



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS ASOCIADOS A LA  
RESISTENCIA A LA RADIOTERAPIA EN CÁNCER DE MAMA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN  
BIOMEDICINA MOLECULAR

**PRESENTA:**

GONZÁLEZ QUINTANA VÍCTOR MANUEL

**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. LAURENCE ANNIE MARCHAT MARCHAU

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO



MÉXICO D.F A 26 DE NOVIEMBRE DE 2012



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 26 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH para examinar la tesis titulada:  
Identificación de microRNAs asociados a la resistencia a la radioterapia en cáncer de mama

Presentada por el alumno:

González  
Apellido paterno

Quintana  
Apellido materno

Victor Manuel

Nombre(s)

Con registro: 

B	1	0	2	0	9	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Dr. Mario César López Camarillo

Dra. Elena Arechaga Ocampo

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

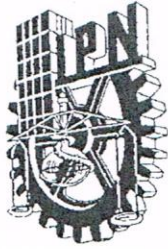
Dr. Absalom Zamorano Carrillo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. César Augusto Sandino Reyes López



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



*INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL*  
*SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO*

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F. el día 26 del mes de Noviembre del año 2012, el que suscribe González Quintana Víctor Manuel alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, con número de registro B102098, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Laurence Annie Marchat Marchau y del Dr. Mario César López Camarillo y cede los derechos del trabajo titulado Identificación de microRNAs asociados a la resistencia a la radioterapia en cáncer de mama, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones lmarchat@ipn.mx; genómicas@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Víctor Manuel González Quintana

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del alumno(a)

ESTE PROYECTO FUE APOYADO POR INSTITUTO DE CIENCIA Y  
TECNOLOGIA DEL DISTRITO FEDERAL (PIUTE-10147)

EL ALUMNO FUE BECARIO DEL CONACYT, SI COMO DEL PROGRAMA  
INSTITUCIONAL DE FORMACION DE INVESTIGADORES (PIFI) Y DEL  
PROGAMA DE BECA TESIS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESTE PROYECTO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE ONCOGENÓMICA  
DE INVESTIGACIÓN BÁSICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
CANCEROLOGÍA, EL LABORATORIO DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
GENÓMICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y  
EL LABORATORIO 2 DE BIOMEDICINA MOLECULAR DE LA ESCUELA  
NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL

## ÍNDICE

Resumen/Abstract	7
Lista de tablas	8
Lista de figuras	8
I. Introducción	10
II. Marco teórico	12
1. Cáncer de máma	12
1.1 Antecedentes	12
1.2 Epidemiología	15
1.3 Marcadores moleculares asociados al desarrollo de CM	19
1.4 Tratamiento de CM	21
1.5 Radioterapia y radioresistencia en CM	27
2. MicroRNAs	33
2.1 Biogénesis de miRNAs	33
2.2 Regulación de la expresión genética	36
2.3 MiRNAs en cáncer	37
2.4 MiRNAs en CM	41
2.5 Perfiles de expresión de miRNAs en cáncer con Radiación	44
III. Justificación	47
IV. Hipótesis	47
V. Objetivos	48
VI. Estrategia experimental	49
VII. Materiales y métodos	50
7.1 Cultivos celulares	50
7.2 Determinación de la dosis letal 50 (DL50)	50
7.3 Generación de células radioresistentes	51
7.4 Ensayo de viabilidad	51
7.5 Ensayo de proliferación	52
7.6 Ensayo clonogénico	53
7.7 Extracción de RNA total	54
7.8 Perfiles de expresión Arreglos Taqman de miRNAs	55
7.9 Determinación de la expresión de cinco miRNAs por q-RTPCR	59
7.10 Predicción de los blancos potenciales de los miRNAs	60
VIII. Resultados	61
8.1 Características y generación de líneas radioresistentes	61
8.2 Determinación de la Dosis Letal 50	61
8.3 Caracterización de la radioresistencia en las líneas celulares MCF-7 y MDa-MB231 radioresistentes	69
8.4 Perfiles de expresión de miRNAs con TLDA	76
8.5 Expresión de cinco miRNAs en la línea radioresistente	78

8.6 Análisis <i>in silico</i> de la predicción de genes blanco y procesos biológicos afectados por los miRNAs modulados	80
IX. Discusión	85
X. Conclusiones	88
XI. Perspectivas	89
XII. Referencias	90

## RESUMEN

**Antecedentes:** La radioterapia es uno de los tratamientos más utilizados en el cáncer, sin embargo, un número importante de pacientes desarrollan resistencia a este tratamiento, la cuál se relaciona con modificaciones genómicas en las células tumorales. Los microRNAs (miRNAs) son reguladores de diversas funciones celulares y las alteraciones en su expresión y función son un evento común en el cáncer que se ha relacionado con la respuesta a diferentes terapias. Por lo que, la determinación de perfiles de expresión de miRNAs relacionados con la radioresistencia, es importante para detectar posibles marcadores moleculares asociados a la resistencia a la radioterapia en cáncer de mama.

**Resultados:** Se estableció un modelo de radioresistencia *in vitro* utilizando las líneas celulares de cáncer de mama MDA MB 231 y MCF-7. Se identificaron 21 miRNAs que modulan su expresión en las células MCF-7 radioresistentes, y por medio de un análisis *in silico*, se identificaron 16 miRNAs que podrían regular genes relacionados con procesos biológicos asociados con la resistencia a la radiación como la reparación de DNA, apoptosis, ciclo celular, transcripción, migración y proliferación.

**Conclusiones:** La expresión de al menos 21 miRNAs está modificada en células de cáncer de mama resistentes a la radiación, lo cual sugiere que las modificaciones en la expresión de los miRNAs podría ser un mecanismo de regulación de la expresión de genes que participan en la resistencia adquirida a la radioterapia en cáncer de mama.

## ABSTRACT

**Background:** Radiotherapy is one of the most common treatments in cancer, however, an important number of patients develop resistance to this treatment, which has been related with genomic modifications in the tumour cells. MiRNAs regulates different cellular functions and alterations in its expression and function are a common event in cancer and it has been related with the response of different treatments. Then, the determination of miRNAs expression profile in relation with radioresistance is an important step to identify molecular markers that could be associated with radiotherapy resistance in breast cancer.

**Results:** We established an *in vitro* resistance model using MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cell lines. We identified 21 miRNAs whose expression is modulated in MCF-7 radioresistant cells. By *in silico* analysis, we identified 16 miRNAs that could regulate genes that are related to biological process associated with the radiation resistance such as DNA repair, apoptosis, cell cycle, transcription, migration and proliferation.

**Conclusion:** The expression of at least 21 miRNAs is modified in radioresistant breast cancer cells, which suggests that modifications in miRNAs expression could be a mechanism of the regulation of genes that participate in the acquired radioresistance in breast cancer.

## Lista de Tablas

1. Factores genéticos de predisposición a CM.	Pág 21
2. miRNAs involucrados en apoptosis.	Pág 37
3. miRNAs involucrados en angiogénesis.	Pág 38
4. miRNAs asociados a cáncer y sus blancos.	Pág 39
5. miRNAs identificados en CM	Pág 44
6. Perfiles de expresión de miRNAs en cáncer después de radiación ionizante	Pág 46
7. Mezcla de reacción para RT de miRNAs	Pág 57
8. Condiciones cíclicas de RT de miRNAs	Pág 57
9. Mezcla de reacción para la preamplificación de RT de miRNAs	Pág 58
10. Condiciones cíclicas para la preamplificación de RT de miRNAs	Pág 58
11. Mezcla de reacción para TLDA	Pág 59
12. Mezcla de reacción para RT de miRNAs	Pág 60
13. Mezcla de reacción para PCR tiempo real de miRNAs	Pág 60
14. Condiciones cíclicas para PCR tiempo real de miRNAs	Pág 60
15. Ensayo de viabilidad para MCF-7 y MDA-MB231 a diferentes dosis	Pág 63
16. Ensayo de proliferación para MCF-7 y MDA-MB231 en respuesta a diferentes dosis de radiación	Pág 65
17. Número de colonias clonogénicas a diferentes dosis	Pág 67
18. Ensayo de viabilidad para determinar la radioresistencia en MCF-7 y MDA-MB231 RR	Pág 69
19. Ensayo de proliferación para determinar la radioresistencia en MCF-7 y MDA-MB231 RR	Pág 71
20. Ensayo clonogénico para determinar la radioresistencia en MCF-7 y MDA-MB231 RR	Pág 72
21. miRNAs expresados diferencialmente en la línea MCF-7 RR	Pág 77
22. miRNAs expresados diferencialmente en MCF-7 RR	Pág 79
23. miRNAs diferenciales y sus genes blanco	Pág 80



## Lista de Figuras

1. Estructura de la glándula mamaria	Pág 14
2. Mortalidad por CM y CU en México	Pág 19
3. Lesiones directas e indirectas al DNA inducidas por la radiación	Pág 27
4. Mecanismos y factores implicados en radioresistencia en CM	Pág 30
5. Procesamiento y función de los miRNAs	Pág 36
6. Ensayo de viabilidad para MCF-7 y MDA-MB231 en respuesta a diferentes dosis de radiación	Pág 63
7. Ensayo de proliferación para MCF-7 y MDA-MB231 en respuesta a diferentes dosis de radiación	Pág 65
8. Colonias clonogénicas MCF-7	Pág 66
9. Ensayo clonogénico	Pág 68
10. Ensayo clonogénico para MCF-7 y MDA-MB231 en respuesta a diferentes dosis de radiación	Pág 69
11. Porcentaje de viabilidad de células MCF-7 y MDA-MB231 RR	Pág 70
12. Porcentaje de proliferación para determinar la radioresistencia de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 RR	Pág 71
13. Ensayo clonogénico para determinar la radioresistencia de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 RR	Pág 73
14. Ensayo clonogénico. Fracción de sobrevivencia	Pág 73
15. Gráfica de volcano plot para obtener miRNAs con expresión diferencial	Pág 75
16. Expresión de cinco miRNAs	Pág 77

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es una de las enfermedades más devastadoras en el mundo debido a que no existe aún una cura o prevención efectiva que pueda disminuir los altos niveles de mortalidad. El CM representa un problema alarmante de salud en nuestro país, con una tendencia a seguir aumentando. La mortalidad por CM supera a la del cáncer de cérvix como principal causa de muerte por tumores malignos en México; asimismo, se ha colocado como la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años. En la Ciudad de México hay 1.7 millones de mujeres mayores de 35 años, es decir, en riesgo para CM. De manera inquietante, se ha estimado que cada dos horas muere una mujer por CM en México (Knaul *et al* 2009). El número elevado de muertes atribuidas a esta enfermedad es debido a que no existe una detección temprana, por lo cual es necesario ampliar el conocimiento de los procesos moleculares que modulan el desarrollo de la neoplasia. Estos datos también se deben a la falta de respuesta de las pacientes a los tratamientos, lo que muestra la necesidad de conocer los mecanismos moleculares de la resistencia a los tratamientos con la finalidad de implementar terapias más efectivas.

La radioterapia constituye una de las tres principales modalidades utilizadas en el tratamiento del cáncer e involucra la aplicación de rayos X, gamma o partículas atómicas de alta energía. Afecta a las células cancerosas que se están multiplicando rápidamente, mucho más de lo que afecta al resto de las células normales y tiene como aplicaciones principales el tratamiento del tumor primario, la reducción del tamaño del tumor antes de la cirugía, la eliminación de las células cancerosas después de la cirugía y el tratamiento del cáncer metastásico (Kurtz *et al* 2000). El 40-60% de los pacientes con cáncer de mama reciben radioterapia, sin embargo, la efectividad clínica del tratamiento difiere entre tumores individuales aún del mismo origen histológico. Particularmente, un número importante de pacientes desarrollan resistencia clínica a la radiación, por lo que la

respuesta adaptativa de los tumores continúa siendo un grave problema en la terapia del cáncer.

Los microRNAs (miRNAs) son reguladores de diversas funciones celulares. La expresión de los miRNAs está altamente regulada en los tejidos sanos, pero la desregulación de su expresión ha sido descrita como un evento común en cáncer (Erson *et al* 2009). Particularmente, su expresión se modifica por agentes que dañan al DNA como la radiación o los fármacos quimioterapéuticos. La función de los miRNAs en las vías de respuesta al daño del DNA en cáncer aun no ha sido caracterizada, sin embargo algunos miRNAs pueden modular la respuesta a la terapia citotóxica a través de la regulación de genes que participan en la respuesta al daño al DNA (Weidhaas *et al* 2007).

Actualmente no se han determinado los perfiles de expresión de miRNAs en células tumorales de mama radioresistentes. La obtención de un perfil de expresión en miRNAs en modelos de radioresistencia representa un enfoque novedoso para encontrar marcadores moleculares de respuesta a radioterapia. La falta de conocimiento con respecto a marcadores moleculares de respuesta a la radioterapia ha permitido el manejo inadecuado de algunos tipos de tumores, por lo que la identificación de nuevos marcadores asociados con la resistencia a la radioterapia es uno de los objetivos primordiales de la investigación oncogenómica (Heneghan *et al* 2010).

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. CÁNCER DE MAMA

#### 1.1 Antecedentes

El cáncer de mama (CM) o carcinoma de mama, es una neoplasia maligna que tiene su origen en la proliferación acelerada e incontrolada de células en el tejido mamario (Robbins *et al* 2009).

Las glándulas mamarias son órganos característicos de los mamíferos encargados de producir leche. Son glándulas exocrinas formadas por lobulillos que se agrupan formando lóbulos, donde se produce la leche que es transportada al pezón a través de ductos.

El pezón por donde emerge la leche se encuentra rodeado por una areola y por debajo de la epidermis y rodeando a la glándula hay tejido de sostén constituido por tejido adiposo y conectivo fibroso (**Figura 1**). En un 80 % de los casos de CM las neoplasias son ductales y el resto corresponde a tumores lobulillares (Avello *et al* 2002).

La transformación de las células epiteliales de la mama para dar lugar finalmente al CM metastásico se da por una amalgama de cambios genéticos, epigenéticos e interacciones aberrantes dentro del microambiente. Durante este proceso con múltiples etapas, se desregula el control de la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la migración celular, dándose interacciones aberrantes entre las células tumorales y las células del estroma que facilitan este proceso (Fattaneh *et al* 2003).

El CM puede iniciar como una lesión pre-maligna conocida como hiperplasia atípica ductal (HAD) donde se encuentran células intraluminares anormales. Se piensa que las lesiones HAD son precursoras del carcinoma ductal *in situ* (CDIS), que son lesiones no invasivas que contienen células anormales proliferando dentro del ducto. En cada una de las etapas del desarrollo de CM, el riesgo de desarrollo maligno o CM invasivo (CMI) aumenta. El CDIS puede dar lugar al CMI, pero no está claro cómo predecir cuál va a ser la progresión de las lesiones. Una vez que las células han invadido otros tejidos, el riesgo de desarrollar metástasis aumenta significativamente, generando tumores en otros órganos no adyacentes. Para formar metástasis, las células deben atravesar la membrana basal, entrar en la vasculatura (intravasarse), sobrevivir a la falta de adherencia, extravasarse y establecer un nuevo tumor en un microambiente extraño. Los ganglios linfáticos son el principal sitio de metástasis del CM (Fattaneh *et al* 2003).

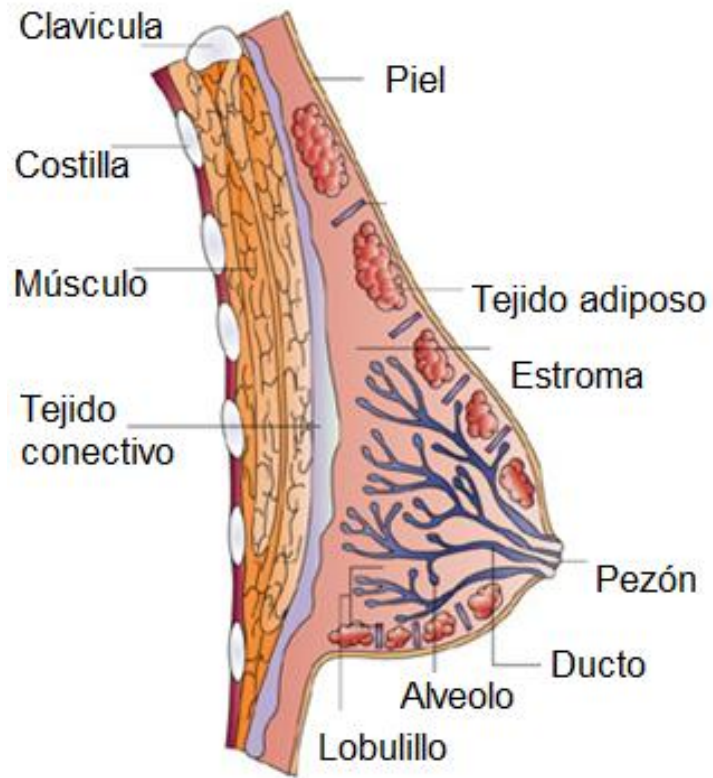


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria. Tomada y modificada de Ali *et al* (2002)

### 1.1.2 Clasificación del CM

El cáncer de mama ha sido clasificado en base a diferentes parámetros los cuáles toman en cuenta la estadificación, histopatología y la presencia de receptores.

El sistema de estadificación *TNM* para el cáncer de mama se basa en el tamaño del tumor (T), su diseminación a los ganglios linfáticos en las axilas (N), y la presencia de metástasis (M). Los tumores de mayor tamaño, de propagación nodal y metastásicos tienen un mayor número de grado en el estadio y un peor pronóstico (Fattaneh *et al* 2003).

La estadificación principal incluye: Estadio cero: es una enfermedad premaligna o con marcadores positivos (a veces llamada CDIS: *carcinoma ductal 'in situ'*).

- Los estadios I-III se definen como los inicios del cáncer y potencialmente curables.
- El estadio IV se define como cáncer en etapa avanzada y/o cáncer metastásico porque el cáncer se diseminó hasta otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia hasta los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro y se considera incurable.

Con respecto a la clasificación histopatológica, esta se basa en la localización del tumor en la glándula mamaria. La mayoría de los tipos de cáncer de mama derivan de la unidad ducto-lobulillar (Ali *et al* 2002). El término *carcinoma in situ* se refiere al tipo de cáncer que se encuentra en los ductos o los lobulillos glandulares, sin invadir los tejidos adyacentes. Por su parte, el *carcinoma invasivo* prolifera en demasía hasta romper la membrana basal e infiltrándose a los tejidos que rodean a los ductos y lobulillos mamarios, penetrando así el tejido circundante.

Y por último, se encuentra la clasificación basada en la expresión de los receptores hormonales y de crecimiento epidermal. Estos receptores son el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2/neu. Estos tres receptores pueden afectar a las células del cáncer de mama aumentando la capacidad de proliferar de éstas. A las células que expresan alguno de estos receptores se les coloca un signo positivo para el receptor correspondiente y un signo negativo si está ausente: ER+ (positivo), ER- (negativo), PR+ (positivo), PR- (negativo), HER2+ (positivo) y HER2- (negativo). Aquellas células que no expresan ninguno de estos receptores se denominan basales o triple negativo. Muchos tipos de CM son sensibles a los estrógenos, lo cual significa que el estrógeno hace que el tumor crezca. Este tipo de cáncer se denomina cáncer positivo para receptores de estrógenos o cáncer positivo para ER (Zepeda-Castilla *et al* 2008).

Aproximadamente el 30% de las pacientes con cáncer de mama tienen lo que se conoce como cáncer de mama triple positivo (ER+, PR+ y HER2+), el 50% corresponde al tipo Luminal A (ER+, PR+ y HER2-), y el 20% corresponde al tipo basal o triple negativo (ER-, PR-, HER2-).

## **1.2 Epidemiología**

### 1.2.1 Cifras a nivel mundial

A nivel mundial, el CM es el cáncer más común entre las mujeres, registrándose 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad. Éste es el cáncer más prevalente a nivel mundial: en los últimos cinco años hay 4.4 millones de mujeres que viven con la enfermedad. Para el 2012 se proyectaban 1.5 millones de nuevos casos (Jemal *et al* 2010).

El CM corresponde al 10.5% de todos los nuevos casos de tipos de cáncer, siendo el de pulmón el que registra más casos (Boyle *et al* 2008; Beaulieu *et al*



2009). El 45% de los casos, así como la mayoría de las muertes por CM, se registran en los países en vías de desarrollo, y se estima un aumento en las proporciones tanto de casos como de muertes (Boyle *et al* 2008; Porter *et al* 2008).

La mortalidad por cáncer mamario se concentra en los países en vías de desarrollo debido, en gran medida, a la falta de acceso a la detección temprana y al tratamiento, y muestra una relación clara con el nivel de desarrollo del país. La letalidad medida como la razón de mortalidad y nuevos casos (entre mujeres) es del 56%, 44% y 39% entre los países de ingresos bajos, medio-bajo y medio-alto, respectivamente; comparado con el 24% observado en los países de ingresos altos (Beaulieu *et al* 2009).

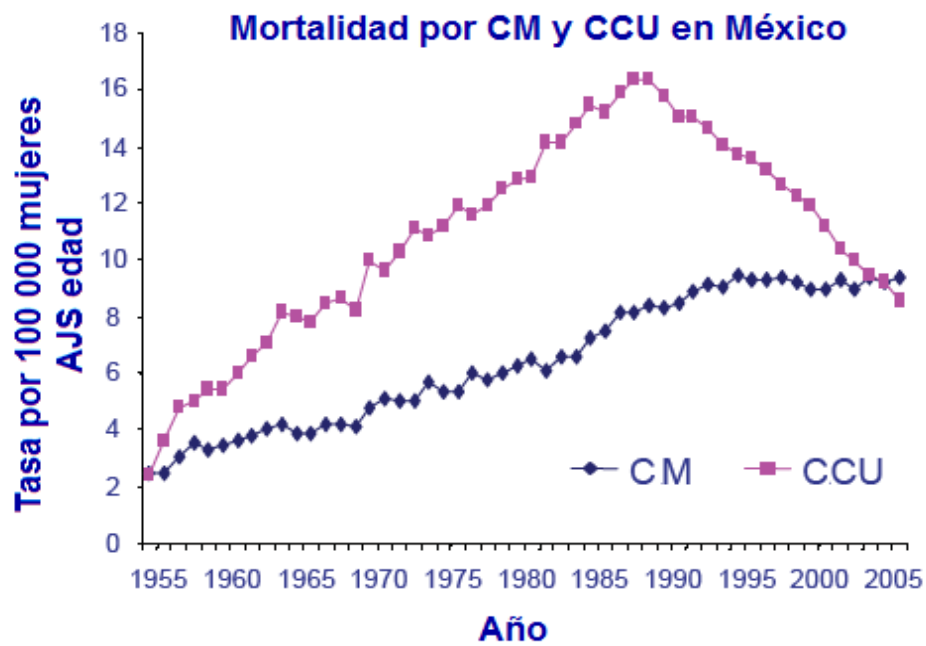
Debido a las muertes tempranas por CM, la Organización Mundial de la Salud ha estimado que los años de vida perdidos (AVISA) por CM son alrededor de 600,000 en la región de Latinoamérica, cifra tres veces mayor que los AVISA por cáncer pulmonar. En ausencia de intervenciones efectivas en los sistemas de salud para la detección y control del cáncer mamario la cifra aumentará a 900,000 AVISA por CM en el 2020 (Murray *et al* 1996).

### 1.2.2 Cifras en México

En México, 12 mujeres mueren diariamente a causa de CM, lo cual representa, aproximadamente, una tercera parte de las pacientes diagnosticadas con este tumor maligno. La tendencia observada en la mortalidad de esta enfermedad muestra incrementos constantes; basta mencionar que en el período de 1980 a 2005 se registró un total de 67,854 defunciones por CM, con un aumento estimado anual del 3.6% en los últimos 18 años (Franco *et al* 2009). Adicionalmente, a partir de 2006 el CM es la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 54 años y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cérvico-uterino (CCU) (**Figura 2**).

La supervivencia de las pacientes con cáncer mamario es inversamente proporcional al estadio del tumor (i.e., a mayor estadio, menor supervivencia). Las mujeres con tumores diagnosticados *in situ* tienen una supervivencia mayor al 95% durante los próximos cinco años, en contraste con 27% para las mujeres diagnosticadas en estadios III y IV, que presentan metástasis distales.

La evidencia sobre México sugiere que la detección tardía sigue siendo la norma y no la excepción, en contraste, por ejemplo, con la situación en los Estados Unidos, donde aproximadamente el 60% de los cánceres mamarios son diagnosticados en estadio I (en México la cifra se estima menor al 10%). De hecho, entre 40 y 50% de los casos se presentan en estadios III y IV y se ve poca mejoría en estos porcentajes desde principios de los años noventa (Knaul *et al* 2009).



**Figura 2.** Mortalidad por cáncer mamario (CM) y cérvico-uterino (CCU) en México de 1955 a 2007 (Tasa por 100 mil mujeres, ajustado por edad). Tomada y modificada de Knaul *et al* (2008 y 2009), con base en datos de la OMS (1955-1979) y la Secretaría de Salud (1978-2002).

