

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Evaluación de miRNAs y/o genes implicados en los mecanismos de resistencia a doxorrubicina en MDA- MB-231 resistentes versus MDA-MB- 231 sensibles.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autora: Dña. Julia Canet Hermida

Directora: Dña. Pilar Eroles Asensio

Tutor: D. Francisco Marco Jiménez

Curso Académico: 2015/2016

Valencia, Julio del 2016



AUTORA: Dña. Julia Canet Hermida

DIRECTORA: Dña. Pilar Eroles Asensio

FECHA: Valencia, Julio del 2016.

TÍTULO: Evaluación de miRNAs y/o genes implicados en los mecanismos de resistencia a doxorubicina en MDA-MB-231 resistentes versus MDA-MB-231 sensibles.

RESUMEN: El cáncer de mama es uno de los tumores más frecuentes entre las mujeres de todo el mundo. Avances recientes tanto en diagnóstico como en tratamiento están dando resultados prometedores con un aumento notable de la supervivencia. Sin embargo, la recurrencia de esta enfermedad es un obstáculo para su curación ya que alrededor del 40% de los pacientes con cáncer de mama recaen y entre ellos, un 60-70% sufren metástasis. El cáncer de mama triple negativo es un tipo de cáncer muy agresivo, con alto grado de metástasis y un bajo pronóstico. Actualmente, este grupo de pacientes dispone únicamente de quimioterapia para ser tratado. No obstante, existen pacientes que presentan resistencia a este tratamiento.

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo consistió en analizar los miRNAs (hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-27b-5p, hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-424-3p, hsa-miR-1972, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-1275) y los genes (CDC25A, SIRT1, CCNE2, E2F1, CDK2, GMNN, BCL2, E2F3) como posibles mecanismos implicados en la resistencia al quimioterápico doxorubicina en cáncer de mama triple negativo. Por otro lado, se evaluó la expresión del miRNA hsa-miR-200c-3p como posible modulador de los genes CDK2 y CCNE2. Para ello, se utilizó la línea celular MDA-MB-231 con y sin resistencia adquirida a la doxorubicina. Ambas líneas celulares se sometieron a una concentración de 5µM durante 24 horas. Posteriormente, los niveles de expresión de los miRNAs y genes seleccionados fueron evaluados mediante RT-PCR.

Los resultados no mostraron una posible relación entre los miRNAs evaluados y la resistencia a la doxorubicina. Sin embargo, en el análisis génico se observó una expresión diferencial de los genes CDK2 y CCNE2 entre la línea sensible y resistente. Por lo tanto, estos resultados sugieren una posible implicación de ambos genes en los mecanismos de resistencia. No obstante, el análisis del miRNA hsa-miR-200c-3p no mostró una regulación sobre CDK2 y CCNE2 en nuestras condiciones celulares empleadas.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de mama triple negativo, doxorubicina, miRNA, genes, ciclo celular, MDA-MB-231.

AUTHOR: Julia Canet Hermida

DIRECTOR: Pilar Eroles Asensio

DATE: July 2016, Valencia

TITLE: Evaluation of miRNAs and genes involved in mechanisms of resistance to doxorubicine in MDA-MB-231 resistant versus MDA-MB-231 sensitive.

ABSTRACT: Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Recent advances in both diagnosis and treatment are giving results with a significant improvement in the survival of patients. Nevertheless, cancer recurrence is an obstacle to healing. Nowadays, around 40% of patients with this disease relapse and amongst them 60-70% metastasize. Triple-negative breast cancer is a very aggressive type with high rate of metastasis and low prognosis. At the present time, this kind of cancer is treated only with chemotherapy. However, there are patients who are treatment resistant.

The aim of this work was to analyse the miRNAs (hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-27b-5p, hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-424-3p, hsa-miR-1972, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-1275) and the genes (CDC25A, SIRT1, CCNE2, E2F1, CDK2, GMNN, BCL2, E2F3) as possible mechanisms implicated in the resistance of the doxorubicine. In addition, miRNA hsa-miR-200c-3p expression was evaluated as a possible modulator of CCNE2 and CDK2. To carry out these studies, the cells lines MDA-MB-231 and in the same line with doxorubicin resistance were used. Both lines were cultured with 5µM of doxorubicine during 24 hours. Finally, the expression profiles of the miRNAs and genes were measured by RT-PCR.

The obtained results did not show a possible relationship between the miRNAs and doxorubicin resistance. However a differential expression of the genes CDK2 and CCNE2 was observed between resistant and sensitive cell lines. These results suggest the possible involvement of these genes in the mechanism of resistance. Nevertheless, the analysis of the miRNA has-miR-200c-3p did not show a regulation of CCNE2 and CDK2 by our cellular conditions performed.

KEW WORDS: Triple negative breast cancer, doxorubicin, miRNAs, genes, cell cycle, MDA-MB-231

A mis padres y hermano. A Adrián por su apoyo constante. Al laboratorio 2 de la UCIM, especialmente a Edu y Anna, por enseñarme todo lo que sé y a Pilar, por darme la grata oportunidad de formar parte de su equipo y por su constante interés. A Paco Marco, por su dedicación y por último y no por eso menos importantes, a las 7 sonrisas que me han permitido recorrer a su lado 4 años de intensa Biotecnología.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Epidemiología y factores de riesgo en el cáncer de mama	1
1.2. Anatomía de la mama	1
1.3. Clasificaciones del cáncer de mama	2
1.3.1. Clasificación anatómica.....	2
1.3.2. Clasificación en función del perfil de expresión génica.....	2
1.3.3. Clasificación en función de marcadores	3
1.4. Cáncer de mama triple negativo	4
1.4.1. Características moleculares y clínicas.....	4
1.4.2. Tratamiento contra el cáncer de mama triple negativo.....	5
1.4.3. Quimioresistencia en cáncer de mama triple negativo.....	6
1.4.4. Desregulación de miRNAs en la quimioresistencia.....	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas	11
3.2. Obtención de los Pellets celulares	11
3.3. Extracción del RNA total	12
3.4. Retrotranscripción	13
3.4.1. Retrotranscripción de los miRNAs	13
3.4.2. Retrotranscripción de los genes	13
3.5. Preamplificación de los genes	14
3.6. RT-PCR de los miRNAs y genes	14
3.7. Cuantificación de la expresión relativa de los miRNAs y genes	15
3.8. Análisis estadístico	16
3.9. Búsquedas informáticas	16
3.9.1. Análisis in silico de la interacción miRNA-gen.....	16
3.9.2. Análisis in silico de las vías de señalización génicas.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Análisis de expresión de miRNAs en MDA-MB-231 resistentes y sensibles a la doxorubicina	18
4.2. Análisis de los genes implicados en ciclo celular y apoptosis	23
4.3. Análisis del miRNA hsa-miR-200c-3p como posible miRNA implicado en la resistencia a la doxorubicina y en la modulación de los genes CDK2 y CCNE2	29

5. CONCLUSIONES.....	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama.....	3
Tabla 2. Rutas celulares de los miRNAs analizados asociadas con el cáncer.....	18
Tabla 3. Tendencia en el cambio de expresión de los miRNAs entre las líneas sensibles y resistentes tratadas con Doxorubicina (MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox) respecto a sus niveles basales (MDA-MB-231C y MDA-MB-231R)	21
Tabla 4. Rutas celulares de la base de datos KEGG de genes implicados en ciclo celular y apoptosis.....	24
Tabla 5. Tendencia en el cambio de expresión génica entre las líneas sensibles y resistentes (MDA-MB-231C y MDA-MB-231R) tratadas con Doxorubicina (MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox).....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia en cáncer de mama triple negativo.....	6
Figura 2. Función biológica del miRNA.....	8
Figura 3. Desregulación de los miRNAs.....	9
Figura 4. Protocolo de extracción del RNA total del kit “mirVana™ miRNA Isolation”.....	12
Figura 5. Proceso de amplificación detectado a tiempo real (RT-PCR).....	15
Figura 6. Análisis de expresión de los miRNAs.....	20
Figura 7. Análisis de expresión génica.....	25
Figura 8. Análisis de expresión del miRNA hsa-miR-200c-3p.....	30
Figura 9. Análisis de expresión de los genes CCNE2 y CDK2.....	30

ABREVIATURAS

μl: Microlitros

μM: Micromolar

ALDH1: Aldehído deshidrogenasa 1

ATP: Adenosín trifosfato

BAK1: "BCL2 antagonist/killer 1"

BCL2: "B-cell lymphoma 2"

Bmi1: BMI1 protoocogen

BRCA1: "Breast cancer 1"

BRCA2: "Breast cancer 2"

BTIC: Células iniciadoras del cáncer de mama

CCNE2: Ciclina E2

CDC25A: "Cell división cycle 25 homolog A"

CDK2: Quinasa 2 dependiente de ciclina

cDNA: Copia de ácido desoxirribonucleico

CK: Citoqueratinas

DMEM/F12: "Dulbecco's Modified Eagle médium: nutrient mixture F-12"

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E2F1: E2F Factor de transcripción 1

E2F3: E2F Factor de transcripción 3

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT: Transición epitelio-mesenquimal

EZH2: Histona-lisina metiltransferasa

GADPH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa 1

GMNN: Geminina

GSH/GST: Glutación/Glutación-S-transferasa

Has-miR-200c-3p: miR-200c*

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HMGB3: "High mobility group box 3"

Hsa-miR-1275: miR-1275

Hsa-miR-1972: miR-1972

Hsa-miR-23a*-5p: miR-23a*

Hsa-miR-27a-5p: miR-27a*

Hsa-miR-27b-5p: miR-27b*

Hsa-miR-29b-1-5p: miR-29b-1*

Hsa-miR-424-3p: miR-424*

IGF1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

MDA-MB-231C Dox: MDA-MB-231 sensible tratada con doxorubicina

MDA-MB-231C: MDA-MB-231 sensible

MDA-MB-231R Dox: MDA-MB-231 resistente tratada con doxorubicina

MDA-MB-231R: MDA-MB-231 resistente

miRNA: Micro ácido ribonucleico

mM: Milimolar

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NF-Kb: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ng: Nanogramos

P21: p21^{Cip1}

P27: p27^{kip1}

P53: "Tumor protein P53"

PARP: Poli-ADP ribosa polimerasa

PDCD4: "Programmed cell death 4"

PPMIF: Proteína fosfatasa 1F

PTEN: Homólogo de la fosfatasa y tensina

RB: Retinoblastoma

RE: Receptor de estrógenos

RISC: Complejo de silenciamiento génico inducido por RNA

RNA: Ácido ribonucleico

RNU43: "Small nuclear RNA C/D box 43"

RP: Receptor de progesterona

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SIRT1: Sirtuina 1

Skp2: Proteína quinasa 2 asociada a la fase S

TrkB: Receptor neurotrófico de tirosina quinasa tipo 2

ZEB1: "Zinc finger E-box binding homeobox 1"

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología y factores de riesgo en el cáncer de mama

El cáncer de mama es un tumor maligno que se desarrolla como consecuencia de anomalías genéticas y genera un crecimiento descontrolado de las células del tejido mamario, pudiendo además invadir otros órganos y tejidos distantes como huesos, pulmones, hígado o cerebro (AECC, 2013a). Este tipo de cáncer es uno de los más frecuentes entre las mujeres de todo el mundo, tanto en países desarrollados como en vías en desarrollo (AECC, 2014a).

Según la Asociación Española Contra el Cáncer, en España se diagnosticó 26.000 casos en el año 2014. Esta organización manifiesta un aumento de la incidencia anual en cáncer de mama, debido en cierta medida, a un mayor envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más temprano. Cabe destacar que la supervivencia aumenta anualmente entre un 1 y un 4%, aunque varía a lo largo de todo mundo, puesto que en los países más desarrollados existen mejores programas de diagnóstico y tratamiento (AECC, 2013b). El diagnóstico temprano es clave en esta enfermedad, puesto que el no tener un sistema de detección precoz, implica que las mujeres sean diagnosticadas en fases más avanzadas, lo que disminuye la tasa de supervivencia considerablemente (OMS, 2014). No obstante, el cáncer de mama supone la primera causa de muerte por cáncer en mujeres con un total de 6.075 muertes en el 2012 en España y 500.000 muertes en todo el mundo (Globocan, 2012), siendo la edad media de fallecimiento de 66 años (AECC, 2013b).

Existen diferentes factores de riesgo que, aunque no son determinantes, pueden aumentar la probabilidad de sufrir cáncer de mama. Antecedentes familiares basados en mutaciones en los genes "*Breast cancer 1*" (*BRCA1*), "*Breast cancer 2*" (*BRCA2*) o "*Tumor protein P53*" (*p53*) se asocian con un riesgo elevado de padecer cáncer hereditario, aunque explican un número reducido de casos (Bosch et al. 2010; Eroles et al. 2012; Yadav et al. 2015). Por otro lado, una exposición prolongada a estrógenos endógenos como una menarquía precoz, una menopausia tardía y una edad elevada en el primer parto también aumentan el riesgo (OMS, 2014). Por último, el consumo del alcohol, la obesidad y la falta de actividad física son también factores de riesgo atribuibles (OMS, 2014).

1.2. Anatomía de la mama

Para comprender cómo se origina el cáncer de mama, es necesario conocer la anatomía de la glándula mamaria comprendida en la estructura anatómica denominada mama. Acorde con

Thibodeau y Patton (2007), cada mama está formada por varios lóbulos separados por septos de tejido conjuntivo. A su vez, cada lóbulo está formado por varios lobulillos donde se encuentran embebidas las células secretoras conocidas como alveolos. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción, sintetizando y transportando los principales constituyentes de la leche. Los lobulillos, disponen de unos conductos que convergen formando el conducto galactóforo, el cual es único para cada lóbulo y suele haber un total de 15 o 20 en cada pecho. Estos conductos galactóforos se unen antes de llegar al pezón y forman los senos galactóforos, los cuales terminan como una pequeña abertura en el mismo pezón. Por último, encontramos el estroma, formado por tejido adiposo y conectivo rodeando la superficie de la glándula mamaria, justo bajo la piel y entre los lóbulos.

