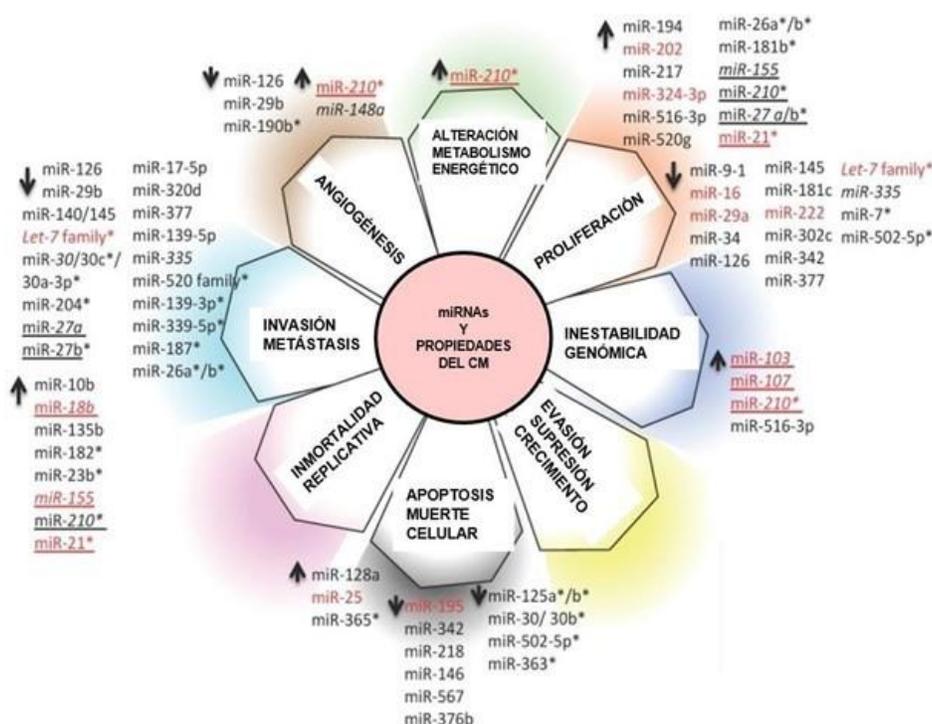


cáncer.

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

#### 1.5.4 Papel de los microRNAs en tumorigénesis de mama

Los microRNAs juegan un papel importante en la fisiopatología del cáncer de mama. Diversos estudios han implicado a los microRNAs en la regulación del inicio, la invasión, la metástasis y la resistencia a quimioterapia en cáncer de mama. En la figura 07 se muestran los microRNAs principales implicados en la regulación de las características intrínsecas de las células tumorales de mama (McGuire *et. al.*, 2015)



**Figura 7. Principales microRNAs implicados en la regulación de las características intrínsecas del cáncer de mama.** Los microRNAs señalados en cursiva tienen función diagnóstica y pronóstica en cáncer de mama. Los microRNAs señalados con un asterisco son microRNAs predictores de respuesta a terapias en cáncer de mama. Los microRNAs subrayados representan microRNAs con múltiples funciones diagnósticas, pronósticas y predictivas. En color negro se presentan los microRNAs no circulantes y, en color rojo, los microRNAs circulantes. Las flechas indican la sobreexpresión o represión de los microRNAs en cáncer de mama (Tomado y modificado de Bertoli *et. al.*, 2015).

Por otro lado, ya es conocido que las CSCs son la subpoblación de células del tumor responsables de la iniciación tumoral, del crecimiento tumoral y de la resistencia a la quimioterapia y radioterapia, favoreciendo la progresión tumoral y la recaída de la enfermedad. Se ha demostrado que el perfil de expresión de microRNAs de CSCs es notablemente diferente de células no CSC, y que algunos microRNAs, entre los cuales destaca la familia let-7, regulan las propiedades de auto renovación y

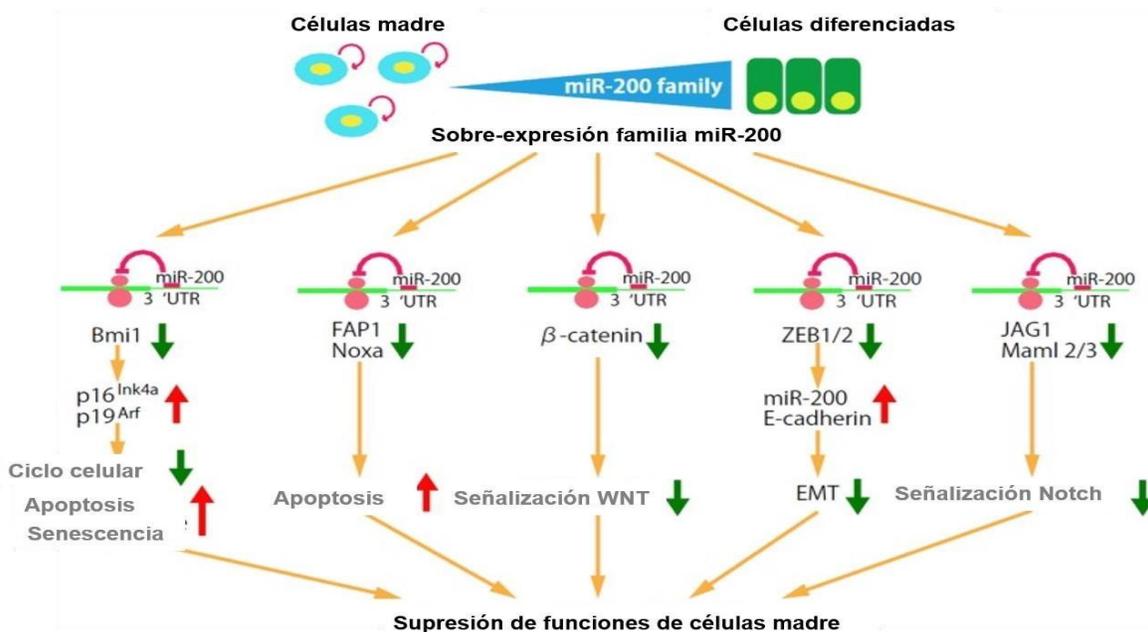


diferenciación de las CSCs (Brabletz et al, 2012).

La familia let-7 desempeña una función supresora de tumores y está reprimida en muchos tipos de tumores incluidos el cáncer de mama. En el tejido normal let-7 desempeña un papel regulando la auto-renovación y actuando como un microRNA pro-diferenciación, mientras que en el cáncer de mama su expresión es reprimida por la vía Wnt /  $\beta$ -catenina, entre las cuales destacan H-RAS y HMGA2, conduciendo a la supresión de la diferenciación y a un aumento de la población de CSCs (Kao *et. al.*, 2016; Yang *et. al.*, 2011).

Además, otros clusters de microRNAs desregulados en CSC de mama, son los clusters regulados negativamente, miR-200 que se expresan como dos transcritos de pri- microRNA policistrónicos separados (miR-200b- 200a-429 y miR-200c-141) y el *cluster* miR-183 (miR-183-96-182), y el cluster regulado positivamente miR-221-222 (Garofalo *et. al.*, 2012). Se ha demostrado que miR-200 tiene un efecto supresor sobre la transformación celular, la proliferación celular, la migración, la invasión y la metástasis (Sulaiman *et. al.*, 2016, p. 200).

El factor esencial para capacidad de auto renovación, Bmi1 es regulado por miR-200, de forma que la represión de la expresión miR-200 en CSCs, conduce al aumento de la expresión de Bim1 que a su vez suprime los genes codificados en el locus Ink4a, p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup> encargados de regular la senescencia, el ciclo celular y la apoptosis (Laberge *et. al.*, 2015) (Figura 08).



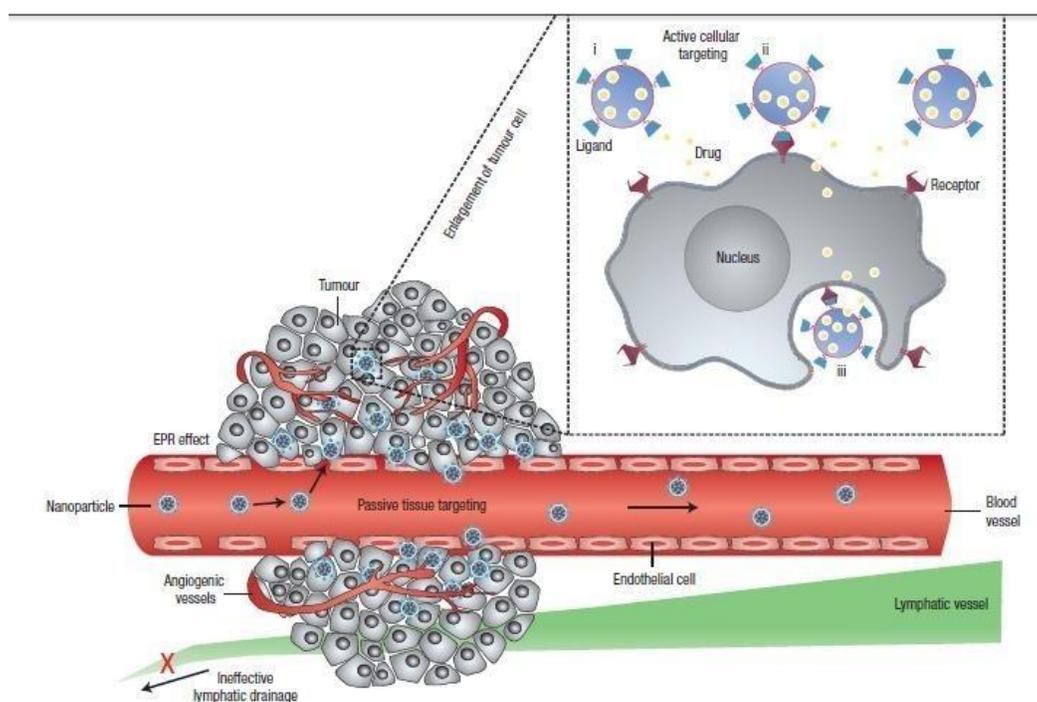
**Figura 8.** Regulación de los genes y las vías de señalización por la familia del miR-200 involucrada en el mantenimiento de las características de células troncales (Tomada y modificada de Shimono y colaboradores., 2015).

De forma importante, estudios recientes han destacado un vínculo entre el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y la formación de CSCs (Brabletz, 2012). Durante el proceso de EMT las células epiteliales tumorales adquieren rasgos mesenquimales y habilidades invasivas y metastásicas. De hecho, la EMT se asocia con la pérdida de las uniones intercelulares y la polaridad epitelial y el aumento de la motilidad celular, además de ser relevante para la adquisición y el mantenimiento de las características de células troncales. Entre los microRNAs que bloquean el proceso de EMT y que actúan como supresores de metástasis se encuentran miR-205, familia miR-200, miR-146a/b, miR-206, miR-335, miR-31, miR-145, miR-7, miR-661, miR-126, miR-15b, miR-16, miR-20a/b y miR-29b (Serpico *et. al.*, 2014).

### 1.6 Nanotecnología en terapia oncológica

La nanotecnología es un campo de investigación multi y transdisciplinar que involucra a la biología, la química, la física, la ingeniería y la medicina. Los sistemas

de liberación nanométricos aplicados a la liberación de fármacos se han convertido en un área de extensa investigación, fundamentalmente porque permiten el mejoramiento de la biodisponibilidad de compuestos pobremente solubles en agua y la liberación vectorizada de los principios activos a varios tejidos y órganos. También se definen como partículas coloidales submicrónicas que oscilan entre 10 y 1000 nm. La Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos, sin embargo, define a la nanotecnología por su escala de trabajo entre 1 y 100 nm o ligeramente superior (Bosselmann y Williams, 2012). En la figura 9 se muestra una representación de los mecanismos de liberación a partir de nano vehículos.



**Figura 9. Representación esquemática de diferentes mecanismos por los cuales los nanovehículos pueden liberar drogas a los tumores.** Las nanopartículas poliméricas se muestran como nanotransportadores representativos (círculos). La vectorización pasiva, donde no hay ningún mecanismo específico que condicione la distribución de las NP, se basa en las propiedades intrínsecas de las NP y se consigue por extravasación de las nanopartículas. La vectorización activa (recuadro) puede ser constituida funcionalizando la superficie de las nanopartículas



con ligandos que promueven el reconocimiento y unión específico a la célula. (Tomado y modificado de Peer et al 2007).

#### 1.6.1 Transportadores lipídicos

El desarrollo científico y tecnológico tendiente a aumentar la efectividad de la nano terapéutica, ha conducido a nuevos diseños de los sistemas de administración de sustancias activas, con el propósito de depositar de forma efectiva y selectiva, las sustancias terapéuticas en concentraciones que maximicen su efectividad. Esto debe lograrse restringiendo el acceso de estas sustancias a las áreas no seleccionadas para su efecto, por lo que se considera que el transportador será uno de los factores más importantes para tener éxito en el traslado y localización (Khoder *et. al.*, 2016).

Existen un gran número de sistemas de suministro de sustancias activas, dentro de los que se encuentran las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), desarrolladas a principios de 1990, como una alternativa a otros sistemas de fármacos como las emulsiones, liposomas y a las nanopartículas poliméricas. En su fabricación se conjuntan las ventajas de las partículas sólidas, con las de las emulsiones y las de los liposomas. Las SLN se han generado simplemente intercambiando el lípido líquido de las emulsiones, por un lípido sólido, lo que significa que son sólidas a la temperatura ambiente y también a la temperatura corporal. Son de forma esférica, con un diámetro entre 50 nm y 500 nm y al estar dispersas en un medio acuoso, forman un sistema coloidal (con una proporción de agua del 70-95%) que ha permitido el suministro de medicamentos de manera controlada y localizada (Sindhvani *et. al.*, 2020; Zhao *et. al.*, 2018).