### 1.3 Marcadores moleculares asociados al desarrollo de CM

Se han descrito diversos marcadores moleculares asociados al desarrollo de CM como la presencia de receptores hormonales y algunos de proliferación celular como HER 2/neu, p53, nm23, Bcl-2 (Lage *et al* 1983; Schaefer *et al* 1984; Young *et al* 1984). Estos factores se han encontrado desregulados en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, HER2 el cual pertenece a la familia de los receptores de factor de crecimiento epidermal (EGFR), teniendo un papel muy importante en la proliferación celular (Olayioye *et al* 2001). Aunque se ha encontrado HER2 sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer, en CM se sobre-expresa en un 30% de los pacientes (Ning *et al* 2009).

Por otro lado, p53 se ha identificado como una importante proteína que actúa como guardián del genoma (Lane *et al* 1992). Es un gen supresor de tumor que mantiene la integridad genómica después de un estrés celular actuando como un factor de transcripción de una serie de genes que están involucrados en mecanismos como apoptosis o arresto del ciclo celular seguido de reparación, para prevenir la propagación del daño del DNA (Ponten *et al* 2001). Mutaciones en p53 son encontradas en 20-40% de los carcinomas de mama (Borresen *et al* 2003; Olivier *et al* 2006).

La siguiente variante más relacionada con CM se halla en la región 16q12, en un bloque de desequilibrio de ligamiento que contiene al gen *TNRC9* y cuya expresión puede predecir la capacidad metastásica de los tumores primarios a hueso (Smid *et al* 2006). La señal en 5p12 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen *MRPS30*, que codifica para una proteína de ribosomas mitocondriales que interviene en el proceso de apoptosis. Por otro lado, la variante situada en 5q11 se halla en el bloque de desequilibrio de ligamiento donde se localizan tres genes; el *MAP3K1* es el candidato más interesante, ya que codifica

a una cinasa activada por mitógenos que interviene en el control de señalización celular.

En cuanto al *locus* 2q33, la región incluye el gen *CASP8*, participante en la apoptosis, aunque el bloque de desequilibrio de ligamiento también incluye a otros genes cuya función no se ha determinado en el cáncer.

La asociación con variantes en 8q24 se localiza en una región muy interesante, ya que diversos estudios la han encontrado vinculada con el cáncer de próstata (Gudmundsson *et al* 2007), colon (Tomlinson 2007) y vejiga (Kiemenev 2008). A pesar de la cercanía con el oncogén *C-MYC*, las bases moleculares que explican cómo estas variaciones afectan la carcinogénesis todavía se desconocen.

Todos estos marcadores moleculares se han identificado y correlacionado con el riesgo y la frecuencia del desarrollo del CM (**tabla 1**).

**Tabla 1.** Factores genéticos de predisposición a CM

Penetrancia	Gen/Locus	Riesgo relativo	Frecuencia de portadores	Metodología
<b>Alta</b>	<i>BRCA1</i>	>10	0.1%	Ligamiento
	<i>BRCA2</i> <i>p53</i>		Muy baja	Resecuenciación de genes candidato
<b>Incierta</b>	<i>PTEN</i>	2-10	Muy baja	Ligamiento
	<i>STK1 1</i>		Muy baja	
	<i>CDH1</i>		Muy baja	
<b>Intermedia</b>	<i>ATM</i>	2-3	0.4%	Resecuenciación de genes candidato
	<i>CHEK2</i>		0.4%	
	<i>BRIP1</i>	2-4	0.1%	
	<i>PALB2</i>		Muy baja	
<b>Baja</b>	10q26,16q12,2q35,	1.08-1.26	24-50%	Asociación de genoma completo
	8q24,5p12	1.07-1.13	28-30%	
	11p15,5q11	1.13	0.87%	
	2q33			

Tomada y modificada de Hidalgo *et al* (2009).

## 1.4 Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento del CM es multidisciplinario, es decir precisa la combinación de diversas modalidades o disciplinas terapéuticas para conseguir un control eficaz de la enfermedad. Las modalidades terapéuticas contra el CM son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia hormonal. Las dos primeras actúan a nivel local, es decir sobre la enfermedad en la mama y los ganglios linfáticos y constituyen el tratamiento de elección en la enfermedad localizada no metastásica. Las restantes actúan tanto a nivel local, como general de todo el organismo, en lo que se denomina tratamiento sistémico, y se utilizan de forma complementaria al tratamiento local con cirugía y/o radioterapia o como tratamiento de primera elección en la enfermedad metastásica o diseminada (Harrison *et al* 2006).

### 1.4.1 Cirugía

La cirugía tiene como finalidad extirpar el tumor en su totalidad a nivel local, es decir a nivel de la mama y de los ganglios linfáticos. El primer tratamiento quirúrgico eficaz fue la mastectomía asociada a la extirpación de los ganglios linfáticos axilares. En el último cuarto de siglo XX se comenzó a considerar la posibilidad de tratar localmente la enfermedad mamaria extirpando sólo la parte de la glándula en la que se había desarrollado el tumor, dando lugar al concepto de cirugía conservadora de la mama también denominada tumorectomía o lumpectomía (Nattinger *et al* 2005).

### 1.4.2 Quimioterapia

Es el tratamiento con medicamentos que matan a las células cancerosas. Se administran por vía intravenosa o vía oral, y viajan a través del torrente sanguíneo hasta alcanzar las células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo (Citron *et al* 2003).

Las modalidades de aplicación de la quimioterapia en los pacientes con CM pueden ser las siguientes:

a) Quimioterapia adyuvante

La quimioterapia adyuvante es la que se administra después de la cirugía. Su indicación depende de los factores pronóstico clásicos que son la edad, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar, el grado de diferenciación celular (grado histológico) y la expresión de los receptores hormonales. Si los ganglios axilares son negativos de infiltración tumoral, las pacientes se clasifican en bajo y medio-alto riesgo. Las de bajo riesgo (receptores hormonales positivos, tumores menores de 2 cm, grado medio-alto I histológico y mayores de 35 años) no son susceptibles de quimioterapia adyuvante. Las de riesgo medio-alto (receptores hormonales negativos o receptores hormonales positivos pero con grado II-III histológico y tumores mayores de 2 cm), se benefician de la quimioterapia adyuvante. Algunos de los fármacos más utilizados son el Cis-platino el cuál se une al DNA de las células cancerosas provocando la muerte celular por apoptosis, el Docetaxel que es un agente que inhibe el crecimiento de los microtúbulos, y la Doxorubicina el cuál es un fármaco que se intercala en el DNA de las células cancerosas provocando la muerte celular (Clarke *et al* 2005).

b) Quimioterapia neoadyuvante

Es la quimioterapia que se administra antes de la cirugía. Está indicada en los cánceres de mama localmente avanzados y en aquellos que midan más de 3 cm o que tengan adenopatías axilares. Se suele utilizar adriamicina y taxanos. La intención de la neoadyuvancia es principalmente la disminución del tamaño tumoral para practicar una cirugía conservadora (lumpectomía en lugar de mastectomía) y la valoración de la respuesta a la quimioterapia para posteriores tratamientos (Joensuu *et al* 2006).

### 1.4.3 Terapia hormonal

La terapia hormonal es otra forma de terapia sistémica. Se utiliza más como una terapia adyuvante para reducir el riesgo de la recurrencia del cáncer después de la cirugía, pero también se utiliza como tratamiento neoadyuvante. Es muy utilizada en el tratamiento contra el cáncer que es recurrente después de ser tratado o que es invasivo.

Esta terapia se basa en la presencia de receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR). Al ser el CM positivo para cualquiera de estos dos receptores, se puede administrar medicamentos que sean bloqueadores hormonales, como el Tamoxifeno, que disminuye la velocidad del crecimiento del cáncer bloqueando a los receptores de estrógeno (Zepeda-Castilla *et al* 2008).

Otro receptor involucrado en esta terapia es el receptor de factor de crecimiento epidermal HER2, el cual regula el crecimiento y proliferación de las células. Se ha observado que en CM está sobre-expresado en el 30% de los casos. Estimula al tumor a crecer con mayor rapidez y por lo tanto dificulta el tratamiento en estos pacientes (Zepeda-Castilla *et al* 2008)

En base a la presencia de estos tres receptores, se puede aplicar diferentes tratamientos (Brenton *et al* 2005):

- ER+ y PR+, pero HER2- (Luminal): pueden darse diferentes tratamientos como tamoxifeno, anastrozol y letrozol.
- ER+, PR+ y HER2+ (HER2/neu, Triple positivo): se utiliza el tamoxifeno y/o trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal que tiene como blanco a HER2 , inhibiendo su función.

### 1.4.4 Radioterapia

La radioterapia es muy utilizada para el tratamiento del CM. Ésta involucra la aplicación de rayos X, gamma o partículas atómicas de alta energía. Afecta a



las células cancerosas que se están multiplicando rápidamente, mucho más de lo que afecta al resto de las células normales. Tiene como aplicaciones principales el tratamiento del tumor primario, la reducción del tamaño del tumor antes de la cirugía, la eliminación las células cancerosas después de la cirugía y el tratamiento del cáncer metastásico (Kurtz *et al* 2000).

Los cambios biológicos que se dan como consecuencia de la radiación ionizante dependen de la energía y del tiempo de exposición a la radiación, pero también son importantes factores biológicos como el ciclo celular, la eficiencia en los procesos de reparación del DNA y la muerte celular.

Cuando las células son expuestas a la radiación ionizante primero ocurren los efectos físicos estándares entre la radiación y los átomos y las moléculas de las células, y posteriormente se genera el posible daño biológico en las funciones celulares. Los efectos biológicos de la radiación resultan principalmente del daño en el DNA, él cual es el blanco principal dentro de la célula. Sin embargo, existen otros blancos celulares que cuando se dañan pueden conducir a la muerte celular. Cuando las células son expuestas a radiación ionizante, el daño a la célula puede ocurrir en forma directa o indirecta (Suntharalingam *et al* 2005) (**Figura 3**). En la acción directa, la radiación interactúa directamente con los blancos celulares (como el DNA), es decir, los átomos del blanco celular pueden ser ionizados o excitados conduciendo a una cadena de eventos químicos y físicos que a la larga producirán daño biológico (Joensuu *et al* 1999). La acción directa es el proceso dominante en la interacción de partículas con alto LET (Transferencia de energía lineal) con la materia biológica, generando el rompimiento de la doble cadena de DNA y provocando la muerte celular.

En la acción indirecta la radiación interactúa con otras moléculas o átomos, principalmente con el agua, ya que representa el 80% del contenido celular. Durante esta acción se producen radicales libres que difunden rápidamente y pueden dañar a los blancos celulares. Los radicales libres como el  $\text{H}_2\text{O}^+$  (ión del agua) y el  $\text{OH}^-$  son de muy corta duración y por lo tanto extremadamente reactivos.

Debido a que sólo presentan un electrón de valencia, pueden romper enlaces químicos y producir cambios químicos que conducen al daño biológico. Cerca de dos tercios del daño biológico producido por radiación con bajo LET como son los rayos X, la radiación  $\gamma$  y los electrones rápidos son debidos a la acción indirecta. La acción indirecta puede ser modificada por sensibilizadores químicos o protectores de radiación (Riley 1999).

Por lo tanto, la radioterapia puede inducir daño directo al DNA, produciendo rompimientos de la cadena sencilla y doble que ocasionan alteraciones genéticas, re-arreglos cromosómico y muerte celular. También puede modificar la expresión de enzimas antioxidantes y generar radicales libres, los cuales representan la fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan el DNA, RNA, lípidos y proteínas, ocasionando graves efectos citotóxicos (Schmidt-Ulrich *et al* 2000).

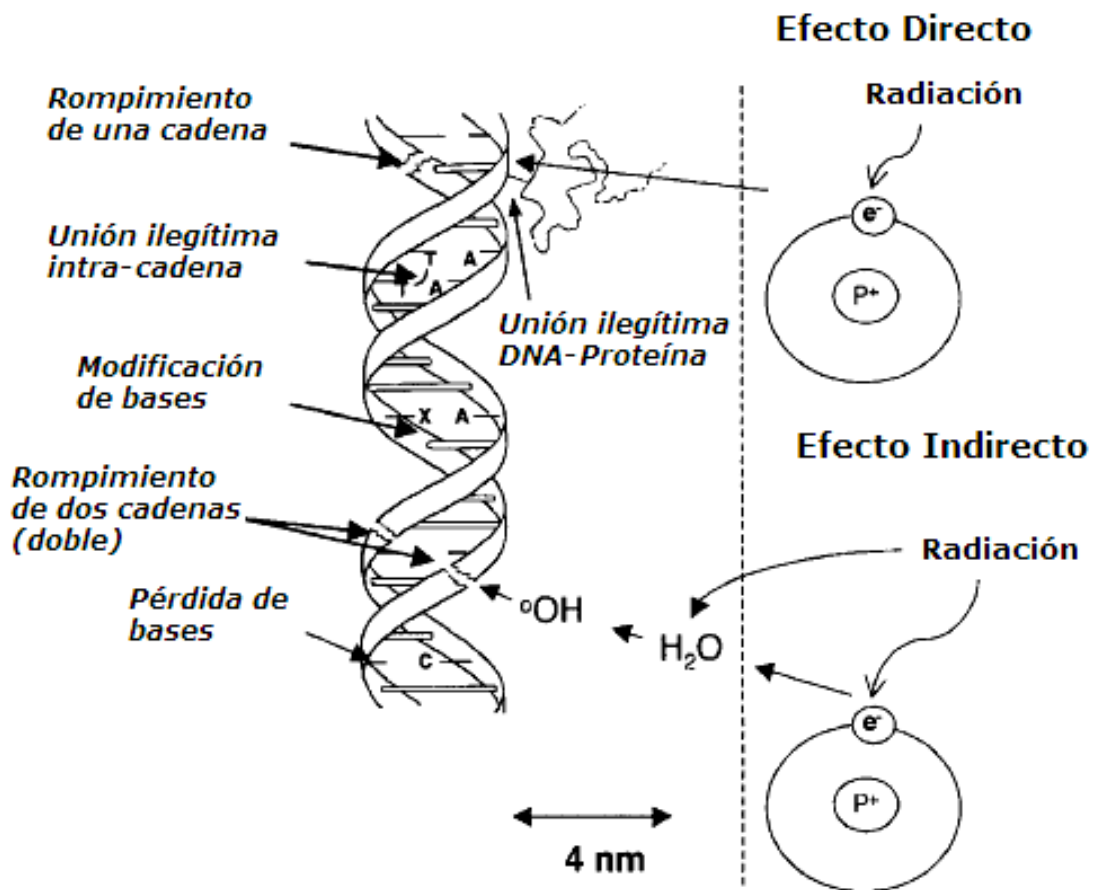


Figura 3. Representación esquemática de las lesiones directas e indirectas al DNA inducidas por la radiación. Tomado de Pouget *et al* (2001).

## 1.5 Radioterapia y radioresistencia en Cáncer de mama.

### 1.5.1 Mecanismos moleculares en respuesta a la radioterapia

La radioterapia es muy utilizada en la clínica como una modalidad esencial contra el cáncer. Particularmente este tratamiento se utiliza en el 40-60% de los pacientes con CM. Evidencias sugieren que la radiación induce inestabilidad genómica, causa resistencia adaptativa e induce una respuesta apoptótica (Kazi *et al* 2006).

La respuesta celular a la radiación incluye la reparación del DNA, arresto del ciclo celular y apoptosis. Es regulada por números genes, como ataxia-telangiectasia mutada (ATM), la proteína supresora de tumor p53 y todos sus blancos, y los genes relacionados con el chequeo del daño al DNA incluyendo cinasas ciclin-dependientes (CDKs) y la familia de las proteínas CDC25 (Barlow *et al* 1997; Canman *et al* 1998; Iliakis *et al* 2003; Can *et al* 2007).

La primera respuesta celular a la radiación es el reconocimiento de las lesiones en el DNA por los puntos de chequeo del daño de éste, que dirige a la reparación del mismo, arrojando el ciclo celular en las fase G1, G2 y M, y disminuyendo también la fase S (Li *et al* 2001). Todos estos puntos de chequeo en respuesta al daño generado por la radiación, conllevan a la transducción de señales que comprenden proteínas cinasas y componentes efectores que tienen como blanco a moléculas de la maquinaria del ciclo celular (Li *et al* 2001). Uno de los principales efectores es la Ataxia telangiectasia mutada (ATM), la cuál esta involucrada en crecimiento anormal y radiosensibilidad. La ATM cinasa es un miembro de la familia de las fosfatotidilinositos 3-cinasas (PI3K). Se ha identificado que la ATM cinasa es un componente principal de la vía de chequeo el daño al DNA, ya que se ha visto que después de una exposición a radiación ionizante, la ATM cinasa es activada inmediatamente, lo que resulta en la fosforilación de

proteínas involucradas en la reparación del DNA, apoptosis y arresto del ciclo celular. Una de estas proteínas es p53, cuya fosforilación por la ATM cinasa activada por radiación activará mecanismos de arresto del ciclo celular y apoptosis (Marchetti *et al* 2003).

BRCA1, un gen supresor de tumor que juega un papel importante en la reparación del daño al DNA. Se ha demostrado que BRCA1 también es fosforilado por la ATM cinasa en respuesta al daño. Esta fosforilación es importante para la función de BRCA1, ya que cuando la proteína BRCA-1 está mutada en sitios de fosforilación, no se lleva a cabo la reparación del daño al DNA causado por la radiación.

La sensibilidad de la célula a la radiación es afectada también por varios factores incluyendo el rango del crecimiento celular, la ploidía del DNA y la presencia de inhibidores de la reparación del DNA o desacetilación de histonas (Schwartz 1992; Schwartz *et al* 1999; Cuneo *et al* 2007; Kasten-Pisula *et al* 2007). Además, la actividad de genes como el de la proteína Akt cinasa B (PKB) influye en la radio-sensibilidad (Brognard *et al* 2001; Toulany *et al* 2008).

#### 1.5.2 Mecanismos de radioresistencia

Aunque la radioterapia es utilizada en la mayoría de los pacientes con CM, del 30 al 40% de los pacientes presenta una resistencia a este tratamiento. Muchos factores están involucrados en la resistencia a la radioterapia. Hasta el momento se han descrito varios factores tanto nucleares como receptores membranales en CM (**figura 4**). Estos factores están relacionados con diferentes mecanismos como reparación de DNA, apoptosis, arresto del ciclo celular, crecimiento celular, sobrevivencia y proliferación.

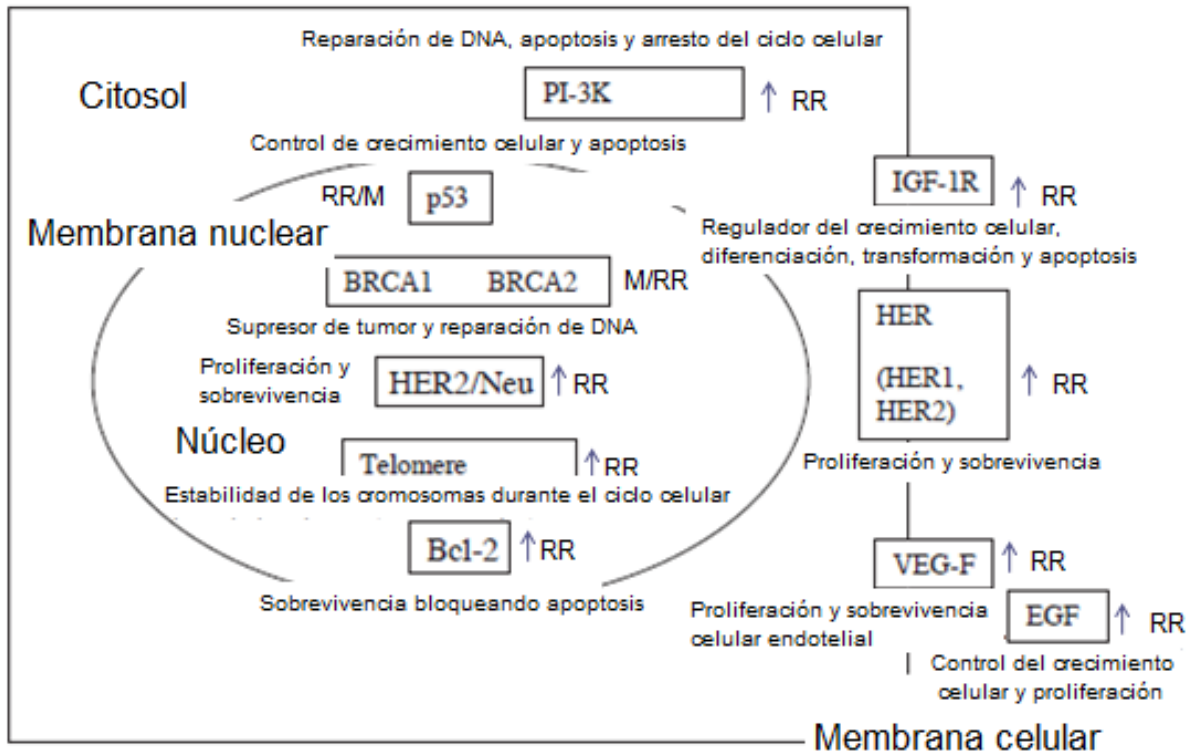


Figura 4. Mecanismos y factores implicados en la radioresistencia en CM; ↑= sobre expresión, M= mutación, RR= radioresistencia (Tomada y modificada de Jameel *et al* 2004)

Los factores implicados en la radioresistencia son:

- Receptor del factor-1 de crecimiento tipo insulina (IGF-IR): es una tirosin cinasa que regula el crecimiento celular, diferenciación, transformación y apoptosis. También ha sido implicado en el desarrollo de CM (Peretz *et al* 2001). En tumores de mama, los niveles de IGF-IR y su sustrato IRS-1, están elevados y esta característica se ha relacionado con radioresistencia y recurrencia (Bartucci *et al* 2001; Turner *et al* 1997). Experimentos de de inhibición de la expresión del RNAm de IGF-IR en células de melanoma de ratón conllevaron al fenotipo de radiosensibilidad (Macaulay *et al* 2001). También se reportó una conexión entre la función de ATM y la expresión de IGF-IR, ya que la sobreexpresión de ATM resulta en el incremento de la actividad del promotor de IGF-IR y por lo tanto en los niveles de IGF-IR, convirtiendo a las células en células radioresistentes, lo que confirma que la disminución de la expresión de IGF-IR contribuye a la radiosensibilidad (Peretz *et al* 2001)
- Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K): esta ruta tiene un papel crítico en la progresión celular promoviendo proliferación celular e inhibiendo apoptosis (Shtivelman *et al* 2003). La Serin/Treonin cinasa (Akt) es efector clave en la vía de PI3K, el cuál da origen a la iniciación de la fase S del ciclo celular. Se ha demostrado que la actividad de PI-3K/Akt contribuye a la resistencia a la radiación ionizante en células de CM, ya que al inhibir esta vía, se sensibilizan a las células de CM a la radioterapia (Liang *et al* 2003).
- Factor de crecimiento epidermal (EGF): regula el crecimiento y proliferación en células normales. Se ha demostrado que la administración de EGF a la línea celular MCF-7 de CM antes de la irradiación, aumenta la radioresistencia de las células. Dicho efecto fue

revertido mediante la adición de un anticuerpo específico para el receptor de EGF (Wollman *et al* 1994).

- Receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER): regula el crecimiento y la proliferación (Earp *et al* 2003). Su sobreexpresión correlaciona con la resistencia a radioterapia y otras terapias adyuvantes (Shtivelman *et al* 2003; Wollman *et al* 1994). Por otra parte, la utilización de inhibidores de HER afecta la respuesta celular a la radiación ionizante en diferentes formas, induciendo apoptosis, arrestando el ciclo celular e impidiendo la reparación del DNA.
- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF): es un importante mediador de la proliferación y supervivencia celular endotelial. Varios estudios experimentales han demostrado la relación entre el aumento en la expresión de VEGF y la radioresistencia (Gorski 1999 *et al*; Gupta *et al* 2002; Homer *et al* 2001). Se ha asociado la poca eficacia en la respuesta a la radioterapia al hecho de que los tumores son hipóxicos, y se ha observado que VEGF se sobreexpresa en estas condiciones (Manders *et al* 2003). Varios estudios han demostrado el incremento en la respuesta a radiación ionizante utilizando agentes anti-angiogénicos y radioterapia (Marchetti *et al* 2003).
- P53: las mutaciones en este gen localizado en el cromosoma 17p son las alteraciones más comunes en el carcinoma primario de mama. P53 está implicado en múltiples procesos como son el control del crecimiento y apoptosis; además, mutaciones en este gen se han asociado con quimio y radioresistencia (Marchetti *et al* 2003). El mecanismo por el cual se genera radioresistencia cuando p53 está mutado no es del todo comprendido, pero se cree que es la pérdida del control del ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis, lo que contribuye a la resistencia al tratamiento.