1.3. Clasificaciones del cáncer de mama

Existen varios criterios para clasificar los diferentes subtipos de cáncer de mama. Así mismo, éste puede clasificarse en función de su localización, de la detección de determinados marcadores o según el perfil genético expresado por estas células genéticamente alteradas.

1.3.1. Clasificación anatómica

Atendiendo a la estructura de la mama, podemos subdividir el cáncer de mama en dos grupos: carcinomas ductales y carcinomas lobulillares (AECC, 2013c). El carcinoma ductal consiste en una proliferación celular maligna desarrollada en las células epiteliales que revisten los conductos galactóforos, mientras que el carcinoma lobulillar corresponde con una neoplasia maligna generada en los lobulillos mamarios, responsables de la generación de la leche. En función de si se produce extravasación celular o no, estos dos grupos se denominan carcinoma ductal in situ o invasivo y carcinoma lobulillar in situ o invasivo. El carcinoma de mama ductal invasivo es el tipo más común de cáncer de mama, siendo su frecuencia de un 80%.

1.3.2. Clasificación en función del perfil de expresión génica

Gracias al desarrollo de las técnicas genómicas, ha sido posible estudiar los perfiles de expresión génica de las células malignas en el cáncer de mama (Perou et al. 2000). Como resultado, se ha podido dividir este tipo de cáncer en seis grupos diferentes (Perou et al. 2000; Eroles et al. 2012): Luminal A (el cual representa el 50-60% de todos los carcinomas de mama), luminal B (10-20%), HER2 positivo (20%), Basal (10-20%), Normal (5-10%) y "CludinLow" (12-14%). Estos subgrupos se diferencian entre otras cosas, por la expresión del receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP), del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y otros genes implicados en la proliferación celular o en la expresión de citoqueratinas (CK) como

la CK5 o CK6 (tabla 1). La clasificación de esta enfermedad en función de sus diferentes características moleculares ha permitido entender el cáncer de mama como una enfermedad heterogénea y posibilita el desarrollo de fármacos específicos y más efectivos.

Tabla 1. Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama

Subtipo molecular	Frecuencia	ER/PR/HER2	CK5/6 EGFR	Genes de proliferación	Grado histológico	Mutaciones TP53	Pronóstico
Basal	10-20%	ER- PR- HER2-	+	Elevados	Elevado	Elevadas	Malo
HER2	10-15%	ER- PR- HER2+	+/-	Elevados	Elevado	Elevadas	Malo
Normal	5-10%	ER-/+ PR+ HER2-	+	Bajos	Bajo	Bajas	Intemedio
Luminal A	50-60%	ER+ PR+ HER2-	-	Bajos	Bajo	Bajas	Excelente
Luminal B	10-20%	ER+/- PR+/- HER2-/+	-	Elevados	Intemedio / Elevado	Intemedias	Intemedio / malo
Clouandin Low	12-14%	ER- PR- HER2-	+/-	Elevados	Elevado	Elevadas	Malo

ER: receptor de estrógenos, PR: receptor de progesterona, HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, CK: citoqueratinas, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico. (Adaptada de Eroles et al. 2012)

1.3.3. Clasificación en función de marcadores

No obstante, existen limitaciones en la aplicación de los conocimientos moleculares sobre los diferentes subtipos de cáncer de mama en la clínica, puesto que en el diagnóstico, la elección del tratamiento se basa en la detección por inmunohistoquímica de tres receptores principalmente: RE, RP y HER2. De tal forma que en la práctica, encontramos cuatro tipos de cáncer de mama (Eroles et al. 2012): luminal A y B, HER2 positivo y triple negativo. El grupo luminal, presenta una sobreexpresión de los receptores hormonales RE y/o RPG. A diferencia del A, el grupo luminal B puede presentar además una sobreexpresión del receptor HER2 o un elevado ratio de proliferación celular. Por otro lado, el grupo HER2 positivo presenta una sobreexpresión del receptor HER2 y un elevado ratio de proliferación. Este carcinoma es más agresivo que el grupo luminal. Finalmente, el triple negativo, que correspondería con el grupo basal en el 80-90% de los casos (Yadav et al. 2015), se caracteriza por la ausencia de expresión de los tres receptores y por presentar al igual que el grupo HER2, un elevado ratio de proliferación. Actualmente, es el cáncer de mama más agresivo que existe y con peor pronóstico debido a la carencia de tratamientos dirigidos (Eroles et al. 2012) .

Dado que el presente trabajo estudia la relación entre el cáncer de mama triple negativo y su resistencia al quimioterapéutico doxorubicina, a continuación nos centraremos en este último subgrupo.

1.4. Cáncer de mama triple negativo

1.4.1. Características moleculares y clínicas

El cáncer de mama triple negativo suele presentarse como un carcinoma ductal invasivo con un elevado ratio mitótico, grado histológico y una eminente infiltración linfocítica (Bosch et al. 2010). Las pacientes con este tipo de cáncer suelen presentar metástasis de órganos viscerales y de los nodos linfáticos (Bosch et al. 2010; Yadav et al. 2015). La probabilidad de recaída en menos de tres años es del 63%, con una probabilidad de muerte del 74% (Oakman et al. 2011). Esto es debido en parte, a la agresividad de su metástasis. Este tipo de carcinoma es más prevalente en mujeres jóvenes afroamericanas (Bosch et al. 2010).

Es importante matizar que el fenotipo triple negativo y el subtipo molecular basal no son siempre sinónimos (Bosch et al. 2010; Eroles et al. 2012). Cuando se habla de triple negativo, se hace referencia exclusivamente a la ausencia de expresión de los tres receptores ER, PR y HER2, mientras que el subtipo basal engloba, además de este patrón molecular, otras características génicas y moleculares. No obstante, como ya se ha comentado, el 80-90% de los casos triple negativo forman parte del grupo basal (Yadav et al. 2015).

El subtipo molecular basal está constituido por la sobreexpresión de genes característicos de las células epiteliales basales (Yadav et al. 2015). El 80% de los cánceres triple negativo presentan una sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). EGFR es un oncogén implicado en la proliferación celular, angiogénesis, metástasis e inhibición de la apoptosis. Su expresión está relacionada con una elevada agresividad, escasa respuesta a la quimioterapia y baja supervivencia (Yadav et al. 2015). Así mismo, podemos encontrar una elevada expresión de citoqueratinas propias de las células basales como las CK5, 6 y 17. La expresión de estas CK está relacionada con un pobre pronóstico y un comportamiento más agresivo en las células cancerígenas (Eroles et al. 2012; Yadav et al. 2015). Cuatro anticuerpos (ER, EGFR, HER2 y CK5/6) son suficientes para detectar el subgrupo basal con una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100% (Bosch et al. 2010).

También es común en este subtipo encontrar alteraciones tanto en los genes *BRCA1* y *BRCA2* como en el gen *p53* (Bosch et al. 2010; Eroles et al. 2012; Yadav et al. 2015). *BRCA1* y *BRCA2* son importantes para la reparación del genoma. Mutaciones en estos dos genes dan lugar a la acumulación de errores en el ADN y a la inestabilidad genómica. Si además, existen alteraciones en los genes que controlan el ciclo celular, como es el gen *p53*, la célula es capaz de evadir la muerte. Como consecuencia, la probabilidad de una transformación maligna aumenta

considerablemente. Mutaciones en los genes *BRCA1/2* aumentan un 60-85% el riesgo de padecer cáncer de mama (Bosch et al. 2010).

1.4.2. Tratamiento contra el cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo se trata habitualmente mediante una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia. El sistema de tratamiento suele dividirse en tratamiento neoadyuvante (previo al tratamiento primario), tratamiento primario y tratamiento adyuvante (posterior al primario) (American Cancer Society, 2014). La cirugía es la opción más habitual y la primera elección en tumores de estadios precoces (AECC, 2014b). La radioterapia suele emplearse después de la cirugía como tratamiento adyuvante con el objetivo de eliminar las posibles células que hayan podido quedar. Si además es necesario añadir quimioterapia, la radioterapia se añade después de ésta (AECC, 2014c).

Cabe destacar que el cáncer de mama luminal y HER2 disponen de la terapia hormonal (dirigida contra los receptores RE y RP) y monoclonal (dirigida contra el receptor HER2) respectivamente (Eroles et al. 2012). Estos tratamientos suelen combinarse junto con la quimioterapia como tratamiento adyuvante. No obstante, la ausencia de los tres receptores RE, RP y HER2 en el grupo triple negativo genera que actualmente no se disponga de dianas terapéuticas para poder ser tratado con mayor efectividad (Oakman et al. 2011). Como consecuencia, la terapia adyuvante actual para tratar este grupo se basa en una quimioterapia estándar constituida por antraciclinas y taxanos principalmente (O'Reilly et al. 2015). Los taxanos producen apoptosis mediante la generación de husillos mitóticos anormales mientras que las antraciclinas son inhibidores de la topoisomerasa II, además de ser intercalantes de ADN (Eroles et al. 2015). Entre los quimioterápicos más frecuentes encontramos la doxorubicina, la doxorubicina combinada con ciclofosfamida o paclitaxel (O'Reilly et al. 2015).

La doxorubicina es una de las antraciclinas más eficaces y más utilizadas en el tratamiento de cáncer de mama (Oakman et al. 2011). No obstante, tanto ésta como otros quimioterápicos que se administran a los pacientes con cáncer de mama triple negativo, resultan no ser totalmente eficaces, puesto que existe un grupo de pacientes que no consiguen eliminar la totalidad de las células tumorales (Carey et al. 2007). Este hecho supone una elevada probabilidad de recaída, puesto que posibilita la reaparición del tumor. Actualmente, un 63% de las pacientes que sufren cáncer de mama triple negativo presentan recaídas con un aumento del ratio de mortalidad del 73% (Oakman et al. 2011).

A pesar de la elevada agresividad del grupo triple negativo, se han observado elevados ratios de respuesta a la quimioterapia como tratamiento neoadyuvante en el subtipo triple negativo en

comparación con el subtipo luminal (Carey et al. 2007). No obstante, si la respuesta a la quimioterapia no es completa, el grupo triple negativo presenta un mayor riesgo de recaída tras la cirugía. Este comportamiento tan contradictorio es conocido como la paradoja del triple negativo. Aunque este grupo responde de forma óptima al tratamiento neoadyuvante, la realidad clínica es que tras la cirugía y la administración de la quimioterapia como tratamiento adyuvante, los pacientes se dividen en dos grupos principalmente: pacientes quimiosensibles y pacientes quimioresistentes (Carey et al. 2007). Este último grupo presenta una probabilidad elevada de recaída en un intervalo de 3 años (Oakman et al. 2011).

1.4.3. Quimioresistencia en cáncer de mama triple negativo

Los mecanismos de esta respuesta tan dispar ante la quimioterapia siguen siendo desconocidos, por lo que la búsqueda de marcadores que nos permitan identificar el grado de respuesta del paciente al tratamiento así como la identificación de nuevas dianas para futuras terapias es una necesidad. Para ello, es esencial identificar los mecanismos de resistencia que permiten a las células cancerígenas sobrevivir a la quimioterapia. Actualmente, hay descritos seis posibles mecanismos de resistencia en las células tumorales triple negativas (O'Reilly et al. 2015, figura 1).

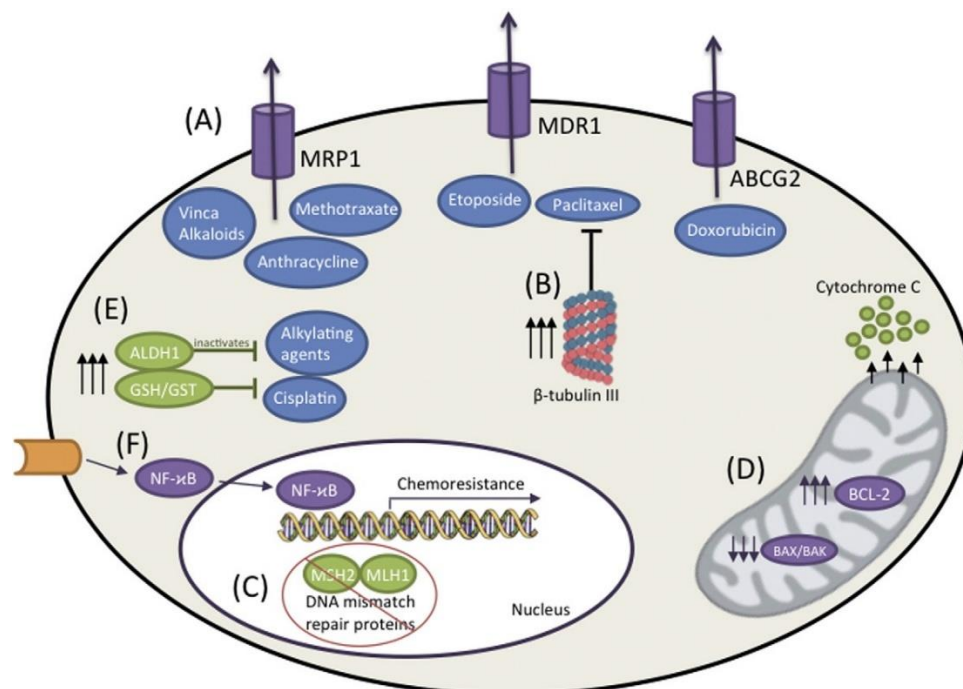


Figura 1. Mecanismos de resistencia en cáncer de mama triple negativo. A) La familia de transportadores ABC transportan el fármaco al exterior celular. B) La sobreexpresión de β -tubulina III induce resistencia al paclitaxel. C) Mutaciones en enzimas reparadoras del ADN. D) Alteraciones en genes implicados en la apoptosis evitan la muerte celular. E) Sobreexpresión de enzimas con capacidad para metabolizar el fármaco (ALDH1 y Glutación (GSH)/ Glutación-S-transferasa (GST)). F) Alteraciones en el factor de transcripción NF- κ B, inducen proliferación celular y supervivencia. Fuente: O'Reilly et al., 2015.