Las ventajas de la utilización de las nanopartículas lipídicas como transportadores incluyen: la utilización de lípidos fisiológicos en su formulación, evitar el uso de solventes orgánicos en su preparación y la posibilidad de ser utilizadas en un espectro amplio para la administración sobre la piel, por vía oral y por vía intravenosa, mediante los medicamentos tradicionales como son las pomadas,



tabletas, cápsulas, suspensiones o soluciones inyectables. Las nanopartículas lipídicas protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, presentan una mejor biodisponibilidad y podrían ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua, al incorporarlas en la matriz lipídica sólida. Entre sus desventajas estarían el posible crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, la tendencia hacia una gelificación impredecible, la existencia de cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de fármacos limitada por la estructura cristalina del lípido sólido (Ashikbayeva *et. al.*, 2019; Qi *et. al.*, 2017).

#### 1.6.2 Usos y aplicaciones en cáncer

El conocimiento actual sobre los procesos biológicos nos permite un mejor entendimiento de los mismos; así como la oportunidad de poder diseñar tratamientos más efectivos, como los que ofrece la nanotecnología. El diseño de materiales altamente selectivos, representan actualmente la oportunidad de mayor potencial a mediano y largo plazo, para técnicas de diagnóstico temprano y tratamientos selectivos que impacten en la supervivencia y la calidad de la misma, en pacientes con cáncer de mama. El uso de esta nanotecnología en cáncer abre un gran campo al diagnóstico precoz y por tanto a la mejoría del pronóstico. Las técnicas de imagen que se utilizan son las mismas que ya existen (resonancia magnética, ultrasonidos, etc.). Pero los compuestos clásicos que se utilizan son poco específicos, tóxicos, inestables y, por lo tanto, rápidamente eliminados. Se pueden utilizar para detectar numerosos marcadores y también como agentes de contraste. Sin embargo, suelen contener materiales tóxicos en su núcleo, por lo tanto, su uso clínico se ve muy limitado.

Todos estos sistemas, además pueden ser modificados en su superficie añadiéndoles anticuerpos monoclonales o bien aptámeros, de tal manera que se dirijan de forma específica a su lugar de acción. Además, con estos sistemas se puede cuantificar la cantidad de marcadores que hay en el tejido tumoral. Esto hace

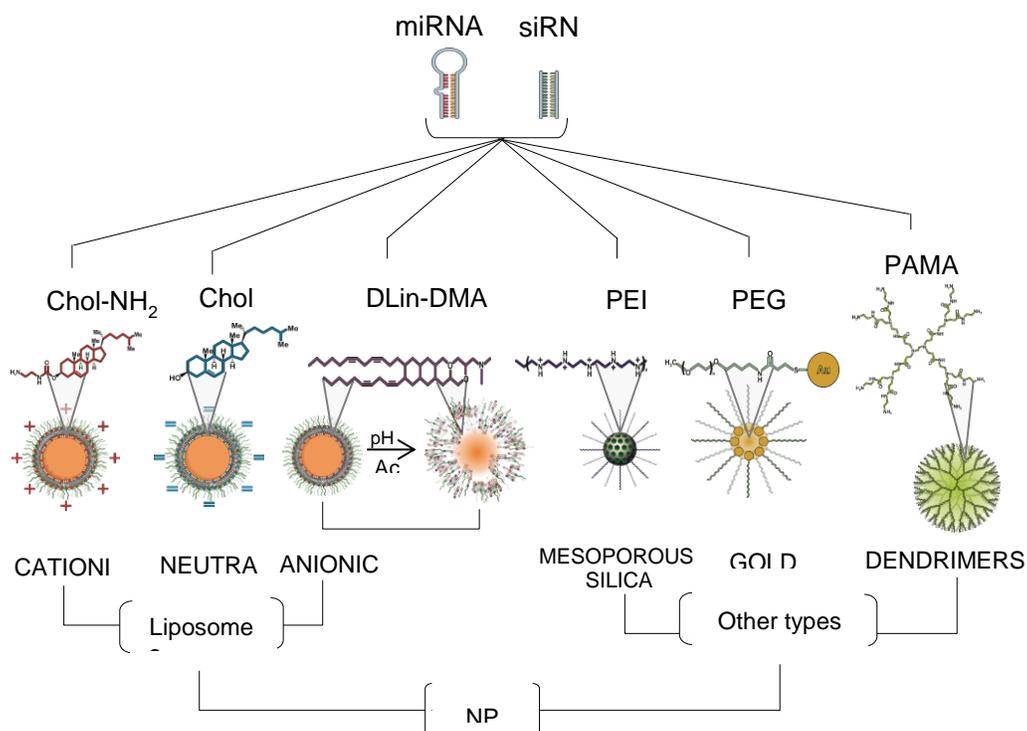


que el tratamiento se pueda personalizar y dirigir de acuerdo al tumor existente. Otra de las opciones que ofrecen los nanosistemas es la posibilidad de monitorizar el tratamiento viendo el estado antes y después utilizando alguno de estos nanosistemas (Kango *et. al.*, 2013). También se ha descrito que la incorporación de nano partículas de oro incrementa la rugosidad de la membrana de las células de cáncer de mama informaron que los tratamientos contra esa enfermedad son cada vez más específicos y eficaces gracias al uso de herramientas innovadoras (D'Agata *et. al.*, 2017).

### 1.6.3 Acarreadores lipídicos nanoestructurados de microRNAs no codificantes

Esta alternativa terapéutica mostró ya en etapas tempranas ser un gran avance en el campo de la administración de ácidos nucleicos. Comparada con otras del estilo como plásmidos recombinantes y oligonucleótidos. Actualmente, se la considera como una de las estrategias más potentes para el tratamiento de los desórdenes genéticos causados tanto por un único defecto genético como por una combinación de defectos genéticos múltiples.

Estas moléculas constituyen una importante promesa para los tratamientos de patologías asociadas con alteraciones por exceso en la síntesis de proteínas. Las enfermedades consideradas actualmente huérfanas de terapéutica y las crónicas son también objetivos interesantes para esta clase de terapia. El campo también ha experimentado avances y obstáculos para la liberación del material similares a los que se vieron con el desarrollo de productos comerciales de otras terapias basadas en ácidos nucleicos. Esto es debido a que ofrecen ventajas significativas en términos de control, consistencia y superioridad durante el diseño, junto con una mejor manufacturabilidad, actividad biológica, inmunogenicidad y seguridad. (Lungu *et. al.*, 2019).



**Figura 10. Representación gráfica de tipos comunes de NP compuestas por liposomas y otros tipos tales como sílice mesoporosa, oro y dendrímeros para la liberación de los nanomicroRNAs (siRNA o microRNA) en células tumorales.** Los tres tipos de liposomas conocidos como catiónicos, neutros y aniónicos sensibles al pH, sintetizados con Chol-NH<sub>2</sub>, Chol y DLin-DMA, respectivamente, se indican en el lado izquierdo. En el lado derecho están la sílice mesoporosa, el oro y los NP basados en dendrímeros unidos covalentemente o no covalentemente a PEI, PEG y PAMAM, respectivamente. RNAip, RNA interferente pequeño; miRNA, microRNA; Chol, colesterol; DLin-DMA, N, N-Dimetilacetamida; PAMAM, poliamido amina; PEG, polietilenglicol; PEI, polietilenimina; NP, nanopartículas.



## 2.- ANTECEDENTES PARTICULARES

### 2.1 Células madre de cáncer de mama

Como ya se mencionó con anterioridad el cáncer de mama triple negativo constituye del 10% al 20% de todos los casos reportados, además algunos estudios han determinado que las células madre de cáncer (CSCs del inglés cancer stem cells) o células troncales tumorales (CTT) pueden relacionarse con el grado de cáncer de mama, es importante señalar que los marcadores CD44+, CD24- y ALDH+ suelen presentarse como marcadores de superficie en las CSCs de cáncer de mama y pueden influenciar la metástasis y la resistencia a los fármacos (Chu *et. al.*, 2018). En conjunto a estos resultados se ha determinado que las CSC tienen la capacidad de iniciar la tumorigénesis *in vivo* e inclusive se ha observado que en pacientes con cáncer de mama que reciben quimioterapia la subpoblación de CSCs aumenta por lo que se ha sugerido que la quimio resistencia de las CSCs puede estar involucrada con la metástasis (Kong *et. al.*, 2018).

En base a estas observaciones las CSCs están propuestas como un potente blanco para tratamiento y con ello mejorar la prognosis del paciente, si bien hasta ahora la terapéutica implementada contra el cáncer de mama se basa en radioterapia, quimioterapia, en el cáncer de mama triple negativo la quimioterapia es la única opción. En un reporte reciente Lanlan Gao y cols. determinaron que la desregulación de algunos microRNAs como el miR-873 en CSCs condujeron a la resistencia a la quimioterapia. (Gao *et. al.*, 2019).

Otro ejemplo que demuestra la importancia del estudio de las CSCs es el estudio realizado por You Wu y cols. quienes observaron que la expresión del miR-29a está influenciada por el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), además demostraron que al ser el miR-29a un microRNA pro-invasión su sobre estimulación induce a las CSCs a la migración e invasión *in vitro* e *in vivo* conduce a la diseminación tumoral (Wu *et. al.*, 2019).



## 2.2 Funciones del microRNA-204-5p en el cáncer de mama

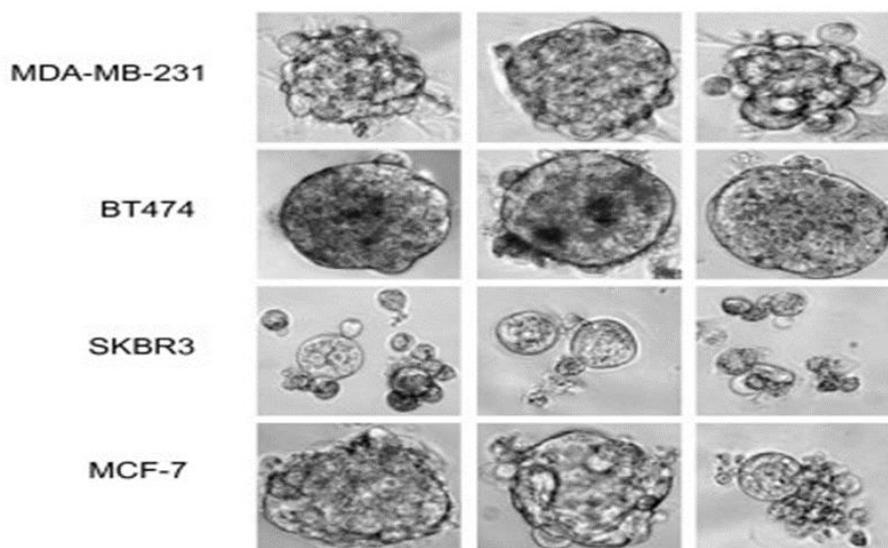
Esta reportado que en determinados tipos de cáncer como el CM la expresión del microRNA-204-5p se encuentra disminuida respecto a células sanas, por lo que se ha propuesto como un potente supresor de tumores como parte de la evidencia experimental propuesta por los múltiples grupos de trabajo internacionales Hong BS y cols. observaron que la restauración de los niveles de expresión del microRNA-204-5p en tejido de cáncer de mama condujo a una menor viabilidad celular, a la disminución en la proliferación celular así como la disminución de la capacidad migratoria de las células (Hong *et. al.*, 2019). Toda y cols. identificaron un comportamiento similar al reestablecer la expresión del microRNA-204-5p en la línea celular MCF7 de cáncer de mama. Adicionalmente ellos observaron que además de los efectos observados por Hong y cols. El restablecimiento del microRNA-204-5p en la línea celular MCF7 indujo la apoptosis celular (Toda *et. al.*, 2018).

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que el microRNA-204-5p inhibe la proliferación celular, la migración, invasión además de que se ha demostrado que puede inhibir la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*, debido a la inhibición de ANGPT1 y TGFBR2, ambos factores pro-angiogénicos implicados en la vía TGF $\beta$  (Flores-Pérez *et. al.*, 2016), Es importante señalar que en células triple negativo la restauración del microRNA-204-5p condujo a la inhibición del mimetismo vasculogénico esto por la supresión de la expresión de proteínas oncogénicas implicadas en vías de señalización tales como PI3K, AKT, TGFB, VEGF (Salinas- Vera *et. al.*, 2018). De manera interesante mediante el análisis del transcriptoma en células restauradas con el microRNA-204-5p se observó la regulación de aproximadamente 549 genes (311 sobre regulados y 238 sub regulados) (Flores-Pérez *et. al.*, 2016).

## 2.3 FORMACIÓN DE MAMOSFERAS

Una propiedad importante de las células madre del cáncer como de las células madre normales, es formar esferas o crecer en colonias en medio sin suero o en

medio de agar blando. Para mostrar la agregación y proliferación de células *made in vitro*, las células se recolectan de muestras tumorales y se suspenden a baja densidad en medio sin suero suplementado con 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 10) (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 11. 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.