- BRCA1 y BRCA2: son genes de predisposición a CM que son responsables del 80-90% del CM hereditario (Thull *et al* 2001). Funcionan como genes supresores de tumor y participan en la reparación de DNA, específicamente en reparación excisión de un nucleótido (NER) y recombinación homologa (HRR). Se ha demostrado que la presencias de mutaciones en estos dos genes aumenta la radiosensibilidad (Xia *et al* 2001). En otro estudio, se encontró una disminución en la regulación de HRR en células con BRCA-2 mutado (Abbot *et al* 1999).
  
- Telomeros: son responsables de mantener la estabilidad de los cromosomas durante el ciclo celular y son importantes en la respuesta celular al daño del DNA. En un estudio de la longitud de los telomeros en células de linfoma murino radioresistentes y radiosensibles usando hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), se demostró que la reducción de la longitud de los telomeros está relacionado con la radiosensibilidad de las células (McIlrath *et al* 2001)
  
- Bcl-2: es un proto-oncogen expresado en tejidos normales y tumorales, que promueve la sobrevivencia celular, bloqueando la apoptosis. Se ha visto que la sobreexpresión de Bcl-2 está asociada tanto al CM como a la resistencia a radiación (Knowlton *et al* 1998; Provenzano *et al* 2003).

### 1.5.3 Expresión diferencial de genes en respuesta a la radioterapia

Muchos estudios han reportado una correlación entre la expresión genética y la respuesta a la radioterapia (Lenhert *et al* 2000; Joki *et al* 2001) y la radiosensibilidad *in vitro* (Rosen *et al* 1999). La radiación induce la activación de procesos de señalización que afectan el patrón de la expresión genética y la actividad de enzimas específicas. Cambios en la expresión de diferentes genes

involucrados en el mecanismo de supervivencia, apoptosis, proliferación, reparación de DNA, supresores de tumores y crecimiento celular han sido previamente descritos (Christos *et al* 2003).

Uno de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes que conllevan a las diversas alteraciones asociadas al desarrollo del cáncer en general y del cáncer de mama en particular, son los miRNAs.

## **2. MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de 21-25 nucleótidos, que regulan la traducción de mRNAs específicos (Lagos *et al* 2001). Los miRNAs dirigen el complejo de silenciamiento a los mRNAs blanco a través de la secuencia complementaria parcial de la región 3'UTR, dando como resultado la supresión de la traducción de éstos (Gregory *et al* 2005).

### **2.1 Biogénesis de miRNAs**

El miRNA primario de aproximadamente 1 kb, es inicialmente transcrito por la RNA polimerasa II a partir de una región no codificante o un gen miR. Un pri-miR regularmente contiene la secuencia de diferentes miRNAs y es caracterizado por una horquilla imperfecta de bases apareadas. Esta horquilla es reconocida por una RNasa III nuclear denominada DROSHA, la cuál contiene dominios de unión al RNA de doble cadena. DROSHA junto a una proteína denominada DGCR8 corta el pri-miRNA en RNA de doble cadena, formando un RNA de aproximadamente 70 nucleótidos con una estructura de horquilla y con dos nucleótidos sin aparearse en la región 3', denominado pre-miRNA. Una vez reconocido por la exportina 5 y una Ran-GTPasa, el pre-miRNA es transportado del núcleo al citoplasma (**Figura 5**) (López-Camarillo *et al* 2012).

En el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por una proteína llamada Dicer, la cuál reconoce RNA de doble cadena, generando un miRNA de doble cadena de aproximadamente 22 nucleotidos (Denli *et al* 2004). La cadena termodinámicamente más estable, la cuál es generalmente la de 3´ a 5´, funciona como un miRNA maduro, el cuál se va a incorporar a un complejo de ribonucleoproteínas denominado RISC. Este complejo RISC está compuesto por una familia de proteínas llamadas Argonautas (AGO), las cuáles van a reconocer al mRNA blanco que por complementaridad total o parcial, será reconocido por el miRNA maduro (Yi *et al* 2003).

En humanos, se han reconocido a cuatro proteínas AGO, las cuales participan en la regulación negativa del mRNA, pero solo AGO2 es capaz de cortar al mRNA blanco. Las cuatro proteínas AGO tienen dominios conservados característicos, un N terminal, MID (Amino de en medio), PAZ (Zwile Piwi Argonauta) y PIWI. El dominio PAZ reconoce al miRNA maduro y lo incorpora al complejo RISC. El dominio PIWI presenta un sitio conservado para la unión de la región 5´ del mRNA y actividad de endonucleasa (Orom *et al* 2008).

Se ha observado que la asociación del complejo RISC con el miRNA unido a su mRNA blanco, puede inhibir la traducción, evitando la unión de los ribosomas al mRNA. Por otro lado, el complejo RISC contiene proteínas reguladoras como GW182, la cuál es una proteína que interactúa con las proteínas AGO, reclutando al complejo de desadenilación hacia el dúplex de miRNA-mRNA. El complejo de desadenilación llamado CCR4-NOT, tiene la capacidad de quitar el la cola de poli(A) del extremo 3´ de los mRNAs blanco, lo que representa la primera etapa de la degradación de los mRNA en los denominados *P-bodies* en el citoplasma (Place *et al* 2008).

En conclusión, los miRNAs regulan la expresión genética por medio de la degradación del mRNA y/o la inhibición de la traducción.

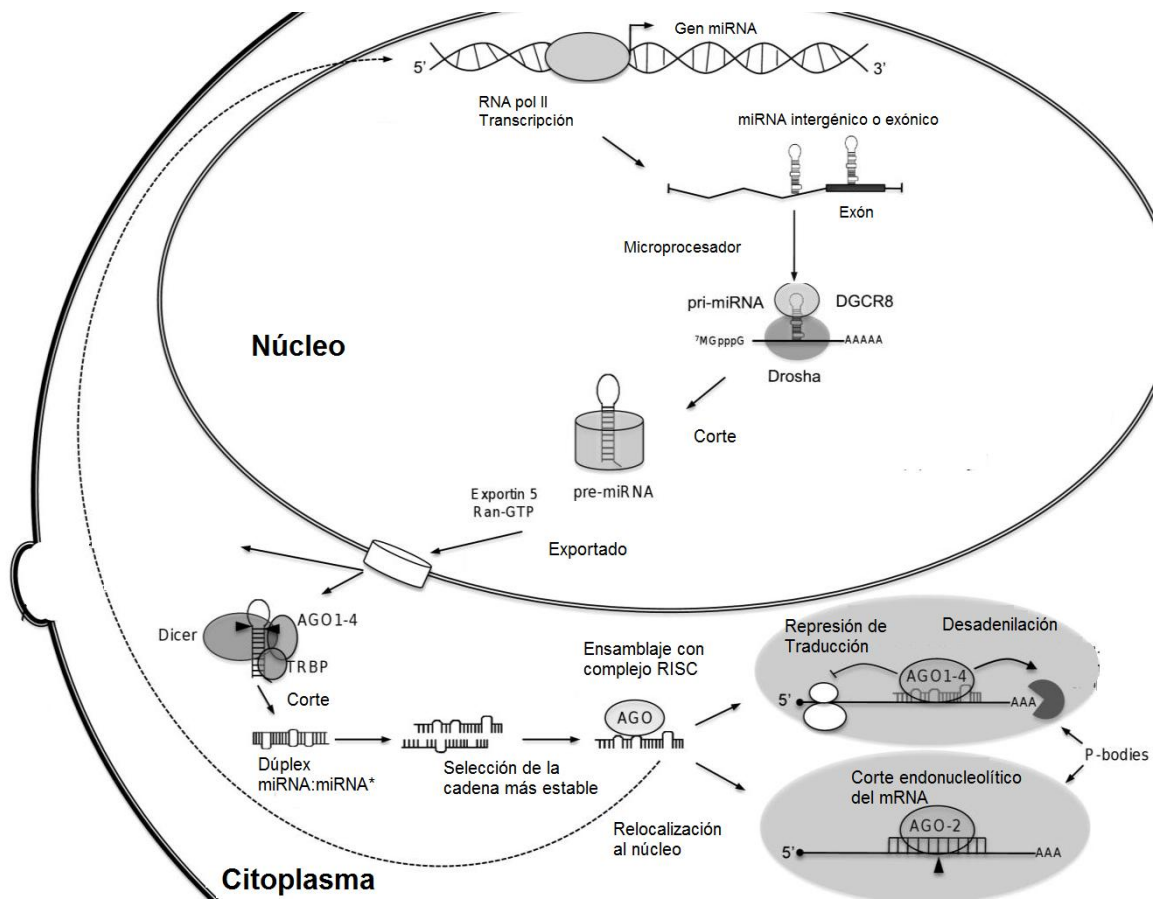


Figura 5. Procesamiento y función de los miRNAs (tomada y modificada de López-Camarillo *et al* 2012)

## 2.2 Regulación de la expresión genética

Como reguladores de la traducción de los mRNA y la expresión de genes, los miRNAs están involucrados en muchos procesos biológicos, incluyendo el tiempo de desarrollo, función de las células stem, diferenciación celular (miR-1 en cardiomiocitos, miR-143 en adipocitos), proliferación (miR-133 en mioblastos), ciclo celular, apoptosis (**tabla 2**), angiogénesis (**tabla 3**), metabolismo (miR-122a), secreción de insulina (miR-375) y en enfermedades, como el cáncer (Zhang *et al* 2007; Lin *et al* 2008; Marson *et al* 2008).

Es conocido que un solo miRNA puede tener múltiples genes blanco y un solo gen puede ser blanco de múltiples miRNAs (Lewis *et al* 2005). Interesantemente, los miRNAs pueden ser muy útiles como biomarcadores para la identificación de la clasificación y origen de varios tumores (Rosenfeld *et al* 2008).

**Tabla 2. miRNAs involucrados en Apoptosis.**

miRNA	Efecto	Blancos	miRNA	Efecto	Blancos
<b>miR-17-5p</b> (Hossain <i>et al</i> 2006)	Anti-apoptótico	E2F1,CiclinaD1	<b>miR-34a</b> (Sun <i>et al</i> 2008)	Pro-apoptótico	E2F3,E2F5,SIRT1,MET,CDK&,CiclinaD1
<b>miR-27a</b> (Scott <i>et al</i> 2006)	Anti-apoptótico	ZBTB10,RINZF,RYBP,DEDAF	<b>miR-15a,miR-16-1</b> (Cimmino <i>et al</i> 2005)	Pro-apoptótico	Bcl-2
<b>miR-133</b> (Xu <i>et al</i> 2007)	Anti-apoptótico	CASP-9	<b>Let-7</b> (Lee <i>et al</i> 2007, Mayr <i>et al</i> 2007)	Pro-apoptótico	Ras,NF2,HMGA2,MYC
<b>miR-221/222</b> (Felli <i>et al</i> 2007)	Anti-apoptótico	P27,p57,c-KIT,Era	<b>miR-122</b> (Lin <i>et al</i> 2008)	Pro-apoptótico	Bcl-w,ciclina G1
<b>miR-106b-25</b> (Kan <i>et al</i> 2009)	Anti-apoptótico	P21/CIP1,Bim,E2F1	<b>miR-101</b> (Su <i>et al</i> 2009)	Pro-apoptótico	Mcl-1
<b>miR-17-92</b> O'Donell <i>et al</i> 2005)	Anti-apoptótico	P21/CIP1,Bim,E2F1	<b>miR-29a,b,c</b> (Fabbri <i>et al</i> 2007)	Pro-apoptótico	Mcl-1,DNMT3A/3B,p85,CD C42
<b>miR-155</b> (Tili <i>et al</i> 2007)	Anti-apoptótico	TP53INP1,FADD,Rip,CASP-3	<b>miR-1</b> (Xu <i>et al</i> 2007)	Pro-apoptótico	HSP60/HSP70
<b>miR-125b</b> (Tili <i>et al</i> 2007)	Anti-apoptótico	TNF- $\alpha$	<b>miR-137</b> (Silber <i>et al</i> 2008)	Pro-apoptótico	CDK6
<b>miR-24</b> (Lal <i>et al</i> 2008)	Anti-apoptótico	P16	<b>miR-145</b> (Wang <i>et al</i> 2009)	Pro-apoptótico	TP53,Era,c-Myc
<b>miR-21</b> (Li <i>et al</i> 2009, Park <i>et al</i> 2009)	Anti-apoptótico	HNRPK,TAp63,PDCD4,RECK,PTEN,TPM1	<b>miR-143</b> (Chen <i>et al</i> 2009)	Pro-apoptótico	ERK5,KRAS

**Tabla 3. miRNAs involucrados en la Angiogenesis.**

miRNA	Efecto	Función
<b>miR-130a</b> (Chen <i>et al</i> 2008)	Pro-angiogénico	Antagoniza la actividad anti-angiogénica de HOXAS y GAX
<b>miR-296</b> (Wurdinger <i>et al</i> 2008)	Pro-angiogénico	Inhibe la degradación de los receptores de VEGF en matrigel <i>in vitro</i>
<b>miR-126</b> (Fish <i>et al</i> 2008)	Pro-angiogénico	Se requiere para el mantenimiento de la estructura vascular en ratones <i>in vivo</i>
<b>miR-210</b> (Pulkkinen <i>et al</i> 2008)	Pro-angiogénico	Regulador de la angiogenesis y supervivencia celular endotelial en respuesta a hipoxia
<b>miR-27b/Let-7f</b> (Kuehbacher <i>et al</i> 2007)	Pro-angiogénico	Se requiere para la angiogenesis en células endoteliales <i>in vitro</i>
<b>miR-378</b> (Lee <i>et al</i> 2007)	Pro-angiogénico	Promueve la angiogenesis en modelo de cáncer de colon <i>in vitro</i>
<b>miR-17-92</b> (Ventura <i>et al</i> 2008, Olive <i>et al</i> 2010)	Pro-angiogénico	Promueve la angiogenesis dentro de células tumorales y células endoteliales
	Anti-angiogénico	Actividad anti-angiogénica en células endoteliales normales
<b>miR-221/222</b> (Felli <i>et al</i> 2005)	Anti-angiogénico	Previene la formación temprana de eritroblastos y mantiene la hematopoyesis de las células stem
<b>miR-34a</b> (Zhao <i>et al</i> 2010)	Anti-angiogénico	Inhibe células progenitoras endoteliales (EPC) que regula angiogenesis

### 2.3 miRNAs en Cáncer (Oncomirs)

Diversos reportes muestran el potencial valor diagnóstico y pronóstico de los perfiles de expresión de miRNAs en diversos tipos de cáncer, de manera tal que los miRNAs podrían funcionar como oncogenes o supresores de tumor por lo que han sido denominados oncomirs. La sobreexpresión o pérdida del silenciamiento epigenético de genes que codifican miRNAs que tienen como blanco genes supresores de tumor, puede inhibir la actividad de una ruta anti-oncogénica específica de un tejido (Marilena *et al* 2005)

Existen diversos reportes acerca de la función de los miRNAs como supresores de tumor. Por ejemplo, el miR15 y miR16 inducen apoptosis al dirigir la degradación del mRNA de Bcl2, el cual es un proto-oncogen antiapoptótico clave en el desarrollo de leucemias, linfomas y carcinomas (Calin *et al* 2002). También se ha encontrado una desregulación de los miR143 y miR145 en carcinomas de colon (Michael *et al* 2003). En carcinoma humano de pulmón, se ha encontrado

subexpresado Let7 y se ha visto que la restauración de su expresión induce la inhibición del crecimiento celular en la línea celular de cáncer A549 (Takamizawa *et al* 2004).

En el 2006, se publicó que miR372 y miR373 son oncomirs implicados en la generación de tumores de células germinales de testículos, debido a su habilidad para superar la senescencia inducida por RAS oncogénico y p53 silvestre en fibroblastos (Mathijs *et al* 2006). Otros grupos han encontrado que miR155 aumenta su expresión en diferentes tipos de linfoma (Metzler *et al* 2004; Eis *et al* 2005). Al momento se han identificado aproximadamente 20 miRNAs asociados a diferentes tipos de cáncer (**tabla 4**).

**Tabla 4. miRNAs asociados a cáncer y sus blancos**

miRNA	Sobre/Sub-expresado	Tipo de cáncer	Blancos	Función	Referencia
<b>Let-7</b>	Sub-expresado	Pulmón, mama, gástrico, ovario, próstata, colon, melanoma y leiomioma	CCND1, CDC25a, CDC34, CDK6, Dicer, HMGA2, HOXA9, MYC, Ras, TLR4	Reprime la proliferación y el crecimiento celular. Let-7f promueve angiogénesis	(Lee <i>et al</i> 2007, Mayr <i>et al</i> 2007)
	Sobre-expresado	Colon, pancreático, carcinoma hepatocelular, AML, leiomioma uterino	Caspasa-3 (Let-7a)	Let-7f reprime NF2 y disminuye la apoptosis inducida por quimioterapia	
<b>miR-10b</b>	Sobre-expresado	CM metastásico, pancreático y glioblastoma	HOXD10	Activa la migración celular y remodela la matriz extracelular	(Ma <i>et al</i> 2010)
<b>miR15a/16-1</b>	Sub-expresado	CLL, mieloma múltiple, adenoma pituitaria, próstata y pancreático	Bcl-2, CARD10, CCND1, CDK6, MCL1, MYB, VEGF, Wnt3A	Induce apoptosis en leukemia; miR16 regula el ciclo celular por la sub-expresión de proteínas G0/G1	(Cimmino <i>et al</i> 2005)
	Sobre-expresado	Carcinoma Nasofaríngeo	BRCA1		
<b>miR-17/18a/19a/19b-1/20a/17-92</b>	Sobre-expresado	Linfoma, mieloma múltiple, meduloblastoma, pulmón y colon	AIB1, AML1, Bim1, CTGF, CDKN1A, E2F1, E2F2, E2F3, PTEN, TGFB2,	Aumenta el crecimiento tumoral y vascularización; miR20a es anti-	(Hayashita <i>et al</i> 2005, Dews <i>et al</i> 2006, Hossain <i>et al</i>



	Sub-expresado	Melanoma, ovario y mama	Tsp1 AIB1, CYCD1	apoptótico  miR-17-92 reduce la proliferación en CM	2006)
<b>miR-106b</b>	Sobre-expresado	Neuroblastoma, mieloma múltiple, próstata, colon y gástrico	CDKN1A, E2F1, Bim	Reduce la respuesta apoptótica después de la estimulación de TGF- $\beta$ vía Bim	(Ivanovska <i>et al</i> 2008)
<b>miR-21</b>	Sobre-expresado	Glioblastoma, leiomiocarcinoma uterino, cabeza, cuello, mama, pulmón, próstata, colon. Estómago y cervix	Bcl-2, MASPIN, PDCD4, PTEN, TPM1, RECK, RASA1	miR-21 silenciado induce apoptosis en glioblastoma; induce invasión y metástasis colo-rectal	(Chan <i>et al</i> 2005, Meng <i>et al</i> 2006, Iorio <i>et al</i> 2005)
<b>miR-29</b>	Sub-expresado  Sobre-expresado	CLL, colangiocarcinoma, colon, mama y pulmón  Mama	CDC42, DNMT3A/B, MCL1, PIK3R1, TCL1  TTP metalopeptidasas	Induce metilación aberrante en cáncer de pulmón vía DNMT3A/B; induce apoptosis vía p53 y MCL1  Induce transición EMT y metástasis	(Fabbri <i>et al</i> 2007)
<b>miR-34</b>	Sub-expresado	Sub-expresado en cáncer pancreático y linfoma de Burkitt sin traslocación de MYC. Hipermetilación de miR34b/c en cáncer de colon	Bcl-2, CCND1, CCNE2, CDK4/6, MYC, DLL1, E23, Notch1, MYCN, MET, SIRT1	miR-34a induce sobre-expresión de p53 y sub-expresión de E2F en cáncer de colon	(Sun <i>et al</i> 2008)
<b>miR-101</b>	Sub-expresado	Carcinoma hepatocelular, vejiga y próstata	COX2, EZH2, MCL1	Alteraciones en la estructura de la cromatina vía represión de EZH2	(Friedman <i>et al</i> 2009)
<b>miR-122a</b>	Sub-expresado	Carcinoma hepatocelular	CAT-1, CCNG1	Modula la expresión de ciclina G1 en líneas celulares de HCC y contribuye a la respuesta al estrés vía inhibición de CAT-1	(Kutay <i>et al</i> 2006)
<b>miR-124a</b>	Sub-expresado	Hipermetilación en leucemia, linfoma, colon, mama, gástrico y pulmón	CDK6, ITGB1, FOXA2, LAMC1, MTPN, MAPK14	Induce diferenciación de células stem que derivan a glioblastoma	(Lujambio <i>et al</i> 2007)

				multiforme e induce arresto del ciclo celular	
<b>miR-125a/b</b>	Sub-expresado	Glioblastoma, mama, ovario y próstata	ERBB2, ERBB3, LIN28, LIN41, TNFSF4	Expresión ectópica de miR-125 afecta la motilidad celular y la invasión en CM.	(Tili <i>et al</i> 2007)
	Sobre-expresado	Síndrome mielodisplástico, AML con traslocaciones específicas y uretra	P53	Expresión ectópica de miR-125b suprime el aumento de p53 e induce apoptosis	
<b>miR-127</b>	Sub-expresado	Hipermetilación en tumores	Bcl-6, RTL1		(Ma <i>et al</i> 2010)
<b>miR-143/145</b>	Sub-expresado	Colon, células B malignas, mama, pulmón y cérvix	MYC, ERK5, HOXA9, KRAS, PARP8	Se han visto secuencias precursoras anormales en cáncer de colon	(Iorio <i>et al</i> 2005, Fulci <i>et al</i> 2007)
<b>miR-155</b>	Sobre-expresado	Linfoma pediátrico de Burkitt, linfoma de Hodgkin, mama, pulmón, colon y páncreas	AGTR1, AID, IKBKE, TP53INP1	Proliferación de células pre-B, leucemia	(Fulci <i>et al</i> 2007, Lee <i>et al</i> 2007)
<b>miR-181</b>	Sobre-expresado	Mama, páncreas y próstata	HOXA11, TCL1	MYCN regula la transcripción de miR181	(Lee <i>et al</i> 2007)
<b>miR-221/222</b>	Sobre-expresado	CLL, tiroides, glioblastoma	c-KIT, p27, CDKN1B, p57, CDKN1C, ESR1	Promueve proliferación; afectan la respuesta TRIAL-dependiente	(Lee <i>et al</i> 2007, Gillies <i>et al</i> 2007)
<b>miR-200</b>	Sub-expresado	CM metastásico	ZEB1/2, TGF- $\beta$	Promueve invasión; la desregulación de miR-200 está involucrada en EMT mediada por TGF- $\beta$	(Neves <i>et al</i> 2010)
<b>miR-372/373</b>	Sobre-expresado	Testicular	LATS2, CD44	Indirectamente antagoniza la inhibición de CDK mediada por p53 durante la senescencia inducida por RAS	(Voorhoeve <i>et al</i> 2006)

## 2.4 miRNAs en Cáncer de mama

Diversos reportes muestran el potencial valor diagnóstico y pronóstico de los perfiles de expresión de miRNAs en CM. Así, el aumento de la expresión de miR37 y miR520c promueve la formación de metástasis al inhibir la expresión de CD44, una proteína asociada al aumento de la supervivencia de las pacientes con CM (Huang *et al* 2008).

En otro estudio, se reportó un aumento en la expresión de miR10b en tumores metastásicos de CM, demostrando una relación con el aumento de la metástasis y migración celular. Particularmente, el miR10b inhibe la traducción del mRNA del homeobox D10, resultando en el aumento en la expresión del gen pro-metastásico RHOC (Ma *et al* 2007).

También se ha observado que el aumento de la expresión del miR21 en CM, contribuye a la disminución de la proteína de muerte celular programada 4 (PCD4), la cual es un supresor de tumor que inhibe el crecimiento celular. También inhibe la tropomiosina 1 (Zhu *et al* 2007; Zhu *et al* 2008).

Otro reporte muestra que la expresión del miR17-5p (mir91) disminuye en tumores de CM (Hossain *et al* 2006). El gen miR-17-5p se localiza en la región 13q31, la cual sufre comúnmente pérdida de heterocigocidad. Este miRNA reprime la traducción de AIB1, el cual es un coactivador del regulador del ciclo celular E2F1. También induce la transcripción dependiente del receptor de estrógenos. Además, los miR20a y miR-17-5p regulan negativamente la expresión del gen de la ciclina D (Yu *et al* 2008).

En el 2008, se reportó que los pacientes con tumores de CM que presentan una baja expresión de miR335 y miR126, tienen una mayor predisposición a desarrollar metástasis. Este se ha relacionado un aumento de expresión de la proteína de matriz extracelular tenascina C y del factor de transcripción SOX4

(Tavazoie *et al* 2008). La disminución en la expresión de miR-126 fue asociada además a un aumento en la proliferación celular. De esta manera se concluye que miR-335 y miR-126 son importantes supresores de metástasis en CM (Zhang *et al* 2008).