Entre ellos, encontramos los transportadores ABC. Esta familia de transportadores, son proteínas transmembrana de unión a adenosín trifosfato (ATP), las cuales permiten secretar el fármaco al exterior celular, disminuyendo considerablemente la toxicidad del mismo. También se han descrito alteraciones en genes relacionados con el ciclo celular y la apoptosis como *p53*, "*B-cell lymphoma 2*" (*BCL2*) o la caspasa-3, impidiendo que la célula muera a pesar de la toxicidad de la terapia. Por otro lado, se han encontrado diversas rutas celulares implicadas en la resistencia. Por ejemplo, expresiones aberrantes del factor de transcripción NF- κ B de la ruta PI3K/AKT es una de ellas. Esta ruta está implicada en la proliferación celular, la supervivencia y el metabolismo. Además, un aumento de la expresión de la β -tubulina III ha sido relacionado con la resistencia al paclitaxel. Por último, mutaciones en las enzimas que reparan el ADN y aumentos en la expresión de enzimas detoxificantes, como la aldehído deshidrogenasa isoforma 1 (ALDH1) o la glutatión (GSH)/Glutatión-S-transferasa (GST), son mecanismos también implicados (O'Reilly et al. 2015).

1.4.4. Desregulación de miRNAs en la quimioresistencia

La quimioresistencia, al igual que el desarrollo del cáncer, puede ser el resultado de una desregulación génica. Alteraciones en las secuencias de ADN como mutaciones, amplificaciones o deleciones pueden dar lugar a un fenotipo quimioresistente (Garzon et al. 2006). No obstante, estudios recientes centran la epigenética como un mecanismo de regulación génica altamente implicado en el cáncer, puesto que aberraciones en estos mecanismos pueden desregular la expresión de los mRNAs y como resultado alterar las funciones biológicas de la célula (Garzon et al. 2006; Eroles et al. 2015).

Estudios recientes sobre modificaciones epigenéticas destacan los miRNAs como moléculas estrechamente implicadas tanto en el desarrollo y progresión del cáncer como en su quimioresistencia (Garzon et al. 2006; Eroles et al. 2015). Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes de 19-24 nucleótidos de longitud que disminuyen la expresión de genes implicados en procesos clave en la célula como apoptosis, desarrollo o diferenciación, proliferación y metabolismo (Garzon et al. 2006). Los miRNAs trabajan junto con el complejo de silenciamiento génico inducido por RNA (RISC). La función del miRNA es reconocer e hibridar con su mRNA complementario, de forma que se impide la traducción del mRNA a proteína. La hibridación del miRNA con el mRNA puede ser mediante una hibridación completa o parcial. Una hibridación completa induce la degradación del mRNA a través del complejo RISC mientras que una hibridación parcial supone la inhibición de la traducción, lo que genera una disminución en la producción de proteínas (figura 2).

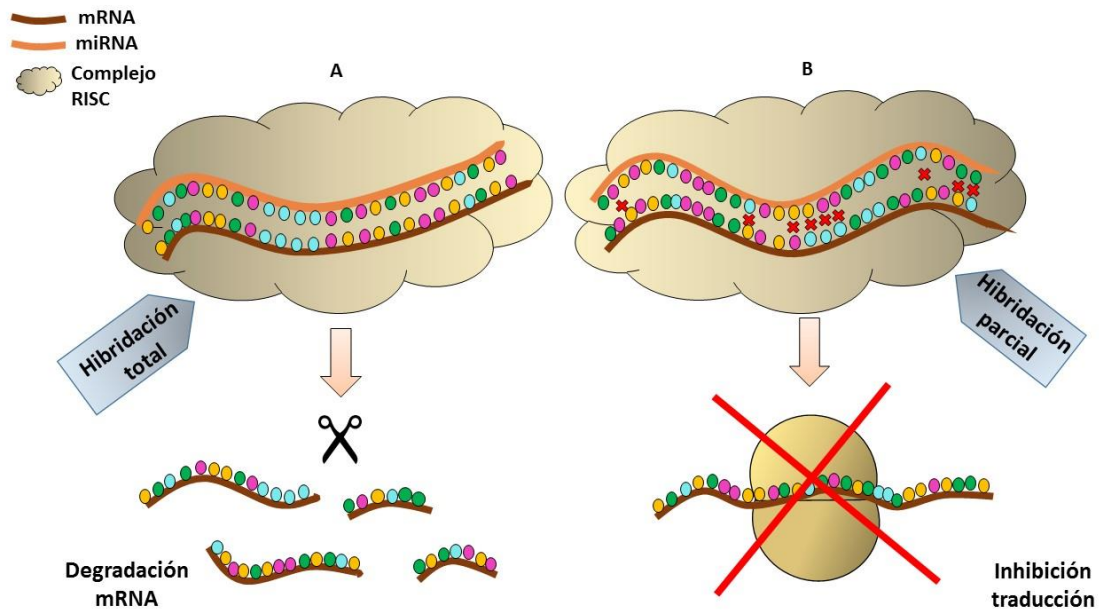


Figura 2. Función biológica del miRNA. (A) Una hibridación total entre el miRNA y el mRNA genera la degradación del mRNA mediante el complejo RISC. (B) Una hibridación incompleta origina una inhibición de la traducción.

En múltiples estudios se ha observado una diferencia de expresión en los niveles de miRNAs entre tejido sano de mama y tejido tumoral (Garzon et al. 2006; Eroles et al. 2015). Aberraciones en sus procesos de biogénesis así como modificaciones genéticas y epigenéticas pueden alterar sus expresiones. Cuando los miRNAs aumentan su concentración por encima de los niveles fisiológicos normales y además, tienen como dianas genes supresores de tumores, se denominan oncomiRNAs. Como consecuencia de este aumento, disminuye la concentración de sus mRNAs dianas. En cambio, si los niveles de miRNAs disminuyen por debajo del nivel fisiológico normal y tienen como dianas oncogenes, sus dianas pueden escapar de su acción inhibitoria y por tanto, se denominan miRNAs supresores de tumores (figura 3). Como resultado, la desregulación de los miRNAs puede darse en los dos sentidos, pudiendo alterar tanto la expresión de genes supresores de tumores como de oncogenes. Ambos casos pueden llevar a padecer cáncer (Garzon et al. 2006).

No obstante, no solo se ha visto una implicación de los miRNAs en el desarrollo del cáncer sino que además, existen evidencias de que pueden actuar como elementos reguladores clave en la adquisición de la quimioresistencia (Eroles et al. 2015). Por ejemplo, en cáncer de mama luminal, sobreexpresiones en los miRNAs hsa-miR-221/222 confiere resistencia al fármaco tamoxifen (terapia endocrina) mediante la reducción de la proteína supresora de tumores $p27^{kip1}$ (p27). Subexpresiones de esta proteína permiten la progresión del ciclo celular a pesar del efecto citotóxico de la doxorubicina (Miller et al. 2008). Por otro lado, sobreexpresiones del miRNA hsa-

miR-125 han sido asociados con una mayor resistencia al paclitaxel en cáncer de mama a través de la subregulación de la proteína pro-apoptótica “BCL2 antagonist/killer 1” (BAK1). Una disminución en esta proteína permite la supervivencia celular (Zhou et al. 2010).

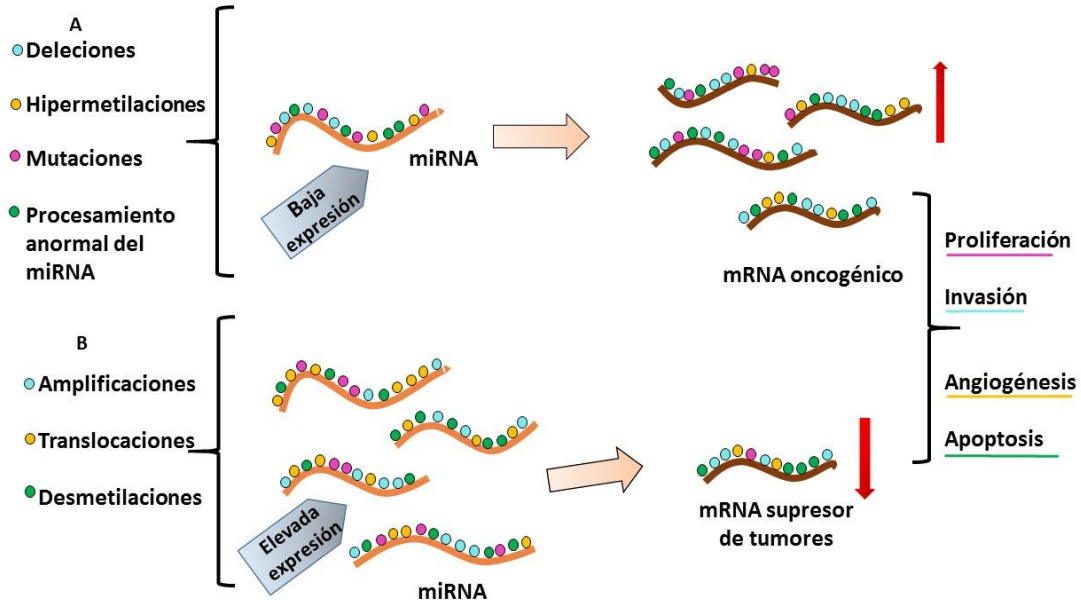


Figura 3. Desregulación de los miRNAs. **(A)** La pérdida de expresión de los miRNAs puede deberse a mutaciones en su secuencia génica, deleciones, hipermetilaciones en el promotor o alteraciones en el proceso de biogénesis. La baja expresión del miRNA que actúa de normal como supresor de tumores aumenta la expresión de oncogenes. **(B)** Anomalías cromosómicas como amplificaciones, translocaciones o desmetilaciones pueden inducir un aumento de la expresión de los miRNAs, que actuarían como oncogenes. Un aumento de expresión de oncomiRNAs disminuye la concentración de mRNAs supresores de tumores. Ambos modelos de desregulación pueden llevar a un aumento de la proliferación celular, invasión, angiogénesis e inhibición de la apoptosis. Fuente: Adaptada de Garzón et al. 2006.

Actualmente hay descritos en la bibliografía un gran número de miRNAs desregulados en condiciones de resistencia a fármacos en cáncer de mama. No obstante, los mecanismos de quimioresistencia en el grupo triple negativo siguen sin estar totalmente esclarecidos.

2. OBJETIVOS

1. Evaluar la expresión diferencial de los miRNAs candidatos (hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-27b-5p, hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-424-3p, hsa-miR-1972, hsa-miR-23a-5p y hsa-miR-1972) entre la línea celular MDA-MB-231 (con y sin resistencia generada a la doxorubicina) tratadas con doxorubicina.
2. Evaluar la expresión diferencial de los genes (*CDC25A*, *SIRT1*, *CCNE2*, *E2F1*, *CDK2*, *GMNN*, *BCL2* y *E2F3*) asociados a rutas del ciclo celular y apoptosis entre la línea celular MDA-MB-231 con y sin resistencia generada a la doxorubicina.
3. Estudiar el miRNA hsa-miR-200c-3p como posible modulador de los genes *CCNE2* y *CDK2* y su posible relación con la resistencia a la doxorubicina en MDA-MB-231.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-231 resistente a la doxorubicina se obtuvieron del grupo de investigación del Dr. Federico Rojo de la Fundación Giménez Díaz de Madrid. La línea resistente fue generada a partir de la línea sensible MDA-MB-231. Para el desarrollo de la resistencia, primero las células fueron cultivadas a una concentración de doxorubicina de $1\mu\text{M}$ (concentración a la cual la viabilidad celular era del 80%). Se mantuvieron 24 horas con el tratamiento y a continuación se cultivaron sin tratamiento hasta que la confluencia fue entorno a un 70%, completándose así un ciclo. Se realizaron cinco ciclos en total siendo la concentración del tratamiento la misma, $1\mu\text{M}$. A continuación, se realizó el proceso de nuevo aumentando la concentración de doxorubicina a $2\mu\text{M}$. Cada vez que se completaban los 5 ciclos, se volvía a repetir todo el procedimiento aumentando la concentración del tratamiento el doble. La concentración final de doxorubicina a la cual se consideró que la línea había adquirido la resistencia fue de $128\mu\text{M}$.

Para la realización de los experimentos, ambas líneas celulares se sembraron a una densidad de siembra de 500.000 células en frascos T25 y fueron cultivadas a 37°C , con una humedad relativa del 95% y 5% de CO_2 . El medio del cultivo utilizado fue Dulbecco's Modified Eagle medium: nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) con 2mM de L-glutamina y suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomina. El modo de cultivo fue en monocapa adherente. Las células MDA-MB-231 son epiteliales y proceden de una mujer caucásica de 51 años de edad con adenocarcinoma.

