



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS
ASOCIADOS CON LA RESPUESTA PATOLÓGICA
COMPLETA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE
EN TUMORES DE PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T

M. EN C. RAÚL GARCÍA VÁZQUEZ



DIRECTORES DE TESIS
DRA. LAURENCE ANNIE MARCHAT MARCHAU
DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

MÉXICO, CDMX. 2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE ANEXOS	12
1 RESUMEN	13
2 ABSTRACT	16
3 INTRODUCCIÓN	19
3.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER	19
3.2 CÁNCER DE MAMA	22
3.2.1 <i>Epidemiología</i>	25
3.2.2 <i>Factores de riesgo y prevención</i>	28
3.2.3 <i>Curso clínico e histopatología</i>	29
3.3 TRATAMIENTO TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE MAMA.....	30
3.3.1 <i>RPC</i>	34
3.3.1.1 Situación de la obtención de la RPC en CMTN	34
3.3.2 <i>Mecanismos moleculares asociados con respuesta a la terapia</i>	37
3.3.2.1 La importancia de la predicción de la respuesta terapéutica	40
3.4 MiRNAs.....	44
3.4.1 <i>Biogénesis y función</i>	45
3.4.2 <i>Oncomirs</i>	50
3.5 PERFILES DE EXPRESIÓN DE MiRNAs Y SU USO EN LAS RUTAS CELULARES IMPLICADAS CON LA RESPUESTA TERAPÉUTICA.....	54
4 JUSTIFICACIÓN	58
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	59
6 HIPÓTESIS	61
7 OBJETIVOS	62

7.1	GENERAL	62
7.2	PARTICULARES.....	62
8	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	63
9	MATERIAL Y MÉTODOS.....	64
9.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRA.....	64
9.1.1	<i>Selección de muestras y estratificación</i>	<i>64</i>
9.2	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	66
9.3	MICROARREGLOS DE BAJA DENSIDAD CON SONDAS TAQMAN (TLDAs)	66
9.4	qRT-PCR DE MIRNAS CON SONDAS INDIVIDUALES.....	68
9.5	CURVA DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER.....	69
9.6	CURVA ROC.....	70
9.7	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE LOS MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS 70	
9.8	CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB- 231 Y BT-20.....	71
9.9	TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE MI R-143.....	71
9.9.1	<i>Evaluación de la proliferación celular y quimiosensibilidad por ensayos de MTT</i> 72	
9.9.2	<i>Evaluación de la migración celular por el ensayo de la herida</i>	<i>73</i>
9.9.3	<i>Arreglo de anticuerpos dirigidos contra proteínas totales y fosforiladas de la vía de señalización PI3K-AKT</i>	<i>74</i>
10	RESULTADOS.....	76
10.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES CON CMTNLA	76
10.2	PERFIL DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIRNAS ENTRE PACIENTES CON CMTNLA QUIENES OBTUVIERON RPC Y NO-RPC	80
10.3	LA EXPRESIÓN DEL SUBCONJUNTO DE MIRNAS VALIDADOS PREDICEN LA RPC Y NO-RPC	84
10.4	LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS MIRNAS VALIDADOS PRONOSTICAN UNA MEJOR TASA DE SLE EN PACIENTES CON RPC	86
10.5	ANTECEDENTES DE LOS MIRNAS DESREGULADOS	88

10.6	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MODULADAS POR LA FIRMA DE MIRNAS DESREGULADOS	90
10.7	VALOR PREDICTIVO Y PRONÓSTICO DE MIR-143-5P EN PACIENTES CON CMTNLA	96
10.8	LA EXPRESIÓN DE MIR-143-5P SE ENCUENTRA DISMINUIDA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA Y TUMORES, E INHIBE LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN CELULAR.	100
10.9	LA RESTAURACIÓN DE MIR-143-5P SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA AL TRATAMIENTO CON CISPLATINO	102
10.10	LA VÍA PI3K/AKT ES LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN MÁS DESREGULADA POR MIR-143-5P	106
10.11	MIR-143-5P REGULA MÚLTIPLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS CON PROLIFERACIÓN CELULAR, MIGRACIÓN CELULAR Y RESPUESTA A LA TERAPIA	109
10.12	LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MIR-143-5P Y SUS GENES DIANA SE ASOCIAN CON UNA MENOR SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA	120
11	DISCUSIÓN	123
12	CONCLUSIONES	143
13	PERSPECTIVAS.....	145
14	REFERENCIAS.....	146
15	ANEXOS	170
16	PRODUCTIVIDAD	177
16.1	ARTÍCULOS	177
16.2	CONGRESOS	178