En el 2010, se publicaron los resultados del análisis de la expresión de miRNAs en 93 tumores primarios de mama humanos, encontrándose que existen miRNAs expresados diferencialmente entre tumores de distintos subtipos y miRNAs que individualmente están relacionados con factores clínico-patológicos. Además se encontró que la expresión de DICER1 y AGO2 se correlaciona con el subtipo de tumor y metástasis (Martello *et al* 2010)

Estos y varios reportes más (**tabla 5**), muestran claramente la importancia que tienen los miRNAs en el desarrollo del CM. Aunque muchos de los miRNAs descritos parecen actuar como oncogenes o supresores de tumor, la función de la mayoría de estos miRNAs asociados a tumores aún no ha sido completamente dilucidada.

También es clara la utilidad que pueden tener los miRNAs en la clasificación y el pronóstico de diversos tipos de cáncer, por lo que la determinación de los perfiles de expresión global de miRNAs en cáncer puede tener una aplicación clínica importante para el manejo terapéutico adecuado de los pacientes.

**Tabla 5 miRNAs identificados experimentalmente en cáncer de mama**

miRNA	Supresor de tumor/oncogén	Blanco	Función	Referencia
miR-661	Oncogén	Nectina-1, Star-D16	Se requiere para una invasión eficiente de células de CM	(Vetter et al 2010)
miR-373/520c	Oncogén	CD44	Metástasis	(Huang et la 2008)
miR-221/222	Oncogén	ER $\alpha$	Altamente expresado en células de CM resistentes al Tamoxifen; Reduce la expresión de varios supresores de tumores	(Di Leva et al 2010)
miR-204/510	Oncogén	PDEF	La sobre-expresión dirige la progresión de la metástasis	(Findlay et al 2008)
miR-103/107	Oncogén	Dicer	Altos niveles están asociados con metástasis	(Martello et la 2010)
miR-92	Oncogén	ER $\beta$ 1	ER $\beta$ 1 está sub-expresado en CM; ER $\beta$ 1 puede ser un supresor de tumor	(Al Nakhle et al 2010)
miR-155	Oncogén	RHOA	Señalización de TGF- $\beta$	(Kong et la 2008)
miR-21	Oncogén	PTEN, TPM1, PDCD4, Maspin, Bcl-2	Invasión y metástasis: PTEN limita la actividad de la vía de PI3K. TPM1 regula la organización de los microfilamentos y el crecimiento dependiente del anclaje. PDCD4 interactúa con EIF4A y previene la síntesis de proteína. PDCD4 y Maspin están implicados en la apoptosis	(Zhu et al 2008, Zhu et al 2007)
miR-10b	Oncogén	HOXD10	Invasión y metástasis: Inhibe la síntesis de la proteína HOXD10, resultando la sobre-expresión de RHOC el cual favorece la migración e invasión	(Ma et al 2007)
miR-9	Oncogén	CDH1	Aumenta la motilidad y la invasión	(Ma et al 2010)
miR-27a	Oncogén	Dedos de Zinc, ZBTB10, Myt-1	Progresión del ciclo celular	(Merten-Talcott et al 2007)
miR-30	Supresor de tumor	Ubc9, ITG $\beta$ 3	Reduce la expresión de las células iniciadoras de tumor. Bloque el aumento de la tumorigénesis y metástasis	(Hurst et al 2009, Li et al 2009)
miR-17-5p	Supresor de tumor	AIB1, ciclina D, E2F1	Crecimiento mediado por E2F1	(Hossain et al 2006)
miR-193b	Supresor de tumor	uPA, ER $\alpha$	La sub-expresión dirige la progresión e invasión tumoral	(Yu et al 2007)
miR-18a/b	Supresor de tumor	ER $\alpha$	Inhibición del crecimiento mediada por ER	(Hurst et al 2009, Li et al 2009)
miR-206	Supresor de tumor	ER $\alpha$	Crecimiento mediado por estrógenos	(Iorio et al 2005, Adams et al 2007, Di Leva et al 2010)
miR-335	Supresor de tumor	SOX4, PTPRN2, MERTK, TNC	Metástasis	(Tavazole et al 2008)

miR-27b	Supresor de tumor	CYP1B1	Modulación de la respuesta de tumores de fármacos anti-cáncer	(Tsuchiya et al 2006)
miR-125a/b	Supresor de tumor	HER-2/3	Crecimiento dependiente de anclaje. Migración e invasión	(Mattle et al 2006, Scott et al 2006)
miR-200	Supresor de tumor	TCF-8, ZEB1/2, BMI1	Señalización TGF- $\beta$ . EMT e iniciación de un fenotipo invasivo	(Dykxhoorn et al 2009, Gregory et al 2008, Shimono et al 2009)
miR-126	Supresor de tumor	IRS-1	Progresión del ciclo celular de G1/G0 a S	(Zhang et al 2008)
miR-145	Supresor de tumor	RNTK	Inhibe el crecimiento tumoral	(Wang et al 2008)
miR-146a/b	Supresor de tumor	EGFR	Supresor de metástasis in vitro	(Hurst et al 2009)
miR-205	Supresor de tumor	HER-3	Inhibe la proliferación mediada por HER	(Iorio et al 2009)
miR-34a	Supresor de tumor	CCND1, CDK6, E2F3, Myc	Daño al DNA y proliferación	(Sun et al 2008, Christoffersen et al 2010)
miR-31	Supresor de tumor	F2D3, ITGA5, M-RIP, MMP16, RDX, RHOA	Metástasis	(Valastyan et al 2009)
Let-7	Supresor de tumor	H-RAS, HMGA2, Lin28, PEBP1	Auto-renovación y diferenciación de T-IC	(Wu et al 2006, Johnson et al 2005, Mayr et al 2007)

## 2.5 Perfiles de expresión de miRNAs en cáncer después de radiación ionizante

Como reguladores de la expresión genética, los miRNAs han sido implicados en la patogénesis del cáncer, actuando tanto como supresores de tumores y oncogenes. De hecho, ciertos perfiles de miRNAs en cáncer han sido correlacionados con el fenotipo maligno de las células cancerosas comparado con las células normales. Clínicamente, es importante que la expresión de distintos miRNAs ha sido asociada con el pronóstico y podría también predecir la eficacia de las intervenciones terapéuticas, incluyendo la radioterapia. De hecho, se ha demostrado que los miRNAs modulan la radiosensibilidad en cáncer de pulmón *in vitro*. Además, células normales presentan niveles alterados de miRNAs en respuesta a la radiación ionizante (Niemoller *et al* 2011)

Hasta el momento se han realizado estudios experimentales en algunas líneas celulares, tanto de cáncer de pulmón (**tabla 6**), como de cabeza, cuello y cerebro (Niemoller *et al* 2011), donde se han demostrado cambios en la expresión de miRNAs que están involucrados en los mecanismos de apoptosis, arresto del

ciclo celular y reparación del DNA. Estos estudios demuestran que hay cambios en la expresión de miRNAs que están participando en mecanismos que pueden estar involucrados en la radioresistencia. Sin embargo, a la fecha no hay reportes acerca de la expresión de miRNAs asociados a la radioresistencia en CM.

**Tabla 6.** Perfiles de expresión de miRNAs en cáncer de pulmón después de radiación ionizante

Funciones de los genes blanco			
miRNA	Apoptosis	Ciclo celular	Daño y reparación de DNA
hsa-miR-16-2	CADM1,GTF2H3,HSPA5,NRG1	BTG3,KNTC1	EXO1,MSH2,PCNA, POLD4,SETX
hsa-miR-22	AIFM3,CASP8,CIDEA,IL6,RTKN, TP53BP2,TRADD	ZW10	EXO1,HMGB1,WRN
hsa-miR-30c-1	CARD8,CASP8,DDIT3,ERCC3, TNFRSF10B,TRADD	CCND3,GMNN	POLD4,POLL,ERCC3
hsa-miR-30b	AGT,BCL3,DDB2,ERCC3, PML,RTKN,TP53	PML	ERCC1,ERCC3,GTF2H4, PML,POLD4,RPA1,TP53
hsa-miR-34a	APOH,BAX,BID,BNIP1,DEDD2 FAS,GRIK2,PCBP4,RYR2,TGFB1	CD28,DBC1,PCBP4, TCF3,TGFB1	PCBP4,POLD1
hsa-miR-34b	BAX,BNIP1,BRE,FAS,NLRP2,SCG2	ATR,DBC1,SPHK1,TCF3	ATR,ERCC5,RFC5
hsa-miR-106a	BAX,BNIP1,HBXIP,NUP62,P2RX4 PPP3R1,TNFRSF10B	BTG3	GTF2H3,MSH3,POLH
hsa-miR-127-3p	AIFM3,BAD,BCL6,NLRP1,PPP3CC	CCND3,RBM38	NEIL1,RBM38,RPA1
hsa-miR-139-3p	ADAMTSL4,AKT1,BAD,BRE,CASP10 CDC2,DNAJB6,MAEA,NLRP1	BRSK1,GTPBP4,TCF3	POLA1,POLE
hsa-miR-183	CASP10,DDIT3,GRIK2,HIPI,IL12B LCK,PPP3CC,SRA1,TCF7L2	BTG3,CD28,CDKN3, HEXIM2,IL12B,NUSAP1	EXO1
hsa-miR-192	ALB,ANGPTL4,ERCC3,FURIN TCF7L2	SPHK1	CDK7,ERCC3,ERCC4 XPA
hsa-miR-206	CIDEA,HSPD1,RASA1,SCG2,TBX3 TCF7L2	CDKN3,SPHK1,TBX3	-
hsa-miR-215	ALB,ERCC3,FURIN,P2RX4,TCF7L2	SPHK1	CDK7,ERCC3,ERCC4 TDG,XPA
hsa-miR-345	ANGPTL4,DHCR24,KNTC1,PCBP4	ZW10	LIG1,POLD3,POLL, RFC1,RPA1
hsa-miR-376a	CADM1,CASP8,FAS,HBXIP,IL6 PPP3CC,TERF1	ATR,BTG3,CDT1, GMNN,NEK11	ATR,MNAT1,NEK11
hsa-miR-516a-5p	ADAMTSL4,BRCA1,CASP8,CD27 CIDEA,FURIN,MAEA,TNF	BMP4	ASF1A,BRCA1,GTFH4, MBD4
hsa-miR-548c-3p	AGT,CD70,DDIT3,FAS	AFAPIL2,EGF,GMNN	CDK7,GTF2H1,HMGB2 MBD4,MFG,MSH2, PCNA,PMS2
hsa-miR-593	CD27,DDB2,DYNLL1,RYR2,STK4	-	-
hsa-miR-636	AGT,BFAR,COL4A3,P2RX4,TRAF2	DBC1	ERCC4,ERCC5,OGG1
hsa-miR-760	ACIN1,BRCA1,BRE,CASP10,CIDEA, HTATIP2,IL6,LGALS12	CDT1,SPHK1	BRCA1
hsa-miR-885-3p	AIFM3,AKT1,BNIP1,CDKN2A, CDKN2C,INHA,SFN,TCF7L2	CDKN2A,CDKN2C, EDN3,ZW10	DDB1,POLD1,PRKCG, RFC5
hsa-miR-1228	-	-	-

Tomada y modificada de Sangsu *et al* 2009

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de mama representa un grave problema de salud pública, con alta incidencia y mortalidad, debido principalmente a la falta de un diagnóstico temprano y a la poca eficacia del tratamiento.

La radioterapia constituye una de las tres modalidades utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama. Pero un número importante de pacientes desarrollan resistencia clínica a esta terapia. Esta radioresistencia se relaciona con modificaciones en la expresión genética.

Los miRNAs constituyen una de las principales vías de regulación de la expresión genética, por lo que, la determinación de perfiles de expresión relacionados con la radioresistencia, es importante para detectar posibles marcadores moleculares en CM asociados a la resistencia a la radioterapia.

### **IV. HIPÓTESIS**

Si los miRNAs se expresan de manera diferencial en la línea celular MCF-7 radioresistente, entonces se podrán definir posibles nuevos marcadores de resistencia a la radioterapia en CM.



## **V. OBJETIVOS**

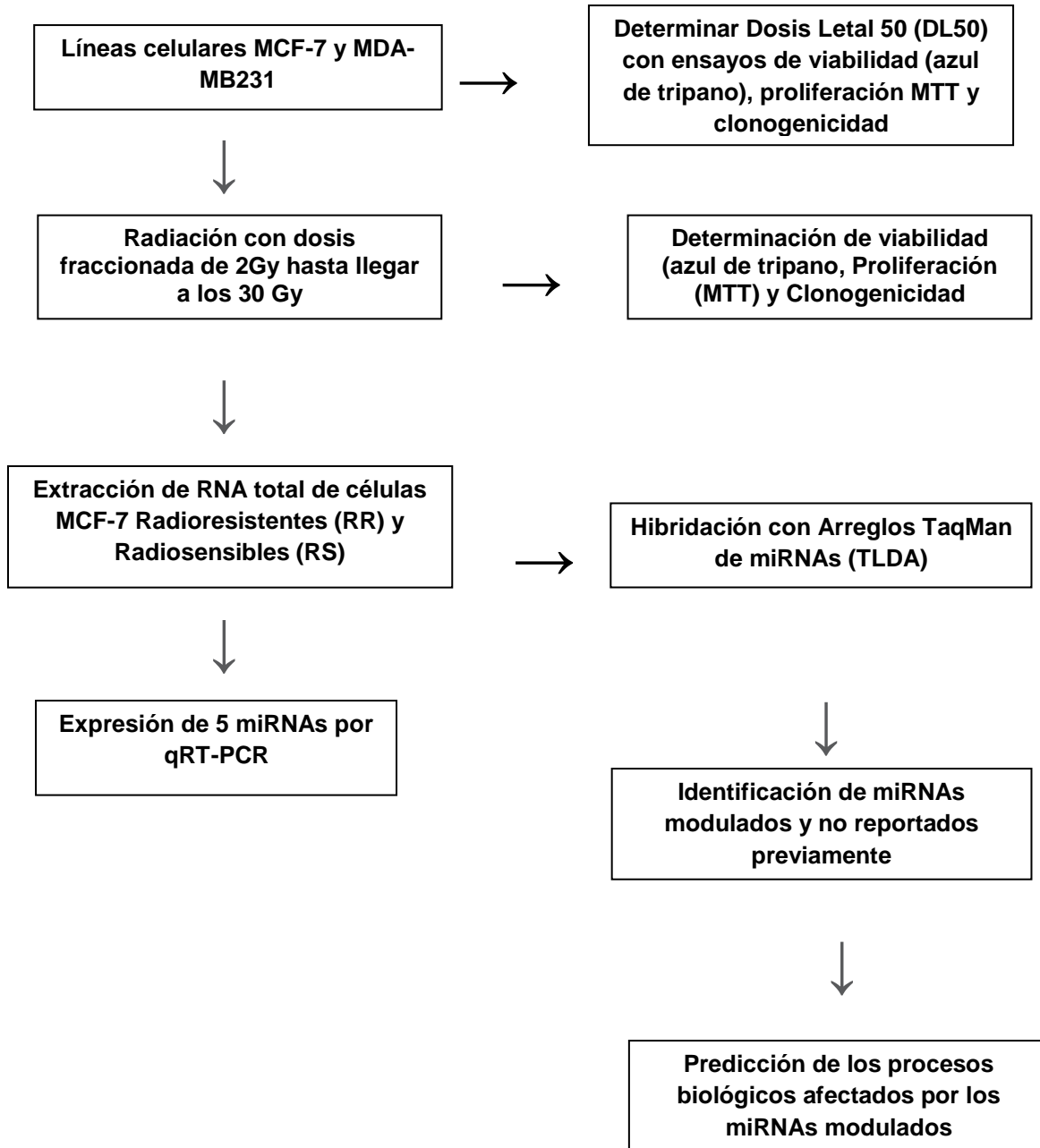
### **Objetivo General**

Identificar miRNAs asociados a la resistencia a la radioterapia en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar la dosis letal 50 para las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y MDA-MB231
2. Generar líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y MDA-MB231 resistentes a radiación ionizante y definir su radioresistencia
3. Comparar el perfil de expresión global de 754 miRNAs en las líneas celulares MCF-7 sensibles y resistentes a radioterapia.
4. Validar la expresión de al menos cinco miRNAs modulados en las células radioresistentes.
5. Predecir las rutas biológicas afectadas por los miRNAs modulados en las células tumorales de mama resistentes a radiación.

## VI. ESTRATEGIA GENERAL



## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Cultivos Celulares**

Las líneas celulares de adenocarcinoma de mama MCF-7 y MDA-MB231 se cultivaron en medio DMEM F12, suplementado con 10% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomycinina al 1%, en una caja de 25 cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

Las células se lavaron con PBS al 1x y se cambió el medio de cultivo cada 72 hrs. Una vez alcanzada la confluencia del 90%, las células se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con el método de azul de tripano y se pasaron a tres cajas de 25 cm<sup>2</sup> con una densidad de 6 x10<sup>5</sup> células por caja: una caja fue para trabajar, una caja sirvió para mantener la línea parental (radiosensible) y una caja se congeló en nitrógeno líquido como reserva.

### **7.2 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)**

Se sembraron 300 000 células de ambas líneas celulares en cinco cajas diferentes para cada línea celular. Al día siguiente, las células se radiaron con diferentes dosis de radiación: una caja no se sometió a radiación y se utilizó como control, otra caja se radió con 2 Gy, otra caja con 4 Gy, otra con 8 Gy y otra con 10 Gy. Para la irradiación con rayos X, se utilizó un acelerador lineal de alta energía (Varian 600C). Las cajas se incubaron durante 24 hrs antes de realizar los ensayos de viabilidad, proliferación y clonogenicidad descritos posteriormente para determinar la DL50 de cada línea celular en cada uno de estos ensayos.

### **7.3 Generación de células radioresistentes**

Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 60%, fueron preparadas e irradiadas de la siguiente manera:

Se removió el medio con una pipeta Pasteur y se agregaron 47 ml de PBS 1x a cada caja. Las células se irradiaron con una dosis de 2 Gy e inmediatamente después de la irradiación, se removió el PBS con la pipeta Pasteur y se agregó medio de cultivo. Se incubaron las células nuevamente bajo las mismas condiciones basales de cultivo.

Cuando las células alcanzaron un 90% de confluencia, se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul de tripano y se subcultivaron en nuevas cajas de 25 cm<sup>2</sup> con una densidad de  $6 \times 10^5$  células/caja. Una vez que alcanzaron el 60% de confluencia, las células fueron preparadas e irradiadas una vez más con 2 Gy. Se realizaron estos procedimientos por triplicado y se repitieron 30 veces hasta alcanzar una dosis total de 30 Gy durante aproximadamente 5 meses.

Las células radiosensibles (RS) fueron tripsinizadas, contadas, subcultivadas, preparadas con PBS 1x en las mismas condiciones, pero sin radiación ionizante, las cuáles sirvieron de control para los siguientes ensayos.

### **7.4 Ensayo de viabilidad con Azul de Tripano**

Este ensayo se realizó primeramente para determinar la DL50 de las células radiosensibles (RS) utilizando células no irradiadas como control y células irradiadas con las diferentes dosis (2, 4, 8 y 10 Gy). También se realizó para caracterizar las células radioresistentes (RR) generadas después de alcanzar la dosis total de 30 Gy, utilizando células RS y células RR, no irradiadas e irradiadas con la DL50 previamente determinada.

Después de la aplicación de la dosis de radiación correspondiente, las células se incubaron 24 hrs en condiciones basales. A las 48 hrs, se despegaron con 0.5 mL de tripsina, se lavaron con 3 mL de medio DMEM-F12 suplementado para inactivar la tripsina y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos para obtener un botón de células.

Después, se retiró el medio y se agregó 1 mL de medio DMEM-F12 para resuspender el botón. Una vez resuspendido el botón, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L que se mezcló con 50  $\mu$ L de Azul de Tripiano en un tubo eppendorf de 0.6 mL.

Se tomaron 10  $\mu$ L de la mezcla y se depositaron en la cámara de Neubauer para contar las células vivas, las cuáles no permiten la internalización del colorante, en el microscopio.

Para la determinación de la DL50, se contaron las células de cada una de las cajas que recibieron diferentes dosis de radiación previamente descritas. Se graficó el porcentaje de células vivas correspondiente a cada dosis de radiación, considerando como el 100% el número de células del control sin irradiar. La DL50 corresponde a la dosis en la cual el 50% de las células están vivas.

### **7.5 Ensayo de proliferación (MTT)**

Este ensayo se realizó primeramente para determinar la DL50 de las células radiosensibles (RS) utilizando células no irradiadas como control y células irradiadas con las diferentes dosis (2, 4, 8 y 10 Gy). También se realizó para caracterizar las células radioresistentes (RR) generadas después de alcanzar la dosis total de 30 Gy, utilizando células RS y células RR, no irradiadas e irradiadas con la DL50 previamente determinada.

Después de aplicar la dosis de radiación correspondiente, las células se incubaron 24 hrs en condiciones basales. A las 48 hrs, se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul de tripano y se subcultivaron en cajas de 25 cm<sup>2</sup> con una densidad de 3x10<sup>5</sup> células/caja por 24 hrs en condiciones basales.

En el caso de la determinación de la DL50, las células se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul de tripano y se sembraron en placas de 96 pozos, con una densidad de 5x 10<sup>3</sup> células por pozo (se hizo por triplicado).

En el caso de la caracterización de las células RR, se prepararon dos cajas con células RS y dos cajas con células RR. Al día siguiente, una caja con células RS y una caja con células RR, fueron irradiadas con la DL50 previamente determinada, mientras que las otras cajas se utilizaron como control. En ambos casos, se incubaron por 24 hrs en condiciones basales. Posteriormente, las células se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul de tripano y se sembraron en placas de 96 pozos, con una densidad de 5x 10<sup>3</sup> células por pozo (se hizo por triplicado).

A las 24 hrs, se removió el medio a las placas así preparadas, se agregaron 100 µL de la solución MTT/DMEM 1:10 por pozo y se incubó durante 4 hrs a 37°C. Después de las 4 hrs de incubación, se retiraron 75 µL de la solución MTT/DMEM y se agregaron 50 µL de DMSO a cada pozo homogeneizando suavemente sin dejar burbujas, la placa se incubó a 37°C por 10 minutos y se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro. Las células vivas convierten el MTT soluble a una forma insoluble en agua de formazán color púrpura.

Se repitió el mismo protocolo a las 48 y 72 hrs.

Para la determinación de la DL50, se contaron las células de cada una de las cajas que recibieron diferentes dosis de radiación previamente descritas. Se graficó el porcentaje de células vivas correspondiente a cada dosis de radiación, considerando como el 100% el número de células del control sin irradiar. La DL50 corresponde a la dosis en la cual el 50% de las células están vivas.

## **7.6 Ensayo de Clonogenicidad**

Este ensayo se realizó primeramente para determinar la DL50 de las células radiosensibles (RS) utilizando células no irradiadas como control y células irradiadas con las diferentes dosis (2, 4, 8 y 10 Gy). También se realizó para caracterizar las células radioresistentes (RR) generadas después de alcanzar la dosis total de 30 Gy, utilizando células RS y células RR, no irradiadas e irradiadas con la DL50 previamente determinada.

Después de aplicar la dosis correspondiente, las células se incubaron 24 hrs en condiciones basales. A las 48 hrs, las células se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul de tripano y se subcultivaron en cajas de 25 cm<sup>2</sup> con una densidad de 3x10<sup>5</sup> células/caja.

En el caso de la determinación de la DL50, las células se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul de tripano y se sembraron en placas de 6 pozos, con una densidad de 1x 10<sup>3</sup> células por pozo (se hizo por triplicado). Se incubaron por dos semanas en condiciones basales.

En el caso de la caracterización de las células RR, se prepararon dos cajas con células RS y dos cajas con células RR. Al día siguiente, una caja con células RS y una caja con células RR, fueron irradiadas con la DL50 previamente determinada, mientras que las otras cajas se utilizaron como control. En ambos casos, se incubaron por 24 hrs en condiciones basales. Posteriormente, las células se despegaron con 0.5 ml de tripsina, se contaron con la técnica de azul

de tripano y se sembraron en placas de 96 pozos, con una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo (se hizo por triplicado).

A las dos semanas, se les retiró el medio, las colonias fueron fijadas con Metanol/Ácido acético 7:1 y fueron teñidas con cristal violeta al 1%. Se contaron las células y las colonias con 50 o más células se consideraron como sobrevivientes clonogénicos.

Para la determinación de la DL50, se contaron las colonias correspondiente a cada una de las cajas que recibieron diferentes dosis de radiación previamente descritas y se calculó la fracción de sobrevivencia (ver abajo) para graficarla de acuerdo a la dosis de radiación, considerando como el 100% el valor de las células del control sin irradiar.

### **7.7 Extracción de RNA total por el método de Trizol**

Las células MCF-7, tanto radiosensibles como radioresistentes, fueron cultivadas por 24 hrs y se les extrajo RNA total.