Una vez obtenida una confluencia del 70-80%, ambas líneas celulares se expusieron a una concentración de $5\mu\text{M}$ de doxorubicina durante 24 horas. De forma paralela, se siguieron cultivando las dos líneas sin tratar. Tras las 24 horas de tratamiento, se procedió a la obtención de los pellets celulares tanto de las líneas tratadas como sin tratar.

3.2. Obtención de los Pellets celulares

Tras las 24 de horas de exposición a la doxorubicina se procedió a la obtención de los pellets celulares. Las células fueron lavadas con tampón de fosfato salino, tripsinizadas con Trypsin-EDTA 0.05% y bloqueadas con 2X de medio de cultivo DMEM/F12. La suspensión celular recogida

se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. El pellet se mantuvo a -80°C hasta la extracción del RNA.

3.3. Extracción del RNA total

La extracción se realizó con el kit mirVana™ miRNA Isolation (Ambion, Austin, Texas) de acuerdo con el protocolo del fabricante (figura 4). Primero, las células fueron lisadas con 600 μl mediante Lysis Binding/Buffer, se mezcló la suspensión, se añadió 1/10 de miRNA Homogenate Additive y se dejó 10 minutos en hielo. A continuación, se añadió ácido-fenol:cloroformo para facilitar la precipitación de las proteínas, retirar DNA e inactivar las RNasas, y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad y temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se desechó la fase orgánica. Seguidamente, se añadió 1,25X de etanol 100% y se pasó la suspensión a un nuevo eppendorf con filtro Cartridge. Se centrifugó durante 15 segundos a máxima velocidad y se descartó la suspensión filtrada, puesto que el RNA se queda adherido al filtro de sílice.

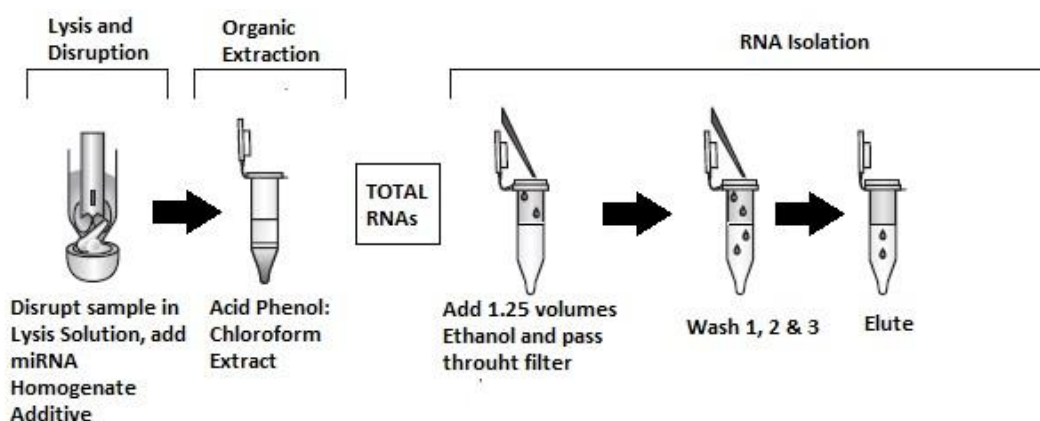


Figura 4. Protocolo de extracción del RNA total del kit "mirVana™ miRNA Isolation" (Ambion, Austin, Texas). (Adaptada del protocolo mirVana™ miRNA Isolation kit, Ambion).

Por último, se realizó un lavado, añadiendo 700 μl de Wash Solution 1, se centrifugó 15 segundos a máxima velocidad, descartando el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces más con 500 μl de Wash Solution 2/3. Finalmente, se puso el filtro en un eppendorf nuevo, se añadió 100 μl de agua libre de nucleasas y se centrifugó 30 segundos a máxima velocidad, quedándonos esta vez con la suspensión filtrada. El RNA extraído se cuantificó mediante el NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Su pureza se evaluó mediante los ratios OD260/280 y OD260/230. El RNA extraído se mantuvo a -80°C hasta realizar la transcripción. Tanto la

extracción de los miRNAs como de los mRNAs se realizó mediante este protocolo, puesto que permite la obtención del RNA total de la célula.

3.4. Retrotranscripción

3.4.1. Retrotranscripción de los miRNAs

Para la cuantificación de los miRNAs mediante RT-PCR, previamente se transcribió el RNA a cDNA puesto que el RNA es químicamente inestable. La retrotranscripción de los miRNAs se llevó a cabo mediante el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Los componentes (dNTPs, Multiscribe™ Reverse Transcriptase, Reverse Transcription Buffer, agua libre de nucleasas y cebadores Taqman) se llevaron a un volumen final de reacción de 50µl. La cantidad de RNA utilizado para la reacción fue 1000ng. Los cebadores Taqman utilizados para la retrotranscripción fueron específicos tanto para el miRNA de control endógeno “small nuclear RNA C/D box 43” (RNU43) como para los miRNAs de interés:

- hsa-miR-27a-5p (miR-27a*)
- hsa-miR-27b-5p (miR-27b*)
- hsa-miR-29b-1-5p (miR-29b-1*)
- hsa-miR-424-3p (miR-424*)
- hsa-miR-1972
- hsa-miR-23a-5p (miR-23a*)
- hsa-miR-1275
- hsa-miR-200c-3p (miR-200c*)

El mix de cebadores fue diluido 1/100 en 1XTE Buffer. A diferencia de la retrotranscripción de genes, los cebadores eran complementarios a las secuencias de miRNAs de interés para que pudieran ser transcritas a cDNA. La reacción de retrotranscripción se programó: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. Tras la retrotranscripción se hizo una dilución 1:4 con agua libre de nucleasas y se conservó a -20°C.

3.4.2. Retrotranscripción de los genes

La retrotranscripción génica para la cuantificación por RT-PCR se realizó para los siguientes mRNAs:

- “Cell division cycle 25 homolog A” (CDC25A)
- Sirtuina 1 (SIRT1)
- Ciclina E2 (CCNE2)

- E2F Factor de transcripción 1 (E2F1)
- Quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2)
- Geminina (GMNN)
- “B-cell lymphoma 2” (BCL2)
- E2F Factor de transcripción 3 (E2F3)

Esta reacción se realizó mediante el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). Los componentes de la reacción (Reverse Transcription Buffer, dNTPs, cebadores aleatorios, Multiscribe™ Reverse Transcriptase y agua libre de nucleasas) se llevaron a un volumen final de 60µl. A diferencia de la retrotranscripción de los miRNAs, se utilizaron como cebadores hexámeros aleatorios de desoxinucleótidos. La reacción se programó 10 minutos a 25°C y 2 horas a 37°C. La cantidad utilizada para la reacción fue menor a 1000ng. Como control endógeno se utilizó el gen *Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa 1 (GADPH)*. Tras la retrotranscripción se hizo una dilución 1:4 con agua libre de nucleasas y se conservó a -20°C.

3.5. Preamplificación de los genes

La reacción de preamplificación se realizó con el objetivo de aumentar la cantidad de cDNA para la cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR. Los componentes (TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems), mix con los cebadores específicos de los genes diluidos en 1XTE Buffer 1/100 y agua libre de nucleasas) se llevaron a un volumen final de 25µl. Los cebadores fueron específicos de los genes. La cantidad de cDNA empleada fue 5ng. Tras la amplificación, se hizo una dilución 1:8 con 0,1X TE Buffer.

3.6. RT-PCR de los miRNAs y genes

Los mRNAs y miRNAs fueron detectados mediante la RT-PCR QuantStudio® 5. La reacción RT-PCR consiste en una amplificación del DNA detectada a tiempo real. Para ello, se emplean sondas Taqman complementarias a las secuencias de interés, las cuales llevan unidas una molécula “quencher” y un fluoróforo. Debido a la cercanía de estas dos moléculas, la fluorescencia emitida por el fluoróforo es absorbida por el “quencher”, de forma que no es detectada por el equipo. No obstante, cuando la polimerasa amplifica la secuencia con la sonda Taqman hibridada en la secuencia de interés, la sonda se hidroliza, el “quencher” se separa de esta y el fluoróforo emite fluorescencia, la cual sí que es detectada debido a la lejanía del “quencher” (figura 5).

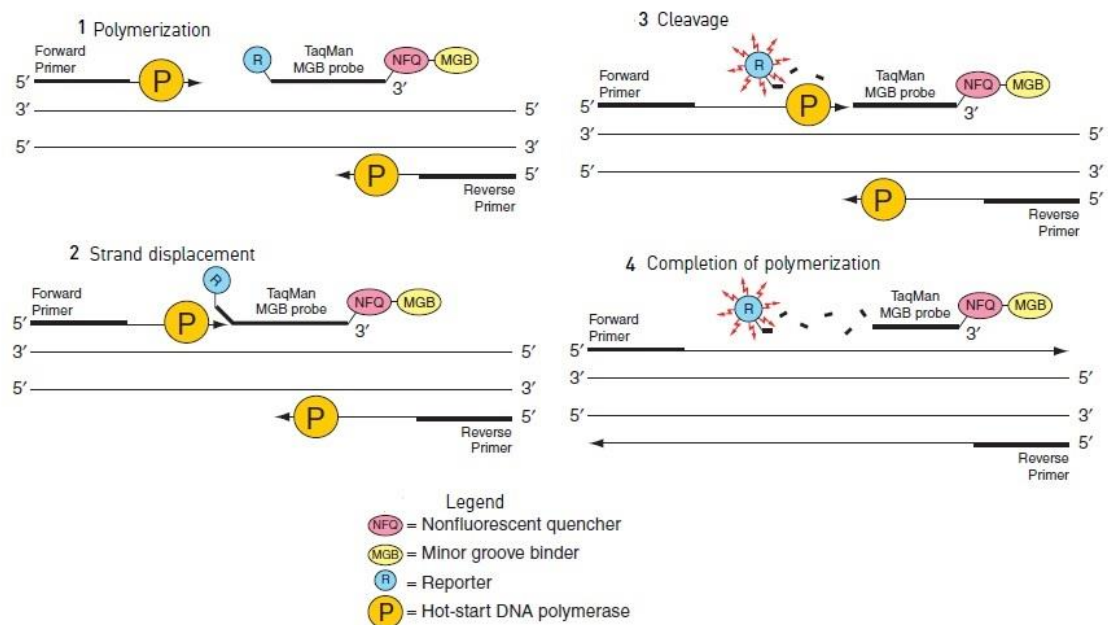


Figura 5. Proceso de amplificación detectado a tiempo real (RT-PCR). 1) La sonda Taqman y los cebadores hibridan con la secuencia de ADN. 2) La polimerasa a partir de los cebadores comienza la amplificación. 3) La polimerasa hidroliza la sonda Taqman de forma que el fluoróforo emite fluorescencia sin que sea absorbida por el “quencher”. 4) El proceso de polimerización finaliza. (Adaptada del protocolo Taqman® Gene Expression Assays, Applied Biosystem).

Para la realización de la RT-PCR, en el caso de los miRNAs, cada pocillo de reacción contenía 2ng de producto, 5µl de TaqMan® Universal Master Mix II no UNG (Applied Biosystems), 0,5µl de sonda específica de cada miRNA y 2,5µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación los miRNAs fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Para la cuantificación de los genes, se utilizó el Master Mix TaqMan® Gene Expression (Applied Biosystems), junto con 2 µl del producto de la amplificación, 0,5 µl de sondas específicas de los genes y 2,5µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de la reacción de amplificación para los genes fueron: 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Tanto los genes como los miRNAs se realizaron en placas de 384 pocillos para PCR donde cada pocillo contenía una determinada sonda Taqman para cada una de las condiciones celulares. Cada gen y miRNA se evaluó por triplicado y se realizaron controles negativos utilizando como sondas, los controles endógenos y como muestra agua libre de nucleasas.

3.7. Cuantificación de la expresión relativa de los miRNAs y genes

Tras la amplificación, se obtuvo el parámetro ciclo umbral (Ct). Este valor corresponde con el ciclo en el cual la intensidad de la señal fluorescente emitida por la sonda se levanta sobre el ruido de fondo. La cuantificación de la expresión de los miRNAs se calculó mediante la fórmula de Livak: cantidad relativa (Fold change) = $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Donde $\Delta Ct = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ miRNA endógeno}$

y $\Delta(\Delta C) = \Delta C_t$ condición celular - condición celular control. Esta fórmula permite calcular la cantidad relativa respecto al miRNA endógeno RNU43 y respecto a la condición celular control (MDA-MD-231 sensible sin tratar). Relativizar frente al miRNA endógeno nos permitió normalizar los resultados y comparar la expresión de los miRNAs en una misma condición de una línea celular mientras que relativizar además frente a un grupo celular control nos permitió comparar la expresión de los miRNAs entre las diferentes condiciones celulares. Para la cuantificación relativa de los genes, se realizó el mismo procedimiento, utilizando como control endógeno la expresión del gen GADPH y como condición celular la línea sensible sin tratar.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se basó en la aplicación de test T-Student con el fin de comparar los niveles de expresión de las líneas MDA-MB-231 sensibles y resistentes a la doxorubicina, tratadas y sin tratar con este quimioterápico. Por consiguiente, la comparación de los niveles de expresión se realizó entre 4 tipos celulares diferentes: línea sensible sin tratar (MDA-MB-231C), línea MDA-MB-231 sensible tratada (MDA-MB-232C Dox), línea resistente sin tratar (MDA-MB-231R) y línea resistente tratada (MDA-MB-231R Dox). Para la realización del análisis, se utilizó la función PRUEBA.T mediante el programa Excel. Las diferencias de expresión se consideraron estadísticamente significativas si eran menores al nivel de significancia 0,05. En las figuras 6, 7, 8 y 9 los valores “a, b, c y d” muestran la significancia estadística para cada gen o miRNA de las cuatro muestras evaluadas. El valor “a” se adjudica a la expresión relativa más elevada, el valor “b” a la siguiente y así sucesivamente, siempre que las expresiones relativas sean estadísticamente significativas. En caso contrario, se adjudica la misma letra. Valores como por ejemplo “bc” para una muestra, indican una significancia equivalente con las muestras “b” y “c”.