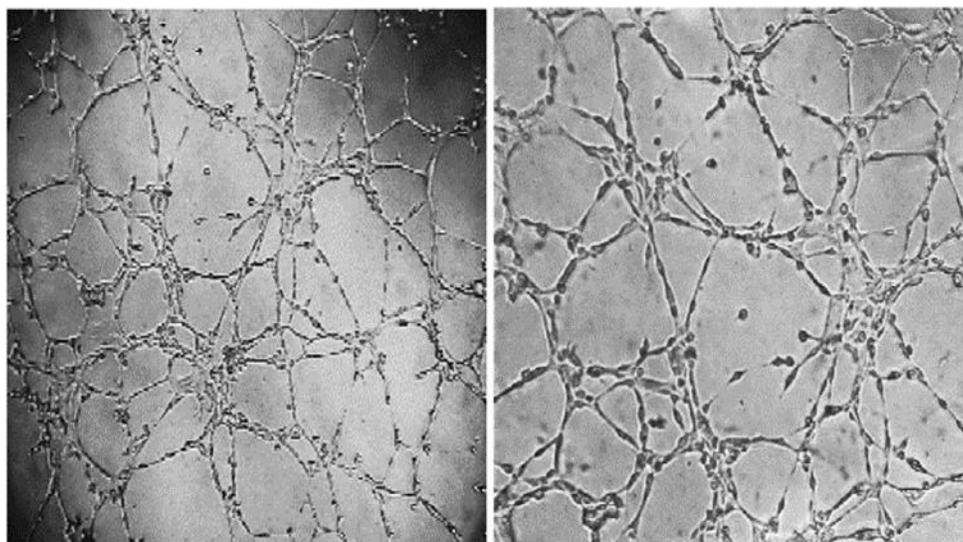
## 2.4 Mimetismo vasculogénico

El mimetismo vasculogénico es un sistema de suministro de sangre independiente de los vasos endoteliales en las células tumorales de diferentes orígenes (Delgado *et. al.*, 2017). El tumor requiere del suministro de sangre para su crecimiento, supervivencia y metástasis, estos mecanismos se han centrado en procesos dependientes de la angiogénesis y mimetismo vasculogénico que, a diferencia de la angiogénesis tumoral clásica, el mimetismo vasculogénico proporciona un suministro de sangre para las células tumorales independiente de células endoteliales (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 i) los vasos sanguíneos dependientes de células endoteliales (angiogénesis clásica) los vasos sanguíneos mosaico y 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. El mimetismo vasculogénico está asociado a un mal pronóstico clínico debido que facilita la metástasis del tumor y la disminución en la sobrevivencia. Existen algunos factores necesarios para la formación de mimetismo vasculogénico como son la interacción de las células tumorales y su ambiente, la remodelación de la matriz extracelular y el microambiente tumoral, siendo la hipoxia el fenómeno más importante debido al gran consumo de energía y 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 descritas son: (1) Positivo para la tinción de PAS y negativo para CD31, (2) células tumorales altamente invasivas, (3) expresión de células multipotenciales, (4) remodelación de la matriz extracelular y (5) la conexión de las estructuras del mimetismo vascular con la microcirculación del tumor (Qiao *et. al.*, 2015; Zhang *et. al.*, 2007). 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 (MMP), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), quinasa de adhesión focal (FAK) y el factor inducible por hipoxia (HIF) (Lu *et. al.*, 2013, Wang *et. al.*, 2017). Además, los RNA no codificantes, como los lncRNA y los microRNA, desempeñan funciones críticas en la formación de VM en tumores malignos (Peng *et. al.*, 2018, Langer *et. al.*, 2018). El miR-200a inhibió 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 de migración, proliferación, invasión y remodelación de la matriz extracelular están implicadas en la formación del mimetismo vasculogénico tales como las vías de señalización PI3k-AKT, MAPK, FAK (Flores *et. al.*, 2003). En estudios recientes por Salinas y colaboradores demostraron que el microRNA-204-5p inhibe la formación de MV en células de cáncer de mama a través de intermediarios de estas vías (Salinas *et. al.*, 2018).



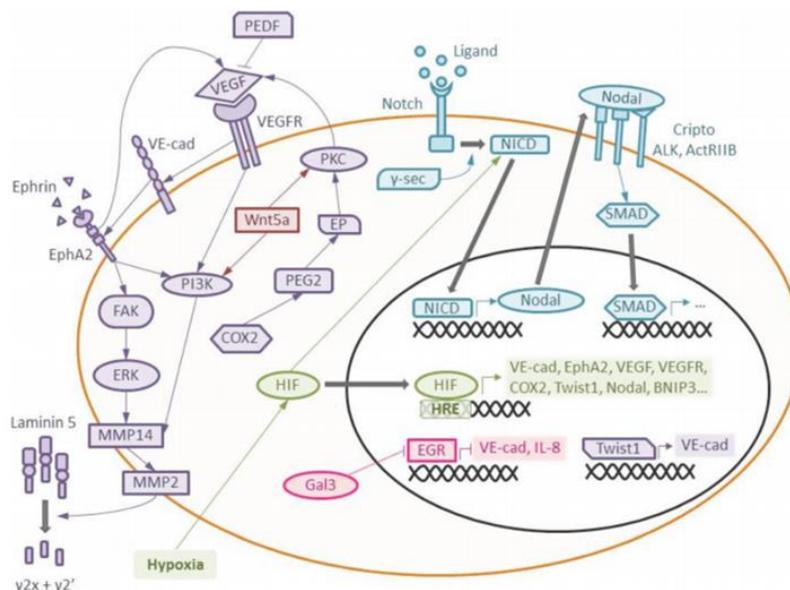
**Figura 12. Mimetismo vasculogénico.** Estructuras tipo capilar formadas por células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia en un cultivo *in vitro*.

## 2.5 Vías del mimetismo vasculogénico

El patrón distintivo de las redes del mimetismo vasculogénico parece recapitular los



patrones de vasculogénesis embrionaria y esta semejanza sugiere que las células tumorales agresivas se convierten en un fenotipo indiferenciado de tipo embrionario (Delgado *et. al.*, 2017). VE-cadherina, Notch y el factor inducible hipoxia 1- $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) están involucradas en las tres vías principales que controlan VM: vascular, hipoxia y vías de señalización embrionarias/células madre (Paulis *et. al.*, 2010, Kirschmann *et. al.*, 2012). En la señalización vascular, VE-cadherina, EphA2 y VEGF conducen a la escisión de laminina 5 y liberación de fragmentos promigratorios  $\gamma 2x$  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 contribuye a todas las vías anteriores al mediar la expresión de algunas moléculas de señalización cruciales. Finalmente, las proteínas Wnt pueden promover el mimetismo vasculogénico a través de la activación de la señalización de PKC y PI3K, aunque podrían desempeñar un papel en la supresión tumoral (Delgado *et. al.*, 2017).



**Figura 13. Principales vías de señalización involucradas en el mimetismo vasculogénico** Representación de las vías de señalización vascular en color púrpura, la señalización de células madre de color azul y la vía de hipoxia en verde.



## 2.6 Acarreadores lipídicos

Dentro de las nanopartículas con potenciales para el tratamiento para diversas enfermedades los acarreadores lipídicos han mostrado una gran eficiencia al emplearse como administradores de ácidos nucleicos en múltiples enfermedades (Hong *et. al.*, 2019) (Patil *et. al.*, 2005). El estudio realizado por Shu- Ting y cols en cáncer colorrectal demostró la efectividad de la formulación al someterse a los cambios ácidos de pH típicos de tumores sólidos (Chen *et. al.*, 2017; Hong *et. al.*, 2019). Propiamente en CM Tao Sun y cols. demostraron que acomplejar determinados fármacos afectó diferentes vías como NRF-2-KEAP1, NK-KB y mTOR/MFA-1/PTEN en comparación a aplicar el fármaco solamente (Sun *et. al.*, 2019). Estas moléculas constituyen un importante potencial para las enfermedades que aún no tienen un tratamiento bien establecido, además se ha demostrado que la aplicación de la terapia basándose en las nanopartículas resulta ser beneficiosa para un buen resultado en el tratamiento, a pesar de que su aplicación aún no se ha descrito en humanos los estudios *in vitro* han demostrado que tiene un alto potencial para comenzar con estudios *in vivo* (Navya *et. al.*, 2019).



### **3.- JUSTIFICACIÓN**

La OMS promueve el control del cáncer de mama en el marco de los programas nacionales de lucha contra el cáncer, integrándolo en la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles. A partir del año 2006, el cáncer de mama representa la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres en México. La terapia contra el cáncer de mama se encuentra mayoritariamente limitada a la radioterapia y quimioterapia, técnicas altamente invasivas e incómodas para el paciente y que en muchos casos conducen a la alteración de su salud integral.

El microRNA-204-5p es un supresor de tumores que inhibe los hallmarks del cáncer, por lo que su estudio podría representar una nueva alternativa terapéutica en cáncer de mama. El conocimiento actual sobre los procesos biológicos nos permite un mejor entendimiento de estos. El uso de nanomateriales altamente selectivos, como acarreadores lipídicos nanoestructurados.



#### **4.- HIPÓTESIS**

Si el microRNA-204-5p regula negativamente genes involucrados en el mantenimiento de las propiedades troncales en células de cáncer de mama, entonces el tratamiento con una formulación que contenga microRNA-204-5p acoplado a un acarreador lipídico nanoestructurado inhibirá el fenotipo troncal y los hallmarks del cáncer.



## 5.- OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

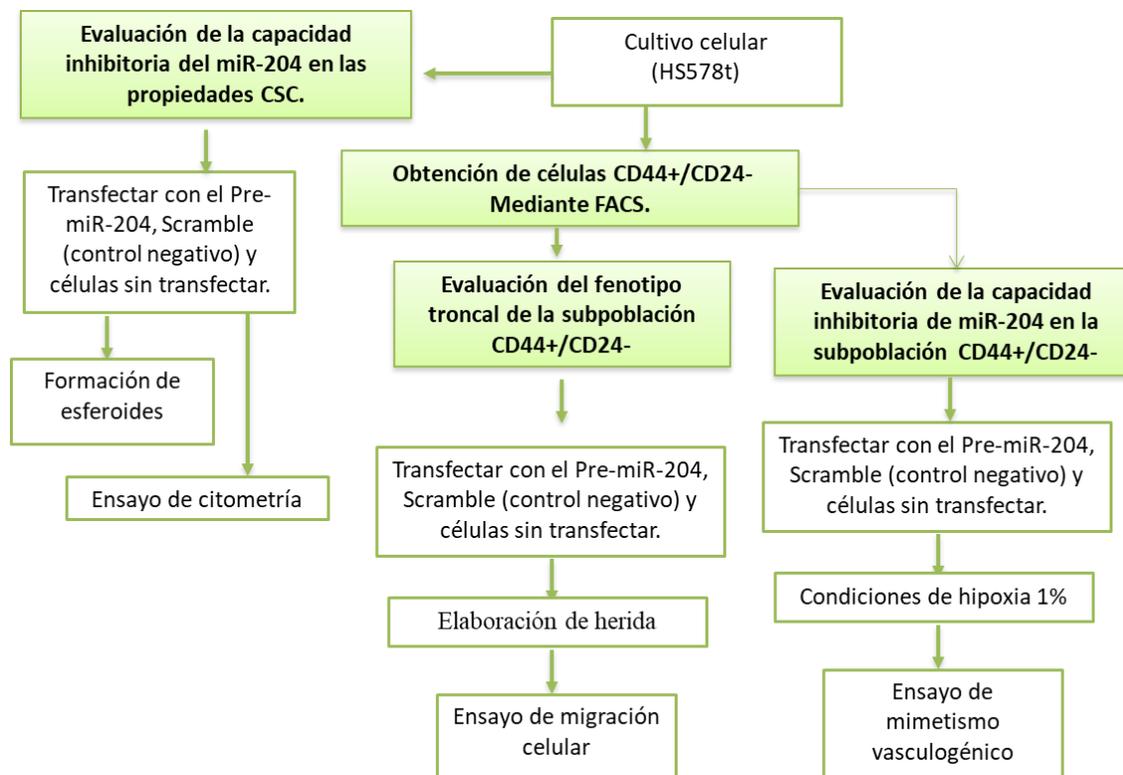
Evaluar el efecto del microRNA-204-5p acoplado a un acarreador lipídico nano estructurado en las propiedades troncales en cáncer de mama.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Selección del nanoacarreador lipídico nanoestructurado.
2. Aislar la subpoblación de células troncales CD44+/CD24- a partir de la línea celular metastásica HS578t de cáncer de mama (mediante FACS).
3. Evaluar el efecto del microRNA-204-5p en las propiedades troncales, porcentaje de células CD44+/CD24- y formación de mamosferas en la línea celular HS578t.
4. Determinar la capacidad del microRNA-204-5p para inhibir el fenotipo troncal de las CSC (CD44+/CD24-) mediante el análisis de los efectos inhibitorios en el mimetismo vasculogénico y la migración celular



## 6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## 7.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Cultivo de la línea celular HS578t.

La línea celular HS578t (ATCC® HTB-126™) proveniente de carcinoma de mama fueron obtenidas de la American Type Culture Collection. Estas se mantuvieron en cultivos axénicos en medios específicos para cada una. Para ello la línea celular HS578T se mantuvo en cajas de 25 cm<sup>2</sup> en medio Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium (DMEM, Gibco) El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina (50 U/mL; Invitrogen). Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta obtener el 80% de confluencia.

### 7.2 Transfección transitoria del microRNA-204-5p

Para llevar a cabo el análisis del efecto de la restauración del microRNA-204-5p en células de carcinoma de mama se transfectaron  $5 \times 10^5$  células (HS578t) las cuales se sembraron en placas de 6 pozos (Corning) y se cultivaron en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 h para permitir la adhesión de por lo menos el 90% de las células. Para llevar a cabo la transfección se realizaron dos mezclas independientes, la primera de ellas contenía 300 µl de Optimem (Gibco) y 15 µl del precursor-microRNA-204-5p(5'GGCTACAGTCSCTCSCCATGTGACTCGTGGACTTCCCT TTGTCATCCTATGCCTGAGAATATATGAAGGAGGCTGGGAAGGCAAAGGGACGTTCAATTGTCATCACTGGC-3') o el control de transfección Scramble (pre-negative control, AM17110; 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3') (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Para la mezcla se adicionaron 15 µl de Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y 300 µl de optimem (Gibco) ambos tubos se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se mezclaron en un tubo de polipropileno adecuado y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Al concluir el periodo de incubación, se retiró el medio de las células fijas y se adicionó la mezcla correspondiente aforándose a un volumen final de 2.5 ml. La eficiencia de la transfección se corroboró mediante el análisis de la expresión del microRNA-204-5p mediante qRT-PCR a las 48 h post-transfección.