1 RESUMEN

El objetivo principal de la quimioterapia neoadyuvante es mejorar el pronóstico del resultado de los pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, pocos se benefician de este tratamiento. La respuesta patológica completa (RPC) es un marcador eficaz para la predicción de beneficios clínicos a largo plazo. Desafortunadamente, entre el 50% -85% de las pacientes tienen una respuesta desfavorable a la quimioterapia. La expresión de los microRNAs (miRNAs) es útil como biomarcadores de progresión del cáncer de mama. En cambio, su potencial para identificar pacientes con RPC ha sido pobremente explorado. Este estudio se enfocó en identificar un perfil de miRNAs asociado con la RPC en pacientes con cáncer de mama triple negativo localmente avanzado (CMTNla) que recibieron una quimioterapia neoadyuvante experimental basada en 5-fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida---cisplatino/Paclitaxel (FAC---CDDP/Ptx). En la cohorte de descubrimiento (10 pacientes con RPC vs 8 sin RPC), se evaluó la expresión de 754 miRNAs usando arreglos de baja densidad con sondas TaqMan. El análisis de clúster jerárquico no supervisado identificó 11 miRNAs diferencialmente significativos entre las pacientes con y sin respuesta (*fold change* ≥ 1.5 ; $p \leq 0.05$). Posteriormente, la expresión diferencial de miR-30a, miR-9-3p, miR-770 y miR143-5p se validó en una cohorte independiente (12 pacientes con RPC vs 5 sin RPC). Además, el análisis de Kaplan-Meier indicó que la expresión de los cuatro miRNAs se asoció con una mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE). La clasificación de *Gene Ontology* de los genes diana predichos por los miRNAs predijo que más de 200 genes podrían estar involucrados en vías de señalización

relacionadas con la quimiorresistencia, tales como VEGF, FAK, WNT y AKT, principalmente. Al respecto, el miR-143-5p podría ser uno de los reguladores más activos de la respuesta a la terapia debido a que ha sido ampliamente reportado como un fuerte supresor tumoral. Por lo tanto, se investigó si la expresión de miR-143-5p podría discriminar entre pacientes con y sin RPC en pacientes con CMTN1a que recibieron la misma quimioterapia neoadyuvante: FAC---CDDP/Ptx. Los datos revelaron que miR-143-5p tiene una expresión significativamente disminuida ($p < 0.0006$) en pacientes que lograron la RPC en comparación con el grupo de pacientes que no respondió. El análisis de la curva característica operadora del receptor (ROC) demostró que miR-143-5p podría ser un buen predictor de la RPC (AUC = 0.849). Adicionalmente, el análisis de Kaplan-Meier identificó que los niveles de expresión bajos de miR-143-5p se asocian con una mayor SLE en pacientes con la RPC. Para obtener más información sobre las funciones celulares de miR-143-5p, primero se identificó que este miRNA está reprimido en tumores de mama y en cuatro líneas celulares de cáncer de mama en comparación con células normales. Interesantemente, la expresión ectópica de miR-143-5p inhibió la proliferación y la migración celular (excepto en MCF-7), y sensibilizó a las células cancerosas al tratamiento con cisplatino. Para descifrar las redes de señalización oncogénicas reguladas por miR-143-5p, se utilizó un arreglo de anticuerpos de fosforilación basados en análisis tipo ELISA de alto rendimiento. El perfil fosfoproteómico de la vía de señalización de PI3K/AKT reveló que miR-143-5p redujo la expresión y la fosforilación de múltiples proteínas asociadas en las rutas de señalización celular de AKT, WNT, SAPK/JNK, FAK y JAK/STAT. Adicionalmente, el meta-análisis de expresión en una cohorte de 5,143 pacientes

con cáncer de mama, arrojó que niveles bajos de expresión de miR-143-5p y GSK3- β , RAF1, Paxilina y p21CIP1 correlacionan con pobre supervivencia. Finalmente, un modelo de regulación hipotética de miR-143-5p sobre sus genes diana directos e indirectos fue provisto para agrupar la información de la modulación de las distintas rutas celulares desreguladas y su impacto sobre algunos de los fenotipos alterados en este estudio. En resumen, se identificó una nueva firma de expresión de miRNAs asociada con la RPC en CMTNla. Los cuatro miRNAs validados podrían utilizarse como biomarcadores moleculares de respuesta clínica a la RPC y de supervivencia en pacientes con este tipo de cáncer que reciben la quimioterapia neoadyuvante basada en FAC---CDDP/Ptx. Además, por sí mismo miR-143-5p también podría ser un posible predictor de la RPC a dicha terapia neoadyuvante y pronosticar una mayor SLE a través de funcionar como un regulador divergente de diversas redes de señalización celular para suprimir la proliferación y migración celular, así como quimiosensibilizar al tratamiento con cisplatino en cáncer de mama. Por lo que miR-143-5p podría también ser un candidato potencial para su evaluación terapéutica

Palabras clave: Cáncer de mama, respuesta patológica completa, quimioterapia neoadyuvante, microRNAs, miR-143-5p, supervivencia, vías de señalización, proliferación celular, migración celular, quimiosensibilidad.