3.9. Búsquedas informáticas

3.9.1. Análisis in silico de la interacción miRNA-gen

El estudio de la interacción entre los miRNAs y sus genes dianas se realizó mediante DIANA-miRPath v2. Esta herramienta informática permite predecir los genes diana de los miRNAs mediante una hibridación computacional entre los miRNAs y las regiones codificantes génicas o las regiones 3'-UTR de los genes. Este servicio facilitó la identificación de las vías de señalización de KEGG (Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas) donde los miRNAs de nuestro estudio estaban significativamente implicados. De todas las rutas encontradas, fueron seleccionadas aquellas relacionadas con el contexto de nuestro estudio. Los parámetros utilizados fueron los estándares del programa: un p-valor threshold < 0,05 y MicroT threshold 0,8.

3.9.2. Análisis in silico de las vías de señalización génicas

Las rutas de los posibles genes implicados en la resistencia a la doxorubicina fueron validadas mediante la base de datos “KEGG pathways”. Esta herramienta permite analizar en qué rutas celulares se encuentran implicados los genes de interés y sus diferentes formas de interacción en cada una de ellas. Las rutas de señalización seleccionadas fueron aquellas relacionadas de acuerdo con el contexto biológico de nuestro estudio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de expresión de miRNAs en MDA-MB-231 resistente y sensible a la doxorubicina

Con el objetivo de estudiar los miRNAs con una expresión diferencial en respuesta a la doxorubicina, Tormo et al. 2015 analizaron los perfiles de expresión de los RNA no codificantes en las líneas celulares triple negativas MDA-MB-231 y MDA-MB-468 y la línea luminal MCF-7. Como resultado, 218 miRNAs presentaron un patrón de expresión alterado estadísticamente significativo. De estos miRNAs, 13 fueron comunes a las tres líneas (grupo I), 25 fueron exclusivos en las líneas triples negativas (grupo II) y 69 en la línea luminal (grupo III).

Dado que los miRNAs del grupo I fueron considerados como un mecanismo de respuesta común a la doxorubicina, decidimos centrarnos en este grupo, en base a los resultados descritos por Tormo et al. 2015 y a la información encontrada en bases de datos a través de DIANA miRPath v.2. Esta herramienta informática nos permitió determinar los genes dianas de los miRNAs (validados y teóricos) y las rutas celulares donde se encontraban implicados mediante la base de datos KEGG. Como resultado de esta búsqueda, pudimos hacer una selección de aquellos miRNAs asociados con rutas celulares relacionadas con el cáncer (tabla 2).

Tabla 2. Rutas celulares de los miRNAs analizados asociadas con el cáncer.

miRNA	Rutas celulares (KEGG)
hsa-miR-27a-5p	Moléculas de adhesión celular (CAMs) (hsa04514), reparación de escisión de bases(hsa03410)
hsa-miR-27b-5p	Jak-STAT (hsa04630), cáncer de próstata (hsa05215), interacción citoquina- receptor citoquina (hsa04060)
hsa-miR-29-1-5p	Desregulación transcripcional en cáncer (hsa05202), PI3K-Akt (hsa04151)
hsa-miR-424-3p	MAPK (hsa04010)
hsa-miR-1972	Melanogénesis (hsa04916), cáncer endometrial (hsa05213), Wnt (hsa04310), moléculas de adhesión celular (CAMs) (hsa04514), mTOR (hsa04150), ErbB (hsa04012)
hsa-miR-23a-5p	Desregulación transcripcional en cáncer (hsa05202), degradación de RNA (hsa03018)
hsa-miR-1275	Adhesión celular (hsa04514), vigilancia del mRNA (hsa03015), PI3K-Akt (hsa04151), Carcinoma basal (hsa03217), melanogénesis (hsa04916), mTOR (hsa04150), Wnt (hsa04310), unión estrecha (hsa04530)

Por consiguiente, dado que Tormo E. et al (2015) observaron una desregulación de estos miRNAs en presencia de doxorrubicina y existen evidencias de que dichas moléculas se encuentran implicadas en diferentes mecanismos del cáncer (tabla 2), decidimos analizar si los miRNAs seleccionados: miR-27a*, miR-27b*, miR-29b-1*, miR-424*, hsa-miR-1972, miR-23a* y miR-1275 podían estar relacionados con la resistencia a la doxorrubicina en cáncer de mama triple negativo.

Para ello, se evaluó la expresión de los miRNAs mediante RT-PCR utilizando la línea celular MDA-MB-231 sensible y resistente tratadas con doxorrubicina (MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox respectivamente) y sin tratar (MDA-MB-231C y MDA-MB-231R). Los resultados pueden verse en la figura 6.

En primer lugar, se pudo corroborar una disminución significativa en la expresión de los siete miRNAs en la MDA-MB-231C Dox respecto a sus niveles basales (MDA-MB-231C) como ya se había descrito en los resultados de Tormo E. et al (2015). En cuanto a la línea MDA-MB-231R Dox también se produjo un descenso significativo de todos los miRNAs cuando esta línea fue sometida al mismo quimioterápico en comparación con sus niveles basales, MDA-MB-231R (figura 6).

No obstante, cabe destacar que los niveles basales de la línea MDA-MB-231R fueron mayores que en la línea MDA-MB-231C, siendo los cambios de expresión de los miRNAs miR-27b*, miR-1972*, miR-23a* y miR-1275 significativos (figura 6). Un aumento en la expresión de los miRNAs disminuiría la concentración celular de sus mRNAs dianas y por lo tanto, podría dar lugar a una disminución o inhibición de determinadas rutas celulares (Garzon et al. 2006). Dado que estos miRNAs están implicados en rutas relacionadas con la proliferación celular y el cáncer (tabla 2), el aumento de expresión de estos miRNAs podría sugerir que las actividades de determinadas rutas del ciclo celular se encontraban disminuidas en la línea resistente. Como la quimioterapia afecta en mayor medida a las células con una mayor capacidad de división (Carey et al. 2007), una disminución en la expresión de genes implicados en ciclo celular podría indicar que la sobreexpresión de estos miRNAs proporcionaba un fenotipo más agresivo en la línea con resistencia generada a la doxorrubicina. Por ejemplo, aumentos en el miRNA miR-1275 han sido asociados con un fenotipo más agresivo en mujeres jóvenes, siendo el grupo triple negativo frecuente entre este tipo de pacientes (Peña-Chilet et al. 2014). Este miRNA tiene como dianas el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) implicado en la proliferación celular (Fawzy et al. 2015) y la proteína de adhesión claudina 11, relacionada en procesos como invasión y metástasis

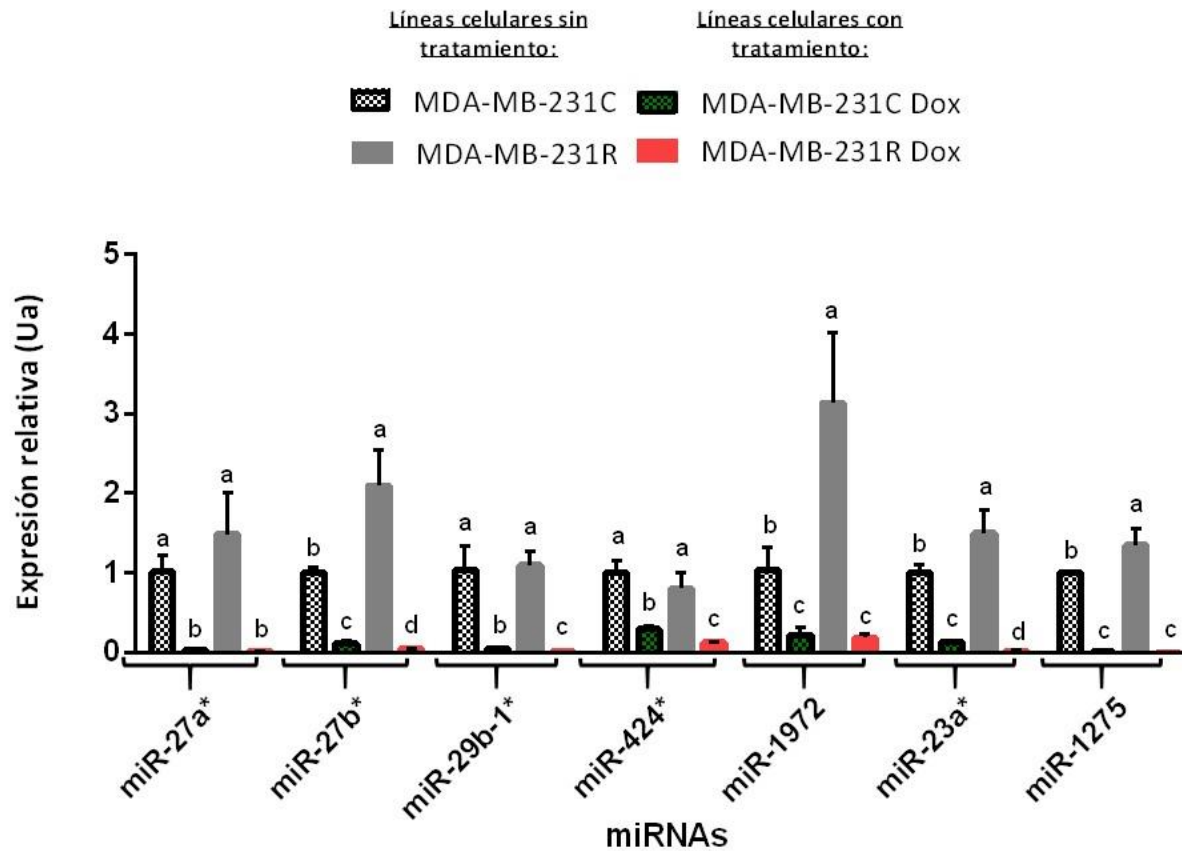


Figura 6. Análisis de expresión de los miRNAs. MDA-MD-231C: línea sensible a la doxorubicina, MDA-MB-231C Dox: línea sensible tratada con doxorubicina a 5µM (24h), MDA-MD-231R: línea resistente a la doxorubicina, MDA-MB-231R Dox: línea resistente tratada con doxorubicina 5µM (24h). Los superíndices a,b,c y d muestran en cada miRNA la significancia estadística entre las dos líneas y sus dos condiciones celulares, siendo el nivel de significancia 0,05. Los genes se evaluaron por triplicado y se normalizaron respecto al miRNA endógeno RNU43 y respecto a la línea sensible sin tratar (MDA-MB-231C).

en células madre de glioma humano (Katsushima et al. 2012). Aumentos de expresión de este miRNA han sido relacionados con una mayor agresividad y capacidad de invasión (Katsushima et al. 2012) y una disminución en la proliferación celular (Fawzy et al. 2015). Por otro lado, aumentos en los miRNAs miR-23a/24-2/27a también han sido relacionados con una mayor agresividad y migración celular a través de la activación de p44/42MAPK en la ruta celular MAPK (Li et al. 2013).

Por lo tanto, para comprobar si los miRNAs podían estar implicados en la resistencia a la doxorubicina se tuvieron en cuenta dos factores. Primero, para que un miRNA pudiese estar implicado en los mecanismos de quimioresistencia, debía de presentar una expresión diferencial entre las líneas MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox. Diferencias de expresión de estas moléculas darían lugar a una distinta concentración de mRNAs y por lo tanto en la célula habría una mayor o menor activación de las rutas celulares implicadas. Como se puede observar en la figura 6, los miRNAs mir-27b*, miR-29b-1*, miR-424* y miR-23a* presentaban una expresión diferencial significativa. Sin embargo, miR-27b* miR-23a* ya de por si mostraban diferencias a nivel basal, por lo que las expresiones diferenciales observadas tras la adición de doxorubicina podrían deberse a un metabolismo diferente o por una implicación en la quimioresistencia. El segundo factor a tener en cuenta, fue la tendencia de cambio que presentaba cada miRNA en las líneas MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox respecto a sus niveles basales. Como resultado de este último análisis, todos los miRNAs sufrían una disminución en sus expresiones (figura 6, tabla 3).

Tabla 3. Tendencia en el cambio de expresión de los miRNAs entre las líneas sensibles y resistentes tratadas con Doxorubicina (MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox) respecto a sus niveles basales (MDA-MB-231C y MDA-MB-231R)

miRNA	MDA-MB-231C Dox vs MDA-MB-231C	MDA-MB-231R Dox vs MDA-MB-231R
hsa-miR-27a-5p	↓	↓
hsa-miR-27b-5p	↓	↓
hsa-miR-29b-2-5p	↓	↓
hsa-miR-424-3p	↓	↓
hsa-miR-1972	↓	↓
hsa-miR-23a-5p	↓	↓
hsa-miR-1275	↓	↓

La dirección de las flechas indica la tendencia de cambio en la expresión de los miRNAs.