### 7.3 Aislamiento de la población de células troncales tumorales (CSC) mediante citometría de flujo (FACS).

Para aislar la subpoblación CSC con inmunofenotipo CD44+/CD24- mediante citometría de flujo se implementaron los receptores de membrana reportados con anterioridad para cada línea celular. Para ello la línea celular HS578t se emplearon los marcadores correspondientes al factor de crecimiento transformante  $\beta 2$  (TGF- $\beta 2$ ) y el Grupo A1 de Alta Movilidad (HMG- A1). Para la línea HS578t se aísla mediante los marcadores CD44+/CD24, SOX2 y ALDH. Ambas líneas fueron cultivadas como se mencionó con anterioridad, 250, 000 células fueron sembradas en placas de 6 pozos (Corning) hasta obtener el 80% de confluencia estas fueron transfectadas como se describió con anterioridad y al concluir las 48 h post-transfección, las células fueron lavadas con PBS 1X pH 7.4 suficiente y se despegaron con PBS-EDTA y tripsina, una vez despagadas se tiñeron con azul tripano y se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer. Una vez determinada la población celular se realizó el marcaje ( $1 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  células) con el anticuerpo específico  $\alpha$ -CD44,  $\alpha$ -CD24 y  $\alpha$ -CD24/CD44 en 100  $\mu\text{L}$  de medio. Las muestras fueron inyectadas en un citómetro de flujo FACS Diva de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como control el ensayo se contó con  $1 \times 10^6$  células sin marcaje. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de citometría de flujo-Centro de Instrumentos de la Coordinación de Investigación en Salud. Hospital de Especialidades CMN "Siglo XXI", IMSS.

### 7.4 Extracción de RNA total

Una vez pasado el tiempo de transfección se extrajo el RNA total de cada condición mediante TRIzol Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello se retiró el medio de las  $5 \times 10^5$  células transfectadas y estas fueron resuspendidas y homogenizadas en 1mL de TRIzol Reagent (Invitrogen), una vez homogenizadas adecuadamente se transfirieron a un tubo de 1.5 mL de polipropileno estéril y se procesaron inmediatamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente la mezcla de TRIzol Reagent (Invitrogen) se incubó



durante 15 min a temperatura ambiente, adicionando 200  $\mu$ l de cloroformo (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol Reagent (Invitrogen) empleado, la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Al concluir la centrifugación se transfirió la fase acuosa (superior) la cual contiene el RNA se adicionó gota a gota en un tubo de polipropileno estéril que contenía 500  $\mu$ l de isopropanol absoluto de grado de biología molecular (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol Reagent (Invitrogen). La muestra se mantuvo en este punto durante 72 h a -20°C. Al concluir el proceso de precipitación el RNA se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Al concluir la centrifugación se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75% de grado de biología molecular (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol Reagent (Invitrogen). Al concluir el lavado se centrifugó nuevamente la mezcla a 7500 RCF durante 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó durante 10 min sobre papel absorbente. La pastilla de RNA fue resuspendida con 25-100  $\mu$ l de agua DEPC precalentada a 65°C. El RNA obtenido se cuantificó mediante el NanoDrop Lite (Thermo Scientific). La integridad del RNA se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5x durante 10 min, el producto se reveló en un fotodocumentador (Bio-Rad).

#### 7.5 Evaluación de la migración celular por ensayo de la herida

Para analizar el efecto de la restauración del microRNA-204-5p en las líneas celulares de carcinoma de mama HS578t, se emplearon  $3 \times 10^5$  transfectadas con el precursor del microRNA-204-5p, Scramble (control de transfección) o sin transfección para ello se empleó el protocolo de transfección transitoria descrito con anterioridad. Al concluir las 48 h post-transfección, se trazó una herida vertical de aproximadamente 2 mm en el monocapa celular con una punta estéril desechable de 200  $\mu$ l. El análisis de la recuperación de la herida se realizó después de 12, 24, 36 y 48 h, como se ha descrito previamente. Para ello las células se fijaron con para formaldehído al 4% cuantificando el área de la herida que se recuperó. Cada análisis contó con triplicados. Los resultados se reportaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Para el análisis de los resultados se realizó una prueba de t-student



y un análisis de análisis de varianza (ANOVA) de una cola, como punto de corte se consideró que un valor de  $p \leq 0.05$  era estadísticamente significativo, cada análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 8.

#### 7.6 Formación de esferoides o mamosferas

Una vez aislada la población celular de CSCs CD44+/CD24-, se determinó la formación de esferoides en la subpoblación celular. Para ello se tripinizó los cultivos celulares (HS578t y MCF-7), una vez resuspendidas se centrifugó la población celular, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la población celular en medio de cultivo específico para cada línea celular. Posteriormente, se contarán las células en una cámara de Neubauer y una vez determinada la población celular se sembraron de 250-500 células por pozo en una caja de 24 pozos de baja adherencia (Corning), adicionando medio DMEM sin suero fetal bovino, y suplementado solamente con 20 ng/ $\mu$ L EGF (Factor de Crecimiento Epitelial), 20 ng/ $\mu$ L bFGF (Factor de crecimiento de fibroblastos básico) y 1X B-27. Las células recién sembradas se incubaron a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de 2-3 semanas evitando el movimiento constante de la placa, con cambios de medio periódico cada 72 h, evitando tomar células del sobrenadante. Para ello se posicionó la placa a 20° y se permitió la sedimentación de las células retirando así solo el medio de cultivo. Una vez concluido el periodo de incubación se cuantificaron las esferas > 50  $\mu$ M de diámetro. El cálculo de la eficiencia de formación de esferas se realizó de manera manual.

#### 7.7 Ensayo de mimetismo vasculogénico

El ensayo de mimetismo vasculogénico se realizó a través de un cultivo de células tumorales en 3D. En primer lugar, las células fueron transfectadas de acuerdo al protocolo explicado anteriormente en las condiciones de control, scramble y microRNA-204-5p incubándolas en condiciones de hipoxia a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 1% de O<sub>2</sub> por 48 h. Transcurridas las 48 h se despegaron las células con PBS-EDTA y tripsina. Se colocaron 50  $\mu$ L de matrigel geltrex preparada (900  $\mu$ L + 100  $\mu$ L de PBS) por pozo en una placa de 96 pozos y se incubó por 1 h a 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, 6, 9 y 12 h. Posterior a esto se realizó la cuantificación de nodos y capilares en cada una de las h evaluadas y se realizó un análisis estadístico.

#### 7.8 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Para el análisis de los resultados se realizó una prueba de t-student y un análisis de análisis de varianza (ANOVA) de una cola, como punto de corte se consideró que un valor de  $p \leq 0.05$  era estadísticamente significativo, cada análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 8.



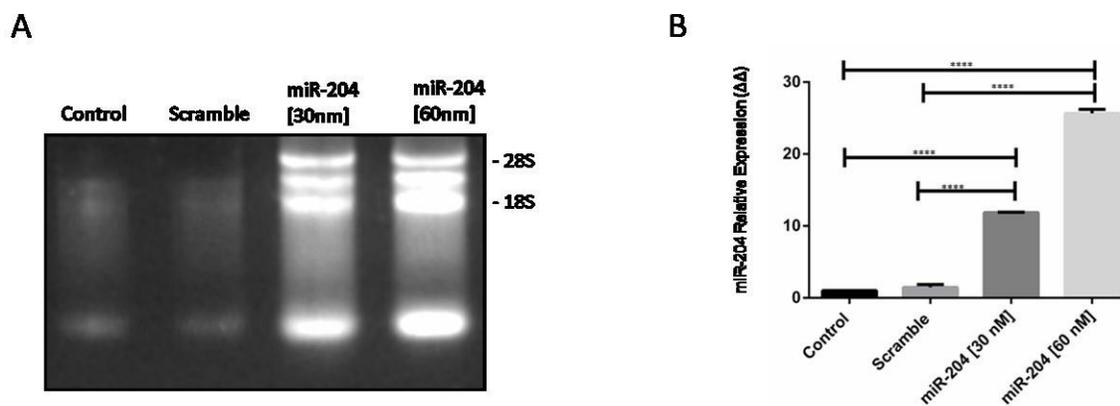
## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Análisis de la integridad del RNA total**

Para determinar la expresión del microRNA-204-5p en la línea celular HS578t, se expandió un cultivo celular de dicha línea y se transfectó con el precursor del microRNA-204-5p, con la metodología previamente descrita.

Para ello primero analizamos la integridad del RNA total obtenido de las células transfectadas con el pre-microRNA-204-5p. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1%, donde se depositó en cada carril, una muestra de RNA total control, scramble y de las células transfectadas con el precursor del microRNA-204-5p a dos distintas concentraciones de 30 y 60 nM.

En la figura 13 se observa una imagen correspondiente a la electroforesis de las muestras de RNA. Podemos observar en el gel de agarosa al 1% las subunidades ribosomales con un peso de 18s y 28s, que nos permite confirmar que las muestras de RNA total se encuentran integras y no degradadas. Con el análisis estadístico, se demuestra la restauración ectópica del microRNA-204-5p en las células transfectadas.



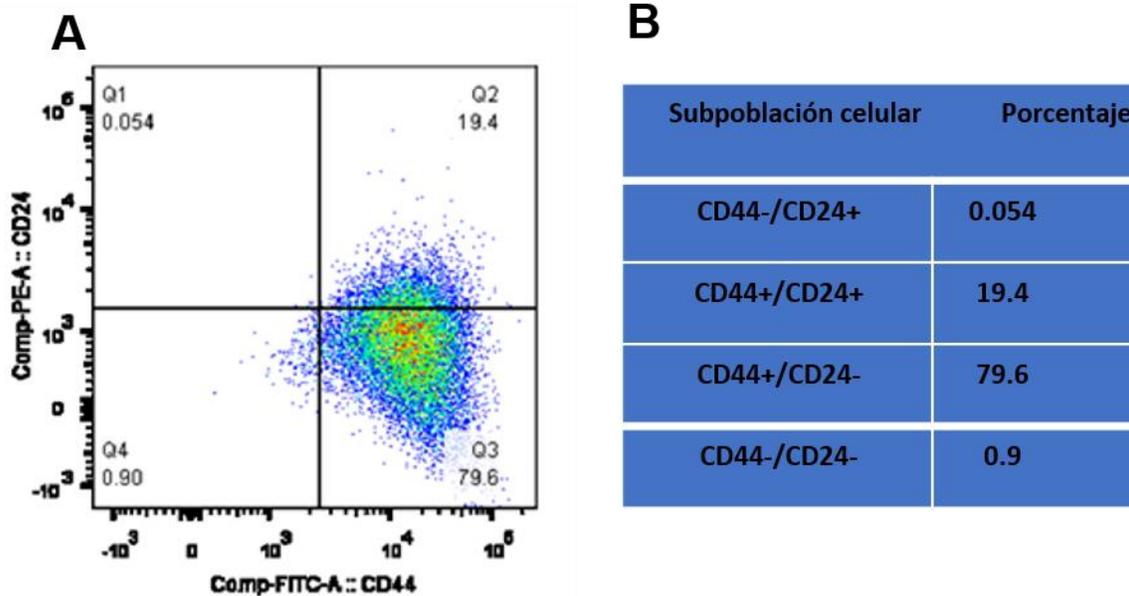
**Figura 14. Restauración ectópica del microRNA-204-5p en la línea celular HS578t.** (A) se muestra la integridad del RNA obtenido de células transfectadas con el microRNA-204-5p. Se pueden observar las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18s 28s, lo que es indicativo de su integridad. (B) Se muestra la restauración ectópica del microRNA-204-5p de las células transfectadas ( $5 \times 10^5$  células). \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



## **8.2 Identificación de células troncales tumorales**

Para identificar si el microRNA-204-5p tiene un papel funcional en las células con fenotipo troncal CD44+/CD24-, realizamos cultivos masivos de células HS578t con el propósito de aislar la cantidad suficiente de células para realizar los análisis correspondientes, sin necesidad de realizar pases con estas células. Obtuvimos esta subpoblación tiñendo con los marcadores de superficie CD24 y CD44, seleccionando aquellas células que fueron positivas para CD44 y negativas para CD24, con lo que obtuvimos un porcentaje del 79.6 % (Fig. 14A) 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 en los resultados que obtuvimos podemos apreciar los porcentajes para las 3 subpoblaciones restantes que se obtienen a partir de los dos marcadores utilizados (Fig. 14B), aunque cabe mencionar que estas células no fueron aisladas debido a que solo utilizamos las células con el fenotipo troncal.