Se retiró el medio de cultivo, se adicionó 1ml de Trizol por caja de  $25 \text{ cm}^2$  y se incubó por 5 minutos a  $37^\circ$  (fase de lisis). Se transfirieron las células lisadas a tubos eppendorf de 1.5 mL nuevos y se adicionaron 0.2 mL de cloroformo (fase de separación). Se agitó vigorosamente la mezcla con vortex durante 30 segundos y se incubó por 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

Al terminar la centrifugación, se formaron dos fases: una fase incolor donde se encuentra el RNA y una fase de color rojo que contiene rojo de fenol y restos de cloroformo. Se separó la fase acuosa (incolor) en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo, se adicionaron 0.5 mL de isopropanol (fase de precipitación) y se incubó durante toda la noche a  $-70^\circ\text{C}$



Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm a 4°C por 15 minutos. Se retiró el isopropanol y el botón de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75% preparado con agua inyectable. Se mezcló con vortex y se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm a 4°C por 10 minutos (fase de lavado).

Se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla de RNA al aire por 30 minutos. Se resuspendió el RNA en 30 µL de agua inyectable. Se verificó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y se determinó su concentración por espectrofotometría.

### **7.8 Perfiles de expresión con Arreglos Taqman microRNA Low Density Array (TLDA)**

Se analizó la expresión de miRNAs mediante el arreglo TaqMan microRNA low density array (TLDA) v3.0 A+B, el cual contiene dos placas con sondas correspondientes a 754 miRNAs humanos, más ocho controles internos. Por lo que permiten evaluar de manera específica y sensible la expresión de los miRNAs en un solo ensayo. Las sondas corresponden a secuencias de los miRNAs reportados en la base de datos mirBASE v10.0 de humano (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>).

Este ensayo se basa en la obtención del cDNA a partir del RNA total previamente aislado y la determinación de la expresión de los miRNAs en tiempo real.

Para obtener los perfiles de expresión de los miRNAs, primeramente se realizó una reacción de retro-transcripción (RT) a partir el RNA previamente extraído de las células MCF-7 radioresistentes y radiosensibles, utilizando el Megaplex Primer Pools (pool de primers stem-loop RT) que permiten amplificar y

detectar cientos de miRNA blanco en un solo experimento, de acuerdo a las siguientes condiciones:

**Tabla 7.** Mezcla de reacción para RT de miRNAS con Megaplex primers pool

Reactivo	Cantidad
RNA total	3.0 $\mu$ L (100 ng/ $\mu$ L)
Megaplex RT primers 10x	0.8 $\mu$ L
dNTPs con dTTP 100mM	0.2 $\mu$ L
MultiScribe Transcriptasa reversa 50U/ $\mu$ L	1.5 $\mu$ L
Buffer RT 10x	0.8 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0.9 $\mu$ L
Inhibidor de RNasa 20U/ $\mu$ L	0.1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de RNasa	0.2 $\mu$ L
Volumen total	7.5 $\mu$ L

La mezcla de reacción se agitó vigorosamente con vortex durante 15 segundos, se centrifugó por 10 segundos a 4°C y se incubó en hielo por 5 min.

Posteriormente, se realizó la retrotranscripción para obtener el cDNA en un termociclador, con las siguientes condiciones:

**Tabla 8.** Condiciones cíclicas de RT con Megaplex primers pool

Temperatura	Tiempo
16°C	2 min (40 ciclos)
42°C	1 min (40 ciclos)
50°C	1 seg (40 ciclos)
85°C	5 min
4°C	$\infty$

### 7.7.1 Pre-amplificación del cDNA con previamente obtenido de la RT MEGaplex

Para obtener una mayor concentración del cDNA de los miRNAs y un mayor rendimiento en la reacción de TLDA, se realizó una pre-amplificación de la RT Megaplex de la siguiente manera:

Se tomaron 2.5  $\mu$ L de la reacción RT y se mezclaron en tubos eppendorf de 0.2  $\mu$ L con los reactivos para la pre-amplificación mostrados en la tabla 9.

**Tabla 9.** Mezcla de reacción para la pre-amplificación de RT de miRNAs con Megaplex

Reactivo	Cantidad
RT	2.5 $\mu$ L
Taqman PreAmp Master mix 2x	12.5 $\mu$ L
Megaplex PreAmp primers 10x	2.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de RNasa	7.5 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>20 L</b>

Una vez obtenida la mezcla de reacción para la pre-amplificación, se realizó la pre-amplificación en un termociclador con las siguientes condiciones:

**Tabla 10.** Condiciones cíclicas de pre-amplificación de RT de miRNAs con Megaplex

Temperatura	Tiempo
95°C	10 min
55°C	2 min
72°C	2 min
95°C	15 seg (12 ciclos)
60°C	4 min (12 ciclos)
99.9°C	10 min
4°C	$\infty$

Una vez terminada la reacción, se añadieron 75  $\mu$ L de T.E para diluir.

### 7.7.2 Perfil de expresión de miRNAs con Taqman Low Density Array (TLDA)

El producto diluido de la pre-amplificación fue evaluado mediante el arreglo TaqMan en un equipo ABI PRISM SDS 7900 con las siguientes condiciones:

**Tabla 11.** Mezcla de reacción para TLDA

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Taqman Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2x</b>	450 $\mu$ L
<b>Producto Megaplex RT</b>	9 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O libre de RNasa</b>	441 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	900 $\mu$ L

Después de mezclar los diferentes componentes de la reacción, se agregaron 100  $\mu$ L de la reacción a cada pozo de la placa del Arreglo Taqman. Se centrifugó a 1200 rpm durante 1 min, se selló la placa, se introdujo al equipo ABI PRISM SDS 7900 y se inició la corrida del arreglo, donde se realiza la hibridación del cDNA con las sondas Taqman específicas para los 754 miRNAs.

Por medio del programa de asistencia Data Assist, se definieron los miRNAs expresados diferencialmente, donde los principales parámetros eran que tuviera un fold change >2 veces y una  $p=0.05$ . La obtención de estos perfiles de expresión de miRNAs en las líneas celulares MCF-7 radioresistentes y radiosensibles, se realizó por duplicado.

### 7.9 Determinación de la expresión de cinco miRNAs modulados por qRT-PCR

Se validaron los resultados de los perfiles de expresión de TLDA, utilizando cinco miRNAs de interés mediante qRT-PCR, utilizando el sistema Taqman miRNAs assays (Applied Biosystems) que tenemos estandarizado en nuestro laboratorio con las siguientes condiciones para cada miRNA:

**Tabla 12.** Mezcla de reacción para RT de miRNAs

Reactivo	Cantidad
RNA total	5.0 $\mu$ L (60-100 ng/ $\mu$ L)
RT primers miRNAs	3.0 $\mu$ L
dNTPs con dTTP 100mM	0.15 $\mu$ L
MultiScribe Transcriptasa reversa 50U/ $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
Buffer RT 10x	1.5 $\mu$ L
Inhibidor de RNasa 20U/ $\mu$ L	0.19 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de RNasa	4.16 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>15 <math>\mu</math>L</b>

El producto diluido fue analizado por PCR tiempo real para cada miRNA utilizando la siguiente mezcla de reacción:

**Tabla.13** Mezcla de reacción para PCR tiempo real de miRNAs

Reactivo	Cantidad
Taqman Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2x	10 $\mu$ L
Producto RT diluido 1:15	1.33 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de RNasa	7.67 $\mu$ L
Sonda específica para c/miRNA	1.0 $\mu$ L

Una vez mezclada la reacción, se realizó la PCR tiempo real con las siguientes condiciones:

**Tabla 14.** Condiciones cíclicas para PCR tiempo real de miRNAs

Temperatura	Tiempo
95°C	10 min
95°C	15 s (40 ciclos)
60°C	1 min (40 ciclos)
4°C	∞

Se realizaron por duplicado estas validaciones para las líneas celulares MCF-7 tanto radioresistentes como radiosensibles.

### 7.10 Predicción de los blancos potenciales de los miRNAs.

La predicción de los blancos de los miRNAs modulados diferencialmente acorde a los resultados de los microarreglos con TLDA de los miRNAs, se hicieron utilizando los programas TargetScan (<http://www.targetscan.org>) PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>), DIANA-microT (<http://diana.pcbi.upen.edu>). Estos programas predicen posibles genes blanco para los diferentes miRNAs, por medio de análisis tanto termodinámicos como de complementaridad de las secuencias de los miRNAs con sus posibles blancos.

Los genes que fueron predichos al menos por dos de estos programas fueron considerados como blanco. Solo se tomaron en cuenta genes que participaban en mecanismos como apoptosis, ciclo celular, proliferación, migración y reparación de DNA

Utilizando el programa DAVID, el cuál es un programa que predice las rutas y los genes que pueden estar regulados por los diferentes miRNAs, se realizó el análisis *in silico* para predecir las rutas afectadas por los diferentes miRNAs y que tuvieran alguna relación tanto con el cáncer de mama, como con el fenómeno de radioresistencia.

## **VIII RESULTADOS**

### **8.1 Características y generación de líneas radioresistentes a partir de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231**

En este trabajo, se utilizaron dos líneas celulares de carcinoma de mama: la línea MCF-7 que es triple positivo, es decir que expresa los receptores hormonales ER y PR, y el receptor Her-2; y la línea celular MDA-MB231, la cuál es invasiva y por lo tanto metastásica, no expresa ninguno de los tres receptores, siendo una línea celular triple negativo.

A partir de estas dos líneas, se generaron líneas radioresistentes, con un esquema de radiación parecido al que reciben las pacientes con cáncer de mama. Las células recibieron dosis de radiación ionizante fraccionada de 2 Gy hasta llegar al total de 30 Gy, con la ayuda de un acelerador lineal, el cuál es el equipo utilizado para la aplicación de la radioterapia en pacientes. Una vez alcanzada la dosis total de 30 Gy, se realizaron los ensayos de viabilidad con azul de tripano, proliferación con MTT y el ensayo clonogénico, para comparar tanto la radioresistencia como el comportamiento de ambas líneas celulares.

### **8.2 Determinación de la DL50**

La DL50 de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 se determinó mediante la realización de los siguientes ensayos:

#### **8.1.1 Ensayo de viabilidad con azul de tripano**

Se sembraron cinco cajas con 300 000 células MCF-7 y cinco cajas con 300 000 células MDA-MB231 y al día siguiente se irradiaron con diferentes dosis únicas (0, 2, 4, 8 y 10 Gy).

Las cajas se incubaron a 37°C y al día siguiente, las células se despegaron con tripsina y se contaron con azul de tripano. Este ensayo se realizó por triplicado para determinar el promedio de células vivas en respuesta a cada dosis de irradiación.

En la tabla 15, se observa que en el caso de las células que no fueron irradiadas (control), el número de células vivas es de 560 000 células en el caso de MCF-7, y 528 000 células vivas en el caso de MDA-MB-231. Con respecto a las células que se irradiaron con las diferentes dosis, se observa claramente una disminución en el número de células con respecto al control, como va aumentando la dosis de radiación, observándose ese mismo patrón en ambas líneas celulares. Por ejemplo, se contaron 355 000 células MCF-7 en la caja correspondiendo a la dosis de 4 Gy, mientras que el número bajó hasta 282 000 cuando se usó la dosis de 8 Gy.

Los valores correspondiendo a las células sin irradiar se consideraron como el 100% de viabilidad en cada línea celular, se calculó el porcentaje de viabilidad para cada una de las dosis de radiación con respecto al control sin irradiar y se los datos se graficaron (Figura 6).

En la gráfica, se observa que la línea celular MCF-7 presentó un porcentaje de viabilidad ligeramente más alto que MDA-MB231, en cada una de las dosis únicas. Particularmente, se observa que la viabilidad es del 51.07% para las células MCF-7 y del 50.37% para las células MDA-MB231, cuando se utilizó la dosis de 8 Gy. Por lo que se puede concluir que la DL50 determinada por el ensayo de viabilidad es de 8 Gy para ambas líneas celulares.



**Tabla. 15** Ensayo de viabilidad para MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes dosis

Líneas celulares						
Dosis	MCF-7			MDA-MB231		
Gy	# células inicial	# células final	%	# células inicial	# células final	%
0	300 000	560 000	100	300 000	528 000	100
2	300 000	472 000	84.28	300 000	422 000	79.92
4	300 000	355 000	63.39	300 000	321 000	60.79
8	300 000	282 000	51.07	300 000	266 000	50.37
10	300 000	210 000	37.5	300 000	155 000	29.35

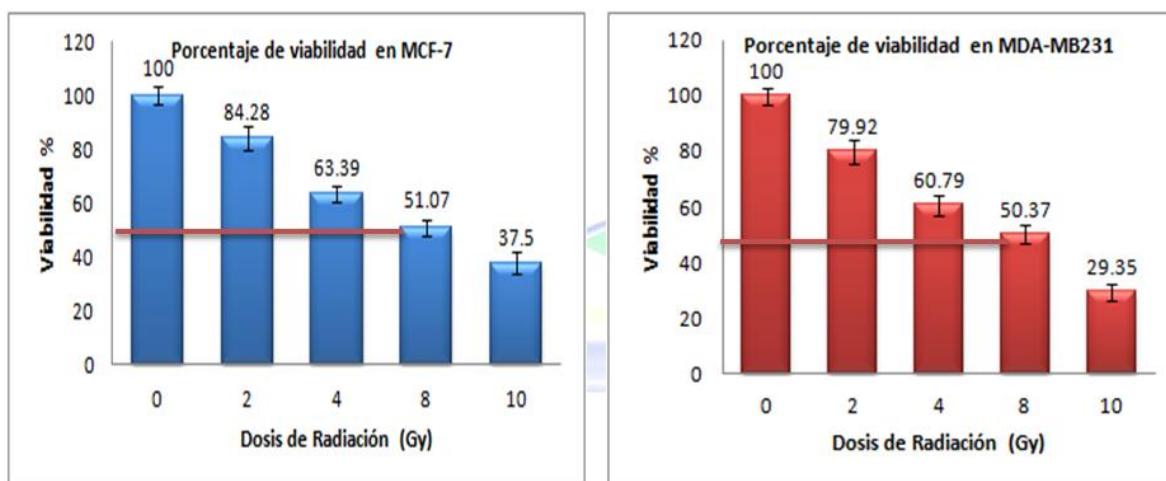


Figura 6. Ensayo de viabilidad con azul de tripano. Se observó claramente la disminución en el número de células con respecto al control y con respecto al aumento de la dosis.

### 8.2.2 Ensayo de Proliferación

Se realizó este ensayo para evaluar la proliferación de ambas líneas celulares mediante el ensayo MTT, a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs), y en respuesta a diferentes dosis de radiación (0, 2, 4, 8 y 10 Gy). Para esto, se subcultivaron 5 000 células/pozo, utilizando las células previamente irradiadas con las diferentes dosis (0, 2, 4, 8 y 10 Gy) en el ensayo de viabilidad con azul de tripano, por triplicado para cada dosis, en tres diferentes cajas de 96 pozos, una

para 24 hrs, una para 48 hrs y una para 72 hrs. Y se analizó la viabilidad mediante el ensayo MTT.

En ambas líneas celular, se observó una disminución en la densidad óptica (DO) comparando con el control (**tabla 16**), ya que las células no fueron capaces de reducir el MTT a formazán después del daño generado por la radiación. tanto a las 24, 48 y 72 hrs. Esto refleja una disminución en la proliferación como va aumentando la dosis,

A partir de los valores de la D.O, se calculó el porcentaje de proliferación, tomando como el 100% el valor de la D.O del control (figura 7). En la grafica, se observa que la línea celular MCF-7 es un poco más resistente a la radiación, ya que presenta un porcentaje de proliferación de 49.28% a los 10 Gy, mientras que la línea MDA-MB231 presenta un porcentaje de proliferación de 45.55% a esta misma dosis. Además, se observa que la viabilidad es del 53.32% para las células MCF-7 y del 50.28%.para las células MDA-MB231, cuando se utilizó la dosis de 8 Gy. Por lo que se pude concluir que la DL50 determinada por el ensayo de proliferación es de 8 Gy para ambas líneas celulares.

**Tabla 16.** Ensayo de proliferación para MCF-7 y MDA-MB231 en respuesta a diferentes dosis de radiación.

Dosis Gy	Líneas celulares											
	MCF-7						MDA-MB231					
	DO 24	DO 48	DO 72	% 24h	% 48h	% 72h	DO 24	DO 48	DO 72	% 24h	% 48h	% 72h
<b>0</b>	0.255	0.344	0.476	100	100	100	0.232	0.303	0.423	100	100	100
<b>2</b>	0.175	0.193	0.216	68.45	56.2	45.38	0.142	0.162	0.172	61.03	53.45	40.66
<b>4</b>	0.144	0.176	0.184	56.45	51.16	38.72	0.124	0.145	0.143	53.43	47.75	33.81
<b>8</b>	0.136	0.151	0.154	53.32	43.99	32.49	0.117	0.132	0.134	50.28	43.46	31.75
<b>10</b>	0.126	0.145	0.146	49.28	42.24	30.81	0.106	0.120	0.127	45.55	39.62	30.18

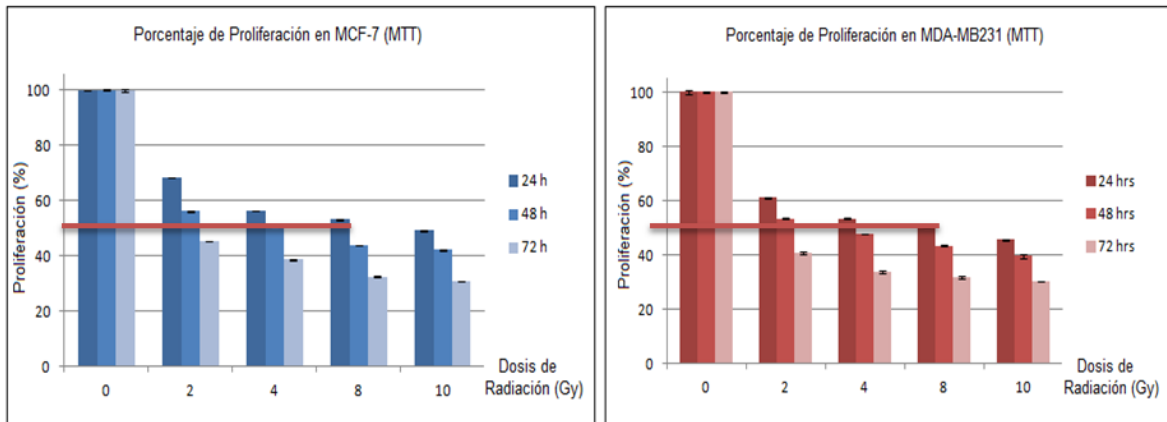


Figura 7. Ensayo MTT, Porcentaje de proliferación. Se puede observar la disminución en el porcentaje de proliferación en ambas líneas celulares con respecto al aumento de la dosis y el tiempo de incubación, debido al daño generado por la radiación.

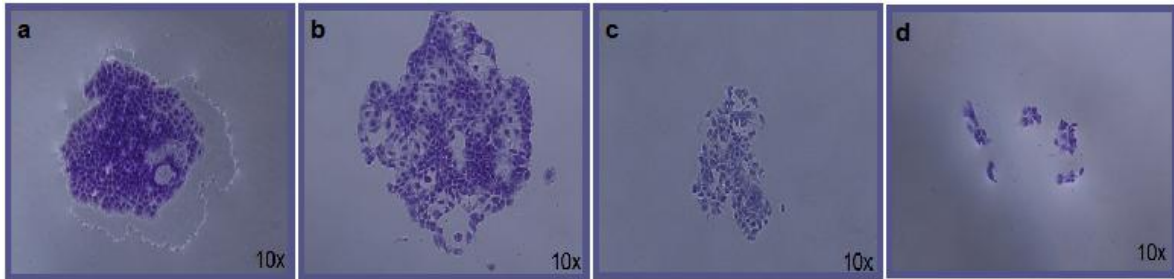
Este ensayo se realizó a estos diferentes tiempos para observar el comportamiento de las células con respecto al aumento de la dosis y ver si con el transcurso del tiempo, el daño generado por la radiación, presentaba el mismo patrón o las células se recuperaban a las 72 hrs. Con los datos obtenidos a las 48 y 72 hrs, se observó que el daño generado por la radiación, repercutía tanto en la muerte celular, como en la capacidad de proliferar de las células.

### 8.2.3 Ensayo Clonogénico

Se realizó este ensayo para ver la capacidad de ambas líneas celulares de formar colonias después de ser tratadas con diferentes dosis de radiación. En ambos casos, se tomaron células de las cajas previamente utilizadas en el ensayo de proliferación. Se utilizaron 1 000 células irradiadas con 2, 4, 8 o 10 Gy, y su control sin irradiar, se sembraron en una caja de seis pozos y se incubaron por dos semanas a 37°C.

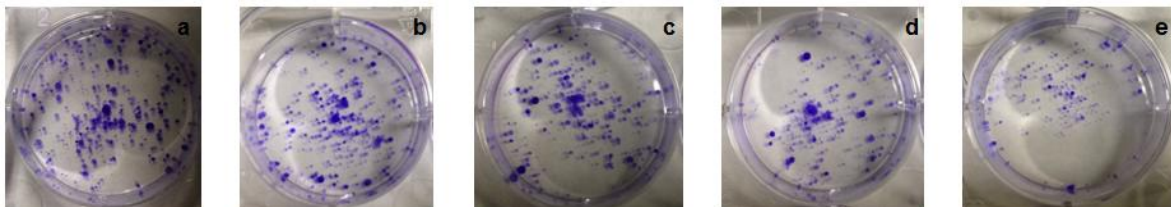
Después de las dos semanas, las células se tiñeron con cristal violeta y se observaron al microscopio (**Figura 8**) para poder identificar las colonias que

tuvieran al menos 50 células, las cuales se consideran como colonias clonogénicas.



**Figura 8** Colonias clonogénicas de la línea MCF-7. Se contaron las colonias en el microscopio y se observó que en los pozos de las dosis 2 (b) y 4 Gy (c), se formaron en la mayoría colonias clonogénicas, pero en los pozos de las dosis 8 (d) y 10 Gy, se formaron tanto colonias clonogénicas como no clonogénicas.

En ambas líneas celulares, se observó un menor número de colonias clonogénicas comparado al control (**Figura 9**). En ambos casos, se observaron colonias en todos los pozos correspondientes a las diferentes dosis, 2, 4, 8 y 10 Gy, pero el número de colonias fue disminuyendo en mismo tiempo que iba aumentando la dosis (**tabla 17**). Así, el número de colonias clonogénicas para el control fue de 932 para la línea MCF-7 y 895 para la línea MDA-MB231. Particularmente, se formaron 513 colonias en el caso de MCF-7 y 498 colonias en el caso de MDA-MB-231, cuando se trataron ambas líneas con 8 Gy de radiación. Por lo que se puede concluir que la DL50 determinada por el ensayo clonogénico es de 8 Gy para ambas líneas celulares.



**Figura 9.** Ensayo clonogénico. Se tomaron fotos de los pozos de las diferentes dosis de radiación y su control, se puede observar claramente una disminución de las colonias con respecto al aumento de dosis (panel a control; panel b 2Gy; panel c 4Gy; panel d 8Gy; panel e 10Gy)

**Tabla 17.** Número de colonias clonogénicas a diferentes dosis

Dosis (Gy)	Colonias formadas		Plating Efficiency (P.E %)		Survival Fraction (SF)	
	MCF-7	MDA-MB231	MCF-7	MDA-MB231	MCF-7	MDA-MB231
0	932	895	93.2	89.5	1	1
2	812	794			0.7567	0.7106
4	659	614			0.6141	0.5495
8	513	498			0.4781	0.4457
10	224	195			0.2087	0.1745

A partir del número de colonias clonogénicas de las células control, se calculó el porcentaje de eficiencia de sembrado o Plating Efficiency (P.E.) para las células no irradiadas (control) (**tabla 17**) con la siguiente fórmula:

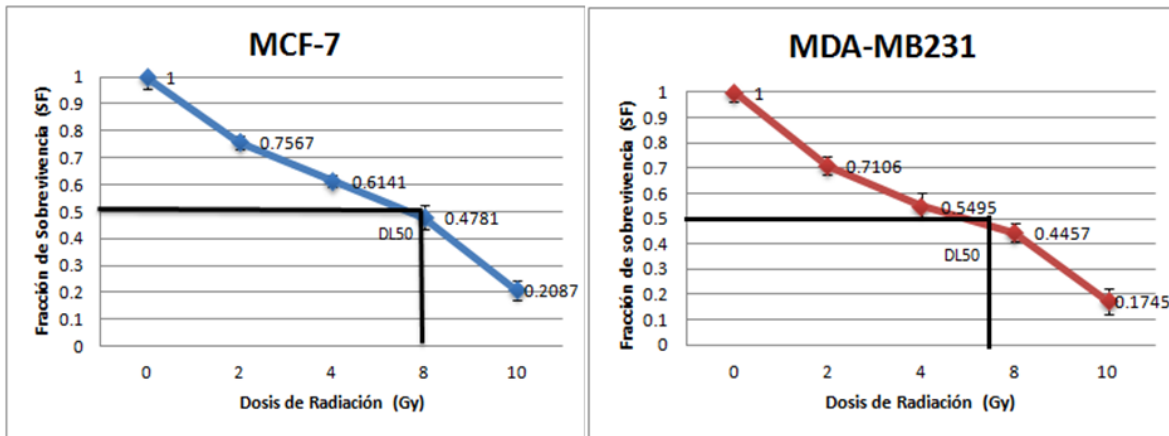
$$\% \text{ P.E.} = \frac{\text{Número de colonias clonogénicas}}{\text{Número de células sembradas}} \times 100$$

Obteniéndose un valor de P.E. de 93.2% para la línea MCF-7 y 89.5% para la línea MDA-MB23.1

Posteriormente, se calculó la fracción de sobrevivencia o Survival Fraction (SF) correspondiente a cada una de las dosis para ambas líneas (**tabla 17**) con la siguiente fórmula:

$$\text{SF} = \frac{\text{Número de colonias clonogénicas después del tratamiento}}{\text{Número de células sembradas}} \times \text{P.E}$$

Los valores de SF así obtenidos se graficaron en función de la dosis (**figura 10**), lo que permitió determinar que la DL50 determinada por fracción de sobrevivencia es de 8 Gy para ambas líneas celulares.