Es importante tener en cuenta que la función de un miRNA es producir el silenciamiento génico a través de la degradación del mRNA o mediante una inhibición temporal de la traducción del mRNA a proteína (Garzon et al. 2006). Como consecuencia, en la célula se reprimen o se activan determinadas rutas celulares. Sin embargo, aunque se pudo determinar que los miRNAs mir-

27b*, miR-29b-1*, miR-424* y miR-23a* realmente presentaban un cambio de concentración estadísticamente significativo entre las líneas resistentes y sensibles cuando fueron tratadas con doxorubicina, no se pudo asumir que a nivel biológico esas diferencias de concentración contribuyeran a producir un fenotipo quimiorresistente o quimiosensible, puesto que, aunque las concentraciones finales de proteína no serían exactamente las mismas, en ambas líneas el comportamiento de regulación de los miRNAs tuvo la misma tendencia de cambio. Ambas líneas celulares mostraron una disminución de los miRNAs tras el efecto de la doxorubicina.

Cabe matizar que la mayoría de miRNAs analizados son de tipo “star” (miRNAs*). Dado que hasta hace poco se pensaba que estos miRNAs no tenían una función biológica, actualmente no se dispone de mucha información sobre ellos. Esto implica que a la hora de buscar información bibliográfica de estudios anteriores, tuvimos que centrarnos en investigaciones basadas en sus miRNAs complementarios (no “star”). No obstante, Okamura et al. 2008 mostraron como determinados miRNAs* podían ser también biológicamente funcionales al igual que sus miRNAs complementarios.

En cuanto a la información previamente descrita sobre los miRNAs evaluados, aumentos en la expresión en algunos de sus miRNAs complementarios han sido relacionados con la quimiorresistencia y con un fenotipo más agresivo en distintos tipos de cánceres. Por ejemplo, Zhang et al. 2014 asociaron en condiciones de hipoxia, una sobreexpresión de miR-424 con una inhibición de la apoptosis a través de la disminución de las proteínas “Programmed cell death 4” (PDCD4), caspasa 3 y la Poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), cuando se administraba doxorubicina en las líneas celulares de melanoma A375, de colon HCT116 y glioma U251. Por otra parte, una elevada expresión de miR-29b ha sido relacionada con una mayor migración celular mientras que una baja expresión ha sido asociada con la inducción de apoptosis a través de la activación del gen *homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN)* en células MDA-MB-231 (Wang et al. 2011). Por último, aumentos en los miRNAs miR-23a y miR-1275 han sido asociados en pacientes con cáncer de mama, con metástasis en los nodos linfáticos y con un bajo pronóstico (Li et al. 2013; Fawzy et al. 2015). En nuestros resultados, para estos cuatro miRNAs, se observó una disminución en sus expresiones en la línea MDA-MB-231C Dox respecto sus niveles basales, confirmando por tanto que una subexpresión de miR-424*, miR-29b*, miR-23a* y miR-1275 no contribuían en el desarrollo de un fenotipo quimiorresistente. No obstante, dado que la línea resistente se comportaba del mismo modo, una subexpresión de todos ellos podría sugerir que no eran partícipes de la quimiorresistencia en nuestra línea MDA-MB-231 resistente.

De forma contraria a nuestros estudios, bajas expresiones del miRNA complementario de miR-27b* (miR-27b), han sido relacionadas con la resistencia al tamoxifen en cáncer de mama luminal a través de la activación de la transición epitelio mesenquimal (EMT) y un aumento de la proteína “high mobility group box 3” (HMGB3), implicada en procesos de quimioresistencia, proliferación y metástasis (Li et al. 2016). Del mismo modo, descensos en la expresión del miRNA “star” miR-27a* han sido asociados con un mayor crecimiento tumoral. Este miRNA tiene como dianas el gen *EGFR*, el cual participa en rutas celulares como Akt y mTOR (Wu et al. 2013). Además, disminuciones en la expresión del miRNA complementario (miR-27a) han sido asociadas con una mayor resistencia a la doxorrubicina en leucemia (Feng et al. 2011). No obstante, en nuestro estudio pudimos observar una disminución de miR-27b* y miR-27a*, en la línea resistente al igual que en la sensible, por lo que no pudimos asociar dichas subexpresiones establecidas por Li et al. 2016 y Feng et al. 2011 con la quimioresistencia adquirida de nuestra línea MDA-MB-231.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, es importante matizar que tanto el grupo triple negativo como todos los grupos que constituyen el cáncer de mama son grupos heterogéneos. Además, como ya hemos visto, los mecanismos de resistencia a la quimioterapia son muy diversos y muy complejos, por lo que no siempre tienen por qué gobernar los mismos procesos quimioresistentes en todas las pacientes. El hecho de que no hayamos encontrado diferencias en la expresión de los miRNAs atribuibles a los mecanismos de resistencia entre la línea MDA-MB-231 sensible y resistente, no quiere decir que la desregulación de algunos de estos miRNAs no pueda presentarse en algunas pacientes, puesto que la línea triple negativa MDA-MB-231 con resistencia adquirida no representa ni mucho menos, a todo el grupo triple negativo quimioresistente. No obstante, estudios más exhaustivos sobre los miRNAs “star” deberían de llevarse a cabo para poder explicar el motivo de su modulación tras la administración de doxorrubicina y su función biológica en el cáncer de mama.

4.2. Análisis de los genes implicados en ciclo celular y apoptosis

Debido al efecto citostático de la quimioterapia, alteraciones en el ciclo celular han sido relacionadas con la resistencia a este tipo de fármaco (Shah y Schwartz 2001). Las antraciclinas, donde se incluye la doxorrubicina, interfieren en la maquinaria de replicación (Eroles et al. 2015). El desarrollo de la quimioresistencia es un proceso complejo donde participan diferentes moléculas y vías de señalización. La regulación de las proteínas en el ciclo celular y en la apoptosis juega un papel importante en este proceso. Por consiguiente, decidimos hacer una

búsqueda bibliográfica de genes implicados en ciclo celular y apoptosis con una posible relación en la quimioresistencia en cáncer de mama triple negativo. Los genes seleccionados fueron los siguientes: *CDC25A* (Cangi et al. 2000) , *SIRT1* (Chu et al. 2005), *CCNE2* (Voducet al. 2008), *E2F1* (Worku et al. 2008), *CDK2* (Yang et al. 2015), *GMNN* (Blanchard et al. 2011), *BCL2* (Abdel-Fatah et al. 2013) y *E2F3* (Lee et al. 2015). Además, mediante la base de datos KEGG, pudimos comprobar la implicación de éstos en distintas rutas del ciclo celular como es el caso de *CDC25A*, *CCNE2*, *CDK2*, *E2F1* y *E2F3*, mientras que el gen *BCL2* presentaba una estrecha relación con la supervivencia celular (tabla 4). Cabe destacar que la mayoría de estos genes se encontraban relacionados en los procesos de desregulación de los miRNAs y en el desarrollo del cáncer.

Tabla 4. Rutas celulares de la base de datos KEGG de genes implicados en ciclo celular y apoptosis

GENES	RUTAS CELULARES (KEGG)
<i>CDC25A</i>	Ciclo celular (hsa04110), miRNAs y cáncer (hsa05206)
<i>SIRT1</i>	Fox0 (hsa04068), AMPK(hsa04152), longevidad (hsa04211), miRNAs y cáncer (hsa05206)
<i>CCNE2</i>	Ciclo celular (hsa04110), p53 (hsa04115), PI3K-AKT (hsa04151), vías de señalización en cáncer (hsa05200), miRNAs y cáncer (hsa05206)
<i>E2F1</i>	Ciclo celular (hsa04110), vías de señalización en cáncer (hsa05200), miRNAs y cáncer (hsa05206)
<i>CDK2</i>	Fox0 (hsa04068), Ciclo celular (hsa04110), p53 (hsa04115), PI3K-AKT (hsa04151), vías de señalización en cáncer (hsa05200),
<i>GMNN</i>	Proteínas de replicación de DNA (hsa03032)
<i>BCL2</i>	Apoptosis (hsa04215)
<i>E2F3</i>	Ciclo celular (hsa04110), vías de señalización en cáncer (hsa05200), miRNAs y cáncer (hsa05206)

Por lo tanto, debido a la estrecha relación de estos genes en el cáncer de mama y su implicación en la supervivencia celular, hicimos un análisis de sus perfiles de expresión mediante RT-PCR en las líneas celulares tratadas con doxorubicina, MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox y sin tratar, MDA-MB-231C y MDA-MB-231R, (figura 7). El objetivo de este experimento, al igual que el estudio anterior, era comprobar si algunos de estos genes se modificaban de forma diferencial entre la línea sensible y resistente y por tanto, podían encontrarse implicados en la resistencia a la doxorubicina.

Como se puede observar en la figura 7, la línea celular sensible MDA-MB-231C Dox presentaba un cambio de expresión en todos los genes evaluados respecto a sus niveles basales. Los genes *CDC25A*, *SIRT1*, *CCNE2*, *CDK2*, *GMNN* y *BCL2* sufrían un descenso en sus concentraciones mientras que los genes *E2F1* y *E2F3* se encontraban sobreexpresados en presencia de este quimioterápico. Todos los cambios de expresión génicos fueron estadísticamente significativos. Por otro lado, en la línea celular resistente MDA-MB-231R Dox pudimos observar un aumento

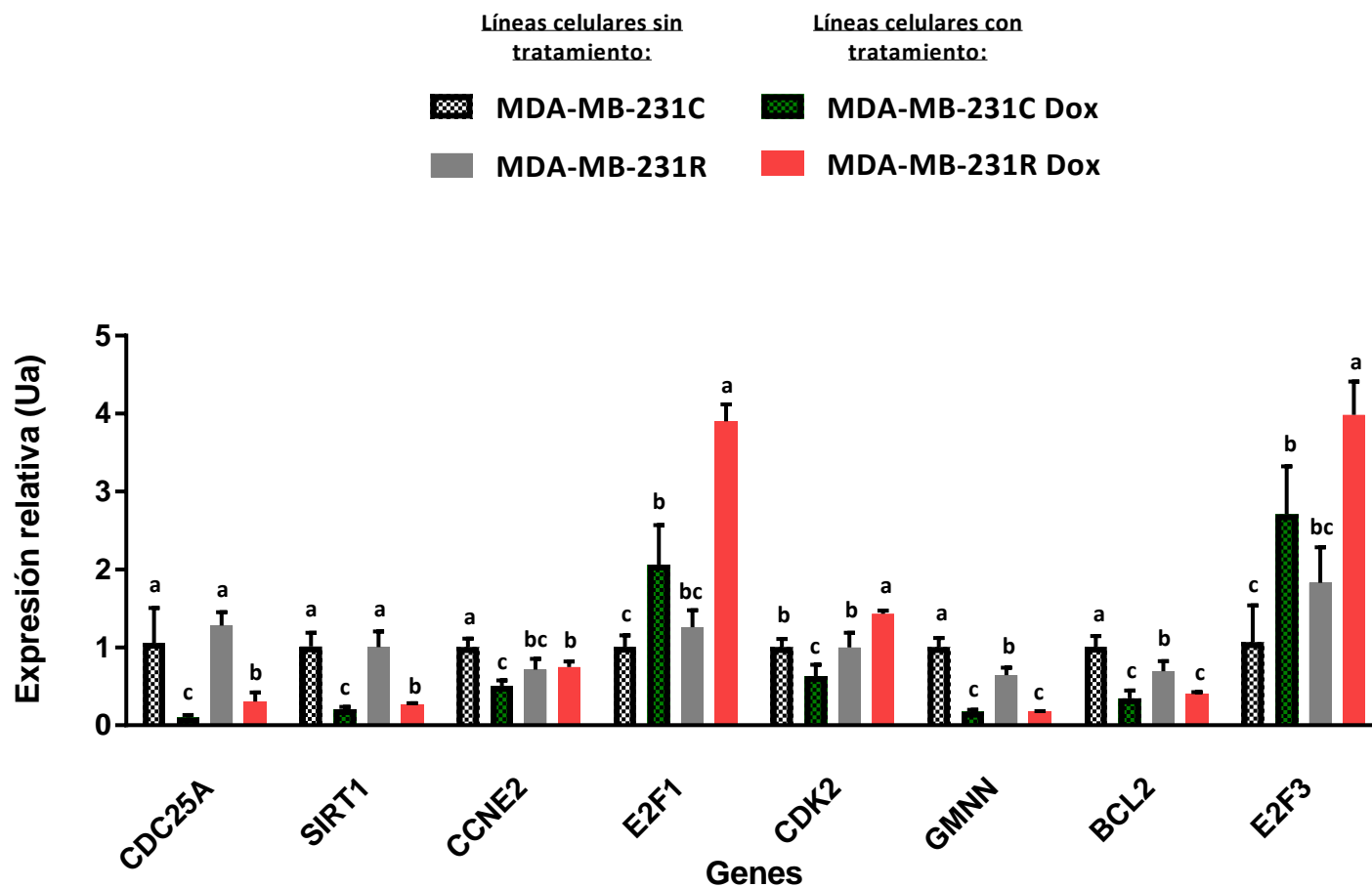


Figura 7. Análisis de expresión génica. MDA-MB-231C: línea sensible a la doxorubicina, MDA-MB-231C Dox: línea sensible tratada con doxorubicina a 5µM (24h), MDA-MB-231R: línea resistente a la doxorubicina, MDA-MB-231R Dox: línea resistente tratada con doxorubicina a 5µM (24h). Los superíndices a,b,c y d muestran en cada gen la significancia estadística entre las dos líneas y sus dos condiciones celulares, siendo el nivel de significancia 0,05. Los genes se evaluaron por triplicado y se normalizaron respecto al gen endógeno GAPDH y respecto a la línea sensible sin tratar (MDA-MB-231).

en la expresión de los genes *E2F1*, *E2F3* y *CDK2* respecto a sus niveles basales, mientras que el resto de genes disminuyeron sus expresiones (figura 7). Es destacable el aumento de expresión que mostraron los genes *E2F1* y *E2F3* en las líneas MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox, (figura 7). *E2F3* es un factor de transcripción que se encuentra implicado en la replicación del ADN y en su reparación, en apoptosis y duplicación del centrosoma (Lee et al. 2015). Sobreexpresiones del gen *E2F3* han sido relacionadas anteriormente con el desarrollo del cáncer de mama (Lee et al. 2015). No obstante, el hecho de que ambas líneas celulares, sensibles y resistentes, presentasen el mismo perfil de expresión sugiere que *E2F1* y *E2F3* no estaban implicados en los mecanismos de quimioresistencia. De acuerdo con nuestros resultados, Tordai et al. 2008 asociaron una mayor quimiosensibilidad con la expresión de genes relacionados con rutas celulares de *E2F3* en tumores de cáncer de mama negativos para el RE.