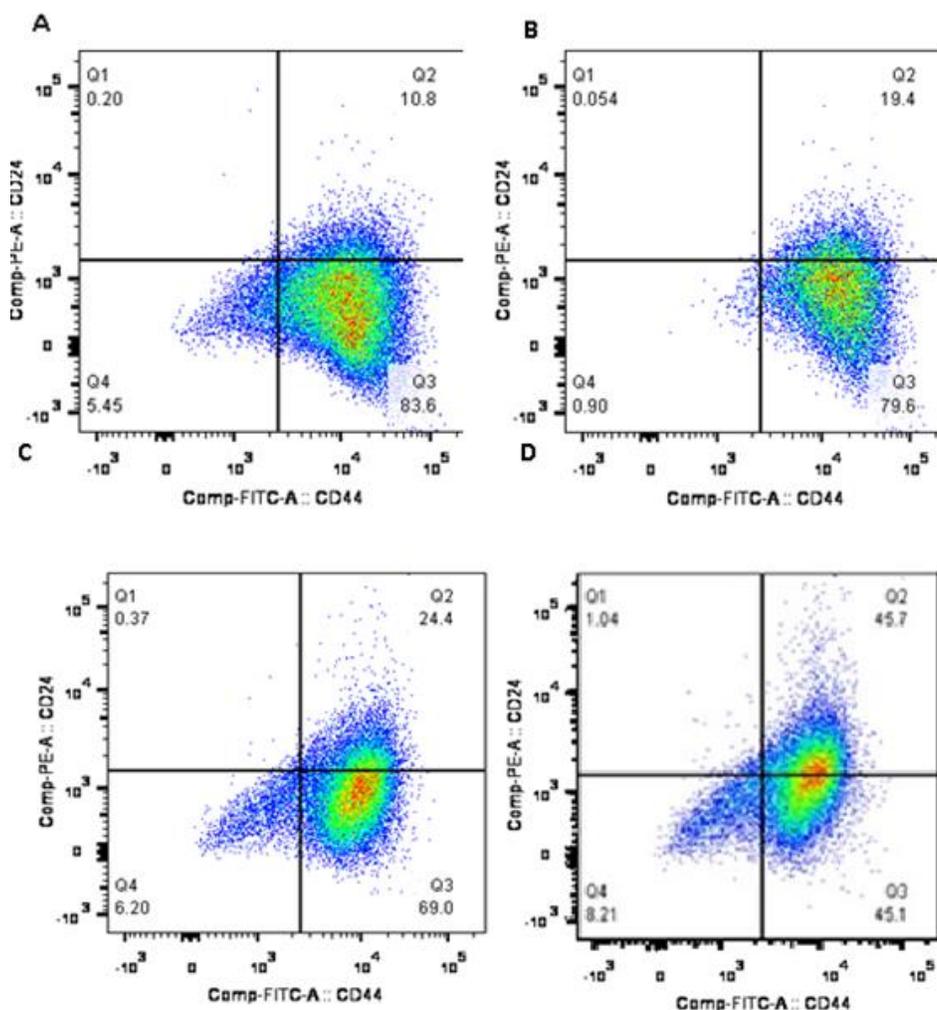
**Figura 15. Gráfico de puntos de las subpoblaciones obtenidas a partir de la línea celular HS578t. (A) Gráfica de puntos obtenida en la separación de las células con fenotipo troncal. (B) Tabla con los porcentajes de las 4 subpoblaciones posibles con los dos marcadores utilizados en las células HS578t.**



### 8.3 Separación de la subpoblación celular CD44+/CD24-

Con el propósito de identificar si el microRNA-204-5p inhibe el fenotipo troncal CD44+/CD24- en la línea celular de cáncer de mama HS578t la cual presenta un porcentaje de células con el fenotipo troncal del 80% +/- 5% de acuerdo a lo reportado en la literatura, se realizó un ensayo de citometría de flujo en el cual se marcaron las células con los anticuerpos para las proteínas de membrana CD24 y CD44 para aislar la subpoblación con el fenotipo troncal, proteínas que se utilizan en diversos artículos para obtener las madre de cáncer de mama. Se introdujeron las células HS578t a través del clitómetro para cuantificar el porcentaje de subpoblación CD44+/CD24- en las condiciones control, scramble (30 nM) y microRNA-204-5p a dos condiciones 30 nM y 60 nM.

Los resultados fueron graficados en gráficos de puntos donde obtuvimos en la condición control (Fig. 15A) 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 el resultado correspondiente a la condición de las células transfectadas con el microRNA-204-5p a 30 nM (Fig. 15C) obtuvimos un porcentaje del 69% observando una disminución significativa con un valor de  $p < 0.0001$  en comparación con el control y scramble (Fig. 15 E), de manera interesante en la condición donde las células fueron transfectadas con el microRNA-204-5p 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 lo que indica que el microRNA-204-5p en la línea celular de cáncer de mama inhibe el fenotipo troncal CD44+/ CD24-.



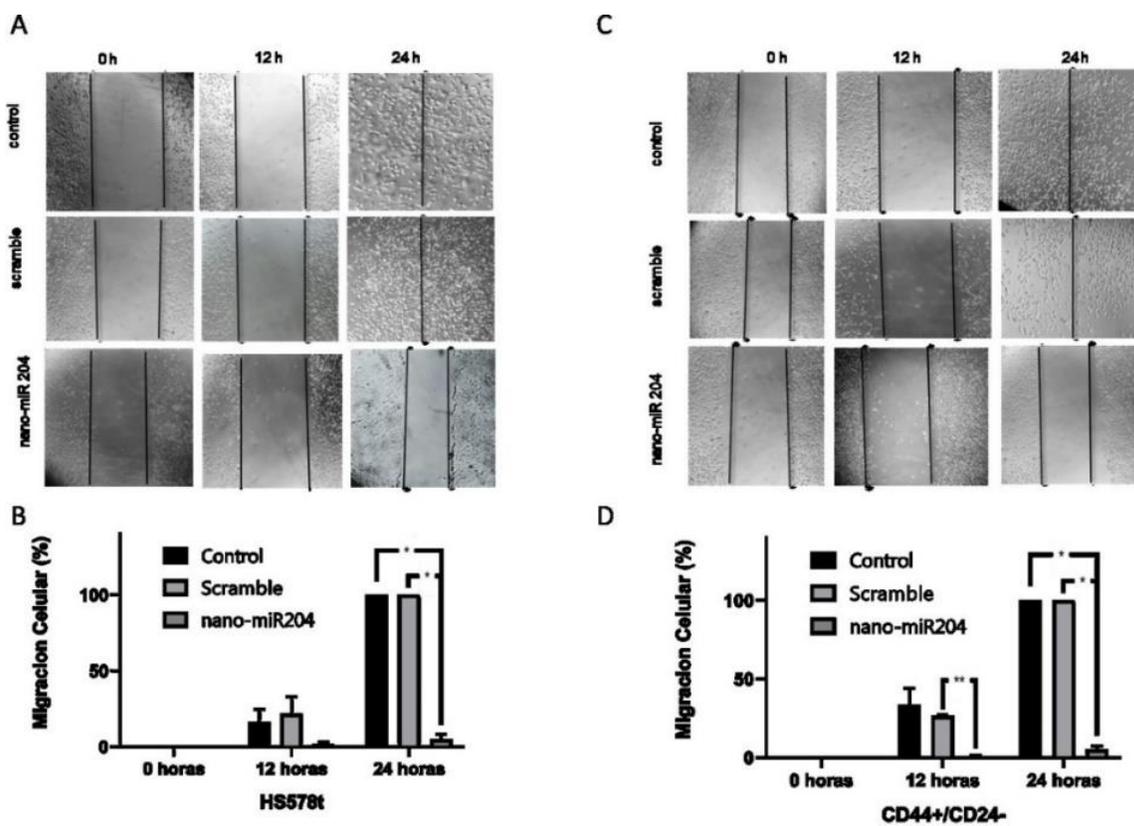
**Figura 16.- Identificación de la subpoblación celular CD44+/CD24- a través de citometría de flujo mediante anticuerpos específicos. A** Condición control (83.6 % de población subcelular CD44+/CD24-). **B** Condición scramble (79.6% de población subcelular CD44+/CD24-). **C** Condición del nano-microRNA-204-5p (69% de población subcelular CD44+/CD24-). **D**) microRNA-204-5p 60nM **E** Análisis estadístico del porcentaje de las subpoblaciones mencionadas. Se muestra una diferencia significativa entre la condición control y microRNA-204-5p (30 nM).



#### **8.4 Efecto del microRNA-204-5p en la migración celular de la subpoblación CD44+/CD24-**

Por otra parte, para determinar el efecto de la sobreexpresión del microRNA-204-5p en la migración celular de la subpoblación CD44+/CD24- se realizó un ensayo de cierre de la herida para lo cual se sembraron 250,000 células en placas de 12 pozos, dichas células fueron transfectadas con Scramble y pre microRNA-204-5p (30 nM) durante 48 hr. Después se realizó una herida en la monocapa y se obtuvieron imágenes de la monocapa a las 12 y 24 h posterior a la generación de la herida.

Los resultados obtenidos muestran que las células que fueron transfectadas con el scramble fueron capaces de migrar cerrando el área de la herida de la monocapa (Figura 16). En contraste, a las 12 h de incubación de las células troncales que fueron transfectadas con el pre-microRNA-204-5p no reducen el área de la herida a las 12 h sin embargo a las 24 h se puede observar una ligera reducción en el área de la herida además de la presencia de células que migraron hacia el centro de la herida, por otro lado las células control muestran una reducción en el área de la herida superior este resultado permite inferir que la sobreexpresión del microRNA-204-5p es capaz de inhibir la migración celular en las línea celular de cáncer de mama de fenotipo troncal CD44+/CD24-



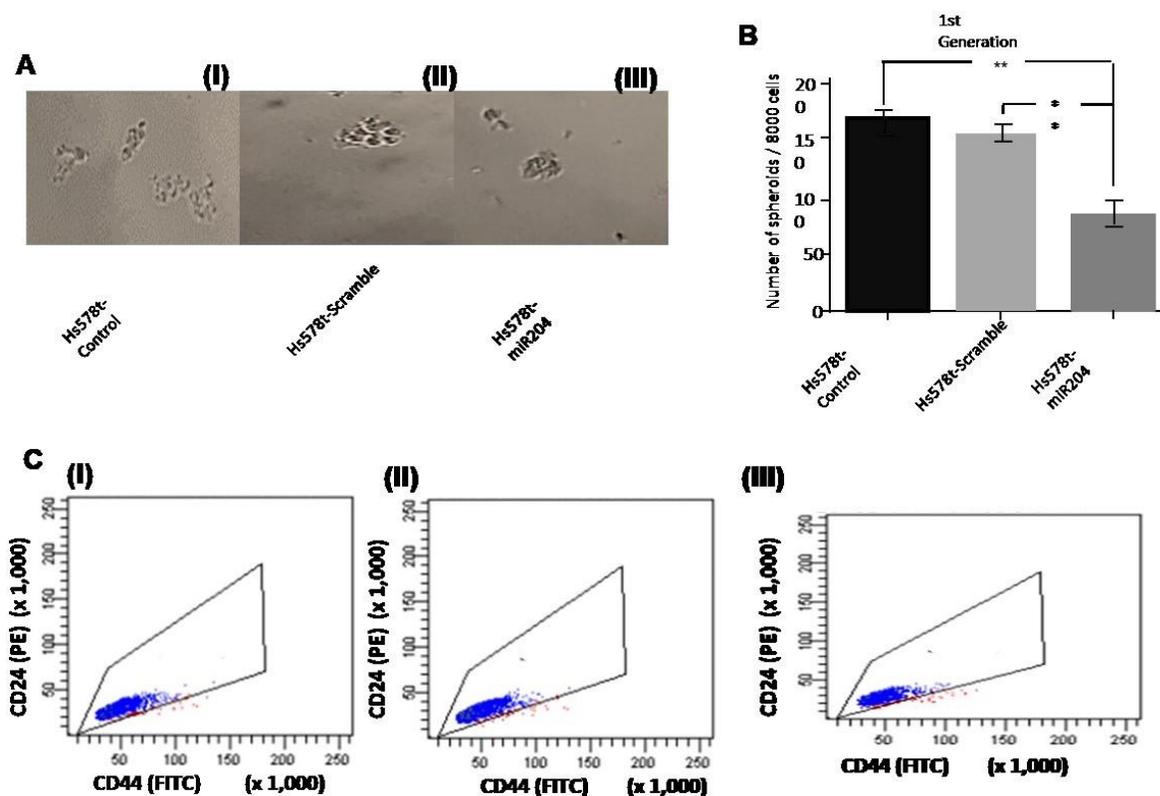
**Figura 17.-** La expresión ectópica del microRNA-204-5p en la subpoblación CD44+/CD24- inhibe la migración celular



### **8.5 Efecto del microRNA-204-5p en la generación de mamosferas**

Con el fin de evaluar si la restauración del microRNA-204-5p era capaz de inhibir la formación de esferoides en las células HS788t se transfectó el precursor del microRNA-204-5p a una concentración de 30 nM, posteriormente llevamos a cabo el ensayo de formación de esferoides bajo las condiciones control (sin transfectar), scramble (30 nM) y microRNA-204-5p (30 nM) monitoreando el ensayo durante 7 días en un microscopio de campo claro.

Los resultados muestran que en la condición control sin transfectar (Fig. 17A) los esferoides se forman a partir del tercer día y conforme pasa el tiempo el número de estos aumenta, observando estas estructuras tridimensionales con su forma esferoidal característica en el sobrenadante del medio, en la condición scramble se observó un comportamiento similar que en el control, los esferoides se observan desde el tercer día y por consiguiente el número de los mismo va en aumento. De manera interesante en la condición transfectada con el microRNA-204-5p la formación de esferoides se observó hasta el quinto día retrasando la aparición de estas estructuras, además de que pudimos observar durante el tiempo de monitoreo que el número de los esferoides era menor en comparación con los observados en las condiciones de control y el scramble. Los resultados indican que la restauración del microRNA-204-5p disminuye significativamente el número de esferoides formados hasta los 7 días con respecto a las células control y transfectadas con scramble



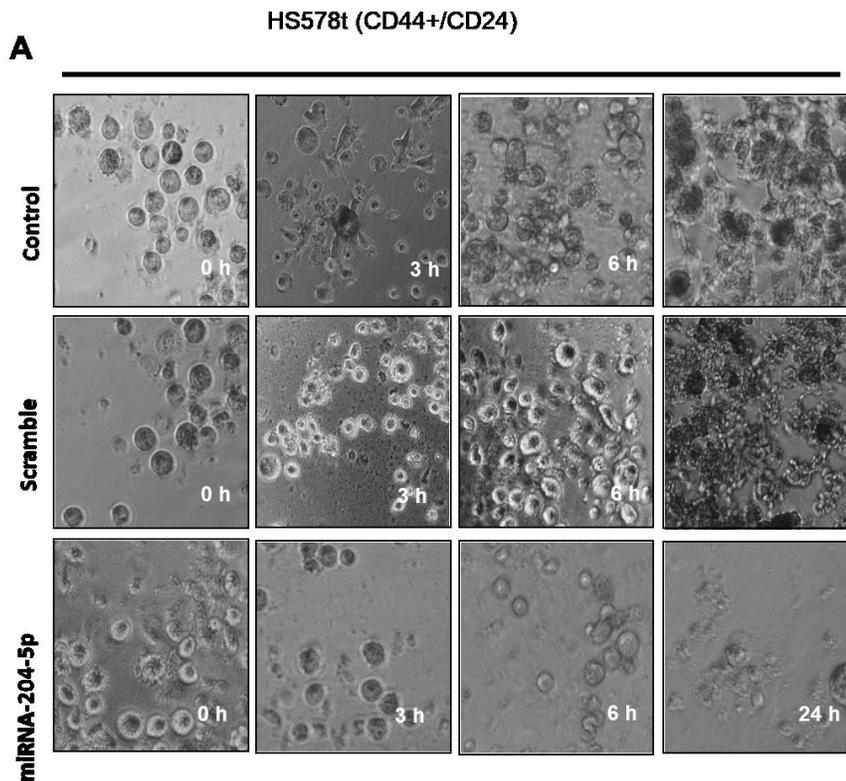
**Figura 18.- Generación de mamosferas en la línea celular HS578t y la subpoblación CD44+/CD24-** A La formación de mamosferas *"in vitro"* se observa en 3 condiciones experimentales: (I) línea celular HS578t, (II) codificación transfectada de línea celular HS578t, y (III) línea celular HS578t transfectada con microRNA-204-5p (B) Cuantificación de mamosferas (C) Validación de la formación de mamosferas en la subpoblación CD44 + / CD24- (línea parental: HS578t) con los anticuerpos CD24 (PE) y CD44 (FITC) a través de la clasificación celular para (I) Formación de mamosferas de la línea celular HS578t, identificó 18.6% en la subpoblación de células CD44 + / CD24-. (II) La formación de mamosferas de la línea celular HS578t transfectada con scramble identificó el 11,6% de la subpoblación de células CD44+/CD24- y (III) La formación de mamosferas transfectadas con microRNA-204-5p, identifica el 1.4% de las células CD44+/CD24- subpoblación.