**Figura 10.** Ensayo clonogénico. Fracción de supervivencia para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231 a diferentes dosis de radiación.

### 8.3 Caracterización de la radioresistencia en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231 radioresistentes

Una vez alcanzada la dosis total de 30 Gy con el esquema de radiación de dosis fraccionada de 2 Gy, se procedió a caracterizar las células MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR así generadas mediante la realización de los mismos ensayos de viabilidad, proliferación y clonogenicidad, utilizando células irradiadas con la DL50 de 8 Gy previamente definida, eso con la finalidad de verificar que las líneas radioresistentes (RR) se comportaban realmente como radioresistentes en comparación a su control radiosensible (RS).

#### 8.3.1 Ensayo de Viabilidad para determinar la radioresistencia de las líneas MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR.

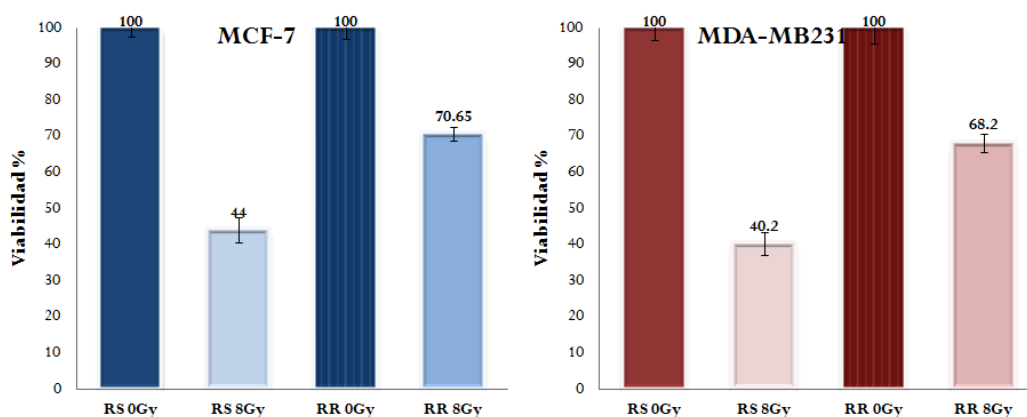
Para este ensayo, se sembraron dos cajas con 300 000 células radioresistentes (RR) cada una y dos cajas con 300 000 células radiosensibles (RS) cada una. Al día siguiente, se irradió una caja con células RR y una caja con células RS con DL50 de 8 Gy, mientras que una caja con células RR y una caja

con células RS no se irradiaron. Al día siguiente, las células se despegaron con tripsina, se tiñeron con azul de tripano y se contaron. En la **tabla 18** se muestra el promedio del número de células de los ensayos realizados por duplicado.

**Tabla 18.** Ensayo de Viabilidad para determinar la radioresistencia en MCF-7 y MDA-MB231

	MCF-7		MDA-MB-231	
	# Cel. final	% de Viabilidad	# Cel. final	% de Viabilidad
RS 0 Gy	500 000	100	485 000	100
RS 8 Gy	220 000	44	195 000	40.2
RR 0 Gy	460 000	100	440 000	100
RR 8 Gy	325 000	70.65	300 000	68.2

Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células irradiadas, tomando como el 100% el número de células RS y RR sin irradiar (RS 0 Gy y RR 0 Gy) respectivamente, y se graficaron los porcentajes (**Figura 11**).



**Figura 11.** Ensayo de Viabilidad para determinar la radioresistencia en las líneas celulares MCF-7 RR y MDA-MB231 RR con respecto a su control RS

En la grafica, se puede observar que las líneas MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR, presentaron un porcentaje de viabilidad mayor que el control RS, después de haber recibido la DL50 de 8 Gy. En el caso de MCF-7 RR, el porcentaje de viabilidad fue de 70.65% en comparación a la MCF-7 RS que fue de 44%. Para MDA-MB-231 RR, el porcentaje de viabilidad fue de 68.2% en comparación a la MDA-MB-231 RS cuyo porcentaje de viabilidad fue de 40.2%. Estos datos confirman que las líneas celulares MCF-7 RR y MDA-MB231 RR se volvieron radioresistentes, siendo un poco más resistente la línea MCF-7.

### 8.3.2 Ensayo de Proliferación. Radiosensibles contra Radioresistentes.

Para este ensayo, se sembraron 5000 células RR y RS por pozo, por triplicado, en placas de 96 pozos, utilizando células irradiadas no irradiadas e irradiadas con la DL50 de 8 Gy (RS 0 Gy, RR 0 Gy, RS 8 Gy y RR 8 Gy). Se prepararon tres placas diferentes que se incubaron durante 24, 48 y 72 hrs a 37°C.

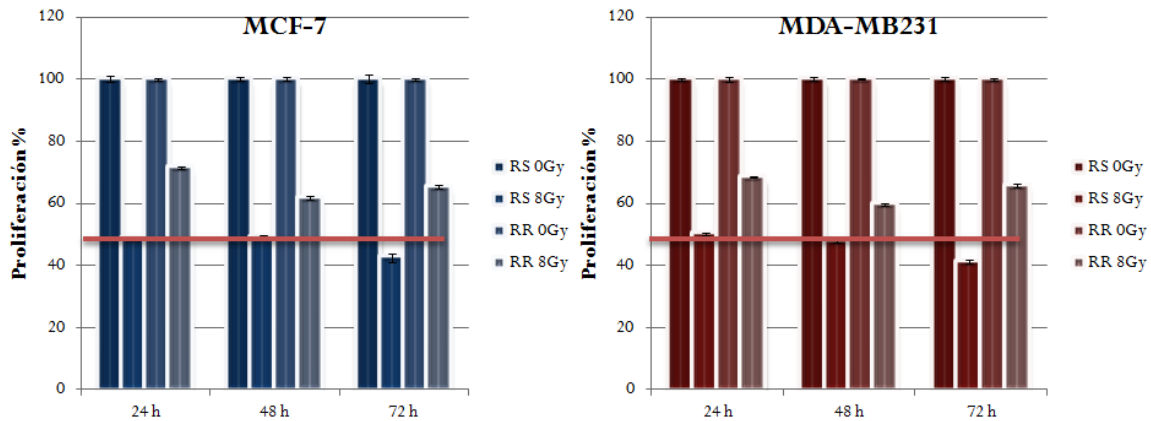
Posteriormente, las células se incubaron con MTT por 4 hrs y se determinó la D. O. de los pozos en un lector de ELISA. En la **tabla 19** se muestran los datos del promedio de la D.O a los tres diferentes tiempos.

**Tabla 19.** Ensayo de Proliferación para determinar la radioresistencia de las líneas MCF-7 RR y MDA-MB231

	MCF-7						MDA-MB231					
	DO 24	DO 48	DO 72	% 24	% 48	% 72	DO 24	DO 48	DO 72	% 24	% 48	% 72
<b>RS 0 Gy</b>	0.216	0.417	0.521	100	100	100	0.205	0.402	0.488	100	100	100
<b>RS 8 Gy</b>	0.105	0.205	0.221	48.77	49.12	42.52	0.103	0.192	0.201	50.24	47.76	41.11
<b>RR 0 Gy</b>	0.183	0.31	0.415	100	100	100	0.174	0.301	0.397	100	100	100
<b>RR 8 Gy</b>	0.154	0.257	0.340	71.38	61.74	65.34	0.140	0.239	0.321	68.39	59.62	65.75



Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células irradiadas, tomando como el 100% el número de células RS y RR sin irradiar (RS 0 Gy y RR 0 Gy) respectivamente, y se graficaron los porcentajes (**Figura 12**).



**Figura 12.** Ensayo de proliferación para determinar la radioresistencia en las líneas MCF-7 y MDA-MB231 RR con respecto a su control RS

En la grafica, se puede observar que las líneas MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR, presentaron un porcentaje de proliferación mayor que el control RS, después de haber recibido la DL50 de 8 Gy. En el caso de MCF-7 RR, el porcentaje de proliferación fue de 71.38% a las 24 hrs en comparación a la MCF-7 RS que fue de 48.77%. Para MDA-MB-231 RR, el porcentaje de proliferación fue de 68.39% a las 24 hrs en comparación a la MDA-MB-231 RS cuyo porcentaje de proliferación fue de 50.24%.

Para los tiempos de 48 y 72 hrs, ambas líneas celulares, tanto RS como RR, presentaron el mismo patrón de disminución en el porcentaje de proliferación cuando recibieron la dosis de 8 Gy, pero resaltando que las líneas RR, presentaron un porcentaje mayor de proliferación que las líneas RS. Estos datos confirman que las líneas celulares MCF-7 RR y MDA-MB231 RR se comportaban como líneas radioresistentes.

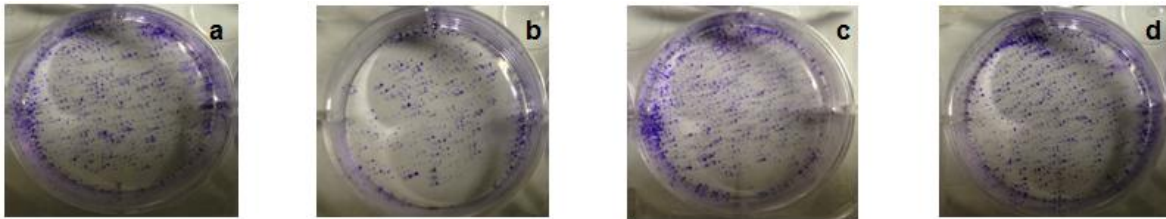
### 8.3.3 Ensayo Clonogénico para determinar la radioresistencia en las líneas MCF-7 y MDA-MB231 RR

Para este ensayo, se sembraron 1000 células por pozo y por triplicado en placas de seis pozos, utilizando células irradiadas no irradiadas e irradiadas con con la DL50 de 8 Gy (RS 0 Gy, RR 0 Gy, RS 8 Gy y RR 8 Gy). Las células se incubaron por 2 semanas a 37°C.

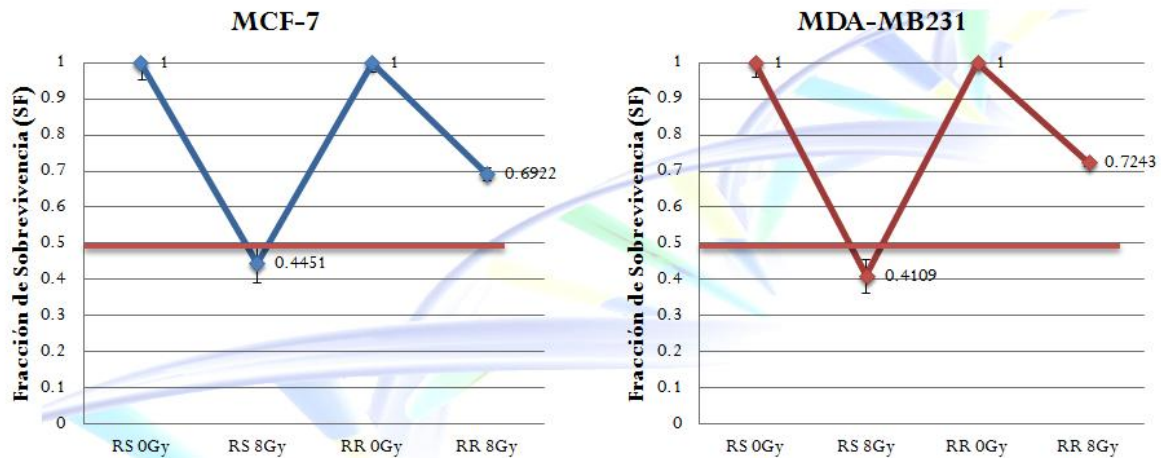
Después de la incubación, las células se tiñeron con cristal violeta y se contaron las colonias clonogénicas (**Figura 13**). El ensayo se realizó por triplicado y en la **tabla 20** se presenta el promedio. El número de colonias de las células RS 0 Gy, fue de 940.33 colonias para la línea MCF-7 y de 914.66 colonias para la línea MDA-MB231. Estos valores se utilizaron para calcular el P.E. y la fracción de sobrevivencia de cada línea celular. Los datos se graficaron los resultados (**Figura 14**).

**Tabla 20.** Ensayo Clonogénico para determinar la radioresistencia en MCF-7 RR y MDA-MB231 RR

	MCF-7				MDA-MB231		
	Cel sembradas	Colonias	P.E	S.F	Colonias	P.E	S.F
<b>RS 0 Gy</b>	1000	940.33	94.03	1	914.66	91.46	1
<b>RS 8 Gy</b>	1000	473.33		0.4451	449.33		0.4109
<b>RR 0 Gy</b>	1000	846.66		1	828		1
<b>RR 8 Gy</b>	1000	817.66		0.6922	792		0.7243



**Figura 13.** Ensayo clonogénico. Fotos tomadas después de teñir con cristal violeta. Panel a = RS sin radiación (RS0 Gy); panel b = RS con radiación (RS8 Gy); panel c = RR sin radiación (RR0 Gy); panel d = RR con radiación (RR8 Gy). Células MDA-MB231



**Figura 14.** Ensayo clonogénico. Fracción de supervivencia para determinar la radioresistencia en las líneas MCF-7 y MDA-MB231 RR

En la grafica, se puede observar que las líneas MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR, presentaron una fracción de supervivencia (SF) mayor que el control RS, después de haber recibido la DL50 de 8 Gy. En el caso de MCF-7 RR, la SF fue de 0.6922 en comparación a la SF de MCF-7 RS que fue de 0.4451. Para MDA-MB-231 RR, la SF fue de 0.7243 en comparación a la MDA-MB-231 RS cuya SF fue de 0.4109. Estos resultados corroboran nuevamente que las líneas MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR se comportaron como radioresistentes en comparación a su control RS

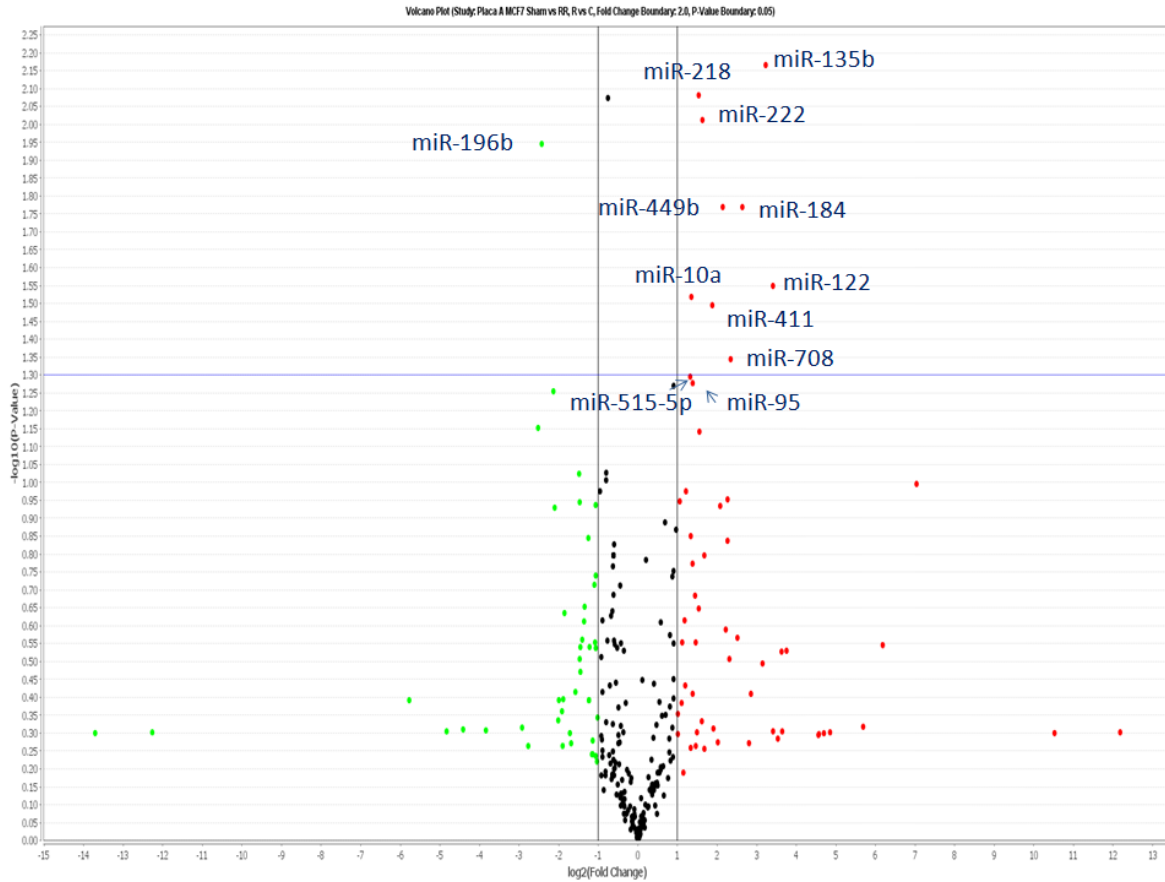
En conclusión, los ensayos de viabilidad, proliferación y clonogenicidad, permiten demostrar que las líneas celulares MCF-7 RR y MDA-MB RR generadas

por el esquema de radiación de dosis fraccionada., se comportaban como radioresistentes.

#### **8.4 Perfil de expresión de miRNAs con la técnica de Taqman Low Density Array**

Después de haberse comprobado que las líneas celulares MCF-7 RR y MDA-MB-231 RR, se comportaban como radioresistentes, se decidió iniciar con el análisis del perfil de expresión de miRNAs en las células MCF-7, ya que es una línea celular que expresa los receptores de estrógeno, progesterona y Her-2, lo cual corresponde al tipo de cáncer de mama más común en pacientes. Por otra parte, no hubo diferencia en la radioresistencia con respecto a la línea celular MDA-MB-231. Para eso se extrajo el RNA total de las células MCF-7 RR y RS y se realizó el perfil de expresión de los miRNAs por el método de Taqman Low Density Array (por duplicado). Los datos obtenidos, es decir el conjunto de los miRNAs que se expresan en las líneas MCF-7 RR y RS, están presentados en la gráfica de Volcano plot, la cual permite identificar los miRNAs que se expresan de manera diferencial entre ambas líneas celulares de acuerdo al fold change y valor de p (**Figura 15**). En la **tabla 21**, se enlistan los miRNAs más significativos.

Un total de 10 miRNAs cumplen con los parámetros considerados inicialmente como significativos, es decir un fold change mayor a 2 y un valor de  $p \leq 0.05$ : miR-196, miR-135b, miR-222\*, miR-449b, miR-184, miR-122, miR-411, miR-223, miR-934, miR-787 y miR-135b\*. Además, se consideraron 11 miRNAs reportados previamente en cáncer, aun si el fold change era menor a 2, siempre y cuando el valor de p sea significativo: miR181a, miR-942, miR-30d, miR-30d\*, miR-515-5p, miR-708, miR-95, miR-222, miR-218, miR-10a y miR-424\*. Por lo que en total, 21 miRNAs cambiaron su expresión en la línea celular MCF-7 RR en comparación con la línea celular MCF-7 RS, de los cuáles solamente tres miRNAs se subexpresaron (miR-196, miR181a y miR-9423) mientras que 18 miRNAs se sobreexpresaron.



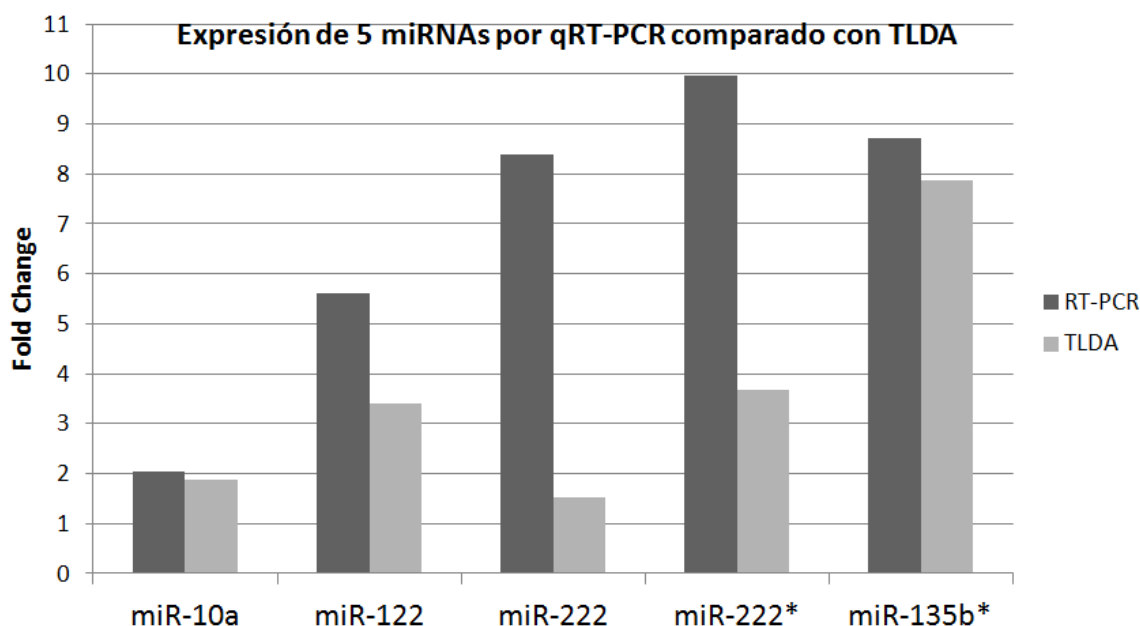
**Figura 15.** Gráfica de Volcano plot para obtener miRNAs que se expresan diferencialmente en las líneas MCF-7 RR y MCF-7 RS. Cuadrante superior derecho: miRNAs sobre expresados con valor de fold change mayor a 2 y una p significativa = 0.05; Cuadrante superior izquierdo: miRNAs sub expresados con valor de fold change mayor a 2 y una p significativa = 0.05

**Tabla 21.** MiRNAs expresados diferencialmente en la línea MCF-7 RR

miRNA	RQ	Fold change	P-value	miRNA	RQ	Fold change	P-value
miR-196b	0.186	-2.43	0.0113	miR-10a	3.683	1.88	0.032
miR-181a	0.32	-1.65	0.0091	miR-424*	3.754	1.91	0.0375
miR-942	0.462	-1.11	0.0329	miR-449b	4.421	2.14	0.017
miR-30d*	2.091	1.06	0.0381	miR-411	5.069	2.34	0.0452
miR-30d	2.092	1.06	0.0513	miR-184	6.225	2.64	0.017
miR-515-5p	2.501	1.32	0.0507	miR-135b	9.394	3.23	0.0068
miR-708	2.541	1.35	0.0303	miR-122	10.6	3.41	0.0282
miR-95	2.614	1.39	0.0529	mir-222*	12.813	3.68	0.0169
miR-222	2.887	1.53	0.0083	miR-223*	14.96	3.91	0.0014
miR-218	3.092	1.63	0.0097	miR-934	126.71	6.98	0.0529
				miR-135b*	234.32	7.87	0.015

### 8.5 Expresión de cinco miRNAs modulados en la línea MCF-7 radioresistente.

Se validaron por qRT-PCR cinco miRNAs de interés, esto para comprobar con otra técnica la expresión de estos miRNAs en nuestro sistema. Se escogió el miR-135b\* por ser el miRNA más sobre-expresado en nuestro modelo de radioresistencia (fold change = 7.87), el miR-10a, miR-122 y el miR-222 por ser miRNAs previamente reportados en cáncer, y el miR-222\* por ser un miRNA no reportado en cáncer (**Figura 16**).