En cuanto al análisis de los genes por su posible implicación en la resistencia a la doxorrubicina, lo primero que se comprobó fue si existían diferencias significativas cuando comparábamos las líneas MDA-MD-231C Dox y MDA-MD-231R Dox. Concentraciones diferentes de expresión génica podrían implicar concentraciones diferentes de proteínas y por lo tanto, las rutas celulares en las cuales participan podrían estar más o menos activadas. Los genes *CDC25A*, *SIRT1*, *CCNE2*, *E2F1*, *CDK2* y *E2F3* presentaban diferencias significativas entre ambas líneas celulares tratadas con doxorrubicina (figura 7). No obstante, hay que tener en cuenta que los genes *CCNE2*, *GMNN* y *BCL2* ya de por sí mostraban diferencias de expresión significativas entre los niveles basales de ambas líneas. Esto implicaría que las posibles diferencias de expresión génicas que se observaron en ambas líneas cuando fueron tratadas con doxorrubicina, podrían estar asociadas a mecanismos de quimioresistencia o simplemente fueran diferencias como consecuencia de un metabolismo basal ya de por sí diferente.

En segundo lugar, comprobamos si la tendencia en el cambio de expresión entre las líneas tratadas MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox era igual o diferente respecto a sus niveles basales MDA-MB-231C y MDA-MB-231R, (figura 7; tabla 5). *CDC25A* y *SIRT1* tendían a disminuir en ambas líneas cuando se trataban con doxorrubicina mientras que el comportamiento de *E2F1* y *E2F3*, como ya se había comentado, era el mismo en ambas líneas. No obstante, la expresión de *CCNE2* disminuía en MDA-MB-231C Dox respecto sus niveles basales MDA-MB-231C, mientras que en la línea MDA-MB-231R Dox la expresión génica se mantenía constante respecto a MDA-MB-231R, (figura 7; tabla 5). Por otra parte *CDK2* tendía a disminuir en MDA-MB-231C Dox respecto a MDA-MB-231-C mientras que en la línea MDA-MB-231R Dox se observaba un aumento en la expresión respecto a MDA-MB-231R (figura 7; tabla 5).

Estos resultados sugirieron que *CCNE2* y *CDK2* podrían estar implicados en los mecanismos de resistencia a la doxorubicina. *CCNE2* es una proteína del ciclo celular cuya función es regular a *CDK2*. La activación de *CDK2* mediante esta ciclina permite la fosforilación de proteínas como la proteína retinoblastoma (RB) la cual promueve la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Voduc et al. 2008). De acuerdo con nuestro estudio, sobreexpresiones de *CCNE2* junto con *CDK2* han sido relacionadas con la resistencia a tamoxifen en cáncer de mama luminal, mientras que la administración de inhibidores de *CDK2* y *CCNE2* restablecía la sensibilidad (Caldon et al. 2012). Además, *CCNE2* también ha sido relacionado junto con la proteína quinasa 2 asociada a la fase S (Skp2) con un pobre pronóstico en el grupo triple negativo. La hipótesis de este mecanismo se basa en que un aumento de la enzima Skp2 contribuyen a la degradación de la proteína supresora de tumores p27. Dado que p27 es un inhibidor del complejo *CCCNE/CDK2*, una disminución de los niveles de p27 permite un aumento de *CCCNE/CDK2* y por lo tanto, se promueve la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la S (Voduc et al. 2008). Dado que en nuestra línea resistente MDA-MB-231 los niveles de *CCNE2* permanecían constantes y *CDK2* aumentaban, es posible que ambos estuvieran promoviendo la progresión del ciclo celular a pesar del efecto citotóxico de la doxorubicina.

Tabla 5. Tendencia en el cambio de expresión génica entre las líneas sensibles y resistentes (MDA-MB-231C y MDA-MB-231R) tratadas con Doxorubicina (MDA-MB-231C Dox y MDA-MB-231R Dox)

GENES	MDA-MB-231C Dox	MDA-MB-231R Dox
	vs MDA-MB-231C	vs MDA-MB-231R
CDC25A	↓	↓
SIRT1	↓	↓
CCNE2	↓	=
E2F1	↑	↑
CDK2	↓	↑
GMNN	↓	↓
BCL2	↓	↓
E2F3	↑	↑

La dirección de las flechas indica la tendencia de cambio en la expresión de los miRNAs. En negrita, los genes con un comportamiento distinto entre la línea sensible y resistente.

Por otro lado, se ha visto que *CDK2* puede fosforilar a la histona-lisina metiltransferasa (*EZH2*), de forma que una sobreactivación de esta enzima puede producir represión transcripcional en regiones promotoras. Sobreexpresiones de esta enzima en pacientes con un fenotipo triple negativo han sido asociadas con estadíos avanzados de los tumores y un aumento de la

mortalidad, puesto que EZH2 facilita la progresión tumoral, metástasis, angiogénesis y expansión de las células iniciadoras de cáncer de mama (BTIC) (Yang et al. 2015). Además, Servant et al. 2004 asociaron un aumento en la actividad de CDK2 junto con CCNE2 y una disminución de p27 y p21^{Cip1} (p21), con una mayor tolerancia a la doxorubicina en cardiomiocitos H9c2 confluentes. De forma contraria, cuando se administraba el inhibidor de CDK2 Roscovitine, se restablecía la sensibilidad a este quimioterápico.

Por lo tanto, *CCNE2* y *CDK2* parecen trabajar de forma conjunta en el ciclo celular y ambos parecen estar relacionadas con mecanismos de supervivencia en cáncer de mama triple negativo (Voducet et al. 2008 y Yang et al. 2015). Además la posible relación de *CDK2* con la resistencia a la doxorubicina establecida por Servant et al. 2004 refuerza nuestros resultados. No obstante, ambos genes deberían de estudiarse con más detenimiento para determinar sus niveles de implicación en la resistencia a este quimioterápico.

En cuanto al resto de genes evaluados, aumentos de la expresión de los genes *CDC25A*, *SIRT1*, *BCL2* y *GMNN* han sido relacionados con un fenotipo más agresivo en cáncer de mama. Por ejemplo, una mayor expresión de *CDC25A* han sido relacionada con un bajo pronóstico en cáncer de mama, a través de la activación de *CDK2* (Cangi et al. 2000). Aumentos en la expresión de *SIRT1* han sido asociados con una mayor expresión de la proteína transportadora glioproteína-P en la línea celular luminal MCF-7, la cual permite el flujo de fármacos desde el interior celular al exterior (Chu et al. 2005). Del mismo modo, una mayor expresión de la proteína antiapoptótica *BCL2* ha sido relacionada por Abdel-Fatah et al. 2013 con una mayor resistencia al tratamiento ATC-CT (R-CHOP; Rituximab-ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolone) en cáncer de mama triple negativo. Por último, sobreexpresiones del gen *GMNN* han sido asociadas con fallos en la citoquinesis del ciclo celular, generando como consecuencia células aneuploides con capacidad de resistir al efecto de los fármacos (Blanchard et al. 2011). En nuestros resultados, se observó una disminución en las expresiones de estos genes en la línea MDA-MB-231C Dox respecto sus niveles basales, corroborando una disminución en sus expresiones con una mayor quimiosensibilidad. Dado que en la línea resistente también tuvieron lugar descensos en sus respectivas expresiones, *CDC25A*, *SIRT1*, *BCL2* y *GMNN* no pudieron ser considerados partícipes de la resistencia adquirida por nuestra línea celular MDA-MB-231.

4.3. Análisis del miRNA hsa-miR-200c-3p como posible miRNA implicado en la resistencia a la doxorrubicina y en la modulación de los genes CDK2 y CCNE2.

Investigando sobre posibles mecanismos que podían regular los genes *CCNE2* y *CDK2*, vimos que el miRNA hsa-miRNA-200c (miR-200c*) regulaba ambos genes en leiomioma uterino (Chuang et al. 2015). El leiomioma uterino es un tipo de carcinogénesis poco frecuente con un elevado ratio de mortalidad y una elevada quimioresistencia (Chuang et al. 2015). Además, en el estudio realizado por Tormo et al. (2015) con el cual partimos nuestro trabajo, se observó un cambio de expresión del miR-200c* dentro del grupo triple negativo (grupo II). Para confirmar si los genes eran posibles dianas de este miRNA, hicimos uso de miRPath v.2. Tanto *CCNE2* como *CDK2* aparecían como dianas validadas experimentalmente de miR-200c* en vías implicadas en cáncer (hsa04012), la ruta p53 (hsa04115) y PI3-Akt (hsa04151).

Por lo tanto, debido a la posible relación de este miRNA en el cáncer de mama triple negativo y en la regulación de los genes *CCNE2* y *CDK2*, medimos la expresión de este miRNA en las líneas MDA-MB-231 sensibles y resistentes para comprobar si podía estar implicado en el fenotipo quimioresistente del grupo triple negativo. Para ello, realizamos una RT-PCR para medir sus niveles de expresión (figura 8).

En cuanto a la posible modulación de los genes *CDK2* y *CCNE2* por miR-200c*, en la línea sensible MDA-MB-231C Dox se observó un descenso de los niveles de expresión en comparación con sus niveles basales (figura 8). Es decir, una disminución en la concentración del miRNA miR-200c* implicaría un aumento de expresión de estos dos genes. No obstante, *CDK2* y *CCNE2* tendían a disminuir en la línea MDA-MB-231C Dox (figura 9). Por otro lado, en la línea MDA-MB-231R Dox se observó un aumento de expresión respecto a sus niveles basales (figura 8). Esto implicaría que un aumento del miRNA debería de disminuir los niveles de *CDK2* y *CCNE2*. Sin embargo, los niveles del primero aumentaban mientras que el segundo permanecían constantes (figura 9). Por lo tanto, nuestros resultados no parecieron mostrar una modulación directa de los genes *CCNE2* y *CDK2* a través miR-200c* bajo los efectos de la doxorrubicina.

Estudios anteriores han relacionado una interacción de miR-200c* con *CDK2* y *CCNE2* en leiomioma uterino (Chuang et al. 2015) o en cáncer de riñón (Wang et al. 2015). Además, en este último estudio, se observó que la sobreexpresión de miR-200c* inhibía el ciclo celular en la fase G0/G1 a través de la interacción con *CDK2* en líneas celulares de carcinoma renal.

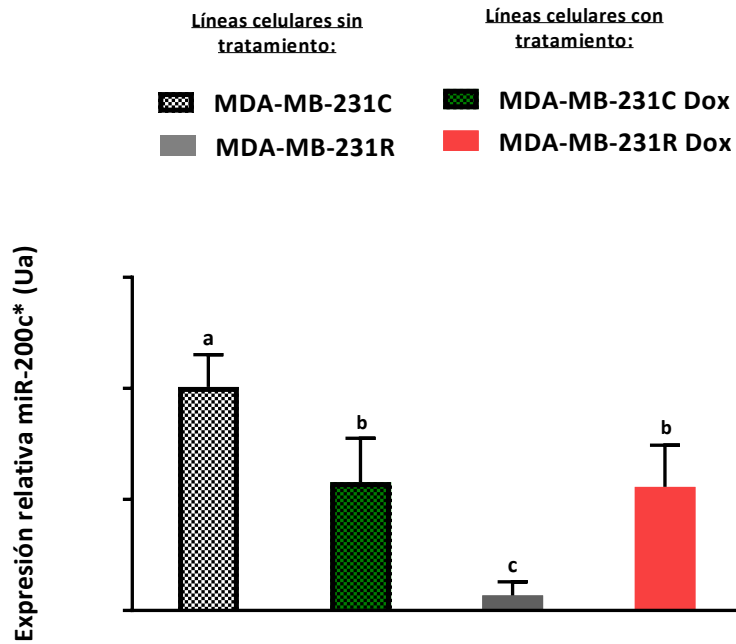


Figura 8. Análisis de expresión del miRNA hsa-miR-200c-3p. MDA-MD-231C: línea sensible a la doxorubicina, MDA-MB-231C Dox: línea sensible tratada con doxorubicina (5µM, 24h), MDA-MD-231R: línea resistente a la doxorubicina, MDA-MB-231R Dox: línea resistente tratada con doxorubicina (5µM, 24h). Los superíndices a,b,c y d muestran en cada miRNA la significancia estadística entre las dos líneas y sus dos condiciones celulares, siendo el nivel de significancia 0,05. El miRNA se evaluó por triplicado y se normalizó respecto al miRNA endógeno RNU43 y respecto a la línea sensible sin tratar.