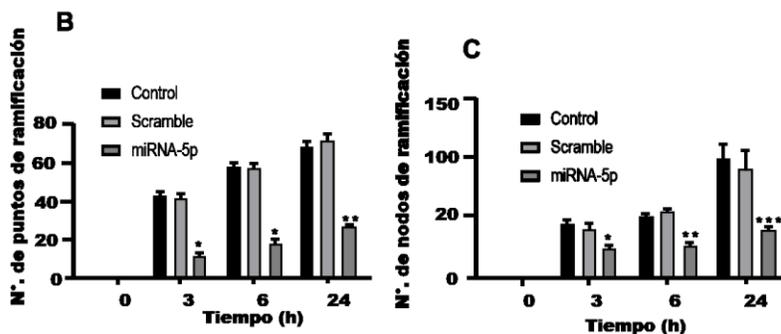
## **8.6 El microRNA-204-5p inhibe la formación de mimetismo vasculogénico.**

Para evaluar el papel funcional de microRNA-204-5p en la formación de redes de canales 3D del mimetismo vasculogénico, restauramos su expresión en las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- de la línea celular HS578t. Posteriormente se preparó la formación de los canales 3D, llevando las células por 48 h 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 microRNA-204-5p y no por realizar un proceso de transfección a las células.

Una vez transcurrido el tiempo las células se colocaron sobre matrigel para observar la formación de las redes del mimetismo vasculogénico. Como podemos observar en la condición control (Figura 18) a las 3 h las células se acomodan para iniciar la formación de las redes, a las h 6 se observan varios tubos capilares característicos del mimetismo vasculogénico y a las 24 h podemos apreciar claramente las redes formadas por los 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 se aprecia un comportamiento casi idéntico a la condición control teniendo a las 24 h los tubos capilares y los puntos de ramificación del mimetismo vasculogénico. Curiosamente la restauración ectópica de microRNA-204-5p dio como resultado la inhibición de la formación de redes capilares y de puntos de ramificación de los canales 3D del mimetismo vasculogénico. Se encontró una reducción significativa del número de puntos de ramificación (Figura 18B) y tubos capilares (Figura 18C) en las células transfectadas con microRNA-204-5p en comparación con las células de control.



**Figura 19. El microRNA-204-5p 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) microRNA-204-5p. Representación gráfica del número de (D) Puntos de ramificación y (E) Canales capilares para cada una de las condiciones, los resultados obtenidos muestran una disminución significativa con un valor de  $*P < 0.0001$  en la condición transfectada en comparación con el control y el scramble.





## 9.- 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 de 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, Ginnestier *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).

Previamente, se ha demostrado que el microRNA-204-5p se encuentra reprimido en tumores y en líneas celulares de cáncer de mama y esta desregulación induce a que se exacerben distintos hallmarks del cáncer (Flores *et al.*, 2016, Salinas *et al.*, 2018). Se han realizado análisis de transcriptoma de las células de cáncer de mama que fueron transfectadas con el microRNA-204-5p en donde se reportó que este microRNA 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 microRNA-204-5p podría estar modulando el porcentaje de células con fenotipo troncal en base que 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 microRNA-204-5p en las células HS578t,



la expresión de proteínas de membrana que están involucradas en la troncalidad de las células tumorales de cáncer de mama 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 microRNA-204-5p. De manera interesante notamos que al aumentar la concentración de la restauración del microRNA-204-5p 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 79% y 45% respectivamente, por lo que creemos que la expresión de este microRNAs 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 microRNA 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 microRNA 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 se demuestra que al restaurar la expresión de microRNA-204-5p 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, se sugiere que este microRNA tiene un papel funcional importante en la autorrenovación de los tumores en células de cáncer de mama (Gallardo *et al*, 2006).



Una característica importante de las células de cáncer es su capacidad para formar el mimetismo vasculogénico 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 microRNA-204-5p en células de cáncer de mama se inhibe de manera significativa la formación del mimetismo vasculogénico y la angiogénesis (Flores *et. al.*, 2016, Salinas *et. al.*, 2018), pero no hay reportes acerca de la función microRNA-204-5p 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 CD44+/CD24- de las células HS578t y realizamos el ensayo de mimetismo vasculogénico. De manera interesante observamos que la restauración ectópica de microRNA-204-5p 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 HS578t, aunque ahora sabemos que este microRNA 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 microRNA-204-5p inhibe el proceso del mimetismo vasculogénico en células con el fenotipo troncal de cáncer de mama, pero nos preguntamos a través de que genes podría estar llevando a cabo esta regulación, por lo que realizamos predicciones para identificar genes blanco del microRNA-204-5p. En conjunto los resultados obtenidos en este proyecto tienen una relevancia importante para fundamentar que el microRNA-204-5p puede regular las células con fenotipo troncal CD44+/CD24- de cáncer de mama, mismas que exacerban los hallmarks del cáncer y brindan el resurgimiento y la resistencia al tratamiento del tumor. Por lo que proponemos que la inducción de la restauración de este microRNA en tumores de cáncer de mama podría ser una alternativa terapéutica importante para mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes.



## 10.- CONCLUSIONES

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

1. El microRNA-204-5p está involucrado en la autorrenovación tumoral, evidenciando esto con el ensayo de formación de esferoides, donde apreciamos que al restaurar la expresión ectópica de este microRNA el tamaño y número de esferoides es considerablemente reducido en comparación con el control.
2. La expresión ectópica del microRNA-204-5p en la subpoblación CD44+/CD24- de la línea parental HS578t inhibe la migración celular.
3. La restauración ectópica del microRNA-204-5p 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.



## 11.- PRODUCTIVIDAD

### Publicaciones científicas

1. **Silva-Cázares, M. B.**, Saavedra-Leos, M. Z., Jordan-Alejandre, E., Nuñez-Olvera, S. I., Cómpean-Martínez, I., y López-Camarillo, C. (2020). Lipid based nanoparticles for the therapeutic delivery of non coding RNAs in breast cancer (Review). *Oncology reports*, 44(6), 2353–2363. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7791>



2. Lozano-Romero A, Astudillo-de la Vega H, Terrones-Gurrola MCDR, Marchat LA, Hernández-Sotelo D, Salinas-Vera YM, Ramos-Payan R, **Silva-Cázares MB**, Nuñez-Olvera SI, Hernández-de la Cruz ON, López-Camarillo C. HOX Transcript Antisense RNA HOTAIR Abrogates Vasculogenic Mimicry by Targeting the AngiomicroRNA-204-5p/FAK Axis in Triple Negative Breast Cancer Cells. Noncoding RNA. 2020 May 26;6(2):19. [doi:10.3390/ncrna6020019](https://doi.org/10.3390/ncrna6020019). PMID: 32466537



3. Marchat, L. A., Hernández-de la Cruz, O. N., Ramírez-Moreno, E., **Silva-Cázares, M. B.**, y López-Camarillo, C. (2020). Proteomics approaches to understand cell biology and virulence of *Entamoeba histolytica* protozoan parasite. *Journal of proteomics*, 226, 103897. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103897>



4.- Flores-Huerta, N.; **Silva-Cázares, M.B.**; Arriaga-Pizano, L.A.; Prieto-Chávez, J.L.; López-Camarillo, C. **LncRNAs and microRNAs as essential regulators of stemness in breast cancer stem cells.** *Biomolecules* 2021, 11, x.  
<https://doi.org/10.3390>



5.- Leyva-Porras, C.; Saavedra-Leos, M.Z.; Cervantes-González, E.; Aguirre-Bañuelos, P.; **Silva-Cázar, M.B.**; Álvarez-Salas, C. Spray Drying of Blueberry Juice-Maltodextrin Mixtures: Evaluation of Processing Conditions on Content Resveratrol. *Antioxidants* **2019**, *8*, 437. <https://doi.org/10.3390/antiox8100437>



6.- Ana L. López-Pablos, César C. Leyva-Porras, **Macrina B. Silva-Cázares**, Francisco E. Longoria-Rodríguez, Sergio A. Pérez-García, Ángel A. Vértiz-Hernández, María Z. Saavedra-Leos, "**Preparation and Characterization of High Purity Anhydrous  $\beta$ -Lactose from  $\alpha$ -Lactose Monohydrate at Mild Temperature**", International Journal of Polymer Science, vol. 2018, Article ID 5069063, 10 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5069063>



7.- Silvia Lorena Montes-Fonseca, Blanca Sánchez-Ramírez, Antonia Luna-Velasco, Carlos Arzate-Quintana, **Macrina Beatriz Silva-Cazares**, Carmen González Horta, Erasmo Orrantia-Borunda, "**Cytotoxicity of Protein-Carbon Nanotubes on J774 Macrophages Is a Functionalization Grade-Dependent Effect**", BioMed Research International, vol. 2015, Article ID 796456, 8 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/796456>



## Citas (según SCOPUS)

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=56674754100>

Silva-Cázares, MacRina Beatriz

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

<https://orcid.org/0000-0002-0277-0186> [Is this you? Connect to Mendeley account](#)

[Edit profile](#) [Set alert](#) [Potential author matches](#) [Export to SciVal](#)

### Metrics overview

5

Documents by author

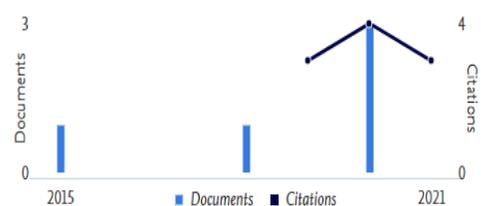
10

Citations by 10 documents

2

h-index:

### Document & citation trends



### Most contributed Topic

Multi Walled Nanotube; Carbon Fluid

[1 document](#)

Lactose; Whey Powder; Amorphi:

[1 document](#)

[View all Topics](#)

5 Documents

Cited by 10 Documents

0 Preprints

New

75 Co-Authors

Topics



## Tesis dirigidas

### Tesis de Maestría

Dirección de Tesis de Maestría “**Evaluación del papel funcional del miR-204 en el mimetismo vasculogénico mediado por las células troncales tumorales CD44+/CD24- de cáncer de mama**” Alumno QFB Rogelio Coronado Uribe. Director de Tesis: Dr. César López Camarillo. Co-directora: **MC Macrina Beatriz Silva Cázares**. Enero 2021. CDMX, México.



Tesis de Licenciatura

Dirección de Tesis de Licenciatura. **“Análisis de secretoma vaginal mediante técnica electroforética desnaturalizante con métodos previos de preparación para fluidos biológicos”** . Alumna: Adilene Sthepania Ontiveros Narvaez. Directora de Tesis: **MC Macrina Beatriz Silva Cázares**. Co-directora: María Zenaida Saavedra Leos. Octubre 2020. Matehuala SLP



## Participación en congresos

**Macrina Beatriz Silva Cázares**, Jonathan Puente Rivera, Stephanie Nuñez Olvera, Euclides Jordan Alejandro, César López Camarillo. “**Análisis de VEGF/HER2 en función de supervivencia en cáncer de mama**” 15 Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación. Instituto Tecnológico de Morelia. 20 de octubre de 2020.



M.sC. Daniel Vazquez-Maldonado, **MC Macrina Beatriz Silva Cázares**, Dr. Isaac Compean Martinez, Dr. José Pérez-Urizar, Dra. MAria Zenaida Saavedra Salazar. **“Characterization of a spray dried microencapsulated poder containing *Bacillus clausii* and resveratrol as co-encapsulating agents”** Congreso Academia Jorunals. Universidad Politécnica Metropolitana de Hidalgo 14-16 octubre 2020 Pachuca, Hidalgo



## **Cursos**

Asistencia a cursos. **Macrina Beatriz Silva Cázares**. “**Curso Básico de Citometría de Flujo**” Instituto Mexicano del Seguro Social. Unidad de Educación. Centro Médico Nacional Siglo 21. 13 al 17 de enero 2020. CDMX.



Curso. **Macrina Beatriz Silva Cázares**. “**Proteómica: Teoría y Práctica**” Instituto Politécnico Nacional. 01 de marzo de 2019. CDMX.