**Figura 16.** Expresión de cinco miRNAs. Se realizó la validación de 5 miRNAs por q-RT-PCR para comparar la expresión obtenida por el método de TLDA.

En la **figura 16**, se observa que por qRT-PCR, los cinco miRNAs se sobreexpresaban en las células radioresistentes en comparación a las células radiosensibles, tal y como se había obtenido con el método de TLDA. Este experimento se realizó por duplicado para poder obtener una  $p \leq 0.05$  y un fold change promedio mayor a 2 con la ayuda del programa de asistencia Data assist, comparando a la línea MCF-7 RS con la línea MCF-7 RR.

### **8.6 Predicción de genes blanco y procesos biológicos afectados por los miRNAs modulados en las líneas radioresistentes.**

Después de haber determinado los miRNAs que se expresan de manera diferencial en la línea celular MCF-7 RR, se realizó una búsqueda bibliográfica para saber si los miRNAs modulados en las líneas radioresistentes, estaban previamente reportados en cáncer (**Tabla 22**).

**Tabla 22.** miRNAs expresados diferencialmente en las líneas MCF-7 RR y reportados previamente en otros tipos de cáncer.

miRNAs	Blanco validado	Tipo de cáncer	Referencia
miR-708	FOXO3/Survivina	Leucemia/C Renal	Bo-Wei Han et al 2011 /Saini et la 2010
miR-222	ERalfa, PR, CAV1, CAV2, PTEN, CDKN1B, BIM, TSC1, FOXO3 /p27(Kip1)	C de mama /C. de mama	Gianpiero et al 2010 /Miller et al 2008
miR-10a	RB1CC1, ARNT, GTFH1, ID4, KLF4, MAPRE1, NR4A3, RB1CC1, TFAP2c /HOXA1 /HOXD10	Leucemia Mieloide Aguda /C. pancreático /C. de mama	Bryant et al 2012 /Ohuchida et al 2012 /Progribny et al 2010
miR-95	SNX1	C. colonorectal	Huang et al 2011
miR-122	CPEB	Fibroblastos*	Burns et al 2011
miR-218	Robo1 /Robo1, BIRC5 /LAMB3 /ECOP(vía NFkB)	C. gástrico /C. Nasofaríngeo /C. cérvix C. gástrico	Jun et al 2010 /Nehd et al 2011 /Martínez et al 2008 /Caiping et al 2010
miR-184	Akt2	Neuroblastoma	Niamh et al 2010
miR-196b	HOXC8	C. de mama	Yong et al 2010
miR-30d	P53	C. de pulmón	Munish et al 2011
miR-181a	ATM	C. de mama	Yujun et al 2011

De los 21 miRNAs modulados en la línea MCF-7 RR, 12 miRNAs ya estaban reportados para a algún tipo de cáncer: miR-708 en leucemia y cáncer renal; miR-222 en cáncer de mama; miR-10a en leucemia, cáncer de páncreas y cáncer de mama; miR-95 en cáncer de colón; miR-218 en cáncer gástrico, nasofaríngeo y cáncer de cérvix; miR-196b en cáncer de mama; miR-30d en cáncer de pulmón; miR-181a en cáncer de mama; miR-449b en cáncer ovárico; miR-411 en cáncer de mama; miR-184 en neuroblastoma; miR-135b en cáncer de mama. Pero para solamente 10 de estos miRNAs, se conocen blancos validados



relacionados con cáncer. Los otros miRNAs identificados en el presente no han sido reportados en cáncer hasta la fecha (miR-942, miR-934, miR-30d\*, miR-221\*, miR-135b\* y miR-223\*).

Después de la búsqueda bibliográfica, se realizó el análisis *in silico* de los genes blanco para cada miRNA expresado diferencialmente en diferentes funciones relacionadas con cáncer, utilizando los tres diferentes programas previamente citados, los cuáles se basan en la complementareidad de los miRNAs con los posibles genes blanco (**Tabla 23**). Se consideraron seis funciones relacionadas con cáncer y radioresistencia, las cuales son: ciclo celular, reparación de dna, apoptosis, transcripción, migración y proliferación.

Para cada uno de los miRNAs, se encontraron diversos blancos relacionados con las funciones y eventos mencionados anteriormente, sugiriendo que la desregulación de la expresión de estos miRNAs, puede afectar a uno o varios blancos de diferentes mecanismos, provocando cambios fenotípicos en las células, en este caso radioresistencia.

**Tabla 23. miRNAs diferenciales y sus genes blanco**

hsa-miRNA	Ciclo celular	Reparación DNA	Apoptosis	Transcripción	Migración/ Proliferación
<b>mir-196b</b>	E2F7, BCAT1, ABL1, CREBL2, CDC25A, CDKN1B, GAS7, RCC2, ZMYND11	RAD23, ABL1, EPC2, EYA4	DDX19B, EPHA7, BIRC6, ABL1, CDKN1B, Igf1, MAP3K1, NRAS, PRUNE2, RXFP2	BCL11A, Bach1, E2F7, Elf4, SRY11, SRY12, Bnc2, CREBL2, EBF1, CDYL, FOXP2, HAND1, HLF, HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXC8, Lcor, mecp2, PBX3, ZBTB39, ZNF200, ZNF507,	M: IGF1, MAP3K1, Pard6b, pdgfra  P: Elf4, SOX11, BCAT1, CDC25A, EPS15, Igf1, OSMR
<b>mir-181a</b>	GLI2, Glis3, JAZF1, kif15, ZIC2, ZIC3, ZIC4, EGR1, EGR2, PLAG1, ZBTB34		BCL2, Bag4, BCL2L11, Bmf, MADD, ARHGEF3, TIMP3, XIAP, ARNT2, CREB1, Casp10, CARD11, CUL5, Esr1, Hsp90b1, HIPK2, HSPA5, IL1a, MAPK1, Map3k10, PAK7, PCGF2, KCNMA1, Prkce, BCLAF1, ATM, TGFbr1, TNF, KRAS	ARID2, Bach2, CEBPA, CREBzf, E2F5, E2F7, GATA6, GLI2, JAZF1, KLF15, KLF6, LMX1A, MGA, MYCBP2, NAB1, PAWR, RORB, SMAD3, SMAD7, SOX5, SOX6, SP1, TARDBP, TMF1, Tgif2, YY1, CREB1, MYCBP, CCNK, CCR6, CDK8, HOXA1, HOXA11, HOXB8, HOXC8, HOXD1, PBX3, BCLAF1, ZNF449, ZNF800	M: CD2AP, KITLG, Six4, B4GALT1, Astn1, CDH13, Col5a1, DCLK1, FLT1, LAMC1, LRP6, MMP14, Phox2b, Ppap2b, PLAU, Pafah1b1, PODXL, PRKG1, SEMA3C, Srf, TNS1, TNS3, TGFbr1, TNF, VAX1
<b>mir-942</b>	CHEK1, CREBBP, SMAD2, SMAD4, CDK6	ATMIN, CHEK1, CRY2, HIPK2, MAPK14,	API5L1, BNIP1, GRAMD4, HIPK2, PEG10, SGMS1	Akna, CREBBP, DNMT3A, KLF3, RBM9, SMAD2, SMAD4, SMAD7, SOX11, DLX3, MAPK14, Rreb1, ZNF238, ZNF235	M: LHX6, MDGA1, CLASP2, EDN3, LAMC1, LRP8, TNS1, ZEB2  P: CD160, COPS2, CREBBP, SOX11, EMP2, MTCP1, PDPN, TGfA, ZEB2
<b>mir-30d</b>	SMAD1, SMAD2, FOXG1, NEFL, NDEL1, LYN		ADAM9, BCL11B, BNIP3L, KLF10, PAWR, RASA1, SOX9, TIMP3, AVEN, CASP3, IGFR2, IL1, IL2RA, NF1, Rarb, socs3	AFF3, AFF4, BCL11B, BCOR, CNOT6, E2F7, KLF10, KLF12, KLF9, MLXIP, SMAD1, SMAD2, SOX9, ATF1, CCNK, FOXD1, HOXA1, NFIB, Rarb, ZNF238, ZNF382	M: ADAM9, WDR44, GNA13, HDAC9, ITGB3, NF1, PTPRK  P: BCL11B, E2F7, KLF10, PAWR, SMAD1, SMAD2, CASP3, IL1, IL2RA, NF1, NFIB, Rarb
<b>mir-515-5p</b>	CCNT2, Mapre1, Mapre2, PKHD1, Smc1a, TACC1	BTG2, Smc1a, Ube2b	API5, BAG1, RYBP, SLTM, TIAM1, GADD45b, HRK, MEF2D, SGPL1	AFF4, BTG2, CREBZF, Gatad2b, ISL1, KLF3, RCOR2, RYBP, SOX12, TBX21, TBX4, CCNT2, HOXC10, IL16, NFIB, VEZF1, ZNF248, ZNF322A, ZNF582, ZNF607	M: ISL1, ABI2, DCX, IL16, OPHN1, SGPL1
<b>mir-708</b>			HTRA2, CASP2, FOXO3, NRAS,	PRDM2, SETDB1, SMAD4, SMARCC2,	P: Rap1b, GNG12, NRAS, STK4

			Rarg, STK4, TEX261	CCNL2, EN2, EYA3, FOXJ3, FOXO3, HOXB3, JMJD6, NFE2L2, Rarg, TRPS1	
<b>mir-95</b>					P: GNAI2, SHOX2
<b>mir-222</b>	CD2AP, E2F2, SH3BP4, CDKN1C, TET2, TCF3, VASH1	BBC3, HIPK1, HIPK2	AKAP13, BBC3, BCL2L11, BMF, APAF1, CDKN1B, ESR1, HIPK1, HIPK2, NTF3, SOCS3, SNCB, THBS1, TP53BP2, PAK1	ARID1A, BMI1, CREBZF, E2F2, FOXO3, HOXA7, IKZF4, NRK, SOX10, SOX11, CUX2, CDKN1B, ESR1, FOXN2, HIPK1, HIPK2, NTF3, NFYB, TCF12, TCF3, TCF4, ZEB2, ZNF385A, ZNF629, ZNF654	M: CXCL12, ITGB3, KDR, MIA3, PIK3R1, THBS1  P: BMI1, CD47, ASPH, CDKN1B, GNAI2, HIPK1, HIPK2, KDR, THBS1
<b>mir-218</b>	ARL3, CABLES1, IKZF1, RASSF2, BRCA1, CHFR, CDK6, FOXN3, HCFC1, PPP1CC, PTP4A1, RCBTB1, SPAST, SMPD3, TLK2, TACC1	BRCC3, BTG2, Atrx, BRCA1, HMGB1, JMY, POLH, pold3,	Arf6, Kcnp3, MCF2, phf17, RYBP, RASSF5, TRAF5, BRCA1, DCC, ELMO1, GRIK2, ITSN1, KALRN, RFFL, SERBP1, LIFR, RARA, ERBB4	AFF4, ARID4B, BCL11A, BCL11B, BMI1, BTG2, CNOT2, CREBZF, DPF3, GABPA, IKZF1, JDP2, KLF12, KLF3, KLF9, RCOR1, RYBP, SATB2, SOX11, SOX5, SP1, TBX15, TGIF2, CDCA7L, CBX7, EBF1, EBF3, FOXN3, HOXA10, HOXB3, HOXD10, HIC2, MED1, MED12L, MED17, MYT1L, NFE2L1, PBX2, rarA, ST18, TCF12, TCF20, TCF4, TRRAP, ZBTB11, ZMIZ1	M: GAB2, MDGA1, SATB2, CDH2, CCDC88A, DCC, DCX, DCLK1, NEUROD4, PLXNA2, RELN, RET, ZEB2
<b>mir-10a</b>	E2F3, E2F7, Papd5, btrc, CAMK2G, CDK6, MAPRE1, SMAD2, UBE2I, ZMYND11		BCL6, BCL2L11, BCL2L2, DPF2, PIK3CA, TBX5, TIAM1, BDNF, GCLM, MAP3K7,	BCL6, BACH2, CNOT6, E2F3, E2F7, GATA6, KLF11, SMAD2, TBX5, MYCBP, EBF2, ESRG, GTF2H1, HOXA3, HOXB3, HOXD10, JARID2, MED1, MTF1, MYT1L, NCOR2, ZNF367, ZMYND11	P: BCL6, E2F3, E2F7, KLF11, SMAD2, ST8SIA1, TBX5, BDNF, CDK6, HDAC4, HOXA3, NR5A2, JARID2, SERPINE1
<b>mir-449b</b>	E2F3, E2F5, FOSL1, SMAD4, CDC25A, CCND1, CCNE2, CDK6, CDKN1C, DBC1, FOXG1, FOXN3, GAS1, HNF4A, PDCD4, PKIA, SIPA1	ATMIN, CCND1, DGKZ	BCL11B, BCL2, FOSL1, NOTCH1, NOTCH2, SOX4, ABR, CASP2, CYCS, EI24, GAS1, HSPA1A, IGFBP3, IL6R, ITSN1, NR4A2, SYVN1	AFF4, ARID4A, BCL2, CRTC1, E2FE, E2F5, FOSL1, GATAD2B, LASS6, NOTCH1, NOTCH2, PKNOX1, SATB1, SATB2, SMAD4, SOX4, TAF4B, TAF5, TGIF2, YY1, CREB3L1, CREB5, CAMTA1, CDKN1C, ELL2, FOXG1, FOXJ2, FOXN2, FOXN3, FOXP1, FOXP2, MTA2, NCOA1, ONECUT2,	M: BCL2, IGFBP3, IL6R, JAG1, MAP2K1, ONECUT2, PTPRM, RRAS, VCL  P: BCL2, KITLG, AREG, CDC25A, CSF1R, GNAI2, LGR4, LGI1, MET, MAP2K1, PRKD1, SIPA1, UHRF2, UCN2

				TCF12, ZFH4, ZNF281	
<b>mir-411</b>			RYBP, MAP3K1, PREX1, SEMA3A	CREBZF, NAB1, POU4F1, RYBP, SMAD4, SP1, SP2, YAF2, EIF2C1, FOXO1, MAP2K1, MAP3K1, ZNF518A	M: POU4F1, CDH2, ZFAND5  P: SMAD4, FOXO1, ERBB4
<b>mir-184</b>				CBX6, EIF2C2, HIF1AN, ILF3, NCOR2, NR4A2, SF1	
<b>mir-135b</b>	Arhgef2, ACVR1B, APC, CCNG2, CLASP1, FOXN3, GAS7, INHBA, IZTS1, NPAT, PIM2, PLAGL1, TXNIP, TLK1		BCL2L2, BNIP2, DPF1, STAMBP, ACVR1B, COL4A3, FOXO1, GHR, HIPK3, INHBA, NET1, PAK7, PIM2, PLAGL1, RARB, TXNIP	AEBP2, BCL11A, BCL9L, BACH1, ELK1, GATA3, KLF13, KLF3, KLF4, MYST4, POU2F3, RCOR1, RYBP, RBM9, SETD7, SIX4, SMAD4, SMAD5, SP1, SP3, TAF4, YBX2, ATF3, CREG1, CUX2, EBF1, FOXK1, FOXN2, FOXN3, FOXO1, HDAC4, HOXA10, HIF1AN, INHBA, MYT1L, RARA, RARB, ZNF143, ZNF217, ZNF236, ZNF302, ZNF362, ZNF652, ZNF772	M: PTK2, SIX4, COL5A1, CTTNBP2, RPS6KB1, ZFAND5, SDCBP  P: CD47, KLF4, RBM9, SMAD4, STAMBP, ATF3, APC, ESRRA, FOXO1, FRK, HDAC4, NF1, NAMPT, PGR, RARB, TXNIP, TGFB2, VASH2
<b>mir-122</b>			RASSF5, EPO, FOXO3, MEF2D, PEG10, PKM2	BACH2, GATAD2B, PHF19, SOX11, TEAD3, CTNND2, CUX1, ESR1, FOXK2, FOXO3, FOXP2, HIF3A, NFAT5, SNX6, ZBTB41	P: EPO, FGF1, FOXP2, LAMC1, PRKRA
<b>mir-934</b>	SKP1, CUL3, EVI5, ILF3, PDPN, SPIN1, SPIN2A, SPIN2B, UBE2E1		ADNP, CUL3, ESR1, KCNMA1, PRNP, PRKCA, BCLAF1, TNFRSF25, YWHAZ	AFF3, EAF1, LMO4, PRDM2, TEAD1, ADNP, ESR1, ILF3, MLL3, NR5A2, NFYB, RUNX1T1, BCLAF1, ZNF217	

## **IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

El cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres a nivel mundial y en México. Uno de los principales tratamientos para combatir el CM es la radioterapia, pero se ha observado que un número importante de pacientes no responde al tratamiento, presentando un promedio de vida de entre 2 a 5 años. En el 2011, Arndt-Christian Muller y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo desde 1993 al 2003, en el cuál se recolectaron datos de 42 mujeres con CM que recibieron radioterapia después de haber sido sometidas a cirugía conservada, donde se encontró un porcentaje de sobrevivencia después de 5 años del 59%, mientras que el 41% de las pacientes tuvo recurrencia de la enfermedad entre los 2 y los años después de haber terminado el tratamiento con radioterapia.

Ya se han estudiado diferentes mecanismos y moléculas relacionados con la resistencia a la radioterapia. En el 2004, Jameel y colaboradores, realizaron una búsqueda bibliográfica para conjuntar los mecanismos involucrados en la resistencia a la radiación en CM, encontrando varios estudios en mecanismos relacionados con la proliferación celular (VEGF, IGFR, EGFR), evasión de la muerte celular (BCL-2), reparación de DNA (BRCA-1 y BRCA-2) y control del ciclo celular (p53), los cuáles presentan una desregulación genética, ya sea mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas, como la regulación de la expresión de dichas moléculas, desencadenando la activación de diferentes vías y generando una resistencia a la radiación ionizante.

Uno de los principales reguladores de la expresión genética son los miRNAs, los cuáles ya han sido descritos tanto en cáncer como en la resistencia a radiación ionizante. Se han realizado diferentes estudios, relacionando el perfil de expresión de los miRNAs con la respuesta a la radiación. En 2009, Sangsu y colaboradores, realizaron un perfil de expresión de miRNAs en líneas celulares de cáncer de pulmón después de ser sometidas a diferentes dosis de radiación

ionizante, encontrando la expresión diferencial de miRNAs en las líneas que recibieron la radiación comparado con el control sin radiación. Realizaron un análisis *in silico* para determinar los posibles blancos de los miRNAs diferenciales y encontraron que la mayoría de los blancos, estaban involucrados en mecanismos como apoptosis, ciclo celular y reparación de DNA (**Tabla 6**). En el 2011, Niomeller y colaboradores, realizaron un estudio similar pero con líneas celulares de cáncer de cabeza, cuello y cerebro, donde encontraron que los miRNAs diferenciales tenían como posibles blancos a moléculas relacionadas con mecanismos de proliferación, metástasis, ciclo celular y apoptosis. Estos estudios, arrojaban datos importantes para poder relacionar la expresión de los miRNAs con la respuesta a la radiación.

En el presente trabajo, se generó un modelo de líneas celulares de CM (MCF-7 y MDA-MB231) resistentes a radiación para posteriormente obtener el perfil de expresión diferencial de miRNAs en las células MCF-7 radiosensibles y radioresistentes. Los resultados mostraron que 21 miRNAs cambiaron su expresión en la línea celular radioresistente. Algunos de esto ya habían sido reportados en cáncer, con blancos validados en diferentes tipos de cáncer (miR-708, miR-222, miR-10a, miR-95, miR-122, miR-218, miR-184, miR-196b, miR-30d, miR-181a). Pero sólo siete miRNAs estaban reportados en cáncer de mama. De manera interesante, seis de los miRNAs identificados en este trabajo no han sido reportados en algún tipo cáncer (miR-942, miR-934, miR-30d\*, miR-221\*, miR-135b\* y miR-223\*). Los posibles blanco moleculares de dichos miRNAs están involucrados en diferentes funciones relacionadas con cáncer y radioresistencia, tales como ciclo celular, reparación de dna, apoptosis, transcripción, migración y proliferación. Esto podría explicar como la modulación de estos miRNAs esté relacionada con la resistencia a la radioterapia en CM.

El trabajo de Sangsu y colaboradores (2009) mostro la sobreexpresión del miR-30b, el cuál pertenece a la misma familia de uno de los miRNAs encontrados en el presente estudio, el miR-30d, el cuál también se sobreexpresa en nuestro

modelo de radioresistencia. Ambos miRNAs tienen blancos moleculares relacionados con apoptosis, ciclo celular y reparación del DNA, indicando que la familia del miR-30, podrían estar relacionada a dicha resistencia.

Se han realizado algunos estudios sobre la expresión de miRNAs en relación a la resistencia a la radioterapia en cáncer. En el 2011, Ping y colaboradores demostraron que el miR-17-92, estaba relacionado con la resistencia a la radioterapia en linfoma. La sobreexpresión del miR-17-92 en células de linfoma radiosensibles, indujo un aumento de la proliferación celular y sobrevivencia, y una disminución de la muerte celular en respuesta a diferentes dosis de radiación. También observaron que el supresor de tumor PTEN, disminuía su expresión al sobre-expresar el miR-17-92 y que la actividad de AKT aumentaba, siendo el primer estudio en demostrar que la expresión del miR-17-92 aumentaba la radioresistencia en linfoma.

En el 2012, Salim y colaboradores demostraron que el miR-204 estaba relacionado con la resistencia a la radioterapia en pulmón. Los autores generaron líneas de cáncer de pulmón no pequeñas resistentes a radiación, y observaron la sobre-expresión del miR-204. Por otra parte, la inhibición de la expresión del miR-204 sensibilizó a las líneas celulares resistentes a radiación, esto mediante la activación de la muerte celular por apoptosis y senescencia.

Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ningún estudio relacionado al perfil global de expresión de miRNAs en respuesta a la radiación ionizante ni la resistencia a ésta en CM, por lo que este trabajo es el primero que se realiza para este modelo.

## **X. CONCLUSIONES**

Se obtuvo un modelo de radioresistencia en líneas celulares de carcinoma de mama, en base a dosis fraccionadas de 2 Gy hasta un total de 30 Gy, el cuál es un modelo similar al recibido por las pacientes con cáncer de mama.

El modelo de radioresistencia generado en este trabajo, modula la expresión de miRNAs en cáncer de mama, obteniéndose un total de 21 miRNAs diferenciales

Los miRNAs diferenciales en las líneas celulares de carcinoma de mama radioresistentes potencialmente regulan genes que participan en procesos biológicos relacionados al cáncer y a la radioresistencia.

La radioresistencia puede estar generada por un cambio en el perfil de expresión de miRNAs en cáncer de mama.



## **XI. PERSPECTIVAS**

- Realizar un análisis proteómico con la técnica de geles bidimensionales para comparar las proteínas expresadas en las líneas celulares MCF-7 RR y RS.
- Correlacionar el perfil de expresión de los miRNAs con el análisis proteómico para determinar posibles blancos relacionados al mecanismo de radioresistencia.
- Inhibir la expresión de algunos miRNAs previamente reportados en cáncer de mama y mecanismos relacionados con la radioresistencia, para evaluar si estos miRNAs están involucrados en dicha resistencia.
- Realizar el perfil de expresión de miRNAs en tumores y correlacionarlo con el perfil de expresión de miRNAs en las líneas celulares MCF-7 radioresistentes.

## XII. REFERENCIAS

- Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL, et al. *Cancer of the Breast. Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier 2008: 1875–1943.
- Abbott DW, Thompson ME, Robinson-Benion C, Tomlinson G, Jensen RA, Holt JT. BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* 1999; 274:18808–12.
- Adams, BD, Furneaux H, and White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol.Endocrinol* 2007; 21: 1132-1147.
- Ali S, Coombes C; Endocrine responsive breast cancer and strategies for combating resistance; *Nature Reviews Cancer* 2002; 101-112;
- Al Nakhle H, Burns PA, Cummings M, Hanby AM, Hughes TA, Satheesha S, Shaaban AM, Smith L, and Speirs V. Estrogen receptor {beta}1 expression is regulated by miR-92 in breast cancer. *Cancer Res*, 70: 4778-4784, 2010.
- Avello EJ. Cáncer de mama. Universidad de Oviedo. 2002 pp.15
- Barlow C, Brown KD, Deng CX, Tagle DA and Wynshaw-Boris A: Atm selectively regulates distinct p53-dependent cellcycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat Genet* 1997; 17: 453-456.
- Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Ando' S, Surmacz E. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:6747–54.
- Beaulieu N, Bloom D, Bloom R. Breakaway: The global burden of cancer-challenges and opportunities, The Economist Intelligence Unit, The Economist 2009.
- Børresen-Dale AL. TP53 and breast Cancer. *Hum Mutat* 2003;21:292–300.
- Boyle P, Levin B,. World Cancer Report 2008, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005;23:7350–7360.
- Brognaard J, Clark AS, Ni Y and Dennis PA: Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001 61: 3986-3997.
- Brown, ML, Goldie SJ, Gerrit D, Harford J y Lipscomb J, 2006. "Chapter 29. Health service interventions for cancer control in developing countries", publicado en Jamison D, Breman J, MeaControl A, Alleyne G, Claeson M, Evans D, Jha P, Mills A y Musgrove P, eds. 2006. "Disease Control Priorities in Developing Countries", Oxford University Press, 2nd. ed. New York.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524–9.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, et al: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; 281: 1677-1679.
- Cann KL and Hicks GG: Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 663-674.
- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1): 181-187.
- Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, and Zhang C.Y. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28: 1385-1392.
- Chen XF, Shen BH, Xia LQ, Khaletzkij A, Chu D, Wong JYC, and Li JJ. Activation of nuclear factor kappaB in radioresistance of TP53-inactive human keratinocytes. *Cancer Res* 2002; 62, 1213–1221.

Chen Y. and Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 2008; 111: 1217-1226.

Ciatto S, Bonardi R, Herd-Smith A, Cariaggi P, Confortini M, Bulgaresi P. Prognostic value of breast cancer cytologic grading: a retrospective study of 213 cases. *Diagn Cytopathol* 1993;9(2):160-163.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, and Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005; 102: 13944-13949.

Citron ML, Berry DA, Cirrincione C, et al: Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: First report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003; 21:1431-1439.

Chan JA, Krichevsky AM, and Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-6033.

Christos S, Soek-Ying N, Lisa MM, Edward LK, Philip ML, Amir J, Philippe M, Steve BF, Adrian LH, and Edison TL; Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study; *PNAS* 2003; 10:18

Clarke M, Collins R, Darby S, et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 2005; 365:1687-1717.

Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, and Lund AH. p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death.Differ* 2010; 17: 236-245.

Cuneo KC, Fu A, Osusky K, Huamani J, Hallahan DE and Geng L: Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 sensitizes human nonsmall cell lung cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 793-800.

Dabbs DJ. Role of nuclear grading of breast carcinomas in fine needle aspiration specimens. *Acta Cytol* 1993;37(3):361-366.

Dabbs DJ, Silverman JF. Prognostic factors from the fineneedle aspirate: breast carcinoma nuclear grade. *Diagn Cytopathol* 1994;10(3):203-208.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF and Hannon GJ: Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-235.

Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, and Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat.Genet* 2006; 38: 1060-1065.

Di Leva G, Gasparini P, Piovan C, Nanganke A, Garofalo M, Taccioli C, Iorio MV, Li M, Volinia S, Alder H, Nakamura, T, Nuovo G, Liu Y, Nephew KP, and Croce CM. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J.Natl. Cancer Inst* 2010 102: 706-721.

Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, and Lieberman J. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS.One* 2009; 4: e7181.

Earp HS, Calvo BF, Sartor CI. The EGF receptor family multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2003;114:315-33.

Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3627-32.

Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992;20(6):479-489.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5):403-410.

Erson AE. miRNAs and cancer. New research developments and potential clinical applications. *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8:2317-22.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, and Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2007; 104: 15805-15810.

Fattaneh AT, Peter D. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs; IARC WHO Classification of Tumours, No 4, 2003

Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, and Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2005; 102: 18081-18086.

Findlay VJ, Turner DP, Moussa O, and Watson DK. MicroRNA-mediated inhibition of prostate-derived Ets factor messenger RNA translation affects prostate-derived Ets factor regulatory networks in human breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 8499-8506, 2008.

Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh R F, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, and Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev.Cell* 2008; 15: 272-284.

Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 1990;65(9 suppl):2121-2128.

Franco-Marina F, Lazcano-Ponce E y López-Carrillo L. "Mortalidad por cáncer de mama en México. Un análisis de edad-periodo-cohorte", *Salud Pública de México* 2009; Vol. 51 supl. 2:S157-S164.

Friedman JM, Jones PA, and Liang G. The tumor suppressor microRNA-101 becomes an epigenetic player by targeting the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Cell Cycle* 2009, 8: 2313-2314.

Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavoraro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M., Maggio, R., Peragine, N., Santangelo, S., Mauro, F. R., Landgraf, P., Tuschl, T., Weir, D. B., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Guarini, A., Foa, R., and Macino, G. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007 109: 4944-4951.

Garcia-Closas M, Hall P, Nevanlinna H, Pooley K, Morrison J, Richesson DA, *et al.* Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics. *PLoS Genet* 2008; 4(4):e1000054.

Gillies, J. K. and Lorimer, I. A. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle* 2007; 6

Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, *et al.* Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumour effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999;59:3374-8.

Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G. J. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat.Cell Biol* 2008; 10: 593-601.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N and Shiekhattar R: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640.

Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, *et al.* Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet* 2007; 39(5): 631-637.

Gupta VK, Jaskowiak NT, Beckett MA, *et al.* Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumour radioresistance. *Cancer J* 2002;8: 47-54.

Guo G.Z, Yan Y.S, Lyn-cook B.D, Wang T.L, Tame D., Ogi J., Khaletskiy A., Li Z.L, Weydert C. and Li J.J, Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol. Cell. Biol* 2003; 23, 2362-2378

Harrison T, Fauci A, Braunwald E, Kasper D; Harrison, *Principios de Medicina Interna*; Editorial McGraw-Hill, 16a Ed; 2005:356-387.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632.

He, L. and Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004 5: 522-531.

Heneghan HM *et al.* miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10:1-8

Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G; "Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada", Instituto Nacional de Medicina Genómica. México. *Salud pública de México / vol. 51, suplemento 2 de 2009*

Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in early laryngeal cancer: relationship with radioresistance. *Clin Otolaryngol* 2001;26:498-504.

Hortobagyi GN, Ames FC, Buzdar AU, Kau SW, McNeese MD, Paulus D, et al. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy. *Cancer* 1988;62(12): 2507-2516.

Hossain, A., Kuo, M. T., and Saunders, G. F. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *MolCell Biol* 2006; 26: 8191-8201.

Huang, Q., Gumireddy, K., Schrier, M., le Sage, C., Nagel, R., Nair, S., Egan, D. A., Li, A., Huang, G., Klein-Szanto, A. J., Gimotty, P. A., Katsaros, D., Coukos, G., Zhang, L., Pure, E., and Agami, R. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat.Cell Biol* 2008; 10: 202-210.

Hudis C, Tan LK. Rare cancers in the breast. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams & Wilkins; 2005: 1015–1033.

Hurst, D. R., Edmonds, M. D., Scott, G. K., Benz, C. C., Vaidya, K. S., and Welch, D. R. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009; 69: 1279-1283.

Iliakis G, Wang Y, Guan J and Wang H: DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22: 5834-5847.

Iorio, M. V., Casalini, P., Piovan, C., Di Leva, G., Merlo, A., Triulzi, T., Menard, S., Croce, C. M., and Tagliabue, E. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 2195-2200.

Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., and Croce, C. M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070.

Ivanovska, I., Ball, A. S., Diaz, R. L., Magnus, J. F., Kibukawa, M., Schelter, J. M., Kobayashi, S. V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A. L., Linsley, P. S., and Cleary, M. A. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol.Cell Biol* 2008 28: 2167-2174.

Jameel J.K.A, Rao V.S.R, Cawkwell L., Drew P.J; Radioresistance in carcinoma of the breast; *The Breast* 2004; 13, 452–460

Jemal A, Center M.M, De Santis C, et al. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1893-1907.

Joki T, Carroll R.S, Dunn I.F, Zhang J, Abe T. and Black P.M, Assessment of alterations in gene expression in recurrent malignant glioma after radiotherapy using complementary deoxyribonucleic acid microarrays. *Neurosurgery* 2001; 48, 195–201.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006; 354:809–820.

Joensuu H, Tenhunen M. Physical and biological targeting of radiotherapy. *Acta Oncol* 1999; 38:75-83.

Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., and Slack, F. J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647.

Kan, T., Sato, F., Ito, T., Matsumura, N., David, S., Cheng, Y., Agarwal, R., Paun, B. C., Jin, Z., Oлару, A. V., Selaru, F. M., Hamilton, J. P., Yang, J., Abraham, J. M., Mori, Y., and Meltzer, S. J. The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology* 2009; 136: 1689-1700.

Kasten-Pisula U, Windhorst S, Dahm-Daphi J, Mayr G and Dikomey E: Radiosensitization of tumour cell lines by the polyphenol Gossypol results from depressed double-strand break repair and not from enhanced apoptosis. *Radiother Oncol* 2007; 83: 296-303.

Kazi M. Ahmed, Shaozhong Dong, Ming Fan, and Jian Jian Li; Nuclear Factor-KB p65 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Radioresistant Breast Cancer Cells; *Mol Cancer Res* 2006;4(12).

Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KK, Stacey SN, et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 2008; 40(11):1307-1312.

Knaul FM, Arreola-Ornelas H, Velázquez E, Dorantes J, Méndez O y Ávila-Burgos L, 2009. "El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social", *Salud Pública de México* 2009; Vol. 51 supl. 2:S286-S295.

Knaul F, Bustreo F, Ha E y Langer A, 2009. "Cáncer de mama: ¿Por qué integrar la detección temprana con las intervenciones en salud reproductiva en países en vías de desarrollo?" *Salud Pública de México*; Vol. 51 supl. 2:S220-S227.

- Knaul FM, López Carrillo L, Lazcano Ponce E, Gómez Dantés H, Romieu I y Torres G, 2009. "Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud", *Salud Pública de México*; Vol. 51 supl. 2:S135-137.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, y Frenk J, 2009. "Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante", *Salud Pública de México*; Vol. 51 supl. 2:S335-S344.
- Knowlton K, Mancini M, Creason S, Morales C, Hockenbery D, Anderson BO. Bcl-2 slows in vitro breast cancer growth despite its antiapoptotic effect. *J Surg Res* 1998;76: 22–6.
- Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J. J., Coppola, D., Dalton, W. S., and Cheng, J. Q. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol.Cell Biol* 2008; 28: 6773-6784.
- Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ.Res* 2007; 101: 59-68.
- Kurtz JM. Radiotherapy for early breast cancer: was a comprehensive overview of trials needed? *Lancet*. 2000 May 20;355(9217):1739-40.
- Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S. T., and Ghoshal, K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J.Cell Biochem* 2006; 99: 671-678.
- Lage A, Rodriguez M, Pascual MR, Diaz JW, Fernandez L. Factors associated with prognosis in human breast cancer. I. Predictors for rate of evolution and relapse. *Neoplasma* 1983;30(4):475-483.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-858.
- Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J. L., Yang, X., Ahmed, F., Navarro, F., Dykxhoorn, D., Lieberman, J., and Gorospe, M. p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PLoS.One* 2008; 3: e1864.
- Lane D. Cancer.p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15–6.
- Lee, C. T., Risom, T., and Strauss, W. M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 209-218.
- Lee, D. Y., Deng, Z., Wang, C. H., and Yang, B. B. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2007; 104: 20350-20355.
- 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., and Schmittgen, T. D. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int.J.Cancer* 2007; 120: 1046-1054.
- Lehnert S, Prediction of tumor response to therapy: Molecular markers and the microenvironment. Apoptosis and chips: An overview of the proceedings. *Radiat. Res* 2000;. 154, 121–124.
- Lewis BP, Burge CB and Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
- Li, J., Huang, H., Sun, L., Yang, M., Pan, C., Chen, W., Wu, D., Lin, Z., Zeng, C., Yao, Y., Zhang, P., and Song, E. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin.Cancer Res* 2009; 15: 3998-4008.
- Li L, Story M, Legerski RJ. Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49: 1157–62.
- Li, X. F., Yan, P. J., and Shao, Z. M. Downregulation of miR-193b contributes to enhance urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression and tumor progression and invasion in human breast cancer. *Oncogene* 2009; 28: 3937-3948.
- Li Z, Xia L, Lee M.L, Khaletskiy A., Wong J.Y.C and Li J.J., Effector genes altered in human breast cancer MCF-7 cells following fractionated ionizing radiation. *Radiat. Res* 2001; 155, 543–553.
- Liang K, Jin W, Knuefermann C, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway for enhancing breast cancer cells to radiotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 2003;2:53–60.
- Lin, C. J., Gong, H. Y., Tseng, H. C., Wang, W. L., and Wu, J. L. miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 2008; 375: 315-320.

- Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, *et al*: Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008;14: 2115-2124.
- López-Ríos O, Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzman V, Hernández-Avila M. Epidemiology of cancer of the breast in Mexico. Consequences of demography transition. *Salud Publica Mex* 1997;39(4):259-265.
- Lourdes Flores-Luna, Eduardo Salazar-Martínez, Reyna Margarita Duarte-Torres, Gabriela Torres-Mejía, Patricia Alonso-Ruiz, Eduardo Lazcano-Ponce. "Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama". *Salud pública de México / vol. 50, no. 2, marzo-abril de 2008*
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M. F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P. P., Caldas, C., Miska, E., and Esteller, M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1424-1429.
- Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E. G., Teruya-Feldstein, J., Bell, G. W., and Weinberg, R. A. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat.Biotechnol* 2010; 28: 341-347.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007, 449: 682-688.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T. T., Valastyan, S., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J., and Weinberg, R. A. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat.Cell Biol* 2010; 12: 247-256.
- Macaulay VM, Salisbury AJ, Bohula EA, Playford MP, Smorodinsky NI, Shiloh Y. Downregulation of the type 1 insulin-like growth factor receptor in mouse melanoma cells is associated with enhanced radiosensitivity and impaired activation of Atm kinase. *Oncogene* 2001;20: 4029-40.
- Manders P, Sweep FC, Tjan-Heijnen VC, *et al*. Vascular endothelial growth factor independently predicts the efficacy of postoperative radiotherapy in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9: 6363-70.
- Marchetti P, Cannita K, Ricevuto E, *et al*. Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. *Ann Oncol* 2003;14:704-8.
- Marilena V. Iorio, Manuela Ferracin, Chang-Gong Liu, *et al*.; MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer; *Cancer Res* 2005;65:7065-7070.
- Marson A, Levine SS, Cole MF, *et al*: Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 2008; 134: 521-533.
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A. R., Daidone, M. G., Bicciato, S., and Piccolo, S. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 2010; 141: 1195-1207.
- Masood S. Prognostic factors in breast cancer: use of cytologic preparations. *Diagn Cytopathol* 1995;13(5):388-395.
- Mathers CD, López AD y Murray CJL, 2001. "The burden of disease and mortality by condition: Data, methods, and results for 2001", en López AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT y Murray CJL, (eds.) "Global Burden of Disease and risk factors", Oxford University Press. New York.
- Mathijs Voorhoeve, Carlos le Sage, Mariette Schrier, Ad J.M. Gillis, Hans Stoop, Remco Nagel, Ying-Poi Liu, Josyane van Duijse, Jarno Drost, Alexander Griekspoor, Eitan Zlotorynski, Norikazu Yabuta, Gabriella De Vita, Hiroshi Nojima, Leendert H.J. Looijenga, and Reuven Agami; A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors; *Cell* 2006; 124, 1169-1181.
- Mattie, M. D., Benz, C. C., Bowers, J., Sensinger, K., Wong, L., Scott, G. K., Fedele, V., Ginzinger, D., Getts, R., and Haqq, C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol.Cancer* 2006; 5: 24.
- Mayr, C., Hemann, M. T., and Bartel, D. P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 2007; 315: 1576-1579.
- McIlrath J, Bouffler SD, Samper E, Cuthbert A, Wojcik A, Szumiel I, Bryant PE, Riches AC, Thompson A, Blasco MA, Newbold RF, Slijepcevic P. Telomere length abnormalities in mammalian radiosensitive cells. *Cancer Res* 2001;61: 912-5.
- Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J. T., Jiang, J., Schmittgen, T. D., and Patel, T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129.

Mertens-Talcott, S. U., Chintharlapalli, S., Li, X., and Safe, S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007 67: 11001-11011.

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:167–9.

Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1:882–91.

Morrow M, Strom EA, Bassett LW, et al. Standard for the management of ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS). *CA Cancer J Clin*. 2002;52:256–276.

Murray C y López AD, 1996. "The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020". Harvard University Press, Cambridge.

Nattinger A. Variation in the choice of breast-conserving surgery or mastectomy: Patient or physician decision making? *J Clin Oncol*. 2005;23:5429–5431.

Gillies, J. K. and Lorimer, I. A. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle*, 6: 2005-2009, 2007.

NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991;265(3):391-395.

Niemoeller Olivier M, Niyazi Maximilian, Corradini Stefanie, Zehentmayr Franz, Li Minglun, Lauber Kirsten and Belka Claus; MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation; *Radiat Onc* 2011; 6:29

Ning Cao, Shiyong Li, Zhaoqing Wang, Kazi Mokim Ahmed, Michael E. Degnan, Ming Fan, Joseph R. Dynlacht, and Jian Jian Li; NF-κB-Mediated *HER2* Overexpression in Radiation-Adaptive Resistance; *Radiat Res*. 2009 January ; 171(1): 9–21.

Nordgard SH, Johansen FE, Alnaes GI, Naume B, Borresen-Dale AL, Kristensen VN. Genes harbouring susceptibility SNPs are differentially expressed in the breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 2007; 9(6):113.

O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Mendell, J. T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-843.

Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3:385–389.

Olive, V., Jiang, I., and He, L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int.J.Biochem.Cell Biol* 2010; 42: 1348-1354.

Olivier M, Langerød A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1157–67.

Ørom UA, Nielsen FC and Lund AH: MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008; 30: 460-471.

Park, J. K., Lee, E. J., Esau, C., and Schmittgen, T. D. Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2009; 38: e190-e199.

Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 1995;27(3):219-226.

Peretz S, Jensen, Baserga R, Glazer PM. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-1 receptor in a pathway regulating radiation response. *PNAS* 2001;98:1676–81.

Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ and Dahiya R: MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1608-1613.

Ponten F, Lindman H, Bostrom A, Berne B, Bergh J. Induction of p53 expression in skin by radiotherapy and UV radiation: a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:128–33.

Porter P. "Westernizing women's risk? Breast cancer in lower-income countries", *The New England Journal of Medicine* 2009; Vol. 358: 213-216.

Pouget JP, Mather SJ. **General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation.** *Eur J Nucl Med* 2001; 28:541-561.

Price JE. The biology of metastatic breast cancer. *Cancer* 1990;66 (6 suppl):1313-1320.



- Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, et al. Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J cancer* 2003;39: 622–30.
- Pulkkinen, K., Malm, T., Turunen, M., Koistinaho, J., and Yla-Herttuala, S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett* 2008; 582: 2397-2401.
- Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994; 1:27-33.
- Rivera DJ SL, Villalpando HS, González CT, Hernández PB. Encuesta Nacional de nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, 2001.
- Robbins y Cotran, Kumar V, Abbas A, Fausto N; *Patología Estructural y Funcional*; Editorial Elsevier, 7ª edición; 2009; 278-324
- Romieu I, Lazcano-Ponce E, Sanchez-Zamorano LM, Willett W, Hernández-Avila M. Carbohydrates and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(8):1283-1289.
- Rosen E.M, Fan S., Rockwell S. and Goldberg I.D, The molecular and cellular basis of radiosensitivity: Implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Inves* 2009; 17, 56–72.
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al: MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 462-469.
- Sangsu Shin, Hwa Jun Cha, Eun-Mee Lee, Su-Jae Lee, Sung-Keum Seo, Hyeon-Ok Jin, In-Chul Park, Young-Woo Jin and Sungwan An; Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells; *International Journal of Oncology* 2009; 35: 81-86.
- Sartor CI. Epidermal growth factor family receptors and inhibitors: radiation response modulators. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:22–30.
- Schaefer G, Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW, Beattie EJ, Jr. Breast carcinoma in elderly women: pathology, prognosis, and survival. *Pathol Annu* 1984;19(Pt 1):195-219.
- Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB and Valeie K: Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000; 153: 245-257.
- Schwartz JL: The radiosensitivity of the chromosomes of the cells of human squamous cell carcinoma cell lines. *Radiat Res* 1992; 129: 96-101.
- Schwartz JL, Murnane J and Weichselbaum RR: The contribution of DNA ploidy to radiation sensitivity in human tumour cell lines. *Br J Cancer* 2009; 79: 744-747.
- Scott, G. K., Mattie, M. D., Berger, C. E., Benz, S. C., and Benz, C. C. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66: 1277-1281.
- Secretaría de Salud, 2007. “Programa de acción: cáncer de mama. 2007-2012”, Secretaría de Salud, México.
- Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R. W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S. P., Chiao, E., Dirbas, F. M., Somlo, G., Pera, R. A., Lao, K., and Clarke, M. F. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138: 592-603.
- Shtivelman E. Promotion of mitosis by activated protein kinase B after DNA damage involves polo-like kinase 1 and checkpoint protein CHFR. *Mol Cancer Res* 2003;1: 959–69.
- Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., Vandenberg, S. R., Ginzinger, D. G., James, C. D., Costello, J. F., Bergers, G., Weiss, W. A., Alvarez-Buylla, A., and Hodgson, J. G. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC.Med* 2008; 6: 14.
- Simpson JF, Page DL. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol* 1994;102(4 suppl 1):S3-S8.
- Smid M, Wang Y, Klijn JG, Sieuwerts AM, Zhang Y, Atkins D, et al. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J Clin Oncol* 2006; 24(15):2261-2267.
- Su, H., Yang, J. R., Xu, T., Huang, J., Xu, L., Yuan, Y., and Zhuang, S. M. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009 69: 1135-1142.
- Sun, F., Fu, H., Liu, Q., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., and Zheng, X. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett* 2008; 582: 1564-1568.

Suntharalingam N, Podgorsak EB, Hendry JH. Chapter 14. Basic radiobiology. In Radiation Oncology Physics. Podgorsak EB. International Atomic Energy Agency 2005: 485-504.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004;64:3753–6.

Tavazoie, S. F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P. D., Gerald, W. L., and Massague, J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451: 147-152.

Thull DL, Vogel VG. Recognition and Management of Hereditary Breast Cancer Syndromes. *Oncologist* 9: 13–24.

Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 2007; 39(8):984-988.

Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., and Croce, C. M. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J.Immunol* 2007 179: 5082-5089.

Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, et al: Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1772-1781.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T., and Yokoi, T. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 2006; 66: 9090-9098.

Turner BC, Haffty BG, Narayanan L, et al. Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res* 1997;57: 3079–83.

Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A. M., Wang, Z. C., Brock, J. E., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009; 137: 1032-1046.

Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S. J., Newman, J., Bronson, R. T., Crowley, D., Stone, J. R., Jaenisch, R., Sharp, P. A., and Jacks, T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008; 132: 875-886.

Vetter, G., Saumet, A., Moes, M., Vallar, L., Le Behec, A., Laurini, C., Sabbah, M., Arar, K., Theillet, C., Lecellier, C. H., and Friederich, E. miR-661 expression in SNAI1-induced epithelial to mesenchymal transition contributes to breast cancer cell invasion by targeting Nectin-1 and StarD10 messengers. *Oncogene* 2010; 29: 4436-4448.

Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y. P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L. H., and Agami, R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124: 1169-1181.

Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev.Cell* 2008; 15: 261-271.

Wang, S., Bian, C., Yang, Z., Bo, Y., Li, J., Zeng, L., Zhou, H., and Zhao, R. C. miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int.J.Oncol* 2009; 34: 1461-1466.

Weidhaas JB et al. microRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res.* 2007; 67:11111-16.

Wollman R, Yahalom J, Maxy R, Pinto J, Fuks Z. Effect of epidermal growth factor on the growth and radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. *Int J Radiat Oncol* 1994;30:91–8.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2006; 103: 4034-4039.

Wurdinger, T., Tannous, B. A., Saydam, O., Skog, J., Grau, S., Soutschek, J., Weissleder, R., Breakefield, X. O., and Krichevsky, A. M. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 2008; 14: 382-393.

Xia F, Taghian DG, DeFrank JS, Zeng ZC, Willers H, Iliakis G, Powell SN. Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 8644–9.

Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z., and Yang, B. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J.Cell Sci* 2007; 120: 3045-3052.

Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-3016.

- Young JL Jr, Ries LG, Pollack ES. Cancer patient survival among ethnic groups in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1984;73(2):341-352.
- Yu, F., Deng, H., Yao, H., Liu, Q., Su, F., and Song, E. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene* 2010; 29: 4194-4204.
- Yu, Z., Wang, C., Wang, M., Li, Z., Casimiro, M. C., Liu, M., Wu, K., Whittle, J., Ju, X., Hyslop, T., McCue, P., and Pestell, R. G. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J.Cell Biol* 2008; 182: 509-517.
- Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E; Molecular Classification of Breast Cancer; Departamento de Cirugía Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, México,D.F; *Cir Cir*, 76(1):87-93; 2008
- Zhang B, Pan X, Cobb GP and Anderson TA: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12.
- Zhang, J., Du, Y. Y., Lin, Y. F., Chen, Y. T., Yang, L., Wang, H. J., and Ma, D. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 2008; 377: 136-140.
- Zhao, T., Li, J., and Chen, A. F. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2010; 299: E110-E116.
- Zhu, S., Si, M. L., Wu, H., and Mo, Y. Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J.Biol.Chem* 2007; 282: 14328-14336.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y. Y. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18: 350-359.