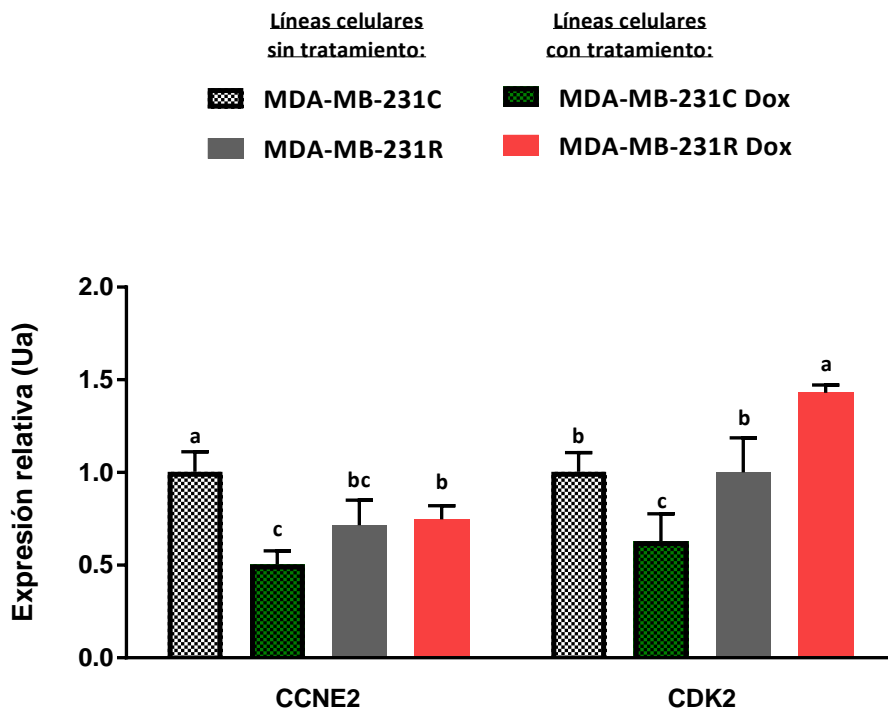


Figura 9. Análisis de expresión de los genes *CCNE2* y *CDK2*. Información extraída de la figura 10

No obstante, un mismo gen puede estar regulado por diferentes miRNAs, siendo la interacción con unos más fuerte que con otros. Por lo que cabría la posibilidad que en nuestro estudio otros miRNAs u otros mecanismos reguladores estuvieran modulando a ambos genes con una mayor intensidad bajo el efecto de la doxorubicina.

En cuanto a la implicación de miR-200c* en el cáncer de mama triple negativo, nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión de este miRNA en la línea MDA-MB-231C Dox respecto a sus niveles basales (figura 8) mientras que en la línea resistente se produjo el efecto contrario, puesto que cuando se administró doxorubicina se produjo una sobreexpresión (figura 8). No obstante, el resultado final fue una concentración equivalente de miR-200c*, por lo que a priori no pudimos asociarlo con la resistencia a la doxorubicina.

Estudios previos al nuestro relacionaron una subexpresión de este miRNA con una mayor probabilidad de desarrollar metástasis en los nodos linfáticos, proponiendo su uso junto con el miRNA hsa-miR-205 como un marcador predictivo de metástasis (Berber et al. 2014). Además, disminuciones en el miR-200c* han sido asociados con aumentos en la proteína fosfatasa 1F (PP1MF) y la proteína "FH1/FH2 domain-containing protein 1" codificada por el gen *FHOD1*. Estas dos proteínas regulan la formación de actina en el citoesqueleto. Aumentos en la expresión de estos genes promueven la migración, invasión y despolarización de la célula (Jurmeister et al. 2012). Además, miR-200c* también tiene como dianas, el represor de la E-cadherina "Zinc finger E-box binding homeobox 1" (ZEB1). De forma que disminuciones en la expresión de este miRNA promueven un aumento de ZEB1 y una disminución de E-cadherina. Esto permite el desarrollo de la EMT en la célula con características de invasión y migración celular (Hurteau et al. 2007).

De forma contraria a nuestros estudios, disminuciones en la sobreexpresión de miR-200c* han sido relacionados con una mayor quimioresistencia a la doxorubicina en la línea celular HER2 positiva BT474 y en la triple negativa MDA-MB-436 (Kopp et al. 2012). La disminución de miR-200c* permite un aumento en la expresión del receptor neurotrófico de tirosina quinasa tipo 2 (TrkB) y de la proteína BMI1 donde el primero se encuentra implicado en procesos de anoikis y el segundo en la renovación celular y en la senescencia. En nuestros resultados, en la línea MDA-MB-231R Dox se observó un aumento en la expresión de miR-200c* respecto a sus niveles basales, por lo que este miRNA tampoco parece ser el motivo de la resistencia generada en esta línea. No obstante, se observó una subexpresión significativa de la línea MDA-MB-231R en comparación con la línea MDA-MB-231C (figura 8), lo que refuerza su uso como marcador molecular de un fenotipo más agresivo como indica la bibliografía.

5. CONCLUSIONES

1. La expresión de los miRNAs candidatos (hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-27b-5p, hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-424-3p, hsa-miR-1972, hsa-miR-23a-5p y hsa-miR-1972) fue diferente entre la línea MDA-MB-231 sensible y la misma con resistencia adquirida a la doxorubicina, observándose una sobreexpresión en esta última. No obstante, cuando ambas líneas fueron tratadas con doxorubicina, en ambas líneas celulares se observó una similar subexpresión de todos los miRNAs evaluados.
2. La expresión de los genes seleccionados (*CDC25A*, *SIRT1*, *CCNE2*, *E2F1*, *CDK2*, *GMNN*, *BCL2* y *E2F3*) asociados a rutas del ciclo celular y apoptosis, dio como resultado una expresión diferencial de los genes *CDK2* y *CCNE2*. Concretamente, ambos genes aparecían subexpresados en la línea sensible tratada con doxorubicina respecto sus niveles basales, mientras que en la línea resistente con doxorubicina, la expresión del gen *CDK2* estaba sobreexpresada y *CCNE2* permanecía constante.
3. El análisis de la expresión del miRNA hsa-miR-200c-3p no mostró modulación directa con los genes *CDK2* y *CCNE2*, puesto que la tendencia en el cambio de expresión de ambos genes no correspondía con el cambio de expresión observado en el miRNA hsa-miR-200c-3p. Sin embargo, se observó una expresión diferencial de este miRNA entre la línea MDA-MB-231 sensible y resistente, sin tratar.

6. BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-FATAH, T.M.A. et al., 2013. Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Annals of Oncology.*, 24(11): 2801–2807.

AMERICA CANCER SOCIETY. (2014). Chemotherapy for Breast Cancer. Visto el 1 de junio. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER. (AECC). (2013a). *Cáncer de mama, ¿qué es?* Visto el 7 de abril. <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/quees.aspx>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER. (AECC). (2013b). *Cáncer de mama, pronóstico (Supervivencia y mortalidad)*, visto 8 de abril del 2016. <https://www.aecc.es/sobreelcancer/cancerporlocalizacion/cancermama/paginas/incidencia.aspx>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER (AECC). (2013c). *Cáncer de mama, tipos*. Visto el 28 de abril del 2016. <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/tipos.aspx>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER. (AECC). (2014a). *Cáncer de mama, incidencias*. visto 7 de abril del 2016. <https://www.aecc.es/sobreelcancer/cancerporlocalizacion/cancermama/paginas/incidencia.aspx>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER. (AECC). (2014b). *Cáncer de mama, tratamiento quirúrgico*. Visto el 1 de junio del 2016. <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/tratamientoquirurgico.aspx>

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER. (AECC). (2014c). *Cáncer de mama, radioterapia*. Visto el 1 de junio del 2016. <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/radioterapia.aspx>

BERBER, U. et al., 2014. MiR-205 and miR-200c: Predictive micro RNAs for lymph node metastasis in triple negative breast cancer. *Journal of Breast Cancer.*, 17(2): 143–148.

BLANCHARD, Z. et al., 2011. Geminin overexpression suppressing cytokinesis induces mammary tumors via ABSTRACT : *Oncotarget.*, 2(12): 1011–1019.

BOSCH, A. et al., 2010. Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treatment Reviews.*, 36(3): 206–215.

- CALDON, C.E. et al., 2012. Cyclin E2 overexpression is associated with endocrine resistance but not insensitivity to CDK2 inhibition in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.*, 11(7): 1488–1499.
- CANGI, M.G. et al., 2000. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *Journal of Clinical Investigation.*, 106(6): 753–761.
- CAREY, L.A. et al., 2007. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research.*, 13(8): 2329–2334.
- CHU, F. et al., 2005. Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*. *Cancer Research.*, 65(22): 10183–10187.
- CHUANG, T.-D., HO, M. & KHORRAM, O., 2015. The regulatory function of miR-200c on inflammatory and cell-cycle associated genes in SK-LMS-1, a leiomyosarcoma cell line. *Reproductive sciences.*, 22(5): 563–71.
- EROLE, P. et al., 2012. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews.*, 38(6): 698–707.
- EROLE P. et al., 2015. MicroRNAs in breast cancer: one More Turn in Regulation. *Curr Drug Targets*.
- FAWZY, I.O. et al., 2015. MiR-1275: A single microRNA that targets the three IGF2-mRNA-binding proteins hindering tumor growth in hepatocellular carcinoma. *FEBS Letters.*, 589(17): 2257–2265.
- FENG, D.D. et al., 2011. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.*, 15(10): 2164–2175.
- GARZON, R. et al., 2006. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 12(12)., 580–587.
- HURTEAU, G.J. et al., 2007. Overexpression of the MicroRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Research.*, 67(17): 7972–7976.
- JURMEISTER, S. et al., 2012. MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Molecular and cellular biology.*, 32(3): 633–51.

- KATUSHIMA, K. et al., 2012. Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 protein suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *Journal of Biological Chemistry.*, 287(33): 27396–27406.
- KOPP, F. et al., 2012. miR-200c Sensitizes Breast Cancer Cells to Doxorubicin Treatment by Decreasing TrkB and Bmi1 Expression. *PLoS ONE.*, 7(11).
- Lee, M., OPREA-ILIES, G. & SAAVEDRA, H.I., 2015. Silencing of E2F3 suppresses tumor growth of Her2+ breast cancer cells by restricting mitosis. *Oncotarget.*, 6(35): 37316–34.
- LI, X. et al., 2013. C-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting sprouty2. *Journal of Biological Chemistry.*, 288(25): 18121–18133.
- LI, X. et al., 2016. MiR-27b is epigenetically downregulated in tamoxifen resistant breast cancer cells due to promoter methylation and regulates tamoxifen sensitivity by targeting HMGB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 3–8.
- MILLER, T.E. et al., 2008. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *Journal of Biological Chemistry.*, 283(44): 29897–29903.
- O'REILLY, E.A. et al., 2015. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA clinical.*, 3: 257–75.
- OAKMAN, C. et al., 2011. Adjuvant systemic treatment for individual patients with triple negative breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland).*, 20(3): 135–41.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (2014). *Cáncer de mama, prevención y control*. Visto el 7 de abril del 2016. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Globocan 2012*. Visto el 7 de abril del 2016. <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
- OKAMURA, K. et al., 2008. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature structural & molecular biology.*, 15(4): 354–63.
- PEÑA-CHILET, M. et al., 2014. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC cancer.*, 14: 529.
- PEROU, C.M. et al., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.*, 406(6797): 747–752.

SERVANT, N. et al., 2004. TBP-associated factor 1 overexpression induces tolerance to Doxorubicin in confluent H9c2 cells by an increase in cdk2 activity and cyclin E expression. *Molecular and Cellular Biochemistry.*, 259(1-2): 71–81.

SHAH, M.A. & SCHWARTZ, G.K., 2001. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research.*, 7 (8): 2168–2181.

THIBODEAU G. y PATTON K. (2007). Anatomía y Fisiología. Elsevier: 1139

TORDAI, A. et al., 2008. Evaluation of biological pathways involved in chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Research.*, 10(2): 37.

TORMO, E. et al., 2015. MicroRNA Profile in Response to Doxorubicin Treatment in Breast Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry.*, 116(9): 2061–2073.

VIMALA, K. et al., 2012. Curtailing Overexpression of E2F3 in Breast Cancer Using siRNA (E2F3) -Based Gene Silencing. *Archives of Medical Research.*, 43(6): 415–422.

VODUC, D. et al., 2008. The combination of high cyclin E and Skp2 expression in breast cancer is associated with a poor prognosis and the basal phenotype. *Human Pathology.*, 39(10): 1431–1437.

WANG, C. et al., 2011. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry.*, 352(1-2): 197–207.

WANG, X. et al., 2015. miR-200c Targets CDK2 and Suppresses Tumorigenesis in Renal Cell Carcinoma. *Molecular cancer research.*, 13(12): 1567–77.

WORKU, D. et al., 2008. Evidence of a tumour suppressive function of E2F1 gene in human breast cancer. *Anticancer Research.*, 28(4 B): 2135–2139.

WU, X. et al., 2013. Coordinated targeting of the EGFR signaling axis by microRNA-27a*. *Oncotarget.*, 4(9): 1388–1398.

YADAV, B.S., CHANANA, P. & JHAMB, S., 2015. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World journal of clinical oncology*, 6(6): 252–63.

YANG, C.C. et al., 2015. Phosphorylation of ezh2 at t416 by cdk2 contributes to the malignancy of triple negative breast cancers. *American Journal of Translational Research*, 7(6): 1009–1020.

ZHANG, D. et al., 2014. Hypoxia-induced miR-424 decreases tumor sensitivity to chemotherapy by inhibiting apoptosis. *Cell death & disease.*, 5: 1301.

ZHOU, M. et al., 2010. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *Journal of Biological Chemistry.*, 285(28): 21496–21507.