2 ABSTRACT

Neoadjuvant chemotherapy aims to improve the outcome of patients with breast cancer, but few would benefit from this treatment. The pathological complete response (pCR) has been proposed as a surrogate marker for the prediction of long-term clinical benefits. However, 50% -85% of patients have an unfavorable response to chemotherapy. MicroRNAs (miRNAs) are biomarkers of breast cancer progression; however, its potential to identify patients with pCR remains poorly understood. Here, we investigated whether a profile of miRNAs could be associated with the pCR in patients with locally advanced triple negative breast cancer (laTNBC) who received an experimental neoadjuvant chemotherapy based on 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide---cisplatin/paclitaxel (FAC---CDDP/Ptx). In the discovery cohort, the expression of 754 miRNAs were evaluated in tumors from 10 patients with laTNBC who achieved a pCR and 8 without pCR by using low density arrays with TaqMan probes. The unsupervised hierarchical cluster analysis identified 11 miRNAs with significant differences between patients with and without response (*fold change* ≥ 1.5 , $p < 0.05$). The differential expression of miR-30a, miR-9-3p, miR-770 and miR143-5p were validated in an independent cohort of 17 patients with or without pCR. In addition, the Kaplan-Meier analysis showed that the expression of these four miRNAs were associated with greater disease-free survival (DFS). The *Gene Ontology* classification of the target genes predicted by the miRNAs indicated that more than 200 genes could be involved in pathways related to chemoresistance, such as VEGF, FAK, WNT and AKT, mainly. Largely, miR-143-5p could be one of the active regulators of the response to

therapy, being a strong tumor suppressor. Here, we investigated whether miR-143-5p could discriminate between patients with and without pCR in laTNBC with the same neoadjuvant regimen (FAC---CDDP/Ptx). The data revealed that miR-143-5p has a significantly decreased expression ($p < 0.0006$) in patients that achieved the pCR compared to the group that did not respond. The analysis of the receiver operating characteristic curve (ROC) indicated that miR-143-5p could be a good predictor of the pCR (AUC = 0.849). In addition, the Kaplan-Meier analysis showed that decreased expression levels of miR-143-5p are also associated with greater (DFS). To obtain information on the cellular functions of miR-143-5p, we first showed that this miRNA is repressed in breast tumors and in four breast cancer cell lines compared to normal cells. Interestingly, the ectopic restoration of miR-143-5p inhibited cell proliferation and migration, and sensitized the cancer cells to cisplatin treatment. To decipher the oncogenic signaling networks regulated by miR-143-5p, we used an array of phosphorylation antibodies based on high-throughput ELISA analysis. The phosphoprotein profile of the PI3K/AKT signaling pathway revealed that miR-143-5p reduces the expression and phosphorylation of multiple proteins involved in the signaling of AKT, WNT, SAPK/JNK, FAK and JAK/STAT. In addition, low expression levels of miR-143-5p and GSK3- β , RAF1, Paxilin and p21CIP1 in a large cohort of breast cancer patients correlate with poor survival. Finally, a hypothetical regulatory model of miR-143-5p was provided to have the information grouped of the modulation of the different deregulated routes in this study and their phenotypic effects. In summary, we identified a new expression signature of miRNAs associated with a pCR in laTNBC. We propose that the four validated miRNAs could be used as molecular biomarkers of clinical

response and survival in patients with this type of cancer who had a pCR to the neoadjuvant therapy. In addition, miR-143-5p could also be a possible predictor of response to neoadjuvant therapy, predict survival, and function as a divergent regulator of various signaling networks to suppress cell proliferation and migration, as well as chemosensitize treatment with cisplatin in breast cancer. MiR-143-5p could be a good candidate for evaluation potential therapeutic.

Keywords: Breast cancer, pathological complete response, neoadjuvant therapy microRNAs, miR-143-5p, clinical outcome, signaling pathways, cell proliferation, cell migration, chemosensitivity.