## Conferencias impartidas

Impartición de conferencia: **Macrina Beatriz Silva Cázares. “Nanoparticles for delivery in breast cancer”** Jornada de Biotecnología 2020. Universidad de Guanajuato. 11 de diciembre de 2020.



Adilene Stephania Ontiveros Narváez y **Macrina Beatriz Silva Cazares**. 8vo Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de San Luis Potosí. “**Análisis electroforético de secretoma vaginal**” Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Octubre 2020.



## 12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams J.M., Cory S. the Bcl.2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26: 1324-1337.
- Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* (2015) 519:482–5.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., y Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Ashikbayeva, Z., Tosi, D., Balmassov, D., Schena, E., Saccomandi, P., y Inglezakis, V. (2019). Application of Nanoparticles and Nanomaterials in Thermal Ablation Therapy of Cancer. *Nanomaterials*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nano9091195>
- 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.
- Barabe, F., Kennedy, J. A., Hope, K. J., y Dick, J. E. (2007). Modeling the Initiation and Progression of Human Acute Leukemia in Mice. *Science*, 316(5824), 600–604. <https://doi.org/10.1126/science.1139851>
- Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–97 (2004).
- 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).
- Bertoli, G., Cava, C. y Castiglioni, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* 5, 1122–1143 (2015).
- Bhat, V., Allan, A. L., y 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.
- 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.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, *et al*. *Curr Biol*. 2007; 17 : 1298–307.
- Bonnet, D., y Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Boone, J. Q., y Doe, C. Q. (2008). Identification of Drosophila type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Developmental neurobiology*, 68(9), 1185–1195. <https://doi.org/10.1002/dneu.20648>
- Bosselmann, S., y Williams, R. O. (2012). Route-Specific Challenges in the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. En R. O. Williams III, A. B. Watts, y D. A. Miller (Eds.), *Formulating Poorly Water Soluble Drugs* (pp. 1–26). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1144-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1144-4_1)
- Brabletz, T. (2012). EMT and MET in Metastasis: Where Are the Cancer Stem Cells? *Cancer Cell*, 22(6), 699–701. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.009>
- Breast Cancer—Women’s Health Issues*. (s/f). Merck Manuals Consumer Version. Recuperado el 5 de mayo de 2020, de <https://www.merckmanuals.com/home/women-s-health-issues/breast-disorders/breast-cancer>
- Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*. (2016) 64:320–33.
- Burkhardt D.L., Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. rev. cancer*. 2008; 8:671-682.
- 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.
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936 (2005).
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., y Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Campbell, L. L., y Polyak, K. (2007). Breast Tumor Heterogeneity: Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? *Cell Cycle*, 6(19), 2332–2338. <https://doi.org/10.4161/cc.6.19.4914>
- Carrasco, C. A., Gadelha, M., Manavela, M., y Bruno, O. D. (2014). Aggressive tumors and difficult choices in acromegaly. *Pituitary*, 17(Suppl 1), 24–29. <https://doi.org/10.1007/s11102-013-0538-5>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., y Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Caussinus, E., y Hirth, F. (2007). Asymmetric stem cell division in development and cancer. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 45, 205–225. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69161-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69161-7_9)
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.-H., Diebel, M. E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., y Wicha, M. S. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research*, 69(4), 1302–1313. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2741>
- Chen, G., Wang, Y., Xie, R., y Gong, S. (2017). Tumor-targeted pH/redox dual-sensitive unimolecular nanoparticles for efficient siRNA delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 259, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.042>.
- Chu, J., Li, Y., Fan, X., Ma, J., Li, J., Lu, G., Zhang, Y., Huang, Y., Li, W., Huang, X., Fu, Z., Yin, Y., y Yuan, H. (2018). MiR-4319 Suppress the Malignancy of Triple-Negative Breast Cancer by Regulating Self-Renewal and Tumorigenesis of Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(2), 593–604. <https://doi.org/10.1159/000491888>
- Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, *et al.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334 : 1351–8.



- Civetta, María Teresa Martín de, y Civetta, Julio Domingo. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53(5), 405-414.
- 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.
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 10(10), 704–714. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>
- Davis-Dusenbery, B. N., y Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of biochemistry*, 148(4), 381–392.
- D'Agata, R., Palladino, P., y Spoto, G. (2017). Streptavidin-coated gold nanoparticles: Critical role of oligonucleotides on stability and fractal aggregation. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.1>
- Delgado-Bellido, D., Serrano-Saenz, S., Fernández-Cortés, M., y Oliver, F. J. (2017). Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Molecular cancer*, 16(1), 65.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (2004) 432:231–5.
- Deshpande A., Sicinski P., Hinds P.W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*. 2005; 24: 2909-2915.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (2004) 432:231–5.
- 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.
- Donovan P, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001; 414: 92-7.
- Donovan, P. J., y de Miguel, M. P. (2003). Turning germ cells into stem cells. *Current Opinion in Genetics y Development*, 13(5), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.010>
- Dumitrescu, R. G., y Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk—Where



- do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), 208–221. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x>
- 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.
- Eroles, P., Bosch, A., Bermejo, B., y Lluch, A. (2010). Mechanisms of resistance to hormonal treatment in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 12(4), 246–252. <https://doi.org/10.1007/s12094-010-0500-1>
- Eroles, P., Tormo, E., Pineda, B., Espin, E., y Lluch, A. (2016). MicroRNAs in Breast Cancer: One More Turn in Regulation. *Current Drug Targets*, 17(9), 1083–1100. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150213114103>
- Esquela-Kerscher, A., y Slack, F. J. (2006). Oncomirs—MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
- Faridi, F., Ponnusamy, K., Quagliano-Lo Coco, I., Chen-Wichmann, L., Grez, M., Henschler, R., y Wichmann, C. (2013). Aberrant epigenetic regulators control expansion of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00254>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., y Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Flores-Pérez, A., Marchat, L. A., Rodríguez-Cuevas, S., Bautista, V. P., Fuentes-Mera, L., Romero-Zamora, D., Maciel-Dominguez, A., de la Cruz, O. H., Fonseca-Sánchez, M., Ruíz-García, E., la Vega, H. A., y López-Camarillo, C. (2016). Suppression of cell migration is promoted by miR-944 through targeting of SIAH1 and PTP4A1 in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2470-3>
- 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 microRNAs exhibit strand bias. *Cell* (2003) 115:209–16.
- Flores-Pérez, A., Marchat, L., Rodríguez-Cuevas, S. *et al.* Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by microRNA-204-5p controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep* 6, 34504 (2016).
- Frank NY, Schatton T, Frank MH: The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120: 41-50, 2010.
- Gao, L., Guo, Q., Li, X., Yang, X., Ni, H., Wang, T., Zhao, Q., Liu, H., Xing, Y., Xi, T., y Zheng, L. (2019). MiR-873/PD-L1 axis regulates the stemness of breast cancer cells. *EBioMedicine*, 41, 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.034>
- 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.
- Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:458–62.
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:509–24.
- Garofalo, M., Quintavalle, C., Romano, G., Croce, C. M., y Condorelli, G. (2012). miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. *Current molecular medicine*, 12(1), 27–33.
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., y Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
- Giordano, S. H., Cohen, D. S., Buzdar, A. U., Perkins, G., y Hortobagyi, G. N. (2004). Breast carcinoma in men: A population-based study. *Cancer*, 101(1), 51–57. <https://doi.org/10.1002/cncr.20312>
- Gomez, D. E., Armando, R. G., Farina, H. G., Menna, P. L., Cerrudo, C. S., Ghiringhelli, P. D., y Alonso, D. F. (2012). Telomere structure and telomerase



- in health and disease. *International Journal of Oncology*, 41(5), 1561–1569.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1611>
- Grimshaw, M. J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J. A., Bohnenkamp, H. R., Chiapero-Stanke, L., Taylor-Papadimitriou, J., y Burchell, J. M. (2008). Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(3), R52.  
<https://doi.org/10.1186/bcr2106>
- Ha, M., y Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell* 100, 57–70 (2000).
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646– 674 (2011).
- Hammond SM. MicroRNA como oncogenes. *Curr Opin Genet Dev*. 2006; 16 : 4–9.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heppner, G. H., y Miller, B. E. (1983). Tumor heterogeneity: Biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Reviews*, 2(1), 5–23.  
<https://doi.org/10.1007/BF00046903>
- Hernández Ramírez, Porfirio, y Dorticós Balea, Elvira. (2004). Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20 (3).
- Hirohashi, S. y Kanai, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 94, 575–81 (2003).
- 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.
- Hosseini H.S. y Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice*. 4 127-129 (2017).
- Hölzel, M., Bovier, A. y 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).
- Hong, S.-T., Lin, H., Wang, C.-S., Chang, C.-H., Lin, A. M.-Y., Yang, J. C.-H., y Lo, Y.-L. (2019). Improving the anticancer effect of afatinib and microRNA by using lipid polymeric nanoparticles conjugated with dual pH-responsive and targeting peptides. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0519-6>
- Hsu, Y.-C., y Fuchs, E. (2012). A family business: Stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(2), 103–114. <https://doi.org/10.1038/nrm3272>
- Islam, F., Gopalan, V., y Lam, A. K.-Y. (2019). Chapter 6 - Cancer Stem Cells: Role in Tumor Progression and Treatment Resistance. En F. Dammacco y F. Silvestris (Eds.), *Oncogenomics* (pp. 77–87). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811785-9.00006-5>
- 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.
- Judson, R. L, Babiarz, J. E., Venere, M., y Blelloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature biotechnology*, 27(5), 459–461.
- Kango, S., Kalia, S., Celli, A., Njuguna, J., Habibi, Y., y Kumar, R. (2013). Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. *Progress in Polymer Science*, 38(8), 1232–1261. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.003>
- Kao, C.-Y., Yang, P.-M., Wu, M.-H., Huang, C.-C., Lee, Y.-C., y Lee, K.-H. (2016). Heat shock protein 90 is involved in the regulation of HMGA2-driven growth and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *PeerJ*, 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.1683>
- Khoder, M., Abdelkader, H., ElShaer, A., Karam, A., Najlah, M., y Alany, R. G. (2016). Efficient approach to enhance drug solubility by particle engineering of bovine serum albumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1), 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.019>



- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and microRNAs exhibit strand bias. *Cell* (2003) 115:209–16.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*.
- Kim, S.-J., Oh, J.-S., Shin, J.-Y., Lee, K.-D., Sung, K. W., Nam, S. J., y Chun, K.- H. (2011). Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 155(3), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.026>
- Kong, X., Zhang, J., Li, J., Shao, J., y Fang, L. (2018). MiR-130a-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(2), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.018>
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., y Cotran, R. S. (2015). *Patología estructural y funcional*. Elsevier.
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. E., Therneau, T. M., y Greipp, P. R. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(1), 21–33. <https://doi.org/10.4065/78.1.21>
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C.,Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li,P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P.-Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1049–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, et al. Radiation-Induced Reprogramming of Breast Cancer Cells. *Stem Cells* 2012;30:833-44
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., y Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*,



294(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>

- Laneve, P., Di Marcotullio, L., Gioia, U., Fiori, M. E., Ferretti, E., Gulino, A., Bozzoni, I., y 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
- Langer EM, Kendsersky 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.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., y Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lee, R. C. (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862–864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., y Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- 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.
- Lee, Y. S., y Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 4, 199–227.
- 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., y Schmittgen, T. D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 120(5), 1046–1054.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., y Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- 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.
- Leon, J. y col. Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos”. *Invest. y Ciencia*, 143. Ago/88. 20-34.
- Li, S., Wang, X., Gu, Y., Chen, C., Wang, Y., Liu, J., Hu, W., Yu, B., Wang, Y., Ding, F., Liu, Y., y Gu, X. (2015). Let-7 microRNAs Regenerate Peripheral Nerve Regeneration by Targeting Nerve Growth Factor. *Molecular Therapy*, 23(3), 423–433. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.220>
- Lin, S., y Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 15(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Li, T., Pan, H., y Li, R. (2016). The dual regulatory role of microRNA-204-5p in cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11667–11677.
- Liu, J., Meng, T., Ming, Y., Wen, L., Cheng, B., Liu, N., Huang, X., Hong, Y., Yuan, H., y Hu, F. (2016). MicroRNA-200c delivered by solid lipid nanoparticles enhances the effect of paclitaxel on breast cancer stem cell. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 6713–6725. <https://doi.org/10.2147/IJN.S111647>
- 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).
- Luo, Q., Wang, J., Zhao, W. *et al.* Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J Hematol Oncol* 13, 19 (2020).
- 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.
- Lungu, I. I., Grumezescu, A. M., Volceanov, A., y Andronescu, E. (2019). Nanobiomaterials Used in Cancer Therapy: An Up-To-Date Overview. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193547>
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM *et al.*



- Vascular canal formation by human melanoma cells in vivo and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999 Sep; 155(3):739-52.
- Mikhaylova, O., Stratton, Y., Hall, D., Kellner, E., Ehmer, B., Drew, A. F., Gallo, C. A., Plas, D. R., Biesiada, J., Meller, J., y Czyzyk-Krzeska, M. F. (2012). VHL-regulated MicroRNA-204-5p suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer cell*, 21(4), 532–546.
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, *et al.* *Oncogene* 2006; 25 : 2537–45
- Ma R, Bonnefond S, Morshed SA, *et al.* Stemness is Derived from Thyroid Cancer Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:114.
- Mata-Miranda, Maribel, Vázquez-Zapién, Gustavo J, y Sánchez-Monroy, Virginia. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194-199.
- Mannelli G., Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers *Cancer Treat Rev*, 38 (2012), pp. 515-539.
- Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans.* (2014) 42:1135–40.
- 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.
- 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.
- McGuire, A., Brown, J. A. L., y Kerin, M. J. (2015). Metastatic breast cancer: The potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Reviews*, 34, 145–155. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9551-7>
- McPherson, K., Steel, C. M., y Dixon, J. M. (2000). Breast cancer—Epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ : British Medical Journal*, 321(7261), 624– 628.



- Michael, M. Z., O' Connor, S. M., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., y James, R. J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research: MCR*, 1(12), 882–891.
- Mitalipov, S., y Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 114, 185–199. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_45](https://doi.org/10.1007/10_2008_45)
- Moreno-Ortiz, H., Esteban-Perez, C., Badran, W., y Kent-First, M. (2009). Isolation and Derivation of Mouse Embryonic Germinal Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 32. <https://doi.org/10.3791/1635>
- Morrison, S. J., y Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Murphy, E., Vaníček, J., Robins, H., Shenk, T., y Levine, A. J. (2008). Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: Implications for latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14), 5453–5458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711910105>
- Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., y 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 y proteomics*, 3 (5), 317–324.
- Navya, P. N., Kaphle, A., Srinivas, S. P., Bhargava, S. K., Rotello, V. M., y Daima, H. K. (2019). Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Convergence*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40580-019-0193-2>
- Ng PM, Lufkin T. Embryonic stem cells: proteins interaction networks. *Biomol Concepts*. 2011; 2: 13-25.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., y Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in*



- endocrinology, 9, 402.
- Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N., y Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 8(1), 45–56. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.45>
- OMS | *Cáncer de mama: Prevención y control*. (s/f). WHO; World Health Organization. Recuperado el 5 de mayo de 2020, de <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- 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.
- Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta*. 1806;2010:18–28.
- 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.
- Peng Y., Croce C.M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy* 1, article number: 15004 (2016).
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., y Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- 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.
- Plummer P. N. *et al*. MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res*. 73, 341–352 (2013).
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M. A., y Daidone, M. G. (2005). Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research*, 65(13), 5506–5511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05->



0626

- Puente J, Del velasco G., ¿Qué es el cáncer y como se desarrolla?. Sociedad española de oncología media. 2019.
- Qi, S.-S., Sun, J.-H., Yu, H.-H., y Yu, S.-Q. (2017). Co-delivery nanoparticles of anti-cancer drugs for improving chemotherapy efficacy. *Drug Delivery*, 24(1), 1909–1926. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1410256>
- 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.
- Revista Médica del Instituto Mexicano del Suro Social Abril-Marzo 2020, Spl, 1 Rev Med Inst Mex Suro Soc 2020 Spl (1) Datos Grals. De la Revista Información Legal.* (s/f). Recuperado el 5 de mayo de 2020, de [https://imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?id\\_revista=250](https://imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?id_revista=250)
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., y Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Robbins S y col: “Patología estructural y funcional” Capítulo VI “Trastornos de la Inmunidad” Capítulo VII “Neoplasia” 5ª Edición 1995.
- Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci.* 1979 Mar-Apr;9(2):144–156.
- Russo J, Russo I.H. development of the human breast. *Maturitas*, 49 (2004), pp. 2-15.
- Ruíz-García, E., González-Barrios, J. A., Pérez-Plasencia, C., Streber, M. L., y López-Camarillo, C. (2016). Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by microRNA-204-5p controls angiogenesis in breast cancer. *Scientific reports*, 6, 34504.
- 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., y 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.



- Sagar, J., Chaib, B., Sales, K., Winslet, M., y Seifalian, A. (2007). Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer cell international*, 7, 9.
- Salinas-Vera, Y. M., Marchat, L. A., García-Vázquez, R., González de la Rosa, C. H., Castañeda-Saucedo, E., Tito, N. N., Flores, C. P., Pérez-Plasencia, C., Cruz-Colin, J. L., Carlos-Reyes, Á., López-González, J. S., Álvarez- Sánchez, M. E., y López-Camarillo, C. (2018). Cooperative multi-targeting of signaling networks by angiomicroRNA-204-5p inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Cancer Letters*, 432, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.003>
- Schabath H. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 2006;119:314-25.
- Serpico, D., Molino, L., y Di Cosimo, S. (2014). MicroRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.002>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017.
- Sgroi D. C. (2010). Preinvasive breast cancer. *Annual review of pathology*, 5, 193–221.
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., y Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology y Research*, 1(2), 109–126.
- Sharma, S., Patnaik, P. K., Aronov, S., y Kulshreshtha, R. (2016). ApoptomiRs of Breast Cancer: Basics to Clinics. *Frontiers in Genetics*, 7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00175>
- Silva-Cázares, M.B., Saavedra-Leos, M.Z., Jordan-Alejandre, E., Nuñez-Olvera, S.I., Cómpean-Martínez, I., & López-Camarillo, C. (2020). Lipid-based nanoparticles for the therapeutic delivery of non-coding RNAs in breast cancer (Review). *Oncology Reports*, 44, 2353-2363. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7791>
- Sin, W. C., y Lim, C. L. (2017). Breast cancer stem cells-from origins to targeted therapy. *Stem cell investigation*, 4, 96.



- Sindhwani, S., Syed, A. M., Ngai, J., Kingston, B. R., Maiorino, L., Rothschild, J., MacMillan, P., Zhang, Y., Rajesh, N. U., Hoang, T., Wu, J. L. Y., Wilhelm, Siu, Zilman, A., Gadde, S., Sulaiman, A., Ouyang, B., Lin, Z., Wang, L., Egeblad, M., y Chan, W. C. W. (2020). The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nature Materials*, 19(5), 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>
- Singh, R., y Mo, Y.-Y. (2013). Role of microRNAs in breast cancer. *Cancer Biology y Therapy*, 14(3), 201–212. <https://doi.org/10.4161/cbt.23296>
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., y Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- 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
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. y Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* 458, 719–724 (2009).
- Sun, Y., Yu, X., y Bai, Q. (2015). microRNA-204-5p inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(10), 12775–12783.
- 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.
- Sulaiman, S. A., Ab Mutalib, N.-S., y Jamal, R. (2016). miR-200c Regulation of Metastases in Ovarian Cancer: Potential Role in Epithelial and Mesenchymal Transition. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00271>
- Sun, T., Gao, J., Han, D., Shi, H., y Liu, X. (2019). Fabrication and characterization of solid lipid nano-formulation of astraxanthin against DMBA-induced breast cancer via Nrf-2-Keap1 and NF-kB and mTOR/Maf-1/PTEN pathway. *Drug*



- Delivery*, 26(1), 975–988. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1667454>
- Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., y Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, 64(11), 3753–3756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0637>
- 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.
- Tay Y, *et al.* MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008;455(7216):1124–8.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., y Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Toda, H., Kurozumi, S., Kijima, Y., Idichi, T., Shinden, Y., Yamada, Y., Arai, T., Maemura, K., Fujii, T., Horiguchi, J., Natsugoe, S., y Seki, N. (2018).
- Molecular pathogenesis of triple-negative breast cancer based on microRNA expression signatures: Antitumor *microRNA-204-5p* targets AP1S3. *Journal of Human Genetics*, 63(12), 1197–1210. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0510-3>
- Uribe, Jorge R, Hernández, Carlos A, Menolascino, Francisco, Rodríguez, Joel E, Istúriz, Linda M, Márquez, María E, Rodríguez, Ramón E, y Uribe, Jorge L. (2010). Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Revista Venezolana de Oncología*, 22(2), 109-116.
- 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.



- 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.
- Velasco-Velázquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., y Pestell, R. G. (2012). Breast Cancer Stem Cells. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 44(4), 573–577. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.020>
- Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002;1:369-91.
- Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, *et al.* *Oncogene* 2007
- Visvader, J. E., y Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer*, 8(10), 755–768.
- Wallden, B., Storhoff, J., Nielsen, T., Dowidar, N., Schaper, C., Ferree, S., Liu, S., Leung, S., Geiss, G., Snider, J., Vickery, T., Davies, S. R., Mardis, E. R., Gnant, M., Sestak, I., Ellis, M. J., Perou, C. M., Bernard, P. S., y Parker, J. S. (2015). Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Medical Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0129-6>
- Wang, R., Lv, Q., Meng, W., Tan, Q., Zhang, S., Mo, X., y Yang, X. (2014). Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *Journal of Thoracic Disease*, 6(6), 829–837. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38>
- 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.
- Weinberg RA La proteína retinoblastoma y el control del ciclo celular. *Célula*. 1995; 81 : 323-330.
- Weigelt, B., Geyer, F. C., y Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, 4(3), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>



- Weiss, M. L., y Troyer, D. L. (2006). Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem cell reviews*, 2(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>
- What Is Breast Cancer? | Breast Cancer Definition.* (s/f). Recuperado el 5 de mayo de 2020, de <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
- Wiseman, B. S., y Werb, Z. (2002). Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570), 1046–1049. <https://doi.org/10.1126/science.1067431>
- Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 87 (2011).
- 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
- Wu, Y., Shi, W., Tang, T., Wang, Y., Yin, X., Chen, Y., Zhang, Y., Xing, Y., Shen, Y., Xia, T., Guo, C., Pan, Y., y Jin, L. (2019). MiR-29a contributes to breast cancer cells epithelial–mesenchymal transition, migration, and invasion via down-regulating histone H4K20 trimethylation through directly targeting SUV420H2. *Cell Death y Disease*, 10(3), 176. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1437-0>
- 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.
- 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.
- Yang, W., Lee, D. Y., y Ben-David, Y. (2011). The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 3(2), 140–155.
- 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](https://doi.org/10.1038/nsmb.1733).
- Yu J, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917–20.



- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., y Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research y Therapy*, 10. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III.
- Zhao, C.-Y., Cheng, R., Yang, Z., y Tian, Z.-M. (2018). Nanotechnology for Cancer Therapy Based on Chemotherapy. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040826>
- Zheng, M., Sun, X., Li, Y., y Zuo, W. (2016). MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(6), 8189–8196. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4722-2>
- Zhou, J., Chen, Q., Zou, Y., Chen, H., Qi, L., y Chen, Y. (2019). Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications. *Frontiers in oncology*, 9, 820.



### **13.- APÉNDICE**

Soluciones y medios de cultivo.

#### **DMEM, SFB 10%,(100 ml):**

90 ml (DMEM, alto glucosa y glutamina, Invitrogen), 10 ml de suero fetal bovino (Invitrogen), previamente inactivado durante 30 min a 56 °C y 1 ml de solución de Penicilina (10.000 U/ml)-Estreptomycin (10.000 ug/ml)

#### **Amortiguador de carga para proteínas (2X):**

2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M, 0.4 mg de SDS, 2ml de glicerol, 200 ug de  $\beta$ mercaptoetanol y 0.1 mg de azul de bromofenol en un volumen final de 10 ml. pH 6.8.

#### **Amortiguador de corrida para electroforesis de proteínas:**

Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 1%. TAE (50X): 242 g de Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 37.2 g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O. Agua c.b.p. 1 L.

#### **TBE (10X):**

108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico, 40 ml 0.5 M de EDTA pH 8. Agua c.b.p.1L.

#### **TE:**

Tris.Cl 10 mM, pH 7.4 y EDTA 1 mM pH 8.0. Solución bloqueadora para Western blot: 5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4

#### **Amortiguador de transferencia (1X):**

Tris (0.025 M), glicina (0.192 M), 20 % de metanol.

#### **Solución de Azul de Coomasie (1 L):**

Coomasie R-250 al 0.25%, 500 ml de metanol y 70 ml de ácido acético. Agua c.b.p.1L.

#### **Solución desteñidora:**

Etanol 30 %, ácido acético 10 % y Agua bidestilada 60%.

#### **Reactivo de Bradford:**

50 mg de Azul de Coomasie G-250, 25 ml de etanol al 100%, 50 ml de ácido fosfórico al 85 % y 500 ml de agua bidestilada. La solución se filtra con papel Whatman No. 1.

#### **Preparación de geles de poliacrilamida (sds-page)**

Para 4 mini geles:

#### **Gel Separador**



Soluciones	Gel Separador		
	7.5%	10%	12%
Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	11.25 ml	15 ml	18 ml
1.5 M Tris pH 8.8	11.25 ml	11.25 ml	11.25 ml
dH <sub>2</sub> O	21.7 ml	18 ml	15 ml
SDS 10%	0.45 ml	0.45 ml	0.45 ml
APS 10%	0.35 ml	0.35 ml	0.35 ml
Temed	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Volumen final	45 ml	45 ml	45 ml

## Gel Concentrador

Soluciones	Gel Concentrador
	3%
Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	2.2 ml
0.5 M Tris pH 6.8	4.9 ml
dH <sub>2</sub> O	12.5 ml
SDS 10%	0.2 ml
APS 10%	0.25 ml
Temed	15 $\mu$ l
Volumen final	20 ml

### **Solución de Acrilamida/Bisacrilamida (30 % : 0.8 %):**

Acrilamida 29.2 g Bisacrilamida 0.8 g Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml. Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No. 1. Almacenar a 4°C hasta un mes, previamente protegido de la luz. Soluciones y reactivos para geles de Acrilamida (SDS-PAGE): 1.5 M de Tris-HCl pH 8.8: 18.15 g de Tris base/100 ml de agua desionizada. 0.5 M de Tris-HCl pH 6.8: 6 g de Tris base/ 100 ml de agua desionizada. 10 % de SDS: 100 g de SDS en 1 litro de agua. APS 10 %: 1 g de Persulfato de Amonio en 10 ml de agua. Alicuotar y congelar a -20°C. Alícuota en uso almacenar a 4°C.

**TEMED (Tetrametiletilendiamina):** Almacenar a 4°C

### **PBS – EDTA 0.2%**

PBS 1X p 7.0 500 ml EDTA 1g Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave 121°C/ 20 min

### **Soluciones y reactivos para geles de Acrilamida (SDS-PAGE):**

1.5 M de Tris-HCl pH 8.8: 18.15 g de Tris base/100 ml de agua desionizada.

0.5 M de Tris-HCl pH 6.8: 6 g de Tris base/ 100 ml de agua desionizada.

10 % de SDS: 100 g de SDS en 1 litro de agua.



APS 10 %: 1 g de Persulfato de Amonio en 10 ml de agua. Alicuotar y congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Alícuota en uso almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .