



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Evaluación de los niveles de miRNA-145 circulante en
plasma de mujeres peruanas y análisis metabólico *in
silico* en cáncer**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Angelo Paul MOTTA PARDO

ASESOR

Mg. Oscar ACOSTA CONCHUCOS

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Motta A. Evaluación de los niveles de miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y análisis metabólico in silico en cáncer [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0001-9176-0248
DNI o pasaporte del autor	72313112
Código ORCID del asesor (es)	0000-0002-1912-0251
DNI o pasaporte del asesor	09456570
Grupo de investigación	GENOBIDC (Grupo de investigación de Genética, Ómicas, Bioinformática y Desarrollo Computacional aplicado a Biomedicina, Farmacia, Toxicología y Alimentos).
Financiamiento	Vicerrectorado de Investigación y Postgrado – UNMSM.
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas).	Laboratorio de Bioquímica de la facultad de Farmacia y Bioquímica –UNMSM Ubicación: Jirón Huanta 1182, Cercado de Lima 15001 Coordenadas geográficas: -12.0558004, -77.0235465.
Año o rango de años que la investigación abarcó.	2 años
Disciplinas OCDE	Biotechnología relacionada con la salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Evaluación de los niveles de miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y análisis metabólico *in silico* en cáncer”

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

ANGELO PAUL MOTTA PARDO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Diecisiete (17)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 11 de diciembre de 2020

Dr. Christian Solis Calero

Presidente

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 619-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Efraín, Frida y hermano Hans, quienes con mucho amor y dedicación me acompañaron en esta inolvidable etapa de mi vida.

A mis abuelitos Abraham y Martina en el cielo.

A mis abuelitos Manuel y Nelly, por todo el apoyo y amor recibido desde siempre.

Ustedes representan mi motivación para servir mejor a las personas.

Agradecimientos

A la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, especialmente al Grupo de investigación de Genética, Ómicas, Bioinformática y Desarrollo Computacional (GENOBIDC) por la oportunidad de ser parte de una gran familia con brillantes personas que me motivaron a ser mejor cada día.

A mi asesor de tesis Mg. Oscar “maestro” Acosta, Dr. Ricardo Fujita, Dr. Jose Luis Buleje, quienes lograron a través de la mayéutica despertar mi interés por la ciencia e innovación con perspectiva global y, además, por brindarme su apoyo y motivación en la realización del presente trabajo de investigación.

Al CIGBM de la Universidad San Martín de Porres, en especial a la Dra. María Luisa Guevara, Dra. Solange Paredes, Dr. Claudio Villegas, Dr. José Sandoval, MSc. Pierina Danos, Dr(c) Alexis Murillo, Rodrigo, Lina, Daisy, Francia, Alejandro, Bernardo y Steve.

Al VRIP-UNMSM, por la subvención económica del proyecto A17040824A para Tesis de Pregrado.

ÍNDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. OBJETIVOS	18
III. GENERALIDADES	19
3.1. ANTECEDENTES	19
3.2. MARCO TEÓRICO	25
3.2.1. MicroRNAs (miRNAs)	25
3.2.2. Biogénesis de los miRNAs	26
3.2.3. miRNA-145	30
3.2.4. Plasma sanguíneo	31
3.2.5. PCR digital.....	32
3.2.6. Análisis <i>in silico</i>	35
IV. METODOLOGÍA	39
4.1. Cuantificación de miRNA-145	39
4.1.1. Obtención de la muestra	39
4.1.2. Criterios de inclusión y exclusión	39
4.1.3. Extracción de ARN total.....	40
4.1.4. Conversión a cDNA	40
4.1.5. Cuantificación de miRNAs convertidos	41
4.1.6. Análisis estadístico	43
4.1.6.1. Estadística descriptiva.....	43
4.2. Identificación <i>in silico</i> de la secuencia de miRNA-145 y los transcritos diana	44
4.2.1. Análisis <i>in silico</i> estructural del pre-miRNA-145	44
4.2.2. Análisis de acoplamiento molecular entre el miRNA-145, transcrito diana y proteína argonauta (AGO).....	45
4.2.3. Identificación de transcritos diana del miRNA-145	46
4.3. Análisis <i>in silico</i> de las rutas de señalización y metabólicas en cáncer asociado a miRNA-145	47
V. RESULTADOS	48
5.1. Cuantificación de miRNA-145	48
5.1.1. Extracción de ARN total y conversión a cDNA	48
5.1.2. Cuantificación de miRNA-145 por dPCR.....	48

5.2. Identificación <i>in silico</i> de la secuencia de miRNA-145 y los transcritos diana.....	52
5.2.1. Análisis <i>in silico</i> estructural del pre-miRNA-145	52
5.2.2. Análisis de acoplamiento molecular entre miRNA-145, transcrito diana y la proteína AGO (código PDB: 3F73)	53
5.2.3. Identificación de transcritos diana	56
5.3. Análisis <i>in silico</i> de las rutas de señalización y rutas metabólicas en cáncer asociado a miRNA-145.....	57
VI. DISCUSIÓN	64
VII. CONCLUSIONES.....	71
VIII. RECOMENDACIONES	72
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
X. ANEXOS	83
10.1. Formato Consentimiento, ficha de registro	83
10.2. Materiales, reactivos y equipos	85
10.3. Procedimientos de extracción de ARN	86
10.4. Procedimientos de conversión a cDNA	87
10.5. Cuantificación de miRNAs convertidos.....	92
10.6. Gráficas de PCR digital	93
10.7. Tabla de secuencias de pre-miRNA-145 en diferentes especies	94
10.8. miRNA-145 relacionado en cáncer.....	96
10.9. Secuencias no traducidas de los receptores de miRNA-145	97
10.10. Gráfico de interacción entre miRNA-145 y transcritos diana.....	106
10.11. Gráfico de anotación de transcritos diana y miRNAs en KEGG	107
10.12. Gráfico de anotación de rutas de metabólicas en GO.....	109
10.13. Gráfico de anotación de rutas metabólicas de la glutamina y glucosa en cáncer	110

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
dPCR	PCR digital
miRNA	MicroRNA
miRNA-145	MicroRNA-145
cDNA	ADN complementario
RISC	RNA Induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por RNA)
AGO	Proteína argonauta
3' UTR	3' untranslated region (región 3' no traducida)
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
KEGG	Enciclopedia Kyoto de genes y genomas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Base de datos y uso de algoritmos predictivos de transcritos diana. Modificado de Bastida *et al.*, 2016.

Tabla 2. Resultados de PCR digital en el programa QuantStudio 3D Analysis Suite.

Tabla 3. Comparación de modelos de estructura secundaria del pre-miRNA-145 y cálculo de mínima energía libre MFE (kcal/mol) obtenido en el programa RNAfold.

Tabla 4. Residuo de aminoácidos de la proteína argonauta interactuando con enlaces tipo puente de hidrogeno con miRNA-145.

Tabla 5. Identificación de transcritos dianas en cáncer asociado a miRNA-145.

Tabla 6. Cambios de la concentración de productos del metabolismo de la glucosa regulados por miRNA-145.

Tabla 7. Cambios de la concentración de productos del metabolismo de la glutamina regulados por miRNA-145.

Tabla 8. Componentes en la etapa de Poliadenilación.

Tabla 9. Condiciones de temperatura en la etapa de Poliadenilación.

Tabla 10. Componentes en la etapa de ligación de adaptadores

Tabla 11. Condiciones de temperatura en la etapa de ligación de adaptadores

Tabla 12. Componentes en la etapa de Transcripción reversa.

Tabla 13. Condiciones de temperatura en la etapa de Transcripción reversa.

Tabla 14. Componentes en la etapa de reacción miRNA-Amp.

Tabla 15. Condiciones de temperatura en la etapa de Reacción de miRNA-Amp.

Tabla 16. Componentes en la etapa de PCR digital.

Tabla 17. Condiciones de temperatura de PCR digital.

Tabla 18. Resultados de PCR digital en la plataforma QuantStudio 3D Analysis Suite.

Tabla 19. Comparación de modelos de estructura secundaria de pre-miRNAs y cálculo de mínima energía libre MFE (kcal/mol) obtenido en el programa RNAFold.

Tabla 20. Secuencias 3'UTR de transcritos diana regulados por miRNA-145.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de biogénesis vía canónica y no canónica de miRNAs. Modificado de O'Brien *et al.*, 2018

Figura 2. Proceso de biogénesis de exosomas y miRNAs en células madre. Modificado de Janas *et al.*, 2015

Figura 3. (A) Expresión de miRNA endógeno en tejido normal. (B) Terapia de inhibición de miRNA con anti-miRNA. (C) Terapia de reemplazo de miRNA. Modificado de Wei *et al.*, 2019.

Figura 4. Esquema de localización del gen miRNA-145. Fuente: Elaboración propia, modificado de NCBI.

Figura 5. Composición de la sangre. Modificado de Dean *et al.*, 2005.

Figura 6. Instrumentos 3D QuantStudio. La figura muestra Chip Loader, ProFlex 2 x Flat Sistema de PCR e instrumento de PCR digital 3D QuantStudio™. Modificado de Borzi *et al.*, 2017.

Figura 7. Flujograma de anotación funcional de miRNA. Modificado de Bing *et al.*, 2014.

Figura 8. Flujograma de cálculo de diluciones para determinar número de copias del miRNA-145 por uL de muestra.

Figura 9. Secuencia del pre-miRNA-145 de la especie Homo sapiens representado en el programa RNAFold y los colores indican la probabilidad de apareamiento de bases.

Figura 10. A. Ilustración de la secuencia de pre-miRNA y estructura secundaria. B. Ecuación de predicción de estructura secundaria del pre-miRNA representado en el programa RNAFold. Modificado de Xu J y cols.

Figura 11. Procedimiento esquemático de la identificación *in silico* de los transcritos diana del miRNA-145. Fuente: Elaboración propia.

Figura 12. Umbral establecido del canal FAM-miRNA-145 (color azul) y VIC-Cel-miR-39 (color rojo) como resultado de la cuantificación de PCR digital en el programa QuantStudio™ 3D Analysis Suite.

Figura 13. Comparación del ratio (miRNA-145/Cel-miR-39) del miRNA-145 en plasma de mujeres peruanas (izquierda) y resultados publicados en mujeres peruanas con cáncer de mama y controles (derecha) por Murillo *et al.* 2019.

Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias de pre-miRNA-145 en diferentes especies realizado en el programa Bioedit.

Figura 15. Imagen A. Visualización molecular de la interacción entre la proteína Argonauta (AGO2) color gris y el dúplex de mRNA-miRNA-145 de color amarillo y azul, respectivamente en el programa Pymol (código PDB: 3F73). Imagen B. Residuos de aminoácidos de la proteína argonauta (AGO2) interactuando mediante enlace de hidrogeno con el miRNA-145 en distancia de 3.6 y 5.8 Å reportado en el programa Pymol.

Figura 16. Visualización de la interacción del miRNA-145/mRNA y la proteína argonauta (AGO2). Creado en Biorender.com

Figura 17. Representación esquemática de las principales rutas de señalización de N-RAS/B-RAF en cáncer de mama. Creado en Biorender.com.

Figura 18. Gráfica de la red de expresión de transcritos diana del miRNA-145 en cáncer de mama y ovario. Modificado de <https://genemania.org/>

Figura 19. Gráfica de la red de expresión de transcritos diana del miRNA-145 en el metabolismo de la glucosa (HK2) y la glutamina (GLS). Modificado de <https://genemania.org/>

Figura 20. Representación esquemática de la ruta de señalización de la proteína CaMKII. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/> y <https://reactome.org/>

Figura 21. A. Representación esquemática de las principales rutas de señalización de EGFR en cáncer de mama creado en Biorender.com **B.** Anotación de las rutas de señalización de EGFR en cáncer de mama. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

Figura 22. Protocolo de extracción de ARN total.

Figura 23. Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente C104R2 (Chip ID: D026D8).

Figura 24. Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software para establecer los límites de los ensayos FAM (azul) y VIC (rojo) para miRNA-145 y Cel-miR-39, respectivamente.

Figura 25. Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente C0FSYE (Chip ID: C093R2).

Figura 26. Gráfico de interacción entre miRNA-145 y transcrito diana hexoquinasa 2. Modificado de <http://www.targetscan.org/>

Figura 27. Gráfico de interacción entre miRNA-145 y transcrito diana glutaminasa GLS. Modificado de <http://www.targetscan.org/>

Figura 28. Ruta de señalización del miRNA-145 y terapia dirigida en las dianas moleculares en cáncer de mama. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

Figura 29. Ruta de señalización del miRNA-145 y terapia dirigida en las dianas moleculares en cáncer epitelial ovárico. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

Figura 30 Anotación esquemática de la regulación del miRNA en las rutas metabólicas de células tumorales. Modificado de <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>

Figura 31. Anotación de las rutas metabólicas de la glutamina. Modificado de KEGG y Reactome.

Figura 32. Anotación de las rutas metabólicas de la glucólisis y gluconeogénesis. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

RESUMEN

Los miRNAs son pequeñas secuencias no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional en diversos procesos biológicos (diferenciación, proliferación celular, ciclo celular y apoptosis). Diversos estudios han reportado bajos niveles de expresión del miRNA-145 en plasma asociado a cáncer, describiéndolo como supresor tumoral. Bajo esta perspectiva, se han desarrollado nuevas técnicas en biología molecular para optimizar la sensibilidad y especificidad como la tecnología de PCR digital (dPCR). El objetivo fue evaluar los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y analizar *in silico* su impacto metabólico en cáncer. Un total de 30 muestras de plasma de mujeres residentes en Lima, entre 20 y 67 años, diagnóstico negativo para cáncer entre los años 2016 y 2018 en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) y Oncosalud, fueron analizadas utilizando dos ensayos con fluorescentes VIC y FAM para la cuantificación de los valores del control exógeno Cel-miR-39 y miRNA-145 respectivamente, en una plataforma de amplificación basada en chips (sistema PCR digital 3D QuantStudio). Los niveles de miRNA-145 circulante en plasma en este grupo de mujeres peruanas fueron mayores que los valores reportados en otros estudios en cáncer de mama. En el análisis *in silico* se identificaron 35 transcritos diana los cuales pertenecen a la ruta de señalización y metabólicas asociadas a la variación de los niveles de miRNA-145 en cáncer de mama y ovario, con gran impacto en el metabolismo de la glucosa y glutamina, específicamente sobre las enzimas hexoquinasa 2 (*HK2*) y glutaminasa (*GLS*). En general, los niveles de miRNA-145 circulante en plasma en esta muestra de mujeres peruanas fueron mayores a los reportados para cáncer de mama y el análisis *in silico* indicó un impacto en las principales rutas metabólicas asociadas a cáncer de mama y ovario. De esta manera se aporta al conocimiento de los factores epigenéticos en cáncer y en el contexto de la medicina personalizada en el Perú.

Palabras clave: miRNAs, miRNA-145, plasma, *in silico*, PCR digital

ABSTRACT

MiRNAs are small non-coding sequences that regulate gene expression at the post-transcriptional level in various biological processes (differentiation, cell proliferation, cell cycle and apoptosis). Several studies have reported low levels of expression of miRNA-145 in plasma associated with cancer, describing it as a tumor suppressor. In this perspective, new technologies in molecular biology are used to optimize sensitivity and specificity, such as digital PCR technology (dPCR). The aim was to evaluate the levels of circulating miRNA-145 in the plasma of Peruvian women and to analyze *in silico* its metabolic impact on cancer. A total of 30 plasma samples from women living in Lima, between 20 and 67 years old, diagnosed negative for cancer between 2016 and 2018 at the National Institute of Neoplastic Diseases (INEN) and Oncosalud, were analyzed using two assays with fluorescent VIC and FAM for the quantification of the Cel-miR-39 and miRNA-145 exogenous control values respectively, on a chip-based amplification platform (QuantStudio 3D digital PCR system). The levels of miRNA-145 circulating in plasma in this group of Peruvian women were higher than the values reported in other studies in breast cancer. In the *in silico* analysis, 35 target transcripts were identified, which belong to the signaling and metabolic pathways associated with the variation of miRNA-145 levels in breast and ovarian cancer, with a great impact on glucose and glutamine metabolism, specifically on the enzymes hexokinase 2 (*HK2*) and glutaminase (*GLS*). In general, the levels of miRNA-145 circulating in plasma in this sample of Peruvian women are higher than those reported for breast cancer and *in silico* analysis indicated an impact on the main metabolic pathways associated with breast and ovarian cancer. In this way, it contributes to the knowledge of epigenetic factors in cancer and in the context of personalized medicine in Peru.

Key words: miRNAs, miRNA-145, plasma, *in silico*, digital PCR.

I. INTRODUCCIÓN

La Epigenética estudia los cambios en la expresión génica heredables en el genoma sin generar algún cambio en la secuencia del ADN que comprende diversas áreas, principalmente en el estudio de metilación del ADN, modificación de histonas y niveles de microRNAs (miRNAs). En la actualidad, se han realizado diferentes estudios sobre la alteración de estos factores epigenéticos, por ejemplo los niveles de miRNAs que pueden promover la tumorigénesis y adicionalmente, susceptibles a factores extrínsecos ⁽¹⁾.

Los miRNAs son una clase de RNAs no codificantes, es decir, aquellos que no son traducidos en proteínas, cumpliendo un rol regulador en la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los miRNAs son secuencias cortas de ácido ribonucleico que bloquean la transcripción por competencia con las regiones RNA-enzima de la maquinaria celular ⁽²⁾ y son indicados como marcadores de ciertos tipos de cáncer. Se han descrito más de 1000 miRNAs humanos y cada uno puede ser regulado por diferentes vías y a su vez, tener un efecto sobre un gran número de blancos y por ello, actualmente se diseñan diversas bases de datos y sistemas de predicción ⁽³⁾.

El cáncer es caracterizado por un estado de desregulación celular, estas modificaciones pueden ser controladas de forma genética o epigenética a nivel post-transcripcionales y traduccionales que podrían regular los procesos a través del nivel de expresión de genes relevantes para el control del ciclo celular. De esta manera, las modificaciones epigenéticas son descritas principalmente por procesos de metilación e inhibición de la transcripción por miRNAs ⁽⁴⁾.

En el Perú, el cáncer de próstata y cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en hombres y mujeres, respectivamente. El cáncer de mama es una enfermedad altamente prevalente en el mundo y es la segunda causa de muerte entre las mujeres peruanas ⁽⁶⁾, según Buleje *et al.*, 2017, existen mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en familias peruanas con cáncer de mama hereditario y cáncer de ovario ⁽⁵⁾. Sin embargo, existen otros factores epigenéticos como los miRNAs que contribuyeron en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y pronóstico temprano en cáncer ⁽¹⁵⁾.

En ese sentido, debido principalmente a la falta de atención y detección temprana del cáncer en el Perú ⁽⁷⁾, el Ministerio de Salud solicitó un informe de misión integrada del Programa de Acción para la Terapia del Cáncer (imPACT) e implementación del Plan Esperanza para fortalecer el control del cáncer, que incluye la planificación del registro de cáncer, aumento de la prevención y diagnóstico temprano ⁽¹⁰⁰⁾.

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías para estudiar y cuantificar los niveles de miRNAs en plasma, como la PCR digital ⁽⁸⁾, se han logrado avances en la comprensión y ampliar el potencial de los biomarcadores tipo miRNAs en el cáncer, en general y en particular, el cáncer de mama. Se han evaluado diversos miRNAs (miRNA-21, miRNA-125, miRNA-145, miRNA-143, miRNA-155) en cáncer rectal, cáncer colorectal, cáncer pulmonar y cáncer de mama, siendo el miRNA-145 uno de los biomarcadores con mayor potencial ⁽⁹⁾.

Los estudios de los miRNAs circulante en plasma han sido utilizados como metodología de diagnóstico molecular no invasivo denominada biopsia líquida, es decir, para la detección y cuantificación con mayor sensibilidad y especificidad que permite un pronóstico y diagnóstico en cáncer sin causar riesgo en el paciente como ocurre con una biopsia sólida ^{(12), (77)}. En este contexto, es importante evaluar los niveles del miRNA-145 circulante en plasma en otras poblaciones e incluir mujeres sin diagnóstico de cáncer para confirmar su potencial uso como biomarcador ⁽¹⁴⁾.

Existen numerosas fuentes de herramientas bioinformáticas que permiten recopilar, almacenar, clasificar y analizar información biológica para la predicción de miRNA asociado a diferentes tipos de condiciones y enfermedades. Estas herramientas permiten descifrar los datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y epigenómicos lo cual permite inferir el impacto al nivel bioquímico, metabólico y por consiguiente la inferencia terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos ⁽¹⁰⁾.

Recientemente, investigaciones realizadas en el país aplicando la nueva tecnología PCR digital para evaluar los niveles de miRNA-10b, miRNA-21, miRNA-145 y miRNA-202 circulante en plasma en 30 pacientes mujeres peruanas con cáncer de mama y 30 controles, cuyo resultado indica una subexpresión estadísticamente significativa del miRNA-145 presente en mujeres peruanas con cáncer de mama con respecto a controles ⁽¹²⁾ lo cual ha generado la necesidad de evaluar un mayor número de muestras para establecer la utilidad de los niveles de miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y analizar *in silico* las rutas metabólicas para ampliar la comprensión de su mecanismo y aplicación como potencial biomarcador de diagnóstico temprano de cáncer ^{(29), (44)}.

El término “*in silico*” es utilizado en las experimentaciones realizadas en una computadora publicado por Danchin en el año 2002 sobre la aplicación de la Informática y uso de herramientas bioinformáticas como una ayuda real para analizar las funciones biológicas y la potencial aproximación computacional llamándolo “*in silico*”, que debe ser complementaria con las experimentaciones *in vivo* e *in vitro* ⁽¹¹⁾.

Actualmente el uso de herramientas bioinformáticas ^{(3), (85), (121)} permitieron analizar los cambios de las principales rutas metabólicas asociadas a los niveles de los miRNAs en cáncer e integrar los datos de expresión génica de diversos tejidos tumorales reportados en los repositorios como miRTarbase ⁽⁹⁵⁾, TargetScan ⁽⁸⁶⁾, entre otros para la identificación de transcritos diana y diseños de representaciones esquemáticas de las rutas de señalización y metabólicas en cáncer como KEGG ⁽⁸⁵⁾ y Reactome utilizado en la industria farmacéutica y la academia ⁽⁴⁸⁾.

En esta perspectiva, considerando que existe una alta prevalencia de condiciones y/o enfermedades crónicas en el Perú, el miRNA-145 tiene potencial uso como biomarcador y es necesario desarrollar la epigenética en el contexto de la medicina personalizada, se propone evaluar los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y realizar un análisis metabólico *in silico* en cáncer.

En este contexto, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas normoexpresado y cuál es el impacto del miRNA-145 a nivel metabólico *in silico* en cáncer?

En ese sentido, en el presente trabajo de investigación se planteó la siguiente hipótesis: los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas están normoexpresado y tienen impacto metabólico *in silico* en cáncer.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y analizar *in silico* su impacto metabólico en cáncer.

Objetivos específicos:

- Determinar los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas mayores de edad, sin diagnóstico de cáncer y residentes en Lima.
- Identificar *in silico* los transcritos diana en las rutas de señalización y metabólicas en cáncer asociado a la variación de los niveles del miRNA-145.
- Analizar *in silico* la variación de los niveles del miRNA-145 y su impacto metabólico en cáncer.

III. GENERALIDADES

3.1. ANTECEDENTES

Existe una relación entre la Epigenética y el metabolismo de la glucosa y glutamina mediante las modificaciones post-traduccionales de las enzimas reguladas por la modificación de histonas, metilación del ADN, niveles de miRNAs y su capacidad de respuesta al medio ambiente en el contexto de la salud y la enfermedad ⁽¹³⁾.

Los niveles del miRNA-145 está subexpresado en los tejidos tumorales y sobreexpresado cumple un rol de supresor tumoral y modifica a nivel post-transcripcional, la expresión del proto-oncogen c-Myc y la glicoproteína de transmembrana mucina 1 (*MUC1*) asociado a cáncer de pulmón y mama, respectivamente. Según Sachdeva *et al.*, 2010, el miRNA-145 es un posible biomarcador y puede servir como un nuevo objetivo de terapia dirigida en cáncer ⁽¹⁴⁾.

Se identificaron miRNAs circulantes en fluidos biológicos como plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, leche materna y orina. Los miRNAs son estables en los fluidos biológicos y según Janas *et al.*, 2015 ⁽⁶⁴⁾, los miRNAs están acompañado de microvesículas denominadas exosomas, sin embargo su estabilidad está sujeto a otros factores de degradación como la presencia RNAsas y condiciones ambientales ⁽¹⁵⁾.

Según Ostefeld *et al.*, 2017, el miRNA-145 cumplió un rol de supresor tumoral en el proceso de apoptosis inducida por las vías de las caspasas dependiente e independiente en células de cáncer de colon modificando a nivel post-transcripcional, la expresión de las proteína Clathrin Interactor 1 (*CLINT1*), la proteína subunidad beta del factor de unión (*CBFB*) y la proteína subunidad alfa de la isoforma de la proteína fosfatasa 3 catalítica (*PPP3CA*) ⁽¹⁶⁾.

El 50% de los pacientes con cáncer colorectal presentaron mutaciones puntuales (V600E) del oncogén viral del sarcoma murino v-raf (*BRAF*). Esta mutación conduce una activación incontrolada en la ruta de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (*MAPK*) en el proceso de tumorigénesis. Sin embargo, no

hay información suficiente sobre los oncogenes (*KRAS*, *NRAS* y *BRAF*) si fueron regulados por factores epigenéticos ⁽¹⁷⁾.

Según Sachdeva *et al.*, 2015, el miRNA-145 causa la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 y una disminución en la fase S, a través del silenciamiento de la expresión del proto-oncogen c-Myc en las células pequeñas del cáncer del pulmón (*NSCLC*) ⁽¹⁸⁾. Además, la regulación del miRNA-145 como potencial supresor tumoral sobre c-Myc está asociado con el proceso de proliferación celular, apoptosis y metástasis en cáncer de ovario, carcinoma de células orales escamosas y células del melanoma ^{(19), (20), (21)}.

El metabolismo desregulado es una característica común de las células tumorales y es considerado un fenómeno de la expresión desregulada de diversos genes incluidos los que codifican miRNAs participantes en varias rutas metabólicas, a través de su actividad reguladora a nivel post-transcripcional en cáncer. Las células tumorales para cumplir con los altos requisitos energéticos, por ejemplo las altas tasas de proliferación celular, requiere un metabolismo que permita la capacidad de crecer a bajas concentraciones de oxígeno y utilizar fuentes de carbono alternativos ⁽²²⁾.

El miRNA-145 cumple un rol de supresor tumoral en la regulación de la expresión de la N-cadherina (*CDH2*), una proteína que participa en las uniones intercelulares de tipo adherente, está asociado en el proceso de invasión y metástasis, inhibiendo la proliferación celular en el cáncer gástrico ⁽²³⁾.

El miRNA-145 regula la expresión de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (*CaMKII*), por lo tanto regula la sobrecarga de Ca^{+2} inducida por especies reactivas de oxígeno y el rol de las fosforilaciones producidas por una quinasa activada por aumento del Ca^{+2} intracelular. Según Harada *et al.*, 2014, el aumento de expresión de CaMKII está determinado por factores epigenéticos que puede producir isquemia miocárdica o apoptosis ^{(24), (25)}.

Además, el miRNA-145 modifica la regulación en la expresión de la proteína catenina gamma 1 ocasionando una degradación de las proteínas de la translocación nuclear de b-catenina y quinasa 4 activada por la proteína p21 (*PAK4*) y una regulación negativa o silenciamiento de los transcritos diana del proto-oncogen c-Myc, que contribuye a la atenuación de la migración celular y las actividades de invasión en cáncer de colon ⁽²⁸⁾.

Según Li *et al.*, 2019, el miRNA-145 inhibió el metabolismo de la glutamina, a través de la regulación de las vías del proto-oncogen c-Myc y enzima glutaminasa (*GLS*) que puede mejorar la estrategia actual de diagnóstico y tratamiento en líneas celulares de cáncer de ovario. Sin embargo, el rol del mecanismo del miRNA-145 en el metabolismo de la glutamina en cáncer de ovario, aún no está definido ⁽²⁹⁾.

El receptor del factor de crecimiento epidermal (*EGFR*) es uno de los objetivo del miRNA-145 que regula la invasión y metástasis, a través de su actividad de supresor tumoral en cáncer de mama. Los datos demostraron un creciente interés en comprender las rutas metabólicas de las células cancerosas y diseñar nuevas opciones terapéuticas que modifique a sus características metabólicas. Por lo tanto, una mejor comprensión del mecanismo y las rutas de señalización, a través del metabolismo de la glucosa de las células del cáncer de mama beneficiaría en el desarrollo de nuevas terapias avanzadas ⁽³⁰⁾.

Se identificó la regulación del transcrito diana N-RAS como objetivo del miRNA-145, que cumple un efecto anti-angiogénico en el cáncer de mama. Según Sachdeva *et al.*, 2010, el miRNA-145 inhibió la expresión del homólogo del oncogén viral RAS de neuroblastoma (*N-RAS*) y del receptor del sustrato de insulina (*IRS-1*) para suprimir a la proteína quinasa B (*PKB*) y la activación de la proteína quinasa de mitógeno activado (*ERK1*) y la expresión de la proteína señalizador, factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) en cáncer colorectal ⁽³¹⁾.

Los niveles de miRNA-145 fueron diferencialmente expresados en tejidos de cáncer de mama y tejidos mamarios normales, y su bajo nivel de expresión está asociada con características patológicas invasivas del cáncer de mama ⁽³²⁾, así como en el carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo, en comparación con los tejidos normales

⁽³³⁾. Según Bockmeyer *et al.*, 2011, el miRNA-145 fue identificado como uno de los ocho tipos específicos de miRNAs en cáncer de mama ⁽³⁴⁾.

Según Ye *et al.*, 2019, demostró que los niveles sobreexpresado del miRNA-145 está asociados a la inhibición de la proliferación, invasión y metástasis de las células tumorales y mejora de la sensibilidad de medicamentos quimioterapéuticos como cisplatino y 5-fluorouracilo en adenocarcinoma esofágico ⁽³⁵⁾. Sin embargo, los niveles de miRNA-145 fueron subexpresado y conservados en diferentes estadios avanzados y metástasis de ganglios linfáticos en carcinoma de células pequeñas del cuello uterino ⁽³⁶⁾.

Además, los niveles de expresión del miRNA-145 fueron monitorizados en la respuesta de agentes antitumorales en las células cancerosas. Por ejemplo, la expresión del miRNA-145 aumentó la respuesta de la terapia adyuvante con 5-Fluorouracilo (5-FU) ⁽³⁷⁾. El miRNA-145 puede ser utilizado como biomarcador de diagnóstico y pronóstico de respuesta en el desarrollo del cáncer colorrectal tratado con un neoadyuvante ⁽³⁸⁾, ⁽³⁹⁾.

Según Xu *et al.*, 2019, demostró que el miRNA-145 inhibe la invasión celular en cáncer ovárico, a través de la regulación del activador de la proteína p21 (*RASA1*), la enzima ADN metiltransferasa 3A (*DNMT3A*), la enzima glicolítica hexoquinasa 2 (*HK2*), adicionalmente se determinó que la hexoquinasa 2 (*HK2*) cambió el efecto Warburg, y está regulado por mecanismos epigenéticos, por ejemplo la metilación del ADN controlado por DNMT3A y el cambio de expresión de HK2 por miRNA-145 ⁽⁴⁰⁾.

La tecnología de secuenciación fue utilizada para medir los niveles de miRNAs en diversas muestras biológicas. Estos métodos permiten una cuantificación no invasiva de miRNAs. Sin embargo, la reproducibilidad entre los diferentes métodos para cada fluido biológico no está establecido. Según Stass *et al.*, 2018, se requiere mayores estudios para identificar protocolos adecuadamente estandarizados y normalizados ⁽⁴¹⁾.

Un método para el análisis de miRNAs en suero o plasma es la cuantificación por PCR cuantitativa de transcripción inversa o RT-qPCR. Este método ha sido ampliamente utilizado para la detección de miRNAs circulantes en plasma de poca cantidad. Además, el análisis de microarreglos también se usa comúnmente en la detección de miRNAs, pero generalmente requiere más material de partida que RT-qPCR, y puede complicarse por la necesidad de desarrollar sondas y condiciones de hibridación que puedan detectar una variedad de miRNAs simultáneamente ⁽⁴²⁾.

La PCR digital (dPCR) es un enfoque innovador para la detección y cuantificación de ácido nucleico en diferentes fluidos biológicos que utiliza una plataforma basada en chip en un sistema QuantStudio 3D que ofrece un método alternativo a la PCR cuantitativa convencional en tiempo real para la cuantificación absoluta. La dPCR es una técnica altamente precisa y sensible que no requiere una referencia estándar, por lo que es un método adecuado para la detección de microRNAs. Sin embargo, el problema de la falta de consenso sobre un método óptimo para la normalización de miRNAs afecta en establecer los límites de los valores reportados en la cuantificación de miRNAs ⁽⁴³⁾.

A partir del descubrimiento del proceso de RNA de interferencia y miRNAs, la industria farmacéutica desarrolló tecnologías basadas en el principio de los oligonucleótidos antisentido, es decir, un diseño artificial de secuencias de bases complementarias de un fragmento del ARN mensajero que permite bloquear la región no traducida por un proceso denominado "*injecting miRNAs*" similar para la administración de la terapia basada en RNA de interferencia (RNAi) como nuevas terapias avanzadas en el área de investigación clínica para enfermedades infecciosas, crónicas y raras ^{(44), (45)}.

Existe un estudio que demostró el potencial uso terapéutico de miRNA-145 contra el cáncer de mama. Los miRNA-145 fueron transfectados en células tumorales y suprimió el crecimiento celular y la motilidad en los sistemas *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, un tratamiento de miRNA-145 combinado con 5-fluorouracilo (5-FU) demostró que inhibe significativamente el crecimiento tumoral entre el 40% hasta el 60% con represión de la oncoproteína c-Myc en comparación con los controles ⁽⁴⁶⁾.

Existe una relación del miRNA-145 y 5-Fluoruracilo que inhibió el crecimiento de la línea celular de cáncer gástrico a nivel *in vitro* y aumentó la sensibilidad del 5-Fluoruracilo, en consecuencia, el miRNA-145 puede mejorar la sensibilidad de terapias dirigidas como gefitinib y vemurafenib en cáncer ⁽⁴⁷⁾.

Existe una base de datos de secuencias de nucleótidos de EMBL administrado por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) en una colaboración internacional con DDBJ (Japón) y GenBank (EE.UU.) que incorpora, organiza y distribuye secuencias de nucleótidos de todas las fuentes públicas disponibles para la búsqueda de secuencias, alineamientos múltiples de secuencias de diferentes especies, predicción estructural y anotación esquemática de una posible ruta de señalización integrando programas especializados como NCBI y GO ⁽⁴⁹⁾, ⁽⁵⁰⁾.

Actualmente varios grupos especializados en Bioinformática realizaron experimentos *in silico* y diseñaron programas como KEGG y Reactome para ayudar a comprender las rutas de señalización en cáncer ⁽⁸⁰⁾ y programas ilustradores como BioRender para optimizar la producción de diagramas y gráficos ⁽⁴⁸⁾. Los nuevos enfoques de sistemas han proporcionado un amplio conocimiento de diversos procesos bioquímicos que incluyen rutas de señalización y rutas metabólicas para identificar posibles objetivos terapéuticos ⁽⁵¹⁾.

Según la información descrita por Wen *et al.*, 2019, el miRNA-145 cumple un rol de supresor tumoral en el proceso de tumorigénesis ⁽¹⁴⁾, ⁽¹⁸⁾. Sin embargo, la regulación del miRNA-145 en las principales rutas de señalización y rutas metabólicas aún no está bien definida. Por ello, existen varias bases de datos especializadas para la anotación, identificación de transcritos diana de miRNAs y representaciones esquemáticas de rutas metabólicas denominado miRBase ⁽⁸⁰⁾, miRTarBase ⁽⁹⁵⁾, KEGG ⁽⁸⁵⁾, respectivamente, que utilizaron datos experimentales de secuenciación de última generación (NGS), RT- q PCR y microarreglos ⁽⁵²⁾.

3.2. MARCO TEÓRICO

3.2.1. MicroRNAs (miRNAs)

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNAs pequeños que no codifican para proteínas, y presentan aproximadamente entre 21 a 25 nucleótidos de longitud. Estas moléculas cumplen un rol importante en la regulación de procesos biológicos como la diferenciación, proliferación celular, desarrollo celular y apoptosis ⁽⁵³⁾. La presencia en suero y/o plasma permite la posibilidad de ser empleado como posible biomarcador en la etapa de prevención, diagnóstico, seguimiento y tratamiento como terapia génica de enfermedades infecciosas y/o crónicas como el cáncer ⁽⁵⁴⁾.

En 1993, se descubrió el primer miRNA durante un estudio sobre el gen Lin-4 de *Caenorhabditis elegans* por Víctor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum. Ellos descubrieron a un posible gen denominado lin-4, que actúa en la regulación del desarrollo de *Caenorhabditis elegans* y no codificaba para proteína. Sin embargo, lin-4 producía dos RNAs de secuencia corta, uno de 22 nt y otro de 61 nt de longitud. En los laboratorios de Ambros y Ruvkum vieron que estos RNAs mostraban zonas antisentido complementarias a múltiples sitios de la zona 3-UTR del gen lin-14. Esto evidenció una disminución de la cantidad de proteína ⁽⁵⁵⁾. Por lo tanto, existe una clase de RNAs no codantes reguladores llamados microRNAs o “miRNAs”.

En el año 2000, se identificó un segundo miRNA denominado Let-7, que presenta la misma función en el proceso de desarrollo en la misma especie *Caenorhabditis elegans*. Posteriormente, Lin-4 y Let-7 fueron identificados en otras especies como *Drosophila melanogaster* y en *Homo sapiens*, respectivamente. Sin embargo, estos miRNAs no presentaron un rol en la regulación del proceso de desarrollo como en la especie *C. elegans*, por lo tanto, se descubrieron que la mayoría de los miRNAs están involucrados en otras vías regulatorias ⁽⁵⁶⁾.

3.2.2. Biogénesis de los miRNAs

En el núcleo, los genes de miRNAs son transcritos como miRNA primario (pri-miRNA) mediante la enzima RNA polimerasa II (Pol II). Los pri-miRNAs serán reconocido por un cofactor denominado proteína de unión a RNA de cadena doble y región crítica de DiGeorge (DGCR8) la cual posee un dominio específico de unión que reconoce al pri-miRNA y expone a una enzima endonucleasa RNAasa III Drosha formando un complejo heterodimérica denominado microprocesador, la cual corta dejando 2 nucleótidos que sobresalen del extremo 3 de la horquilla para formar un pre-miRNA. El pre-miRNA es exportado hacia el citosol, a través de la proteína exportina 5 y el cofactor Ran-GT. En el citoplasma, el pre-miRNA es reconocido y modificado estructuralmente por la enzima RNAasa III Dicer generando un dúplex de miRNAs. Luego el dúplex de miRNAs se une a la proteína Argonata y forman un pre complejo RISC o denominado “*RNA-induced silencing complex*”. Finalmente, la hebra madura es separada de su hebra complementaria, donde en la mayoría de casos es degradada ⁽⁵⁷⁾. Se conoce que varios miRNAs poseen un mecanismo diferente de biogénesis llamados biogénesis no canónica (Figura 1), debido principalmente a las diferencias estructurales de los precursores lo que les permite ser procesados por otros complejos como el espliceosoma ⁽⁵⁸⁾; sin embargo, actualmente se conoce poco sobre la regulación transcripcional de los pri-miRNAs, excepto que algunos pri-miRNAs se encuentran en la región intrónica de los genes huésped, incluyendo genes codificantes de proteínas, por lo tanto, podrían estar regulados por factores de transcripción en la región promotora del gen huésped. Adicionalmente, algunos miRNAs están agrupados en transcripciones policistrónicas, indicando que estos miRNAs se encuentran coordinados y regulados durante el desarrollo ^{(59), (60), (61)}.

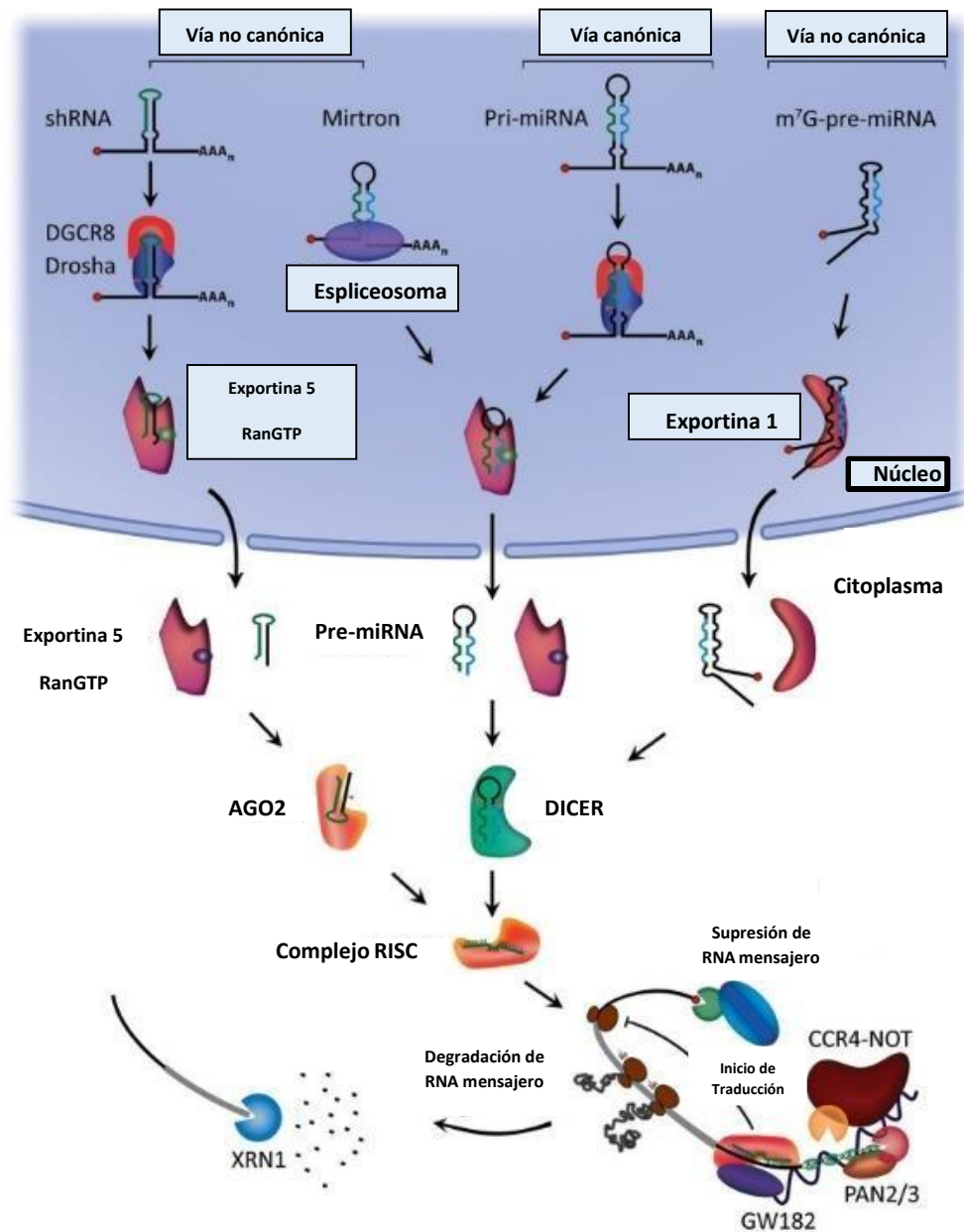


Figura 1. Proceso de biogénesis vía canónica y no canónica de miRNAs.

Modificado de O'Brien *et al.*, 2018 ⁽⁶¹⁾

Durante la aplicación de múltiples pasos de filtración y centrifugación para separar las células sanguíneas del plasma y recuperar el ARN de ambas secciones, demostraron que los miRNAs en suero y/o plasma no estaban asociados con células o fragmentos de células más grandes, sino que existían en una forma estable y protegida ⁽⁶²⁾. Estudios recientes han revelado que los miRNAs pueden protegerse en microvesículas (hasta 1 μ m) o en pequeñas vesículas de membrana de origen endocítico llamadas exosomas ⁽⁶³⁾. Descubrieron que los miRNAs se

incorporan a las partículas exosómicas, luego hay una etapa de liberación de exosomas. Además, los miRNA empaquetados en exosomas pueden ser entregados a las células receptoras donde ejercen el silenciamiento génico a través del mismo mecanismo que los miRNAs celulares (Figura 2) ⁽⁶⁴⁾. Según Pigati *et al.*, 2010, demostró que la liberación de miRNAs en el plasma sanguíneo y fluidos biológicos es selectiva y que esta selectividad puede correlacionarse con malignidad ⁽⁶⁵⁾.

Según Turchinovich *et al.*, 2011, se reportó que la mayoría de los miRNAs en plasma y medios de cultivo celular pasaron completamente a través de filtros de 0.22 μm y después de la centrifugación a 11 000 \times g, permanecieron en el sobrenadante lo que indica un origen no vesicular de miRNAs extracelulares. Además, se demostró que los miRNAs extracelulares estaban predominantemente libres de exosomas o microvesículas. No obstante, existe una asociación entre miRNAs y la proteína argonauta (Ago2), una proteína relacionada con el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) ⁽⁶⁶⁾. Otros estudios demostraron que los miRNAs circulantes en plasma fueron en su mayoría subproductos de células muertas que permanecen estables y forman un complejo con Ago2 en el entorno extracelular ⁽⁶⁷⁾.

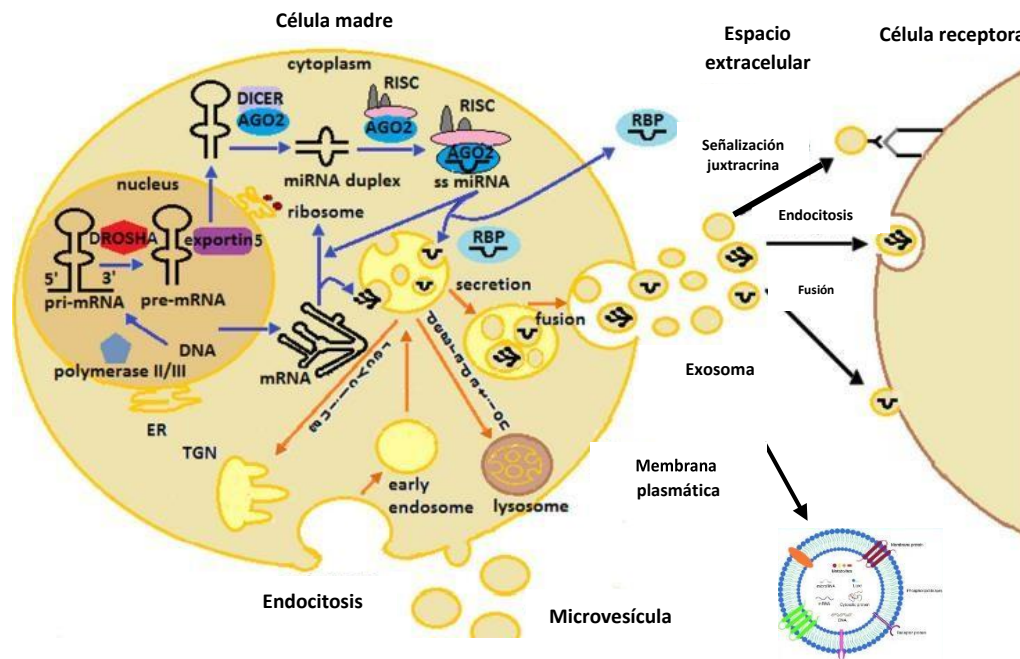


Figura 2. Proceso de biogénesis de exosomas y miRNAs en células madre.

Modificado de Janas *et al.*, 2015 ⁽⁶⁴⁾.

Se estima que los miRNAs regulan aproximadamente el 60% de todos los genes que codifican proteínas. El grado de complementariedad entre los miRNA y sus objetivos determina los resultados reguladores ⁽⁶⁸⁾. Los miRNAs se unen a secuencias de mRNA que codifican proteínas con complementariedad que podría inducir la vía de interferencia mediada por ARN (ARNi), y en consecuencia provocó una escisión de mRNA por AGO2 en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) ⁽⁶⁹⁾. Sin embargo, el emparejamiento imperfecto de bases entre miRNA y el transcrito diana existe con mucha más frecuencia en mamíferos. Asimismo, los miRNAs actúan uniéndose a sitios dentro de las regiones no traducidas 3' (3'UTR) del transcrito diana ⁽⁷⁰⁾.

Actualmente existen nuevas estrategias terapéuticas dependiente de los niveles de miRNAs, por ejemplo, la terapia de inhibición de miRNA mediante un diseño de un inhibidor anti-miRNA que es un oligonucleótido monocatenario con una secuencia complementaria del miRNA maduro. Otro ejemplo, la terapia de reemplazo de miRNAs que contiene una secuencia madura endógena que se introducen en las células para proporcionar una fuente exógena de miRNAs adicionales (Figura 3) ⁽²⁶⁾.

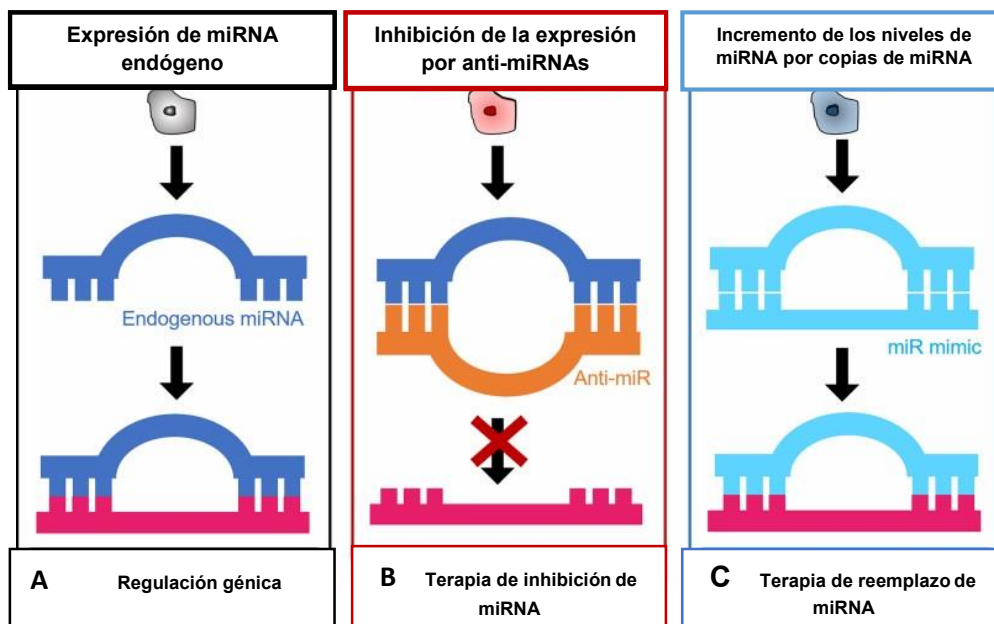


Figura 3. (A) Expresión de miRNA endógeno en tejido normal. (B) Terapia de inhibición de miRNA con anti-miRNA. (C) Terapia de reemplazo de miRNA

Modificado de Wei *et al.*, 2019 ⁽²⁶⁾.

3.2.3. miRNA-145

El gen del miRNA-145 está ubicado en la región cromosómica 5q32-33 y tiene 4.08 kb de longitud (Figura 4). La secuencia está altamente conservada en relación a otros miRNAs. Dependiendo de la dirección de transcripción, el locus miRNA-145 puede generar dos procesos de transcripciones, miRNA-145-3p denominado cadena pasajera y miRNA-145-5p denominado hebra guía. El miRNA-145-3p transcrito es procesado para producir miRNAs de 22 nucleótidos y el miRNA-145-5p genera 23 fragmentos de nucleótidos. El locus del cromosoma donde se expresa el miRNA-145 está cerca de la región cromosómica 5q31 relacionado con la aparición y desarrollo de tumores, además el miRNA-145 presenta bajos niveles de expresión en tejidos tumorales ^{(71), (72)}.

El miRNA-145 fue secuenciado por primera vez en un tejido cardiaco específico de ratón y posteriormente fue descubierto en humanos con cáncer colorrectal ⁽⁷³⁾. La secuencia y tejido específico de la transcripción del miRNA-145 son altamente conservados, y regula la expresión de oncogenes a nivel post- transcripcional, cumpliendo un rol de supresor tumoral ⁽⁷¹⁾. En tejidos mesodérmicos, como el útero, ovario, testículo y próstata y corazón, los niveles de expresión del miRNA-145 fueron sobreexpresado con respecto a los tejidos tumorales, donde los niveles del miRNA-145 fueron mínimamente expresado o subexpresado, incluyendo colon, mama, próstata, pulmón, hígado, vejiga, ovario, adenoma pituitaria y linfoma de células B ^{(71), (33)} y en muestras de plasma de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama ⁽¹²⁾. Existe evidencia que el miRNA-145 inhibe el proceso de tumorigénesis y regula el crecimiento tumoral, invasión, metástasis y angiogénesis e interactúa con la región 3-UTR del transcrito diana del RNA mensajero ⁽⁷⁴⁾.

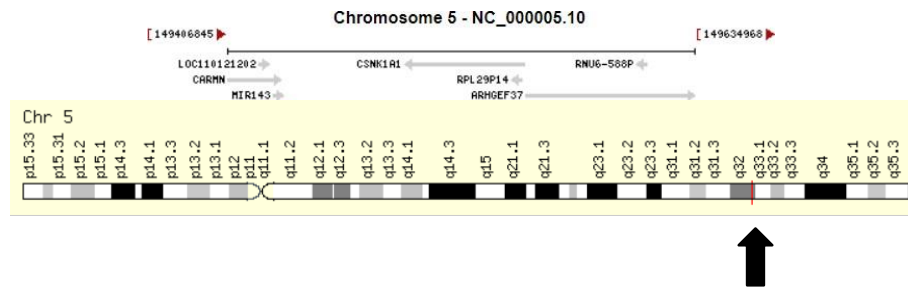


Figura 4. Esquema de localización del gen miRNA-145

Ubicación del gen miRNA-145, cromosoma 5 (específicamente en la región cromosómica 5q32)

Fuente: Elaboración propia, modificado de NCBI

3.2.4. Plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo o plasma es una solución acuosa de color amarillo que comprende el 55 % del fluido sanguíneo. No contiene a las células sanguíneas, por ejemplo a los eritrocitos, leucocitos y trombocitos. El plasma contiene un 92 % de agua y 7% de proteínas plasmáticas (globulinas, albúminas y fibrinógeno), que mantiene la presión coloidal osmótica sobre 25 mmHg, un 0.9 % de sales inorgánicas (calcio, sodio, potasio y bicarbonato), que ayuda a mantener los niveles pH y el resto compuestos orgánicos diversos como los aminoácidos, vitaminas, hormonas, lípidos y factores de coagulación (Figura 5).

El plasma se obtiene en el proceso de centrifugación, es decir, girar la sangre completa con un anticoagulante en una centrifuga. El plasma es más claro y forma una capa amarillenta en la superficie, mientras que las células sanguíneas por tener mayor densidad se encuentran en la capa inferior. El plasma se mantiene congelado a - 80 °C para conservar la funcionalidad de los diversos factores de coagulación e inmunoglobulinas, luego se descongela antes de utilizar y tiene una vida útil de varios años dependiendo de las condiciones de almacenamiento. El plasma, como la sangre completa, se prueba inicialmente para garantizar la seguridad de los receptores. Según las regulaciones de la FDA, el plasma recolectado se somete a pruebas bioquímicas y moleculares para identificar enfermedades transmisibles, principalmente Sífilis, VIH y hepatitis A, B y C (75).

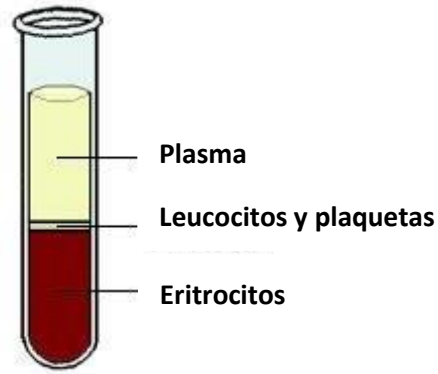


Figura 5. Composición de la sangre
Modificado de Dean *et al.*, 2005 ⁽⁷⁵⁾

Actualmente la expresión de algunos miRNAs miRNA-16, miRNA-21, miRNA-145, miRNA-132 y miRNA-155 se correlaciona con el grado y estado del receptor de estrógeno. Por ello la importancia del estudio en plasma podría servir como una herramienta de tamizaje aceptable para la población en general y permitirá determinar biomarcadores para el diagnóstico temprano mujeres con cáncer de mama sin realizar algún procedimiento invasivo ⁽¹⁵⁾.

3.2.5. PCR digital

La PCR digital (dPCR) es una técnica derivada de la reacción de cadena de polimerasa basada en la dilución y división de los ácidos nucleicos en varios compartimentos. La división puede lograrse creando una emulsión de agua en aceite (dPCR basada en emulsión) o usando chip con microcanales (dPCR basada en un sistema de microfluídica). Esta última utiliza microcanales de 20 000 pocillos en la etapa de dispersión y luego la muestra es amplificada en un termociclador. La tecnología aporta una alta precisión y sensibilidad, logrando diversas aplicaciones en muestras con bajas concentraciones, incluyendo la detección y cuantificación de bajo nivel de patógenos, secuencias genéticas raras, variaciones en el número de copias, niveles de expresión génica de organismos unicelulares y cuantificación de niveles de expresión de miRNAs circulante en plasma humano. La fluorescencia emitida se mide en el punto final de la amplificación ^{(43), (76)}.

La dPCR utiliza un canal referencial (ROX) que permite verificar el número de micropocillos con muestra y dos canales (FAM y VIC) para medir la fluorescencia emitida por cada amplificación de la muestra expresada en copias/uL. En la técnica PCR cuantitativa (qPCR), por el contrario, se emplean canales idénticos (FAM y VIC) para calcular el valor de unidades de fluorescencia emitida y comparar con una curva estándar, o sea se debe precisar previamente donde se mide una muestra conocida. Por esta razón se dice que la cuantificación por qPCR es específica pero relativa a la curva estándar, a diferencia de la dPCR que es una medición absoluta de los ácidos nucleicos presentes en la muestra ⁽⁷⁷⁾.

La aplicación del sistema de QuantStudio 3D™ permite obtener valores de la fluorescencia del miRNA-145 y Cel-miR-39 en copias/uL. El valor inicial fue obtenido de la cantidad total de pocillos en el canal con fluorescente FAM (azul) detectado a una longitud de onda de 520 nm, VIC (rojo) detectado a una longitud de onda de 550 nm o si ambas muestras son detectadas en un mismo pocillo (verde), y los pocillos vacíos por el canal referencial ROX (amarillo) detectado a una longitud de onda de 610 nm ⁽⁷⁸⁾.

El valor obtenido es dividido por el volumen de la muestra, calibrado en 15 uL (indicaciones del fabricante). La cantidad de ADN se estima con la ecuación:

$$\text{N}^\circ \text{ de copias/ Reacción} \times 20000 / 15 = \text{N}^\circ \text{ copias / Reacción} \times 1333.33 = \text{N}^\circ \text{ copias/ Volumen}$$

El programa reporta el número de copias/reacción, también el valor final en número de copias/uL en la plataforma QuantStudio 3D™ ingresando a una cuenta personal desde internet ⁽⁷⁹⁾.

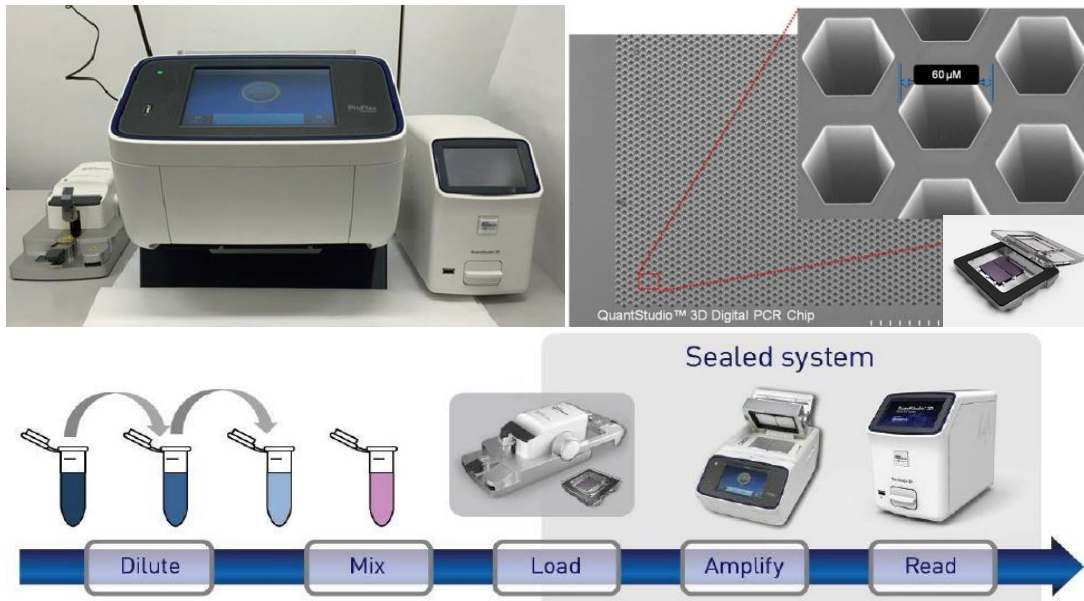


Figura 6. Instrumentos 3D QuantStudio. La figura muestra Chip Loader, ProFlex 2 × Flat Sistema de PCR e instrumento de PCR digital 3D QuantStudio™
Modificado de Borzi *et al.*, 2017 ⁽⁴³⁾.

3.2.6. Análisis *in silico*

Existen diferentes herramientas bioinformáticas que permite almacenar la información de miles de miRNAs descubiertos. La información se actualiza diariamente en base de datos y oficialmente compilados en programas como miRBase o Genbank, las cuales se utilizan como repositorio para las secuencias y anotación de miRNAs ⁽⁸⁰⁾.

Adicionalmente, algunos programas como RNAFold permiten la predicción de estructuras secundarias de pre-miRNAs y representa gráficamente la porción de horquilla o "*hairpin*", a partir de la información de la secuencia transcrita del miRNA primario. Los algoritmos utilizados en estos programas identificaron las estructuras de horquilla en regiones no codificantes y no repetitivas de la secuencia presente en el Genoma ⁽⁸¹⁾.

Los miRNAs computacionalmente son filtrados, según la secuencia evolucionaria conservativa en diferentes especies y las secuencias precursoras de miRNAs conocidas que presentan un rol importante en la búsqueda de algoritmos por ejemplo, miRSeeker, miRank, miRDeep, miRDeep2 y miRanalyzer permitieron discriminar valores entre predicciones verdaderas o falsos positivos ⁽⁸²⁾.

Estos resultados analizados *in silico* se complementa para validar la predicción con datos obtenidos de técnicas experimentales como clonamiento molecular, secuenciamiento o hibridación. Actualmente con el avance del secuenciamiento de próxima generación (NGS), ha sido utilizado para descubrir miRNAs sistemáticamente e incorporar los resultados en la base de datos de miRNAs ⁽⁸³⁾.

Muchos métodos computacionales descritos en la tabla 1 como miRWalk 2.0., TargetScan, RNAhybrid y DIANA-microT, TarBase v.8 fueron desarrollados para identificar los transcritos diana del miRNA. En muchos casos, estos algoritmos fueron desarrollados concentrando la cantidad de evidencia empírica desde sitios dianas y validadas experimentalmente para la selección de miRNAs, a partir de las bases complementarias presente en la región 3-UTR o 5-UTR y datos de expresión génica en diferentes muestras biológicas ⁽⁸⁴⁾.

Base de datos	Características	Enlace
miRBase	Secuencias, transcritos diana	http://microna.sanger.ac.uk/
miRWalk 2.0.	Secuencias, transcritos diana e integración de rutas metabólicas	http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/
miRTarbase	Secuencias, transcritos diana y referencias bibliográficas	http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/
TarBase v.8	Secuencias, transcritos diana y referencias bibliográficas	http://carolina.imis.athena-innovation.gr/
miRNAMap	Posible localización de transcritos diana	http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/
RNA-hybrid	Información sobre sitios de acoplamiento	https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/
PicTar	Información sobre las zonas 3 UTR de mRNA diana	https://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertbrate.cgi

Tabla 1. Base de datos y uso de algoritmos predictivos de transcritos diana.

Modificado de Bastida *et al.*, 2016 ⁽¹²¹⁾

Para realizar un análisis *in silico* en rutas metabólicas se requiere un análisis sistemático de las funciones de los genes relacionado con la información genómica e información funcional de orden superior de sistematizar el efecto global del control regulador de los miRNAs, existen varias plataformas de servidor para identificar las vías celulares potencialmente afectadas por un grupo de miRNAs. Esta información es proporcionada en el programa de acceso libre como NCBI, miRTarbase y la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG). La información genómica se almacena en la base de datos “Genes”, que es una colección de catálogos de genes para todos los genomas completamente secuenciados y algunos genomas parciales con anotación actualizada de las funciones de los genes. La información funcional de orden superior se almacena en la base de datos “Pathway”, que contiene representaciones gráficas de procesos celulares, como el metabolismo, el transporte de membrana, la transducción de señales y el ciclo celular. La base de datos se complementa con un conjunto de tablas de grupos para obtener

información sobre las subvías conservadas, que a menudo están codificadas por genes acoplados en posición en el cromosoma y que son especialmente útiles para predecir las funciones de los genes. Una tercera base de datos en KEGG es LIGAND para la información sobre compuestos químicos, moléculas enzimáticas y reacciones enzimáticas. KEGG proporciona herramientas gráficas Java para explorar mapas genómicos, comparar dos mapas genómicos y manipular mapas de expresión, así como herramientas computacionales para la comparación de secuencias, la comparación de gráficos y el cálculo de rutas. Las bases de datos de KEGG se actualizan diariamente y están disponibles gratuitamente (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)⁽⁸⁵⁾.

Adicionalmente, la lista de genes dianas puede ser la unión o intersección de predicción de estos programas. El test de target de genes en cada término es continuado por Gene Ontology (GO), rutas y anotación de enfermedades. Para las dianas de miRNA-target utilizando “*machine learning*” con set de datos experimentales publicados. Este método también es adoptado a un modelo para anotación funcional permitiendo hacer contribuciones con acceso a internet. Los miRNAs con fenotipos y anotación miRNA, base de datos de dianas moleculares, como miRBase, TargetScan, PicTar con múltiples plataformas incluyendo las bases de datos de genes y nucleótidos (Figura 7)⁽⁸⁶⁾.

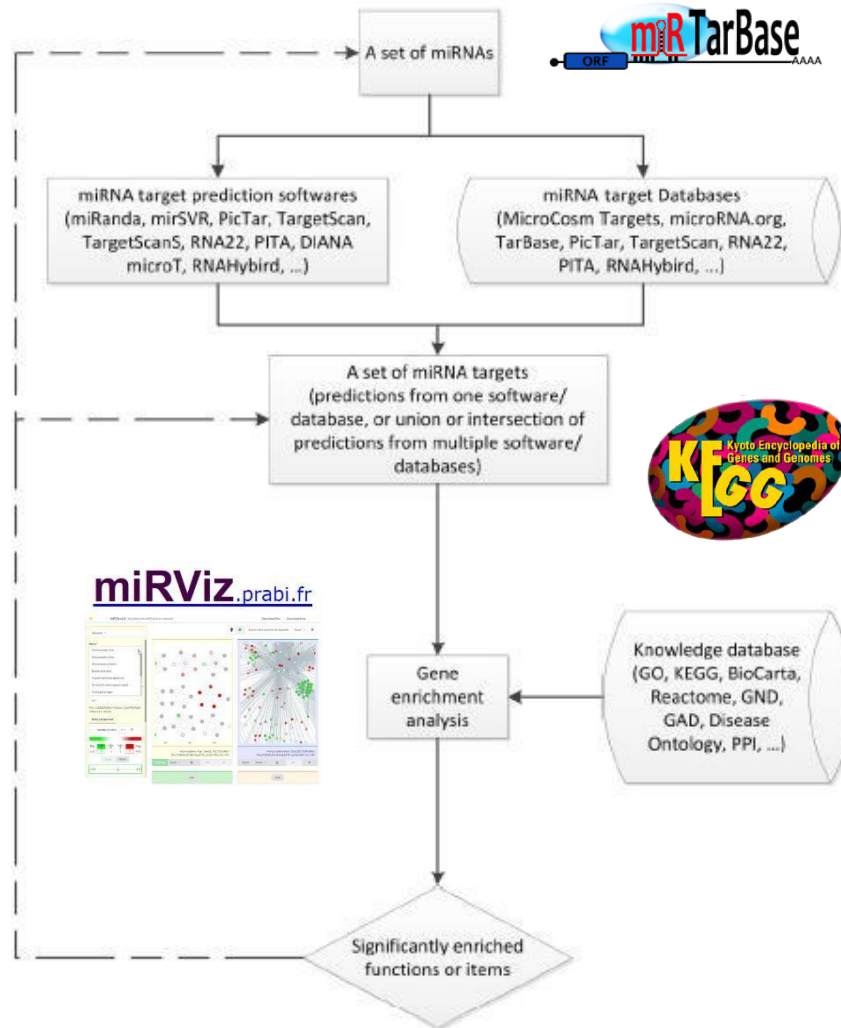


Figura 7. Flujograma de anotación funcional de miRNAs.

Modificado de Bing *et al.*, 2014 ⁽⁸⁶⁾.

Existen modelos matemáticos que representan el mecanismo de regulación génica mediada por miRNAs asociados a parámetros cinéticos mediante una ecuación diferencial ordinaria. Las reacciones permitieron interpretar las ecuaciones en términos de concentraciones y los ratios cinéticos, donde una sola transcripción del miRNA interactúa exclusivamente con cada molécula diana. Además, considerando que los ratios cinéticos en el modelo matemático son constantes ⁽⁸⁷⁾. Sin embargo, se debe establecer un parámetro específico en la ecuación matemática para realizar una simulación.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Cuantificación de miRNA-145

4.1.1. Obtención de la muestra

Las muestras de plasma de mujeres peruanas entre las edades de 20 y 67 años, procedentes de la ciudad de Lima, con diagnóstico negativo de cáncer de mama entre los años 2016 y 2018, fueron proporcionadas por el INEN, Oncosalud y almacenadas en el CIGBM, facultad de Medicina Humana, USMP. En total fueron 43 muestras y de ellas se consideraron 30 para el análisis final debido a los valores reportados del miRNA-145 y Cel-miR-39. Todas las mujeres participantes firmaron el consentimiento informado (anexo 10.1.).

El protocolo de investigación y el consentimiento informado ha sido aprobado por Comité de Ética de la referida facultad (Oficio N° 826-2015-CIEI-USMP-CCM).

4.1.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión y exclusión fueron:

Criterio de inclusión: Mujeres peruanas mayores de 18 años sin grado de parentesco entre ellas. Voluntarias sanas con diagnóstico negativo de cáncer de mama que expresan autorización para colecta de sangre a través de consentimiento informado (Anexo 10.1.).

Criterios de exclusión: Mujeres peruanas menores de 18 años y que presentan diagnóstico positivo en cáncer de mama o alguna patología.

4.1.3. Extracción de ARN total

El ARN fue extraído a partir de 200 uL de plasma, con el kit comercial miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemania), según el método descrito por el fabricante ⁽⁸⁸⁾ (Anexo 10.3.). Se mezcló 200 uL de plasma con 1000 uL del reactivo Qiazol lysis, luego se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se adicionó 3.5 uL de Spike in control Cel-miR-39 (1.6×10^8 copias / uL) y agitó vigorosamente. Se adicionó 200 uL de cloroformo y agitó 3000 RPM durante 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifugó 12 000 rpm, 4 °C durante 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo evitando el contacto con la interfase. Se adicionó 900 uL de etanol 100% e inmediatamente se transfirió 700 uL a la columna de membrana de sílice y se centrifugó a 12 000 RPM durante 15 segundos. Se añadió 700 uL de buffer RWT y se centrifugó a 12 000 RPM durante 15 segundos. Luego se agregó 500 uL de buffer RPE y se centrifugó a 12 000 RPM durante 15 segundos. También se agregó 500 uL de etanol 80% y se centrifugó a 12 000 RPM durante 2 minutos. Finalmente se cambió el tubo de colección y se centrifugó nuevamente a 13 000 RPM por 5 minutos. Se colocó en tubo de microcentrífuga (1.5 mL) y se agregó 14 uL de agua libre de RNAsas y se centrifugó a 13 000 RPM por 1 minuto. El ARN total, que contiene miRNAs, fue cuantificado por espectrofotometría en el rango UV 260 nm y 280 nm con el Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific). La relación 260/280 o ratio de absorbancia A260/280 es un indicador de pureza de la muestra de ácido nucleico analizado.

4.1.4. Conversión a cDNA

Los miRNAs fueron convertidos a cDNA con un kit comercial TaqMan advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) kit, según condiciones del fabricante ⁽⁸⁸⁾. Se agregó mix Poly(A) siguiendo las condiciones de temperatura para la poliadenilación a 37°C por 45 minutos, luego una reacción de detección a 65°C por 10 minutos. Se agregó 10 uL de mix de reacción de ligación para cada tubo que contiene 6.7 uL de la muestra del producto e reacción de poly(A). Las condiciones de temperatura en esta etapa fueron la reacción de ligación a 16°C por 60 minutos e inmediato se realizaron las reacciones de

transcripción reversa. Se agregó 15 uL de RT Mix de reacción para cada tubo de reacción conteniendo previamente 16.7 uL de la muestra del producto de reacción de ligación. Adicionalmente se agregaron un mix de 1.5 uL primers universales y 3 uL del mix de la enzima Transcriptasa reversa por cada reacción, siguiendo las condiciones de temperatura a 42°C por 15 minutos y una reacción de detección de 85°C por 5 minutos. Además, se agregó 45 uL de mix de reacción del amplificado del miRNA (miR-Amp Mix) para cada tubo que contiene 5 uL del producto RT. Las condiciones de temperatura para la reacción del amplificado del miRNA fueron a 95°C por 15 minutos para la activación de la enzima, luego 14 ciclos de 95°C por 3 segundos para la desnaturalización del cDNA y 14 ciclos de 60°C por 30 segundos para la etapa de alineamiento y extensión. Finalmente, las reacciones de detección fueron a 99°C por 10 minutos seguido por una temperatura de sostenimiento de 4°C (Anexo 10.4.). El producto de reacción de miR-Amp reacción se puede almacenar a -20°C durante 2 meses.

4.1.5. Cuantificación de miRNAs convertidos

Cada muestra de cDNA enriquecido fue amplificada para el miRNA-145 y el miRNA exógeno (Cel-miRNA-39). El mix de preparación contiene 7.5 uL de master mix, 2.26 uL de cDNA enriquecido, 0.75 uL de sonda FAM, 0.75 de sonda VIC y 3.74 uL de agua libre de nucleasas sumando un volumen final de 15 uL, luego, esta muestra es transferida a un material de soporte para realizar la dispersión en el chip (Anexo 10.5.). Finalmente se añade aceite y se sellan los chips.

Los chips se ubican en el termociclador ProFlex™ -Applied Biosystems para iniciar una fase de denaturación de 10 min. a 96°C, luego 40 ciclos de hibridación y extensión a 56°C por 2 min., una fase de denaturación de 98°C por 30 seg. y una extensión final de 60°C por 2 min. Finalmente, los chips fueron puestos a 10°C hasta su lectura (Anexo 10.5.).

Los chips fueron procesados por la lectora 3D del QuantStudio3D™ digital PCR System y los datos interpretados en la plataforma QuantStudio3D-Analysis Suite Cloud software siguiendo el protocolo descrito por Conte *et al.*, 2015 ⁽⁷⁶⁾.

Se elaboró un flujograma de cálculo de diluciones para determinar el número de copias de miRNA-145 por uL de muestra (Figura 8).

Si

N: Cantidad de copias en tubo (200 uL de plasma); X: Valor de QuantStudio

$$N = X \cdot (10) \cdot (31.7) \cdot (13) / (3.7) \times (200)$$

N = X · Factor de dilución

En 1 mL de plasma:

N = X · Factor de dilución · 1000 uL

Cantidad de copias/mL de plasma: X · **2.029**

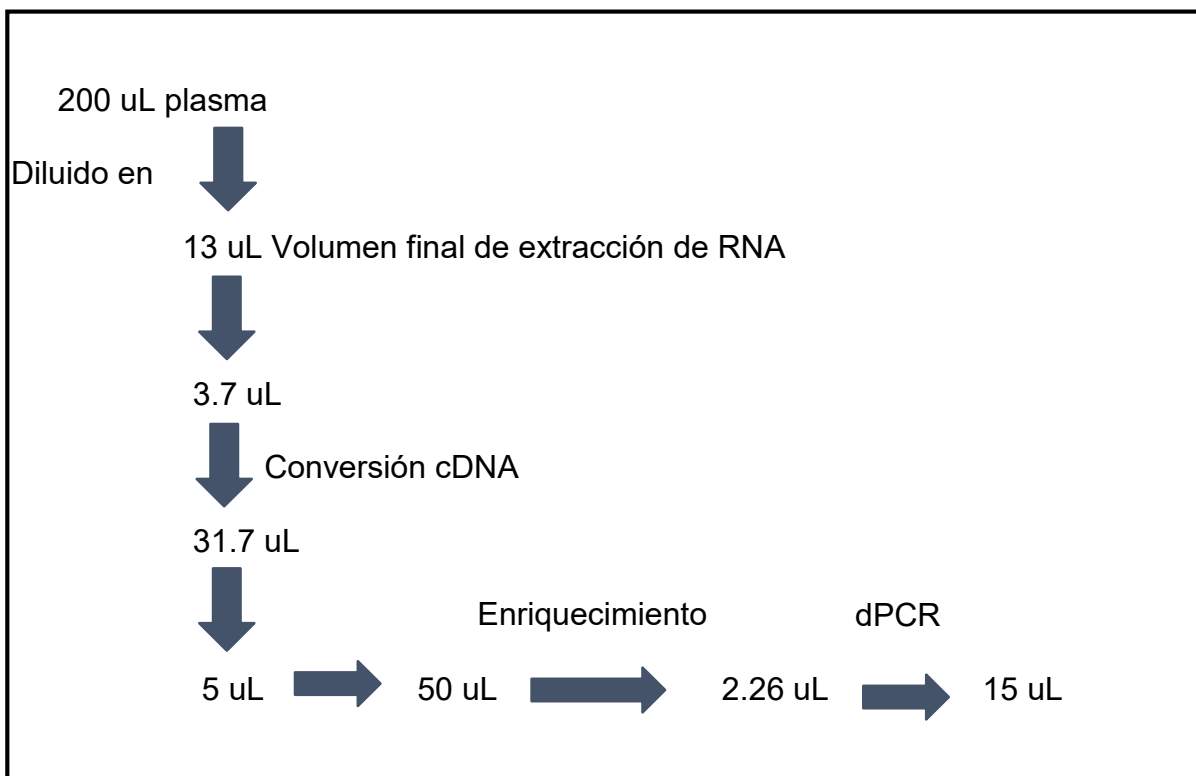


Figura 8. Flujograma de cálculo de diluciones para determinar número de copias del miRNA-145 por uL de muestra.

4.1.6. Análisis estadístico

4.1.6.1. Estadística descriptiva

Los datos y gráficos fueron obtenidos por el programa QuantStudio 3D Analysis Suite v.3.0.3, se analizó la distribución de los datos (test de normalidad) con la prueba de Shapiro-Wilks. El programa Graph Pad Prim 8.02, IBM SPSS Statistics 24.0 y MS Office Excel 2013 se utilizó para el análisis estadístico correspondiente (89).

Análisis de distribución de Poisson

Las lecturas en el chip, basado en un sistema de microfluídica en la técnica de PCR digital, proporcionó un mecanismo para ejecutar miles de reacciones de PCR en paralelo y obtener una gran cantidad de particiones en cada pocillo que contiene la muestra de cDNA, master mix y reactivos de ensayo TaqMan® con las sondas fluorescentes VIC (color rojo) y FAM (color azul), y se analizaron individualmente para detectar la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de una señal de amplificación. Sin embargo, si los pocillos han recibido más de una molécula de la secuencia objetivo, adicionalmente el Sistema de PCR digital QuantStudio 3D midió un factor de corrección con el modelo de Poisson (90), (43), (108).

El número medio de moléculas por partición es estimado utilizando el modelo de Poisson, y luego convertido en concentración dividiendo por partición volumen, es decir, número de copias/uL de muestra. El modelo de Poisson se utilizó para analizar experimentos de PCR digital y según Majumdar *et al.*, 2016, demostró mayor precisión en la cuantificación (108), es decir, conforme presenta un mayor número de divisiones, existe una mayor precisión de la prueba (90).

Según el modelo de Poisson, el número promedio de moléculas objetivo están determinadas por la ecuación:

$$\lambda = -\ln(1-p)$$

λ : número promedio de moléculas objetivo por unidad.

p : proporción del número de unidades con señal positiva con el número total de unidades partidas.

4.2. Identificación *in silico* de la secuencia de miRNA-145 y los transcritos diana

El análisis de la secuencia de referencia del miRNA-145 (NC_000005.10) fueron obtenidos en el repositorio del Centro Nacional de Información de Biotecnología (Gene ID: 406937) y los transcritos diana fueron identificados en el programa miRTarbase ⁽⁹⁵⁾ y miRViz ⁽¹¹⁹⁾ (Figura 7).

La secuencia conocida y publicada del miRNA-145 fueron obtenidas del programa miRBase (ID: MI0000461). Adicionalmente, las secuencias de miRNA-145 en la especie *homo sapiens* fueron alineadas en el programa Bioedit con otras especies que contiene la secuencia de miRNA-145 ⁽⁸⁰⁾.

4.2.1. Análisis *in silico* estructural del pre-miRNA-145

La secuencia del pre-miRNA-145 fue seleccionado en el programa miRBase. Luego se anotó la secuencia al programa RNAfold que presenta un ingreso o “*input*” y como resultado se obtuvo un modelo estructural preliminar de la estructura secundaria del pre-miRNA-145 que presentó una energía de plegamiento expresado en kcal / mol, según Lorenz *et al.*, 2011 ⁽⁹¹⁾. El filtrado de las secuencias pre-miRNA-145 se realizó sobre el programa que utilizó una serie de algoritmos matemáticos de Zucker y Stiegler para medir la mínima energía libre (MFE) con los parámetros de energía de Turner ⁽⁹²⁾.

RNAfold presenta una salida u “*output*” en formato de texto con la anotación punto y paréntesis. Cada nucleótido emparejado se encuentra representado por un paréntesis, mientras que los puntos representan nucleótidos libres.

Ejemplo:

```
CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUUUCCAGGAAUCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU
.(((.((.((((.(..(((.(.((((((((((.....)))))))))))).)).))))..)))))).)).)).).
```



Figura 9. Secuencia del pre-miRNA-145 de la especie *Homo sapiens* representado en el programa RNAFold y los colores indican la probabilidad de apareamiento de bases.

El programa calculó un conjunto de parámetros, por ejemplo, la mínima energía libre ajustada (AMFE), índice de mínima energía libre (MFEI), mínima energía libre del conjunto termodinámico (MFEE) mediante la siguiente ecuación⁽⁹³⁾ en la figura 10.B.

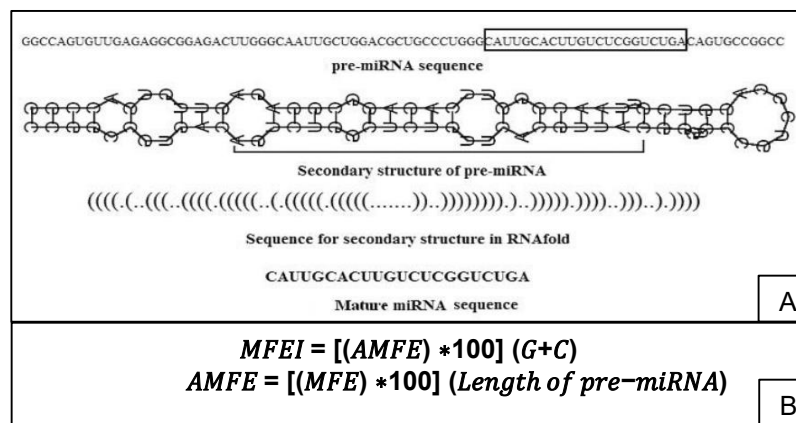


Figura 10. A. Ilustración de la secuencia de pre-miRNA y estructura secundaria.**B.** Ecuación de predicción de estructura secundaria del pre-miRNA representado en el programa RNAFold. Modificado de Xu J y cols⁽¹²²⁾.

Los pre-miRNA-145 de la especie *homo sapiens* predichos se comparó con otros pre-miRNAs presentes en las mismas rutas de señalización en cáncer.

4.2.2. Análisis de acoplamiento molecular entre el miRNA-145, transcrito diana y proteína argonauta (AGO)

La estructura tridimensional de la proteína AGO (685 residuos de aminoácidos) fue obtenida de la base de datos del Banco de datos de proteínas (PDB ID: 3F73, cadena A). La preparación de la estructura y la corrección de la proteína AGO y diseño del miRNA-145 se realizaron en el programa Pymol para el análisis de la interacción entre dúplex miRNA-145-mRNA y la proteína AGO ⁽⁹⁴⁾.

4.2.3. Identificación de transcritos diana del miRNA-145

El estudio de interacción entre el miRNA-145 y transcritos diana fueron identificados mediante los programas miRBase, miRWalk 2.0 ⁽¹²¹⁾ y miRTarBase v.8 ⁽⁹⁵⁾

La lista de transcritos diana predichos fueron comparados con los niveles de expresión del miRNA-145 utilizando el programa miRGator v3.0 los cuales permitieron la integración de datos de expresión del miRNA-145 y transcritos diana.

En resumen, se realizó un análisis de identificación *in silico* del miRNA-145 y transcritos diana utilizando herramientas bioinformáticas (Figura 11).

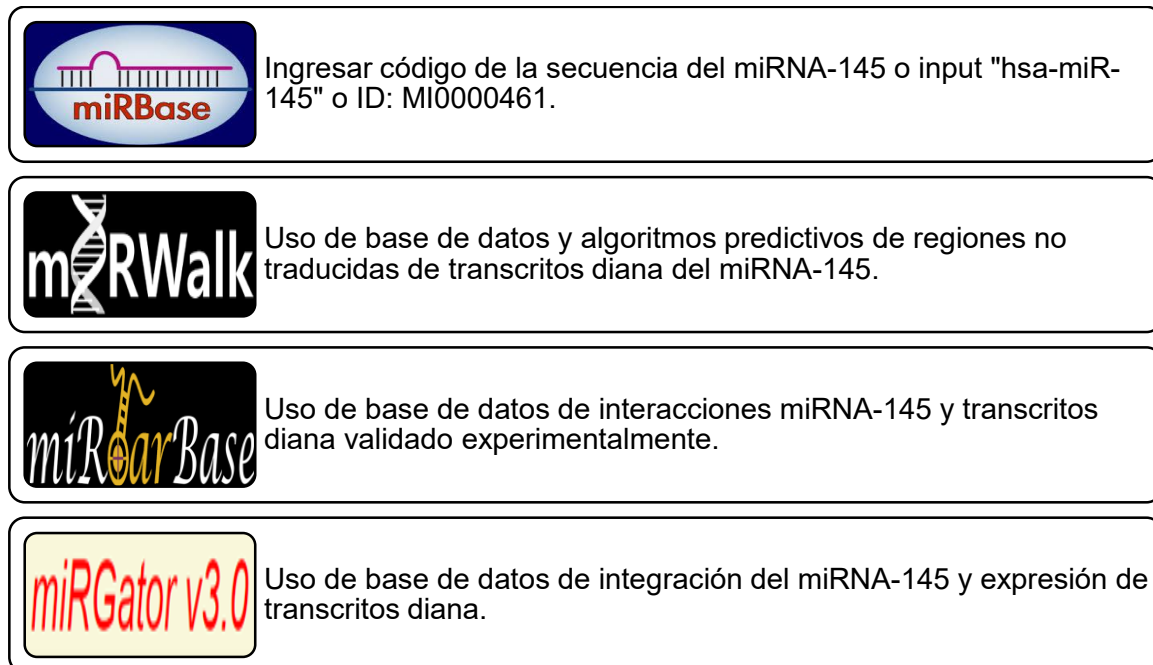


Figura 11. Procedimiento esquemático de la identificación *in silico* de los transcritos diana del miRNA-145.

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Análisis *in silico* de las rutas de señalización y metabólicas en cáncer asociado a miRNA-145

La identificación *in silico* del miRNA-145 y los transcritos diana fueron obtenidos del procedimiento anterior (Figura 11) y fueron representados mediante un mapa esquemático sobre las principales rutas de señalización y metabólicas en cáncer asociado a miRNA-145 en el programa BioRender ⁽⁴⁸⁾.

Los resultados fueron comparados con los reportes de la colección de base de datos de enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) ⁽⁸⁵⁾ y Reactome ⁽⁴⁹⁾, ⁽⁵⁰⁾.

V. RESULTADOS

5.1. Cuantificación de miRNA-145

5.1.1. Extracción de ARN total y conversión a cDNA

El promedio de los valores de concentración del ARN total de las 43 muestras de plasma de 200 uL fue 31.63 ± 18.28 ng/ μ L y el promedio de los valores del ratio de absorbancia (A260/280) fue 1.80 ± 0.21 .

El promedio de los valores de concentración de cDNA fue 1629.40 ± 321.21 y el promedio de los valores del ratio de absorbancia (A260/280) fue 1.91 ± 0.05 .

5.1.2. Cuantificación de miRNA-145 por dPCR

En la cuantificación de miRNA-145 por PCR digital se utilizaron dos ensayos con fluoróforos de color rojo (VIC) y azul (FAM). Se determinó el valor del umbral a 1200 RFU como frontera entre los valores no amplificados (puntos amarillos), los valores amplificados del ensayo del control exógeno Cel-miR-39 (puntos rojos), y el valor del umbral a 3604.47 RFU como frontera entre los valores amplificados del miRNA-145 (puntos azules) y valores no amplificados (Figura 12).

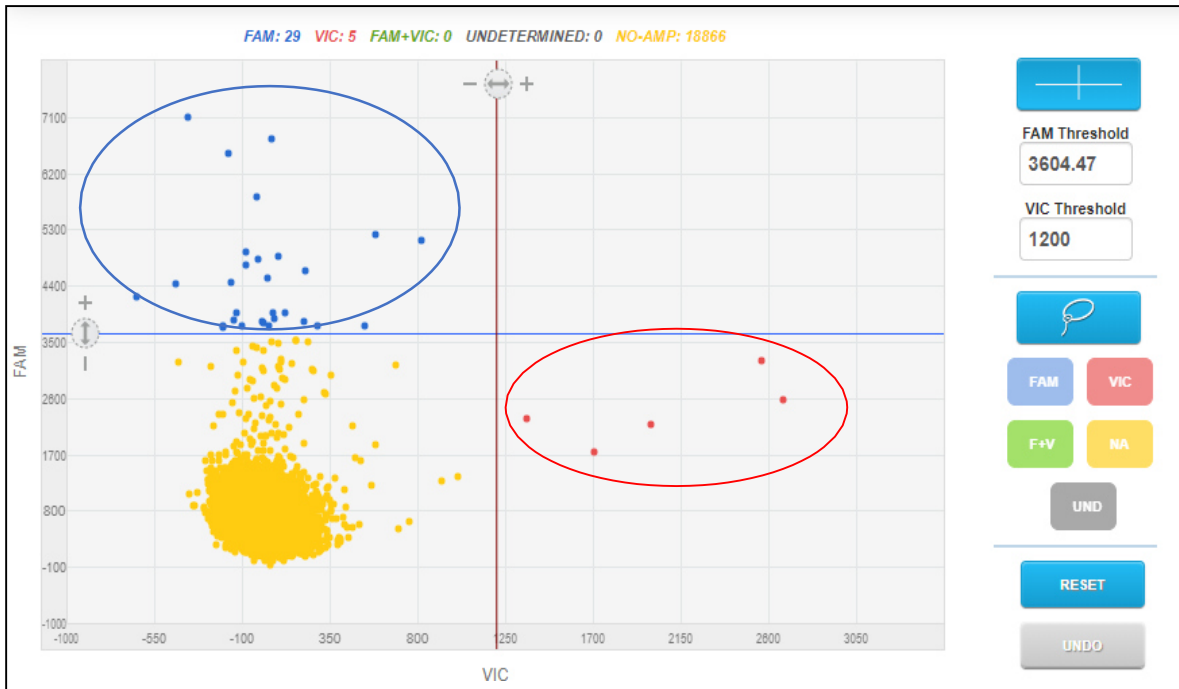


Figura 12. Umbral establecido del canal FAM-miRNA-145 (color azul) y VIC-Cel-miR-39 (color rojo) como resultado de la cuantificación de PCR digital en el programa QuantStudio™ 3D Analysis Suite.

Los valores de las 43 muestras de plasma fueron expresados en copias/uL de plasma del miRNA-145(FAM) y Cel-miR-39(VIC). Sin embargo, 13 muestras no fueron consideradas en el presente análisis, porque solo amplificó el control exógeno *Spike in control* Cel-miR-39 (VIC), (Anexo 10.6.). El valor de la mediana del miRNA-145 y cel-miR-39 fueron 2,61 copias/uL de plasma y 1,15 copias/uL de plasma, respectivamente y el promedio del miRNA-145 fue $6,07 \pm 1,60$ copias/uL de plasma (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de PCR digital en el programa QuantStudio 3D Analysis Suite.

ID muestra		Copias/uL muestra		Copias/uL plasma		Valor normalizado copias/mL plasma		Ratio
N°	Ensayos	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC	
1	C0D1OS	1.28	0.22	2.59	0.45	9.28E+07	1.60E+08	5.80
2	C0CSY9	1.51	2.41	3.07	4.89	1.00E+07	1.60E+08	0.63
3	D01LC0	3.02	0.78	6.13	1.58	6.20E+07	1.60E+08	3.87
4	D01M79	8.28	1.74	16.79	3.54	7.60E+07	1.60E+08	4.75
5	D01LP5	11.14	0.50	22.60	1.02	3.56E+08	1.60E+08	22.25
6	D01LP6	9.55	1.43	19.38	2.90	1.07E+08	1.60E+08	6.69
7	D01LP1	3.14	0.71	6.37	1.43	7.11E+07	1.60E+08	4.44
8	D01N1P	6.01	1.26	12.19	2.55	7.66E+07	1.60E+08	4.78
9	D01M0Q	4.88	2.33	9.90	4.72	3.36E+07	1.60E+08	2.10
10	D01M1D	2.09	0.61	4.24	1.24	5.49E+07	1.60E+08	3.43
11	D01M0T	1.90	1.03	3.8	2.10	2.93E+07	1.60E+08	1.83
12	D01ZW	2.71	0.53	5.50	1.08	8.17E+07	1.60E+08	5.11
13	D027ZO	4.76	0.45	9.66	0.91	1.70E+08	1.60E+08	10.62
14	D0259V	1.30	0.16	2.63	0.33	1.28E+09	1.60E+08	8.00
15	D026D8	0.15	0.35	0.31	0.72	6.85E+06	1.60E+08	0.43
16	D025LK	0.75	1.97	1.53	4.00	6.11E+07	1.60E+08	0.38
17	D026OE	0.06	0.11	0.12	0.23	7.98E+06	1.60E+08	0.50
18	D026AU	0.04	0.17	0.09	0.35	4.01E+07	1.60E+08	0.2
19	D025LI	0.12	0.29	0.24	0.60	6.40E+06	1.60E+08	0.40
20	D025MD	0.26	2.65	0.53	5.38	1.57E+07	1.60E+08	0.10
21	C0FESK	0.61	0.35	1.23	0.72	2.74E+07	1.60E+08	1.71
22	C0FBBT	0.84	3.13	1.71	6.36	4.31E+07	1.60E+08	0.27
23	C0FMNX	0.04	0.38	0.08	0.78	1.60E+07	1.60E+08	0.10

24	C0FMZ6	0.39	1.03	0.80	2.10	6.07E+06	1.60E+08	0.38
25	C0G1YS	0.25	0.36	0.52	0.74	1.12E+07	1.60E+08	0.70
26	C0G24H	4.69	0.60	9.51	1.22	1.25E+08	1.60E+08	7.83
27	C0G7QS	19.61	2.27	39.78	4.61	1.38E+09	1.60E+08	8.64
28	C0CU10	0.21	0.47	0.42	0.95	7.12E+07	1.60E+08	0.44
29	C0D6TR	0.11	0.45	0.23	0.91	3.99E+07	1.60E+08	0.25
30	C0FQCG	0.16	0.33	0.33	0.66	7.98E+07	1.60E+08	0.50

Los valores del ratio (miRNA-145/Cel-miR-39) no presentaron una distribución normal ($W=0.723$) descrito en la tabla 2. Los resultados de PCR digital fueron comparados con otros estudios de mujeres peruanas con cáncer de mama y controles reportados por Murillo *et al.*, 2019 ⁽¹²⁾.

Los valores del ratio (miRNA-145/Cel-miR-39) fueron expresados en copias/mL de plasma (Figura 13).

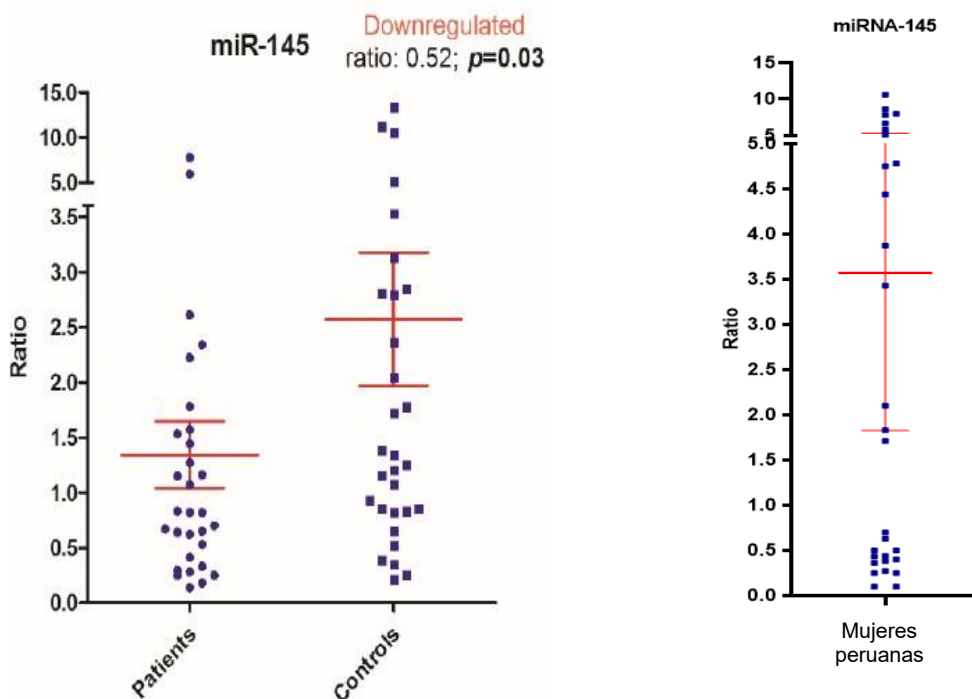


Figura 13. Comparación del ratio (miRNA-145/Cel-miR-39) del miRNA-145 en plasma de mujeres peruanas (derecha) y resultados publicados en mujeres peruanas con cáncer de mama y controles (izquierda) por Murillo *et al.*, 2019 ⁽¹²⁾.

5.2. Identificación *in silico* de la secuencia de miRNA-145 y los transcritos diana

Se identificaron las secuencias del pre-miRNA-145 y miRNA-145 en la base de datos de miRBase y se realizó un análisis de alineamiento múltiple de 20 secuencias de pre-miRNA-145 seleccionadas de diferentes especies en el programa Bioedit (Figura 14).

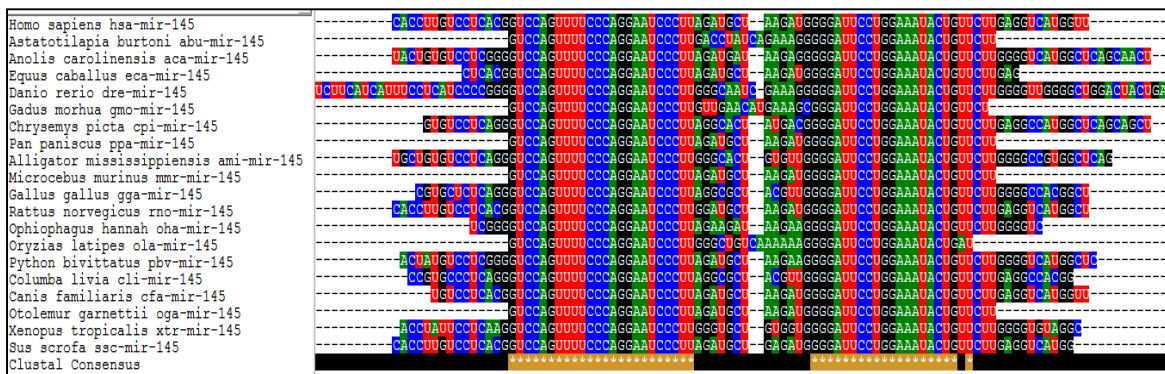




Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias de pre-miRNA-145 en diferentes especies realizado en el programa Bioedit.

5.2.1. Análisis *in silico* estructural del pre-miRNA-145

Se analizó la predicción de la estructura secundaria del pre-miRNA-145 en el programa RNAfold mediante el algoritmo de Zucker y Stiegler ⁽⁹²⁾, y el cálculo de energía libre mínima (MFE) expresado en kcal/mol, utilizando los parámetros de Turner. Los valores de MFE de la secuencia de pre-miRNA-145 mínimo y máximo de las 20 especies seleccionadas presentaron una secuencia conservativa entre - 41.10 kcal/mol y - 25.2 kcal/mol, respectivamente (Anexo 10.7.) y además, se comparó el modelo estructural de predicción del pre-miRNA-145 obtenido en RNAFold y miRTarBase (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de modelos de estructura secundaria del pre-miRNA-145 y cálculo de mínima energía libre MFE (kcal/mol) obtenido en el programa RNAfold.

MiRNAs	Estructura de pre-miRNA-145 Fuente: RNAFold	Estructura de pre-miRNA-145 Fuente: mirTarbase	MFE (kcal/mol) Fuente: RNAFold
hsa-miR-145			- 41.10

5.2.2. Análisis de acoplamiento molecular entre miRNA-145, transcrito diana y la proteína AGO (código PDB: 3F73)

La visualización de residuos de aminoácidos y átomos participantes en enlaces puente de hidrógeno entre el complejo miRNA-145-mRNA y proteína argonauta (código PDB 3F73) fueron analizados en el programa Pymol (Figura 15).

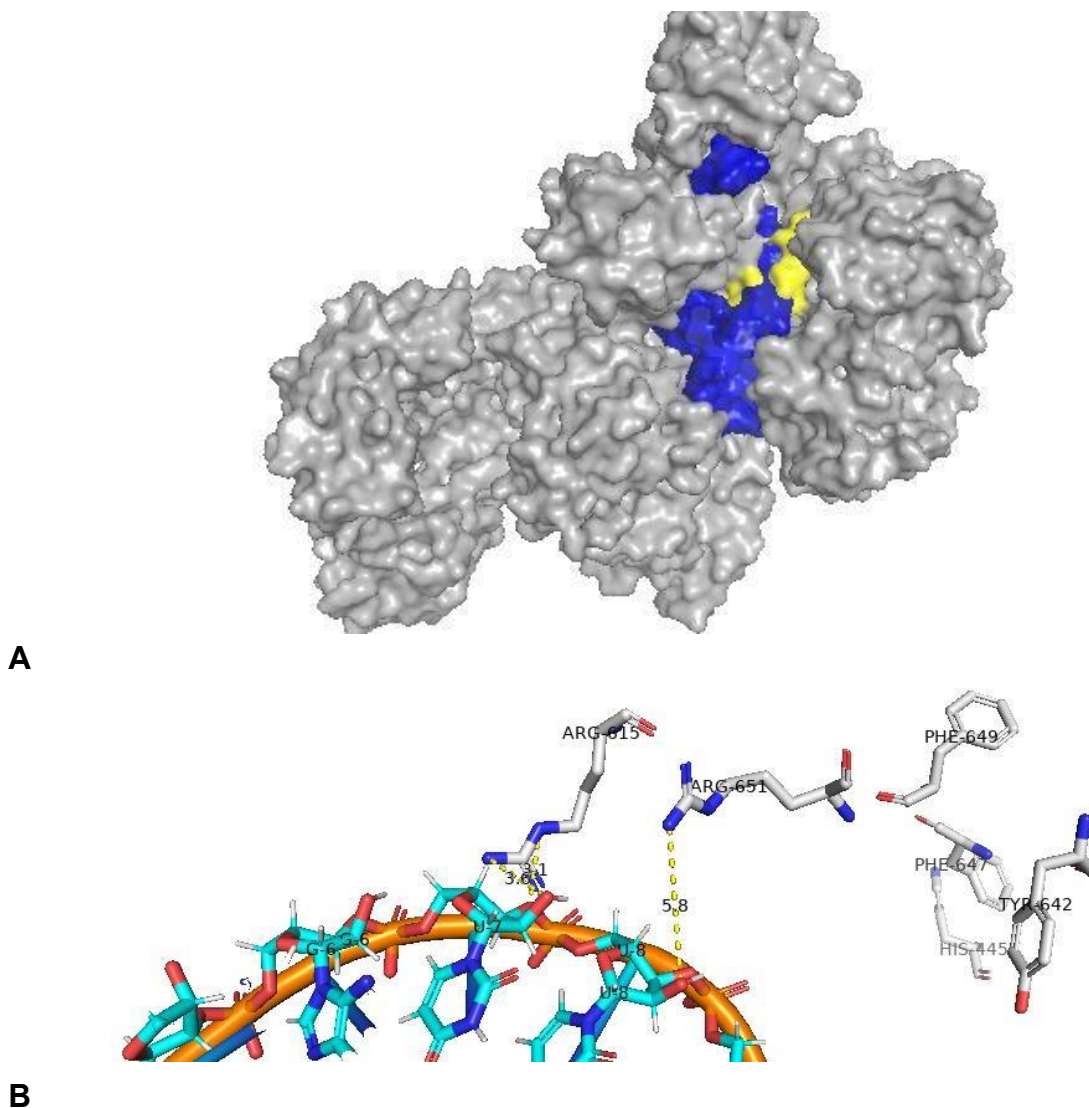


Figura 15. Imagen **A.** Visualización molecular de la interacción entre la proteína ArgonAUTA (AGO2) color gris y el dúplex de mRNA-miRNA-145 de color amarillo y azul, respectivamente en el programa Pymol (código PDB: 3F73). Imagen **B.** Residuos de aminoácidos de la proteína argonauta (AGO2) interactuando mediante enlace de hidrogeno con el miRNA-145 en distancia de 3.6 y 5.8 Å reportado en el programa Pymol.

Adicionalmente se modificó una de las hebras guía con la secuencia madura del miRNA-145 en el programa Pymol.

El análisis de los residuos de aminoácidos de la proteína argonauta que rodea a los miRNA-145, como ARG 615, ARG 651, PHE 649, se calculó midiendo una distancia de 3.1 Å, 3.6 Å y 5.8 Å, respectivamente.(Figura 15.B y tabla 4).

Tabla 4. Residuo de aminoácidos de la proteína argonauta interactuando con enlaces tipo puente de hidrogeno con miRNA-145.

miRNA	Residuo	Posición del átomo	Distancia (Å)
MiRNA-145	ARG 615	NH1...O4 (U17)	3.1
MiRNA-145	ARG 615	NH1...O2(U7)	3.6
MiRNA-145	ARG 651	NH2...O2(U8)	5.8

En el programa Biorender se diseñó una gráfica del mecanismo de interacción del miRNA-145/mRNA y la proteína argonauta AGO2 (Figura 16), según los datos reportados en miRTarBase ⁽⁹⁵⁾.

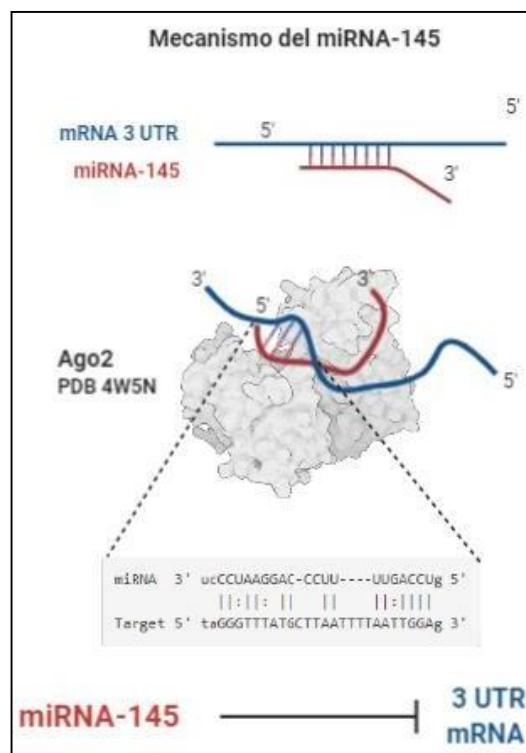


Figura 16. Visualización de la interacción del miRNA-145/mRNA y la proteína argonauta (AGO2). Creado en Biorender.com

5.2.3. Identificación de transcritos diana

Los datos obtenidos en los programas miRWalk, DIANA miRPathv2 y miRGator fueron 32 transcritos diana en las rutas de señalización y 3 transcritos diana en las rutas metabólicas de glucosa y glutamina en cáncer asociado a la variación de los niveles del miRNA-145 (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de transcritos dianas en cáncer asociado a miRNA-145.

Rutas de señalización y metabólicas (KEGG)	Gen	Número de transcritos	Transcritos diana
Ruta de señalización de calcio	CAMKD2	6	NM_001321571, NM_001321567, NM_001321574, NM_172128, NM_001221, NM_172127
Proliferación celular y metástasis	MYC	2	NM_002467, NM_001354870
Proliferación celular y metástasis	NRAS	1	NM_002524
Proliferación celular y metástasis	BRAF	2	NM_001354609, NM_004333
Proliferación celular y metástasis	VEGF-A	1	NM_001287044
Proliferación celular y metástasis	EGFR	6	NM_005228, NM_001346899, NM_001346897, NM_201284, NM_201282, NM_201283
Proliferación celular y metástasis	TP53	14	NM_001126112, NM_001276761, NM_000546, NM_001276760, NM_001126113, NM_001276695, NM_001126114, NM_001276696, NM_001126118, NM_001126115, NM_001126117, NM_001276699, NM_001126116, NM_001276698
Glucólisis	HK2	1	NM_000189
Glutaminólisis	GLS	2	NM_014905, NM_001256310

5.3. Análisis *in silico* de las rutas de señalización y rutas metabólicas en cáncer asociado a miRNA-145

A partir de los datos reportados de secuencias no traducidas de los transcritos diana del miRNA-145 (Tabla 5) ⁽⁹⁵⁾, se analizaron *in silico* las rutas de señalización en cáncer de mama en Biorender.com (Figura 17) mediante una representación esquemática del mecanismo de miRNA-145 y la expresión de las proteínas N-RAS (ID mirTarbase: MIRT007107), proto-oncogen B-RAF (ID mirTarbase: MIRT053219) y VEGF-A (ID mirTarbase: MIRT006215).

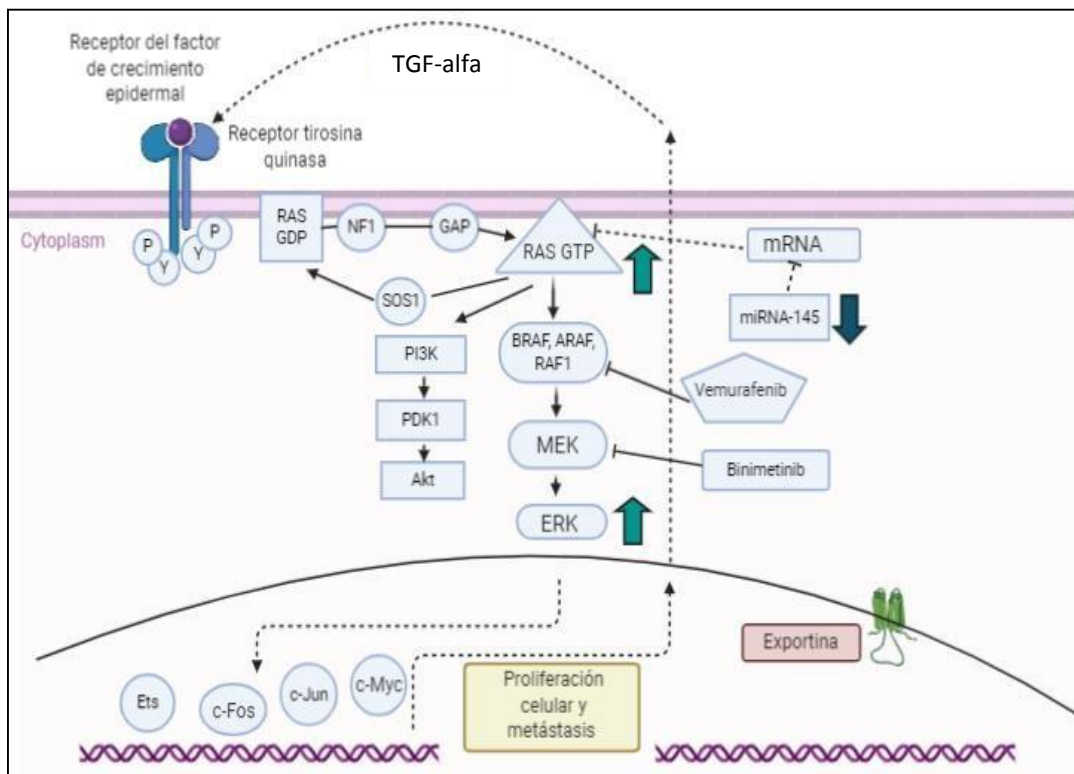


Figura 17. Representación esquemática de las principales rutas de señalización de N-RAS/B-RAF en cáncer de mama. Creado en Biorender.com

También otra ruta de señalización presente fue p53 interactuando con el factor de transcripción c-Myc (ID mirTarbase: MIRT004290) relacionado a la proliferación celular y metástasis. El factor de transcripción oncoproteína c-Myc, regula la expresión de genes relacionados principalmente en el metabolismo de la glutamina y metabolismo de la glucosa (Figura 21).

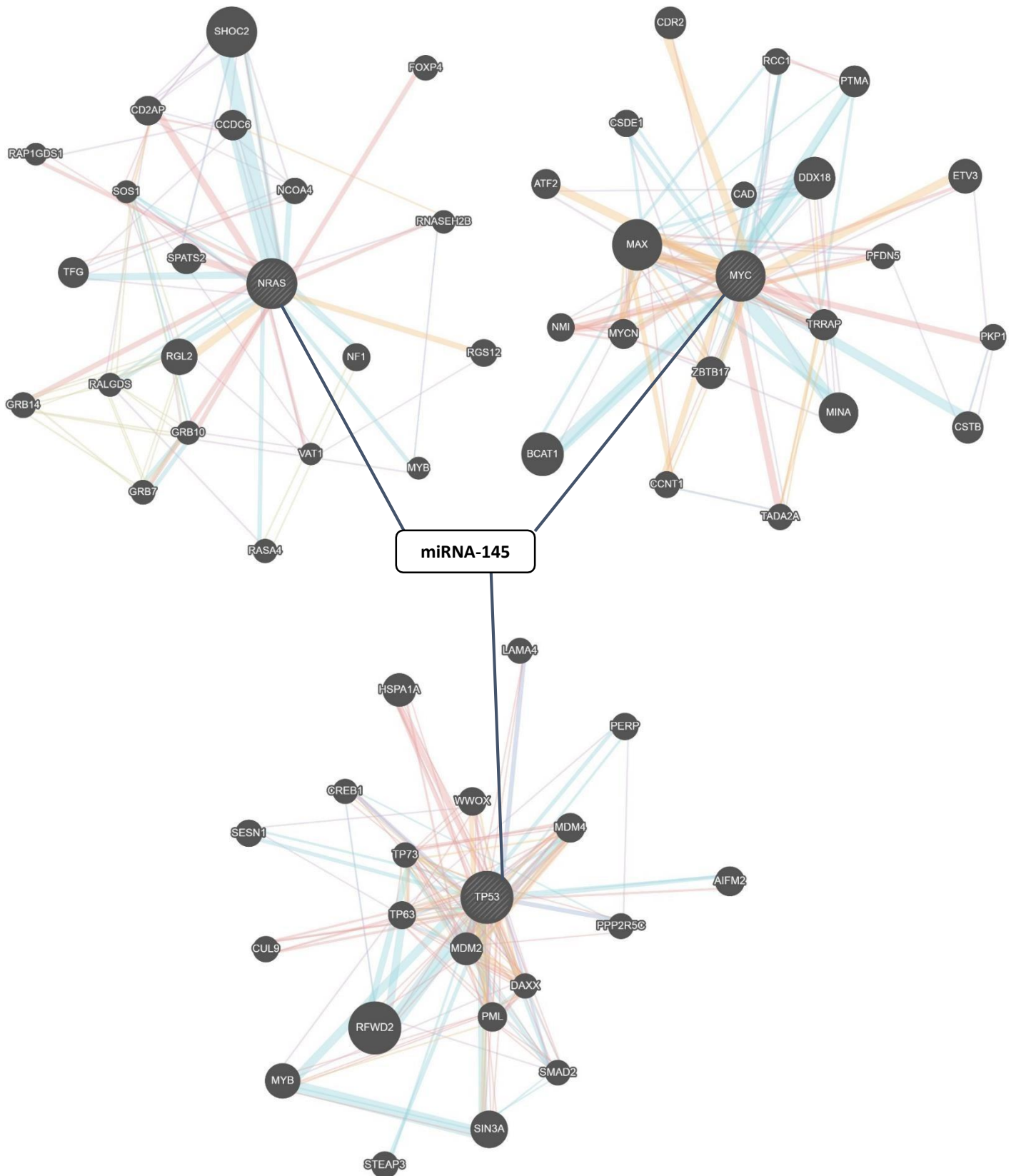


Figura 18. Gráfica de la red de expresión de transcritos diana del miRNA-145 en cáncer de mama y ovario. Modificado de <https://genemania.org/>

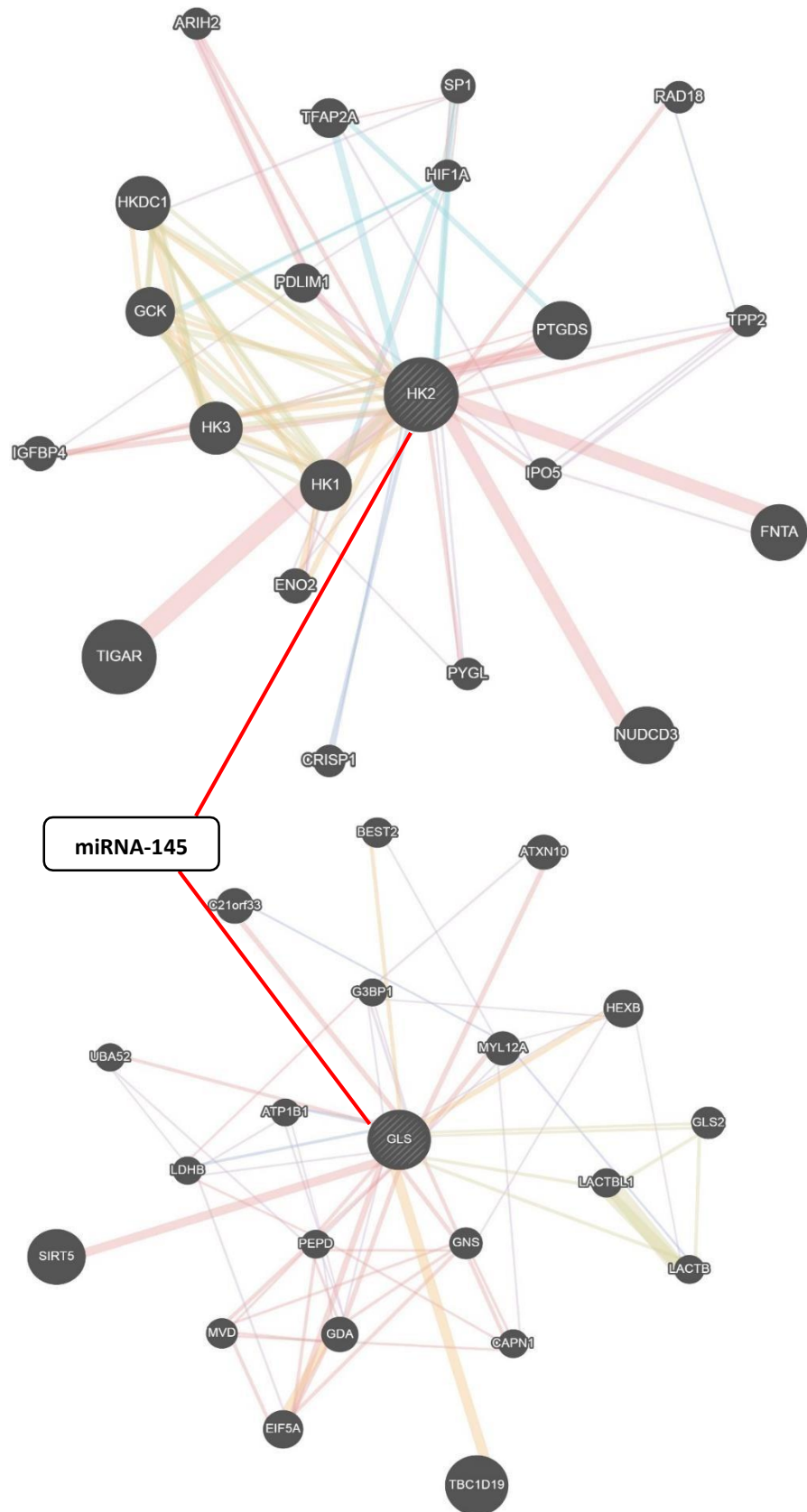


Figura 19. Gráfica de la red de expresión de transcritos diana del miRNA-145 en el metabolismo de la glucosa (HK2) y la glutamina (GLS). Modificado de <https://genemania.org/>

Adicionalmente, se analizó *in silico* la ruta de señalización de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) regulado por miRNA-145 en el proceso de apoptosis de cardiomiocitos y se elaboró una representación esquemática.

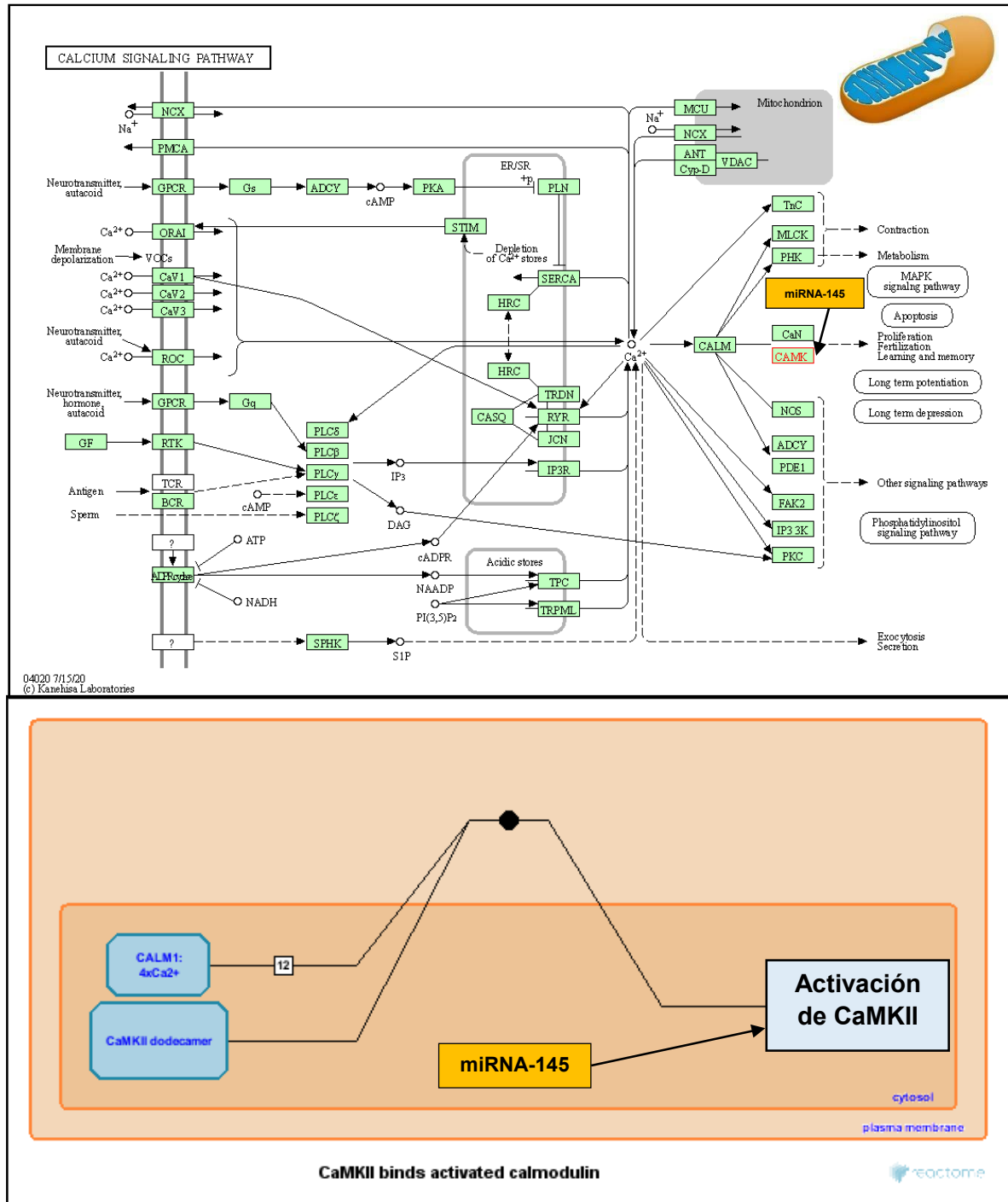


Figura 20. Representación esquemática de la ruta de señalización de la proteína CaMKII.

Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/> y <https://reactome.org/>

Se realizó un análisis comparativo *in silico* de las rutas de señalización del mecanismo de regulación del miRNA-145 sobre el receptor EGFR (ID mirTarbase: MIRT003325) creado en Biorender y comparado con la anotación en KEGG (ID KEGG: hsa05224).

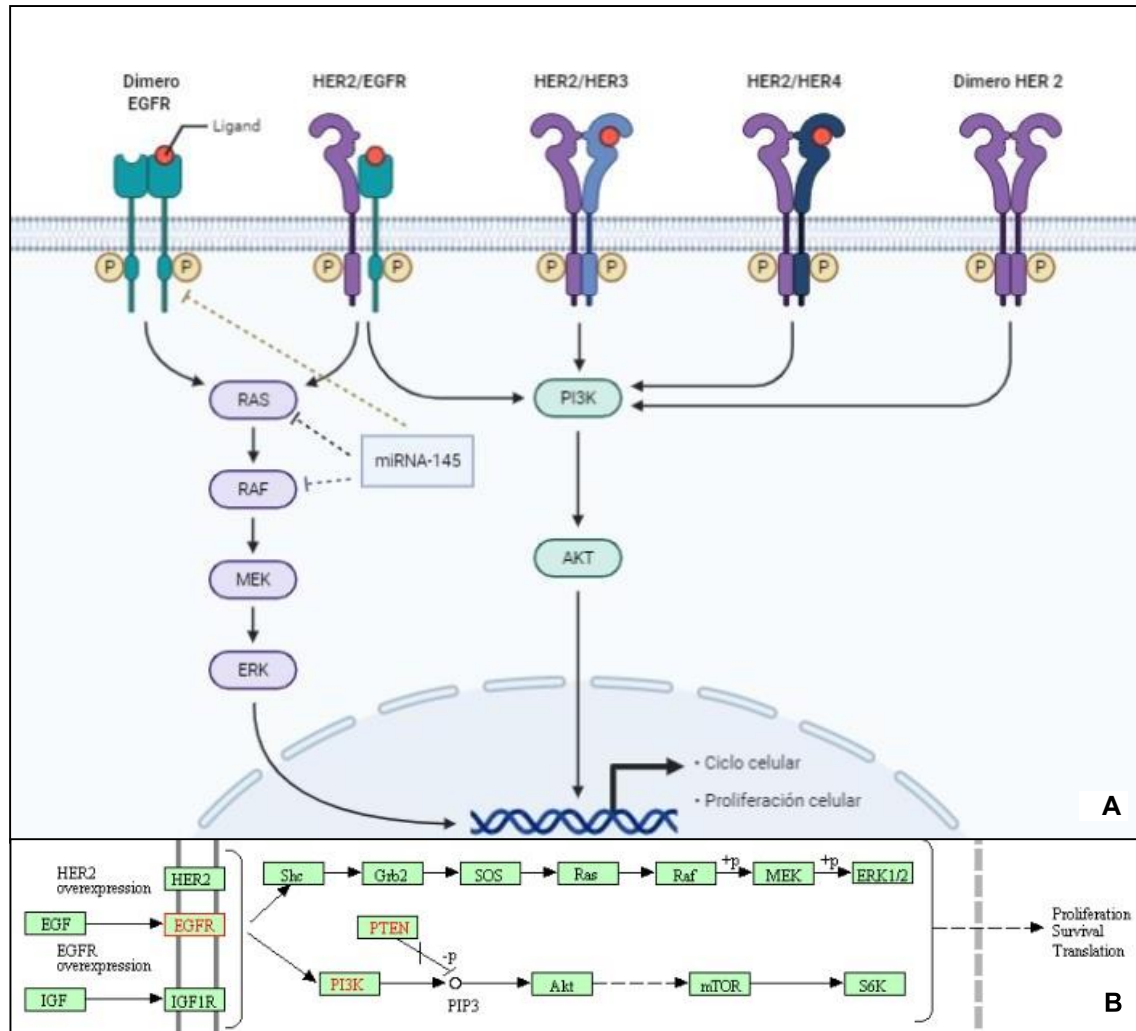


Figura 21. A. Representación esquemática de las principales rutas de señalización de EGFR en cáncer de mama creado en Biorender.com **B.** Anotación de las rutas de señalización de EGFR en cáncer de mama. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

Según los resultados presentados en la figura 21 y comparados con los datos reportados en KEGG (Anexo 10.8.), se analizó *in silico* los datos de expresión génica de los transcritos diana en diferentes tejidos tumorales, utilizando herramientas bioinformáticas (Figura 11) para la descripción de los cambios en el metabolismo de glucosa y glutamina asociados a la variación de los niveles de

miRNA-145⁽³⁵⁾ en cáncer, a través de la regulación de las enzimas hexoquinasa 2 (*HK2*) (Tabla 6) y glutaminasa (*GLS*) (Tabla 7), respectivamente.

Tabla 6. Cambios de la concentración de productos del metabolismo de la glucosa regulados por miRNA-145.

Niveles de expresión	Enzimas	Ruta metabólica	Cambios	Efecto en cáncer
<p>↑ [MiR-145] Sobreexpresado, según los datos reportados por Conte <i>et al.</i>, 2015⁽⁷⁶⁾ miRNA/Cel-miR-39 (>1000 copias/μL de plasma)</p>	<p>↓ [HK2]</p>	<p>Glucólisis anaeróbica</p>	<p>Hay una disminución de concentración de glucosa-6 fosfato, lactato y ATP.</p>	<p>Disminuye el proceso de proliferación de células tumorales e inhibición de la metástasis.</p>
<p>[MiR-145] Normoexpresado miRNA/Cel-miR-39 (≥ 1 copia/uL plasma)</p>	<p>[HK2]</p>	<p>Glucólisis anaeróbica</p>	<p>La glucosa se transforma en glucosa-6 fosfato, a través de la fosforilación del grupo 6-hidroxilo de la glucosa. Hay producción de lactato y poco ATP.</p>	<p>No hay un efecto demostrado en cáncer.</p>
<p>↓ [MiR-145] Subexpresado, según los datos reportados por Murillo <i>et al.</i>, 2017⁽¹²⁾ (0-1 copias/uL plasma)</p>	<p>↑ [HK2]</p>	<p>Glucólisis anaeróbica</p>	<p>Hay un aumento de la producción de glucosa-6 fosfato, lactato y poco ATP.</p>	<p>Aumento de la proliferación celular y desarrollo de tumorigénesis.</p>

Tabla 7. Cambios de la concentración de productos del metabolismo de la glutamina regulados por miRNA-145.

Niveles de expresión	Enzimas	Ruta metabólica	Cambios	Efecto en cáncer
<p>↑ [MiR-145] Sobreexpresado, según los datos reportados por Conte <i>et al.</i>, 2015 ⁽⁷⁶⁾ miRNA/Cel-miR-39 (>1000 copias/μL de plasma)</p>	<p>↓ [GLS]</p>	<p>Glutaminólisis</p>	<p>Hay una disminución de la concentración de glutamato, alfa cetoglutarato y aspartato.</p>	<p>Disminuye el proceso de proliferación de células tumorales e inhibición de la metástasis.</p>
<p>[MiR-145] Normoexpresado miRNA/Cel-miR-39 (≥ 1 copia/uL plasma)</p>	<p>[GLS]</p>	<p>Glutaminólisis</p>	<p>La glutamina se transforma en glutamato y luego en alfa-cetoglutarato (α-KG). Finalmente hay producción de aspartato.</p>	<p>No hay un efecto demostrado en cáncer.</p>
<p>↓ [MiR-145] Subexpresado según los datos reportados por Murillo <i>et al.</i>, 2017 ⁽¹²⁾ (0-1 copias/uL plasma)</p>	<p>↑ [GLS]</p>	<p>Glutaminólisis</p>	<p>Hay un aumento de producción de glutamato, alfa cetoglutarato y aspartato.</p>	<p>Aumento de la proliferación celular y desarrollo de tumorigénesis.</p>

VI. DISCUSIÓN

El miRNA-145 tiene una función importante en diferentes procesos biológicos, principalmente en el ciclo celular, proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y supresor de múltiples oncogenes y tumores ⁽⁷¹⁾. La presencia del miRNA-145 en plasma permite ser utilizado como un posible biomarcador en la etapa de prevención, diagnóstico y tratamiento como terapia génica denominado oligonucleótido antisentido (Antagomir) o siRNA (Small Interference RNA) contra enfermedades crónicas como el cáncer en ensayos clínicos ^{(44), (107)}. Sin embargo, es necesario ampliar el estudio sobre la evaluación de los niveles de miRNA-145 en personas sin diagnóstico de cáncer para confirmar si efectivamente es un biomarcador en el diagnóstico temprano de cáncer de ovario como describe Li *et al.*, 2019 ⁽²⁹⁾ o en cáncer de mama como describe Murillo *et al.*, 2019 ⁽¹²⁾.

En relación con la evaluación de los niveles de expresión del miRNA-145, depende de los métodos empleados para la purificación y cuantificación, por ello se realizó la extracción de RNA total, incluyendo miRNAs según las condiciones descritas por el fabricante con el kit comercial miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemania) ⁽⁸⁸⁾, que contiene una membrana de sílica que permite una mejor filtración de miRNAs en comparación con otros métodos tradicionales ⁽⁹⁷⁾. Además, otra mejora para realizar el análisis está representado por la normalización a partir de un control exógeno o *spike-in control* (Cel-miR-39), que ofrece un punto de control adicional para el procesamiento y fiabilidad de los resultados ⁽¹²⁾.

El valor promedio de concentración y pureza del RNA extraído fue 31.63 ± 18.28 ng/ μ L, correspondiente a las condiciones del fabricante y reportados por Zhou *et al.*, 2015 ⁽⁹⁸⁾, donde el promedio de concentración y desviación estándar de RNA a partir de 200 μ L de plasma fue 31.23 ± 12.36 ng/ μ L en 109 personas aparentemente sanas sin diagnóstico de cáncer y adicionalmente, el ratio promedio de absorbancia A260/280 en la cuantificación en Nanodrop fue de 1.80 ± 0.21 , correspondientes a los resultados de diferentes protocolos de extracción de RNA a partir de plasma descrito por Moret *et al.*, 2013 ⁽⁹⁹⁾.

En el presente trabajo, el 100% (N=43) de las muestras presentaron valores de fluorescencia de VIC y/o FAM, demostrando una alta sensibilidad de detección con la técnica de PCR digital o dPCR correspondiente a los reportes de Borzi *et al.*, 2017 ⁽⁴³⁾. El método utilizado permite solo una cuantificación absoluta en un chip basado en un sistema de microfluídica ⁽¹⁰⁸⁾, en contraste con la PCR cuantitativa que emplea una curva estándar para medir los niveles de expresión del miRNA-145 ⁽⁷⁶⁾. Sin embargo, el 30.23% (N=13) solo amplificó para Cel-miR-39 (Anexo 10.6.), debido a su degradación mediante las enzimas RNAsas durante el proceso de recolección de la muestra ⁽¹⁰⁰⁾, cambios de temperatura o cambios de pH en plasma descrito por O'Brien *et al.*, 2018 ⁽⁶¹⁾.

En la Tabla 2, el valor del umbral de referencia de fluorescencia del ensayo VIC fue 1200 RFU (Unidades de fluorescencia relativa) considerando los 300 chips analizados con solo un ensayo (VIC), según los resultados reportados por Murillo *et al.*, 2017 ⁽¹²⁾. Sin embargo, el instrumento no puede realizar un análisis preciso cuando solo hay una fluorescencia, VIC o FAM, porque está configurado para elegir un umbral para cada sonda fluorescente descrito por Conte *et al.*, 2015 ⁽⁷⁶⁾ (Figura 12). El valor del umbral de FAM fue 3604.47 RFU considerando el promedio de los puntos más inferiores para cada uno de los chips analizados con la finalidad de evitar establecer los límites cerca de los puntos no amplificados (amarillos) presente en la figura 12, según la metodología reportada por Giannoni *et al.*, 2018 ⁽⁷⁹⁾.

El valor promedio de los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas fue $6,07 \pm 1,60$ copias/uL de plasma. Además, los valores de la mediana de los ensayos con fluorescente FAM (miRNA-145) y VIC (cel-miR-39) fueron 2,61 copias/uL de plasma y 1,15 copias/uL de plasma, respectivamente (Tabla 2). El valor del control exógeno Cel-miR-39 fueron correspondiente a los valores de detección $1,12 \pm 0.16$ copias/uL de plasma en PCR digital reportados por Cirillo *et al.*, 2020 ⁽¹²⁰⁾. Adicionalmente, los valores del ratio (miR145/Cel-miR-39) no presentaron una distribución normal ($W=0.723$), y los niveles del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas fueron mayores que los valores reportados en mujeres con cáncer de mama reportados por Murillo *et al.*, 2019 ⁽¹²⁾, y correspondiente a otros estudios evaluados a controles sanos comparados con

muestras de tejidos de pacientes con cáncer colorectal ⁽¹⁰¹⁾, cáncer cervical ⁽¹²⁷⁾, y enfermedad de arteria coronaria ⁽¹⁰²⁾.

En el presente trabajo se analizó *in silico* el impacto metabólico del miRNA-145 en cáncer, utilizando diferentes herramientas bioinformáticas descrito por Bastida *et al.*, 2016 ⁽¹²¹⁾. Primero se identificó la secuencia de miRNA-145 mediante un alineamiento múltiple de las 20 secuencias de pre-miRNA-145 en diferentes especies en el programa Bioedit (Figura 14) ⁽¹⁰⁴⁾, demostrando que existe una alta conservación evolutiva de la secuencia madura del miRNA-145 correspondiente a los datos reportados por Ye *et al.*, 2019 ⁽³⁵⁾ y registrados en miRBase (Anexo 10.7).

A partir de la secuencia obtenida en miRBase ⁽⁸⁰⁾, se analizaron modelos de predicción de estructura secundaria del pre-miRNA-145 mediante el cálculo de energía libre mínima (MFE) del plegamiento del pre-miRNA-145 ⁽⁹²⁾ y se identificaron las secuencias maduras del miRNA-145 en una región de menor probabilidad de formar dímero o “hairpin” entre su misma secuencia complementaria descrito por Mathews *et al.*, 2010 (Tabla 3) ⁽⁸¹⁾ y en la especie *Homo sapiens* presentó un valor de -41.10 kcal/mol ⁽⁹²⁾, correspondiente a los valores reportados principalmente en la clase Mammalia ⁽⁷⁴⁾ y presenta una sola hebra o cadena lineal (Figura 16) ⁽⁷¹⁾.

Luego de identificar la hebra de secuencia madura de miRNA-145, se realizó un análisis *in silico* de acoplamiento molecular entre el complejo formado entre miRNA-145, transcrito diana Homeobox A9 (*HOXA9*) y la proteína argonauta (AGO), donde los residuos de aminoácidos de la proteína argonauta se unieron mediante enlaces puente de hidrógeno con miRNA-145, como la arginina en la posición 615 (ARG 615), arginina posición 651 (ARG 651), fenilalanina posición 649 (PHE 649), se calculó una distancia de 3.1 Å, 3.6 Å y 5.8 Å (Tabla 4) en el programa Pymol, correspondiente a los valores reportados por Pritam *et al.*, 2015 ⁽⁹⁴⁾ en la Figura 15.B, demostrando una afinidad de unión entre el complejo y la región no traducida del transcrito diana *HOXA9* ⁽⁹⁴⁾ y también en otros transcritos diana, por ejemplo Hexoquinasa 2 y glutaminasa reportados en el programa TargetScan ⁽⁸⁴⁾, ⁽⁸⁶⁾ (Anexo 10.10.). Estos resultados describe las propiedades del miRNA-145 mediante las

interacciones intermoleculares reportado por Janas *et al.*, 2015 ⁽⁶⁴⁾. Sin embargo, es necesario ampliar el enfoque computacional mediante una simulación de dinámica molecular para evaluar la estabilidad del complejo miRNA-145-AGO2 y la secuencia 3 UTR del transcrito diana (Anexo 10.9.).

Se identificaron 35 transcritos diana del miRNA-145 en cáncer de mama y ovario, según su relación en las rutas metabólicas de la glucosa y glutamina utilizando las herramientas bioinformáticas miRWalk 2.0 ⁽¹²¹⁾ y miRTarBase v.8 ⁽⁹⁵⁾ (Tabla 5), y los datos fueron correspondientes a los transcritos diana reportados por Ye *et al.*, 2019 ⁽³⁵⁾ y Das *et al.*, 2015 ⁽⁷²⁾ (Anexo 10.8). Aunque el miRNA-145 no está reportado en las rutas de señalización de estadio temprano de cáncer de mama y cáncer de epitelio ovárico en el programa KEGG (Anexo 10.11) ⁽⁸⁵⁾, actualmente hay reportes de miRNA-145 presente en tejidos de glándulas mamarias publicados en miRTarbase descrito por Chou *et al.*, 2019 ⁽³⁾ y nuevos programas como miRViz, correspondiente a los datos experimentales de miRNA-145 reportados por Giroux *et al.*, 2019 ⁽¹¹⁹⁾.

Los niveles de miRNA-145 fueron subexpresado en tejidos tumorales ^{(14), (32), (71), (30)} y en plasma ⁽¹²⁾ reportado por Murillo *et al.*, 2019 ⁽¹²⁾ menos de 1 copia/uL de plasma (Tabla 6), y se demostraron cambios en las rutas de señalización mediante el aumento de los niveles de expresión de las proteínas N-RAS (Figura 17), que activa a las proteínas quinasas serina-treonina intracelulares del fibrosarcoma rápidamente acelerado (*RAF*). Asimismo, la activación de *RAF* desencadenó un proceso de fosforilación del receptor quinasa extracelular (*MEK*) y la quinasa regulada por señales extracelulares (*ERK*) ⁽³¹⁾ que finalmente regula a los factores de transcripción nucleares como la oncoproteína c-Myc (Figura 18), donde conduce un aumento excesivo de los procesos de proliferación celular y la tumorigénesis ^{(19), (20), (21)}.

Los niveles del miRNA-145 sobreexpresado, según los datos de referencia reportados por Conte *et al.*, 2015 ⁽⁷⁶⁾ fueron mayores a 1000 copias/ μ L de plasma descrito en la tabla 6 y 7. Además, según Wen *et al.*, 2019 ⁽¹⁴⁾ cumple un rol como

potencial supresor tumoral sobre el factor de transcripción proto-oncogen c-Myc⁽¹⁹⁾,⁽²⁰⁾,⁽²¹⁾, que regula aproximadamente el 40 % del proceso de desarrollo tumoral en tejidos de mama⁽¹⁴⁾, y además regula la expresión de genes hexoquinasa 2 (*HK2*) y glutaminasa (*GLS*) relacionados en el metabolismo de glucosa y metabolismo de glutamina, respectivamente (Figura 19). En células tumorales existe un cambio en el proceso de glucólisis anaeróbica y la disminución de la activación de c-Myc inhibe la expresión de la enzima HK2 y en consecuencia modifica la actividad de la enzima hexoquinasa 2 (*HK2*) en convertir la glucosa en glucosa-6 fosfato, a través de la fosforilación del grupo 6-hidroxilo de la glucosa, y finalmente produce pocas cantidades de lactato y ATP como describe Xu *et al.*, 2019⁽⁴⁰⁾. Entonces las células tumorales aumentaron la absorción de glucosa y otras vías alternativas como la glutamina para compensar esta disminución de energía reportado en KEGG⁽⁸⁵⁾ y Reactome⁽⁴⁹⁾,⁽⁵⁰⁾ (Anexo 10.13.).

La relación entre el miRNA-145 y su transcrito diana enzima glutaminasa (*GLS*) fueron identificados en el metabolismo de la glutamina o glutaminólisis que representa una segunda fuente de nutrientes en las células, porque proporciona sustratos para un aumento de producción de ácidos grasos y triglicéridos en el proceso de lipogénesis y biosíntesis de ácido nucleico que fueron fundamentales para mantener la alta tasa de proliferación celular en células tumorales⁽¹¹⁰⁾ basado en el reporte de Li *et al.*, 2019⁽²⁹⁾. La glutamina es el aminoácido más abundante en el plasma⁽¹¹¹⁾ y cuando ingresa a la célula tumoral, se convirtió en glutamato y luego en alfa-cetoglutarato (α -KG) por la enzima glutaminasa (*GLS*), glutamato deshidrogenasa (*GDH*) y otras enzimas, como glutamato piruvato transaminasa (*GPT*) para la producción de alanina y glutamato oxalacetato transaminasa (*GOT*) para la producción de aspartato (Tabla 7).

En este contexto, la variación de los niveles de miRNA-145 regula la expresión de *GLS*⁽¹¹⁰⁾, por lo tanto, existe una alteración en el metabolismo de la glutamina de las células tumorales (Tabla 7)⁽¹⁰⁷⁾. Si los niveles de miRNA-145 están subexpresado, entonces aumentaría la expresión del factor de transcripción c-Myc que activaría una mayor expresión de enzima *GLS* (Figura 19) y conduce a un

aumento en el proceso del catabolismo de la glutamina en cáncer de mama ⁽¹¹²⁾ y ovario ⁽¹¹³⁾ (Anexo 10.13.), correspondiente a los resultados de Zeng *et al.*, 2017, sobre un mayor consumo de glutamina, aumento de la producción de α -KG y los niveles de ATP en las células de colangiocarcinoma intrahepático (ICC). Estos reportes demostraron que existe una red reguladora del miRNA-145 y GLS que puede proporcionar una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de resistencia de medicamentos contra cáncer de mama ⁽¹⁰⁷⁾, ⁽¹⁰⁹⁾.

La ruta de señalización de los niveles de miRNA-145 y su regulación sobre la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) en el proceso de apoptosis todavía no está bien definido ⁽¹⁰⁶⁾. Sin embargo, Cha *et al.*, 2013 ⁽¹⁰⁵⁾, demostró que el miRNA-145 cumple un rol supresor sobre CaMKII en el proceso de activación de señalización causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios del flujo de Ca^{+2} intracelular que induce el proceso de apoptosis de cardiomiocitos (Figura 20) ⁽¹⁰⁵⁾. Por lo tanto, una sobreexpresión del CaMKII causa una sobrecarga de Ca^{+2} inducida por ROS y además aumentaría la secreción de cardioquinas dirigidas a órganos periféricos en respuesta a estrés o procesos inflamatorios en el miocardio ⁽²⁵⁾, ⁽¹¹⁴⁾. Estos datos confirmaron la importancia de considerar como una potencial terapia de reemplazo de miRNA-145 descrito por Wei *et al.*, 2019 ⁽²⁶⁾ dirigido a cardiopatías isquémicas y varios tipos de cáncer ⁽¹⁰⁵⁾ (Anexo 10.9.).

La figura 21 representa la relación entre el miRNA-145 y su regulación sobre la activación del factor de receptor de crecimiento epidermal (EGFR), y además presenta un rol importante en la glucólisis anaeróbica de las células de adenocarcinoma de pulmón descrito en el programa KEGG (Figura 21.B.) y las células de cáncer de mama, según Jung *et al.*, 2019 (Figura 21.A.) ⁽³⁰⁾. El miRNA-145 inhibe la activación de EGFR, entonces disminuye la producción de lactato, captación de glucosa y la tasa de acidificación extracelular inducida por glucosa (Tabla 6). Además, el análisis metabolómico descrito por Makinoshima *et al.*, 2014, confirmó que la producción de metabolitos fue reducida significativamente en la glucólisis, la vía de la pentosa fosfato y la biosíntesis de pirimidina ⁽¹¹⁸⁾.

Otro mecanismo en función de la expresión de EGFR está relacionada con una alta captación tumoral del análogo de glucosa, la fluorodesoxiglucosa (*FDG*) que incorporada a las células fueron fosforiladas por la enzima hexoquinasa 2 (*HK2*), por lo tanto, existe una relación entre los niveles subexpresado de miRNA-145 y un cambio en el flujo glucolítico mediante el aumento de la actividad de la enzima HK2 ^{(107), (30), (40)} (Tabla 6) y correspondiente a las rutas metabólicas reportadas en KEGG ⁽⁸⁵⁾ y Reactome ⁽⁵⁰⁾ (Anexo 10.13.).

En general los niveles de miRNA-145 desregulados fueron subexpresado o sobreexpresado, aunque según García *et al.*, 2020 ⁽⁷⁴⁾ incluye la categoría de valores normoexpresado en función a otras variables de clasificación, por ejemplo, subtipos de tumores con la finalidad de monitorear los cambios de expresión ⁽¹⁴⁾ y establecer umbrales de detección durante los diferentes estadios, y principalmente en personas sin diagnóstico de cáncer ⁽²²⁾. Además, no existe evidencia sobre los niveles normoexpresado del miRNA-145 y su efecto en cáncer descrito en las tablas 6 y 7, pero presentaron niveles de expresión variables y correspondiente a los valores reportados en controles ⁽¹²⁾ y mayores en promedio comparados con otros estudios de miRNA-145 subexpresado en cáncer de mama y ovario ^{(74), (29), (113)}.

Con los resultados de la investigación, se aporta en el conocimiento de los niveles del miRNA-145 en plasma y para mejorar los métodos de extracción, detección y cuantificación con la técnica dPCR, y también el impacto metabólico en cáncer analizado *in silico* con diferentes herramientas bioinformáticas.

VII. CONCLUSIONES

- Los niveles del miRNA-145 circulante en plasma en esta muestra de mujeres peruanas entre 20 y 67 años, sin diagnóstico de cáncer y residentes en Lima fueron mayores que los valores reportados en estudios en cáncer de mama.
- En el análisis *in silico* se identificaron 35 transcritos diana los cuales pertenecen a las rutas de señalización y metabólicas asociado a la variación de los niveles de miRNA-145 en cáncer de mama y ovario.
- La variación de los niveles de miRNA-145 tienen un impacto en el metabolismo de la glucosa y la glutamina, evidenciado por el análisis *in silico* de datos de expresión génica en cáncer de mama y ovario, principalmente en las funciones de las enzimas hexoquinasa 2 (*HK2*) y glutaminasa (*GLS*).

VIII. RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios del miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y su relación con parámetros bioquímicos (niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos) y otros factores que determinen la variación de los niveles de expresión.
- Se recomienda ampliar el estudio del miRNA-145 circulante en plasma como posible biomarcador de diagnóstico y pronóstico en una muestra de mujeres con diferentes estadios de cáncer de mama y cáncer de ovario.
- Realizar un análisis *in silico* comparativo entre el miRNA-145 y otros miRNAs a nivel epigenómico, proteómico y metabolómico en cáncer de mama y cáncer de ovario.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chuang J, Jones P. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res.*2007; 5(2):24-29.
2. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10): 1712.
3. Chou C, Shrestha S, Yang C. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *NAR* 46(1): 296-302.
4. Stahlut C, Slack F. The role of microRNAs in Cancer. *Yale J Biol Med.* 2006 Dec; 79 (3-4): 131-140.
5. Buleje, J, Guevara M, Acosta O, Huaman F, Danos; P. Mutational analysis of BCRA1 and BRCA2 in peruvian families with hereditary breast and ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med.* 2017; 5(5): 481-484.
6. Zafra J, Tenorio J, Villarreal D, Carrillo R y Bernabe A. Cancer related mortality in Peru: Trends from 2003 to 2016. *Plos One.* 2020.
7. Nevin P, Blas M, Bayer A, Rao D, Molina Y. Positive Cancer Care in Peru: Patient and Provider Perspectives. *Health Care Women Int.* 2019; 15:1-14.
8. Ma J, Li N, Guarnera M, Jiang F. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. *Biomark.* 2013; 8: 127-136.
9. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol.* 2011; 39(2): 409-415.
10. Zhi H, Huang H, Wu C, Jung M. Omics based molecular target and biomarker identification. *Meth Mol Biol* 2011; 719: 547-571.
11. Tarang S, Weston M. Macros in microRNA target identification: A comparative analysis of *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* approaches to microRNA target identification. *RNA Biol*; 2014, 11: 324-333.
12. Murillo A. Evaluation of Plasma miRNAs for early diagnosis of breast cancer. En: *Conceitos Basicos de Genética.* Atena Editora; 2019.

13. Etchegaray J, Mostoslavsky R. Interplay between metabolism and epigenetics: a nuclear adaptation to environmental changes. *Mol Cell*. 2016; 62 (5):695-711.
14. Wen X, Zhen L, Fei D, Wang D. miR-145: a potential biomarker of cancer migration and invasion. *Am J Transl Res* 2019; 11 (11): 6739-6753.
15. Buleje J, Ponce J, Guevara M, Murillo A, Fujita R. Acidos nucleicos tumorales circulantes en plasma como nuevo método no invasivo para detección y monitoreo de cancer. *Carcinos*, 2016; (1): 39-45
16. Ostefeld MS, Bramsen JB, Lamy P. miR-145 induces caspase dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in TA bladder tumors. *Oncogene*. 2010; 29(7):1073–1084.
17. Ta T, Nguyen Q, Chu H, Long V. RAS/RAF mutations and their associations with epigenetic alterations for distinct pathways in Vietnamese colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2019.
18. Sachdeva M, Zhu S, Wu F. Represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad. Sci USA*. 2009; 106: 3207–12.
19. Zhang W, Wang Q, Yu M. MicroRNA-145 function as a cell growth repressor by directly targeting c-Myc in human ovarian cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2014; 13: 161–8.
20. Shao Y, Qu Y, Dang S. MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6. *Cancer Cell Int*. 2013; 13: 51.
21. Dynoodt P, Speeckaert R, De Wever O. miR-145 overexpression suppresses the migration and invasion of metastatic melanoma cells. *Int J Oncol*. 2013; 42:1443–51.
22. Pedroza A, Romero S, Justo M. MicroRNAs in Tumor Cell Metabolism: Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Oncol*. 2019; (9): 1404.
23. Gao P, Xing AY, Zhou GY, et al. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer. *Oncogene*. 2013; 32: 491–501.
24. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2: Roles in Signaling and Pathophysiology. *J Biol Chem*. 2012. 14; 287(38): 31658-31665.

25. Harada M, Luo X, Murohara T. MicroRNA Regulation and Cardiac Calcium Signaling Role in Cardiac Disease and Therapeutic Potential. *Circ Res.* 2014; 14: 689-705.
26. Wei S, Paoletti C, Campisi M, Osaki T. MicroRNA delivery through nanoparticles. *J Control Release.* 2019; (313): 80-95.
27. Yamada N, Noguchi S, Mori T. Tumor-suppressive microRNA-145 targets catenin delta-1 to regulate Wnt/beta-catenin signaling in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2013; 335: 332–42.
28. Arndt GM, Dossey L, Cullen LM. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2009; (9): 374.
29. Li J, Wu L, Pei M, Jiang Y. miR-145 inhibits glutamine metabolism through c-myc/GLS1 pathways in ovarian cancer cells. *Cell Biol Int.* 2019 ; (43):921-930.
30. Jung K, Lee E, Park J. EGF receptor stimulation shifts breast cancer cell glucose metabolism towards glycolytic flux through PI3 kinase signaling. *PLoS One.* 2019; 14 (9): e0221294.
31. Sachdeva M, Mo Yin. MiRNA-145 mediated suppression of cell growth invasion and metastasis. *Am J Transl Res* 2010; 2 (2): 170-180.
32. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 7065–70.
33. Sempere LF, Christensen M, Silahdaroglu A. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 11612–20.
34. Bockmeyer CL, Christgen M, Muller M. MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 130: 735–45.
35. Ye D, Shen Z, Zhou S. Function of microRNA-145 and mechanisms underlying its role in malignant tumor diagnosis and treatment. *Cancer Manag Res.* 2019; (11): 969-979.
36. Huang L, Lin JX, Yu YH. Downregulation of six microRNAs is associated with advanced stage, lymph node metastasis and poor prognosis in small cell carcinoma of the cervix. *PLoS One.* 2012; 7:33762.

37. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol.* 2011; 39: 409–15.
38. Zhang J, Zhang K, Bi M, et al. Circulating microRNA expressions in colorectal cancer as predictors of response to chemotherapy. *Anticancer Drugs.* 2014; 25: 346–52.
39. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L. Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers.* 2009; 26: 27–34.
40. Xu Q, Liu Z, Qian X, Deng F. MiR-145: a potential biomarker of cancer migration and invasion. *Am J Transl Res.* 2019; 11(11): 6739-6753.
41. Stass A, Magen I, Brooks T. Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA Biol.* 2018; 15(8): 1133-1145.
42. Donati S. Human Circulating miRNAs Real-time q RT-PCR based Analysis: An Overview of Endogenous Reference Genes Used for Data Normalization. *Int J Mol Sci.* 2019. 20(18): 4353.
43. Borzi C, Calzolari L, Conte D, Sozzi G. Detection of microRNAs using Chip Based QuantStudio 3D Digital PCR. *Digital PCR for miRNA Detection. Methods Mol Biol.* 2017; (16): 239-245.
44. Bajan S. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells* 2020; (9): 137.
45. Ajay F, Raman P, Gunpreet K. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy, *Perspect Clin Res.* 2016; 7(2):68-72.
46. Kim S, Oh J, Shin J. Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *J Control Release.* 2011; (155): 427–34.
47. Peng W, Hu J, Zhu XD. Overexpression of miR-145 increases the sensitivity of vemurafenib in drug-resistant colo205 cell line. *Tumour Biol.* 2014; 35: 2983–8.
48. Goodsell D, Jenkinson J. Molecular Illustration in Research and Education: Past, Present, and Future. *J Mol Biol.* 2018; 430(21): 3969-3981.

49. Stoesser G, Baker W, Van den Broek, Camon E. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 1; 30(1): 21-26.
50. Yan P, He Y, Xie K, Kong S. *In silico* analyses for potential key genes associated with gastric cancer. *Peer.* 2018 ; (6): 6092.
51. Villaamil V, Gallego G, Cainzos I, Ayerbes M, Aparicio L. State of the Art *in Silico* Tools for the Study of Signaling Pathways in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13 (6): 6561-6581.
52. Sykes P, Neoh S, Brisco M, Hughes E, Condon J, Morley A. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques.* 1992 (13):444–449.
53. Xia J, Guo X and Deng K. Epigenetics, MicroRNAs and Human Cancer. Babashah 2014. (2): 30-51.
54. Mitchell P, Parkin R, Kroh E, Fritz B, Wyman S, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad USA.* 2008, 105 (30):10513–8.
55. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000; 408(6808):86–89.
56. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75(5):843–54.
57. Denli A, Tops B, Plasterk R, Ketting R, Hannon G. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature;* 2004 432:231–235.
58. Han J, Lee Y, Yeom K, Nam J, Heo I, Rhee J, Sohn S, Cho Y, Zhang B-T, Kim V. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the DroshaDGCR8 complex; 2006. *Cell* 125:887–901.
59. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen B. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development,* 2003 17:3011–3016.
60. Havens M, Reich A, Duelli D, Hastings. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids;* 2012. *Res:* 1–15.

61. O'Brien, Hayder Heyam, Zayed Yara and Peng Chun. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol.* 2018; (9):402.
62. Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira ME, Barcinski MA. Tumor derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett.* 2009; 283:168–175.
63. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010, 285:17442–17452.
64. Janas T, Janas M, Sapon K. Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS* 589. 2015; 1391-1398.
65. Pigati L, Yaddanapudi S, Kim D, Hearn S, Danforth D. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PloS One.* 2010; 5(10): 13515.
66. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B: Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011; (39): 7223-7233.
67. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, Miller K, Stephan C, Jung K. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urol Oncol.* 2010; 28:4–13.
68. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004; 304:594–596.
69. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 2004; 101(9):2999–3004.
70. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001; 294(5543):853–858.
71. Yun S, Wang R, Chen L. MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *J Cell Mol. Med.* 2014; 18(10): 1913-1926.

72. Das A, Pillai R. Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Das and Pillai Cancer Cell Int.* 2015;15:92.
73. Lagos M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology.* 2002; (12): 735-739.
74. Garcia A, Lopez B, Fajardo C, Camara R. Increased E2F1 mRNA and miR-17-5p expression is correlated to Invasiveness and Proliferation of Pituitary Neuroendocrine Tumours. *Diagnostics* 2020 ;(10):1-13.
75. Dean L. Blood groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information; 2005.
76. Conte D, Verri C, Borzi C. Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR. *BMC Genomics.* 2015; 23: 849.
77. Mensah M, Borzi C, Verri C. MicroRNA Based Liquid Biopsy: The Experience of the Plasma miRNA Signature Classifier (MSC) for Lung Cancer Screening. *J Vis Exp.* 2017; (128): 56326.
78. Murillo A. Evaluación de los niveles de DNA circulante en plasma de pacientes con cáncer de mama por PCR digital. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
79. Giannoni S. Evaluación de mutaciones en el gen PIK3CA en tumor y plasma de pacientes peruanas con cáncer de mama mediante PCR digital Lima 2016-2017: Análisis de sensibilidad y nivel de concordancia. [Tesis]. Lima: Universidad San Martin de Porres; 2018.
80. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; 39 (1):152–7.
81. Mathews D, Moss W. Folding and Finding RNA Secondary Structure. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(12): a003665.
82. Isaac B. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 2005; 579 (26):5904–10.
83. Friedlander MR, Chen W, Adamidi C. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotech* 2008;26(4):407–15.
84. Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou AG. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Meth* 2006; 3 (11):881–6.

85. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2017; (4): 45.
86. Bing L, Li J, Cairns M. Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform.* 2014; 15(1): 1-19.
87. Whichard Z, Motter A, Stein P, Corey S. Slowly Produced MicroRNAs Control Protein Levels. *The Journal of Biological Chemistry* vol 286, NO, 6, pp. 4742-4748.
88. Qiagen. MiRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit. Disponible en: <https://www.qiagen.com/au/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/cell-free-rna/mirneasy-serum-plasma-advanced-kit/#orderinginformation>.
89. Mishra P, Pandey C, Singh U, Gupta A. Descriptive Statistics and Normality Tests for Statistical Data. *Ann Card Anaesth.* 2019; 22 (1): 67-72.
90. Viti A, Terzi A and Bertolaccini. A practical overview on probability distributions. *J Thorac Dis.* 2015; 7 (3).
91. Lorenz R, Bernhart S, Siederdisen C, Tafer H. Vienna RNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.* 2011; 6: 26.
92. Zucker M, Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* 1981; (9): 133-148.
93. Rehmsmeier M, Steffen P. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 2004; 10(10): 1507- 1517.
94. Pritam R, Konkimalla B, Rath S, Hansa J. Elucidation of the Molecular Interaction between miRNAs and the HOXA9 Gene, Involved in Acute Myeloid Leukemia, by the Assistance of Argonaute Protein through a Computational Approach. *Genomics and Informatics.* 2015; 13 (2): 45-52.
95. Huang H, Lin Y, Li J, Huang K, Shrestha S. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Research.* 2020; (48): 148-154.
96. Wang K. Epigenomics – Technologies and Applications. *Circ Res.* 2018. 27; 122 (9): 1191-1199.
97. Monleau M, Bonnel S. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics.* 2014; 15 (1): 395.

98. Zhou X, Zhu W, Wen W, Cheng W. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. 2015. *Nature Scientific Reports* 5: 11251.
99. Moret I. Assessing an Improved Protocol for Plasma microRNA Extraction. *Plos One*. 2013; 8 (12).
100. Vidaurre T, Santos C, Gomez H. The implementation of the Plan Esperanza and response to the imPACT Review. *Lancet Oncol*. 2017; 18(10): 595-606.
101. Faccini J, Ruidavets J, Cordelier P. Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Sci Rep* 2017; 7: 42916.
102. Satoh J. MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer's disease from Publica Data. *Biomark Insights*. 2015. (10): 21-31.
103. Padmashree D, Ramachandraswamy N. Identification and characterization of conserved miRNAs with its targets mRNA in *Trichinella Spiralis*. *Bioinformatics*. 2016; 12 (5): 279-284.
104. Cha M, Jan J, Song B, Lee C. MicroRNA-145 suppresses ROS-induced Ca²⁺ overload of cardiomyocytes by targeting CaMKII. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013. 720-726.
105. Zhang C. MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology: a new therapeutic target for vascular disease, *Cell Cycle* 8. 2009; 3469–3473.
106. Quan Y, Huang X, Quan X. Expression of miRNA-206 and miRNA-145 in breast cancer and correlation with prognosis. *Oncol Lett*. 2018; 16 (5): 6638-6642.
107. Majumdar N, Banerjee S, Pallas M, Wessel T, Hegerich P. Poisson Plus Quantification for Digital PCR Systems. *Sci Rep*. 2017. (7): 9617.
108. Zheng B, Ye H, Chen J, Cheng D, Cai C, Chen G. LncRNA TUG1 sponges miR-145 to promote cancer progression and regulate glutamine metabolism via Sirt3/GDH axis. *Oncotarget*. 2017. 8(69): 113650-113661
109. Cluntun A, Lukey M, Cerione R, Locasale J. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer*. 2017; 3(3): 169-180.
110. Choi Y, Park K. Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. *Biomol Ther*. 2018; 26 (1): 19-28.

111. Cha Y, Kim E, Koo J. Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (3): 907.
112. Yang L, Moss T, Mangala L. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Mol Sys Biol.* 2014; 10(5): 728.
113. Planavila A, Fernandez J, Villarroya F. Cardiokines as Modulators of Stress-Induced Cardiac disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017. (108): 227-256.
114. Ikeda S, Matsushima S, Okabe K, Ikeda M, Ishikita A. Blockade of L-type Ca^{+2} channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of CaMKII-NF-kb pathway. *Nature.* 2019; (9): 9850.
115. Khan K, Patel J. Schaefer T. Nifedipine. *Stat Pearls.* 2020.
116. Nassal D, Gratz D, Hund T. Challenges and Opportunities for Therapeutic Targeting of Calmodulin Kinase II in Heart. *Front Pharmacol.* 2020; (11): 35.
117. Makinoshima H, Takita M, Matsumoto S, Yagishita A, Owada S, Esumi H, Tsuchihara K. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Regulates Global Metabolic Pathways in EGFR-mutated Lung Adenocarcinoma. *J Biol Chem.* 2014. (30): 20813-20823.
118. Giroux P, Bhajun R, Segard S, Picquetot C. miRViz: a novel webserver application to visualize and interpret microRNA datasets. 2019.
119. Cirillo P, Margiotti K, Mesoraca A, Giorlandino C. Quantification of circulating microRNAs by droplet digital PCR for cancer detection. *BMC Res.* 2020, (13): 351.
120. Bastida V. Técnicas de aprendizaje automático para predicción de dianas de microRNA (Tesis). Sevilla: Universidad de Sevilla; 2016
121. Zeinali T, Mansoori B, Mohammadi A. Regulatory mechanism of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis. *Biomed and Pharmacother.* 2019; (109): 195-207.
122. Xu J, Li F, Fen Q. Identification of MicroRNA Precursors Machine and String Kernel. *Geno. Prot. Bioinfo.* 2008; (6): 121-128.

X. ANEXOS

10.1. Consentimiento, ficha de registro



La Molina, 23 de junio de 2015

Oficio No. 826 - 2015 - CIEI-USMP-CCM

Señor Doctor
José Luis Buleje Sono
Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina Humana - USMP
Presente

Ref. Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la **sesión del 22 de junio evaluó y aprobó** los siguientes documentos:

- Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."
- Hoja Informativa para el Paciente

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CadeM

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ESTUDIO GENÉTICO:

Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.

Nombre:
Fecha: Edad:
DNI: Teléfono: No de Registro:
Médico tratante:
Hospital Referencia:

He recibido información de forma verbal y escrita sobre el proyecto **Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.**

De acuerdo a esta información he entendido que:

- 1.- Se me va a extraer una muestra de sangre periférica para realizar un estudio genético.
- 2.- El objetivo de dicho estudio es analizar los genes que están implicados en el cáncer, su respuesta a tratamiento y pronóstico.
- 3.- Los resultados del estudio no influirán en el manejo de la enfermedad.
- 4.- Se guardará la confidencialidad de los resultados del estudio, pudiéndose utilizar los datos de forma anónima para estudios epidemiológicos.
- 5.- Si creo conveniente, puedo anular el consentimiento así como solicitar que se destruyan las muestras extraídas.

Leído el documento **CONSIENTO** que se me extraiga una muestra para realizar el estudio genético.

Lima, _____ de _____ del 201_

Firma del paciente

Firma del Investigador



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica Ceda



10.2 Anexo. Materiales, reactivos y equipos

1. Materiales

- Micropipetas de 5 uL, 10 uL, 100 uL y 1000 uL de capacidad
- Tubos Eppendorf
- Guantes de nitrilo
- Tips estériles
- Chips dPCR QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K v.2.0 (Applied Biosystems™)

2. Reactivos

- Kit miRNeasy Serum/Plasma Qiagen
- Kit miRNeasy Serum/Plasma Spike in control (cel miR-39) Qiagen
- Kit TaqMan advanced miRNA cDNA Synthesis kit Thermo Fisher Scientific.
- TaqMan® Advanced miRNA Assays Reporter dye: VIC™
- TaqMan® Advanced miRNA Assays Reporter dye: FAM™
- Solución Master Mix QuantStudio™ 3D Digital PCR v.2.0 (Applied Biosystems™)
- Cloroformo
- Etanol (70%, 80%, 96% y 100 %)

3. Equipos

- Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- Termociclador Sistema PCR digital QuantStudio 3D Thermo Fisher
- Micropipetas: 10, 100 y 1000 uL.
- Congeladora -80 °C (ThermoScientific™)
- Sellador chips QuantStudio™ 3D (Applied Biosystems™)
- Equipo lector chips QuantStudio™ 3D (Applied Biosystems™)
- Microcentrifuga refrigerada Eppendorf580R

10. 3. Procedimientos de extracción de ARN

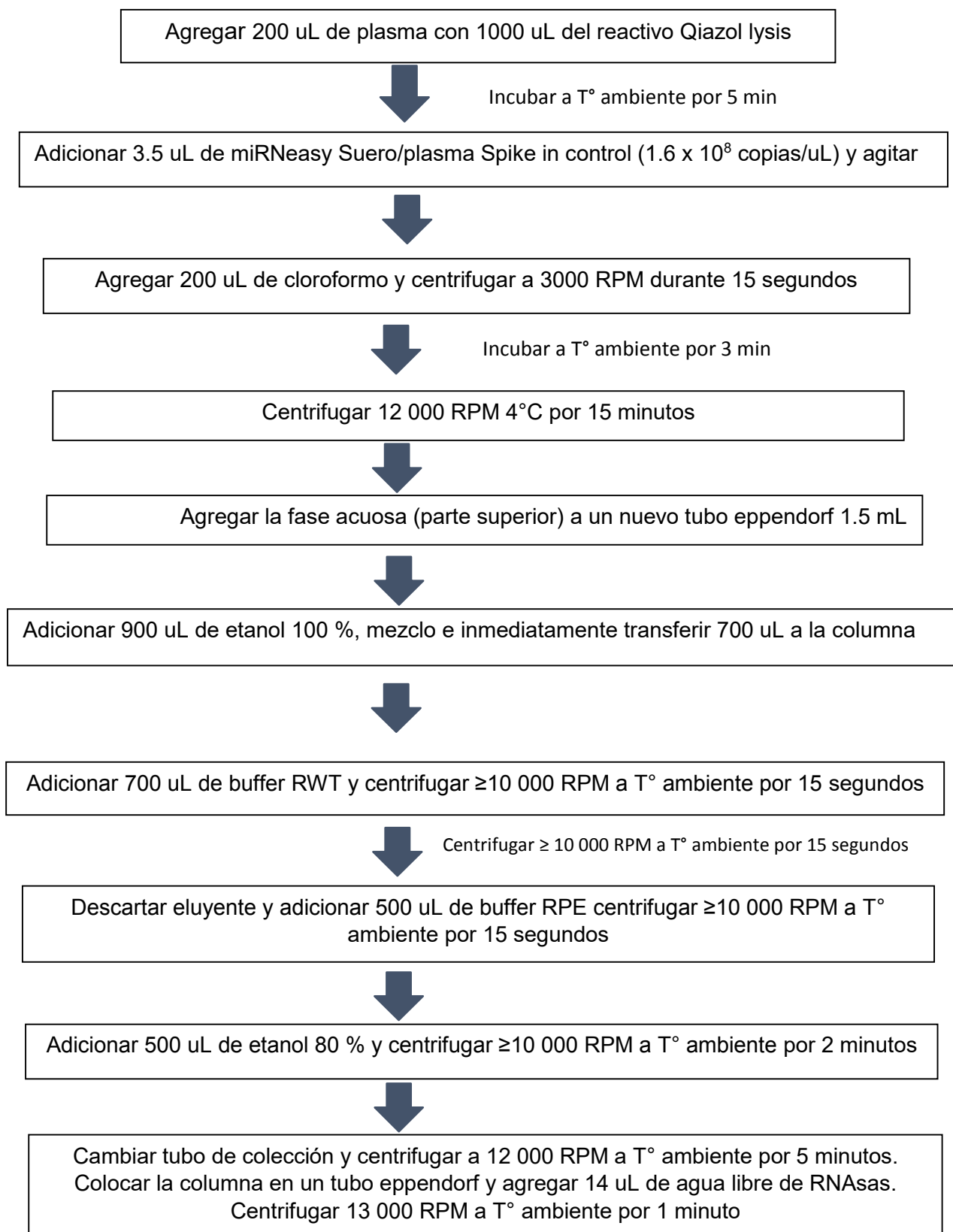


Figura 22. Protocolo de extracción de ARN total ⁽⁸⁸⁾.

10.4. Procedimientos de conversión a cDNA

Adición de Poly(A)

1. En un tubo de 0.2 mL se preparó cantidad suficiente del mix de reacción Poly(A), luego centrifugó a 5000 RPM durante 5 segundos para 43 muestras.
2. Los volúmenes preparados incluyen 10 % del promedio para una reacción (Tabla 1).

Tabla 8. Componentes en la etapa de Poliadenilación

Componentes	Cantidad para 1 Rx	Cantidad para 43 Rxns
10X Poly(A) Buffer	0.5 uL	23.65 uL
ATP	0.5 uL	23.65 uL
Enzima Poly(A)	0.3 uL	14.19 uL
Agua libre de RNAsas	1.7 uL	80.41 uL
Volumen total del mix de reacción Poly(A)	3 uL	141.9 uL

3. Se agregó 3.7 uL de muestra en cada tubo de reacción, luego se transfiere 3 uL del mix de reacción de Poly(A).
4. Se cerró la tapa del tubo de reacción y se centrifugó a 5000 RPM durante 5 segundos.
5. Se centrifugó el tubo de reacción a 2000 RPM durante 3 segundos para eliminar las burbujas de aire.
6. Los tubos de reacción fueron colocados en el termociclador e incubó siguiendo los controles de temperatura (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de temperatura en la etapa de Poliadenilación

Pasos	Temperatura	Tiempo
Poliadenilación	37 °C	45 minutos
Stop reaction	65 °C	10 minutos
Hold	4 °C	Hold

Proceder inmediatamente a la reacción de ligación de adaptadores

Reacción de ligación de adaptadores

1. En un tubo eppendorf de 0.6 mL se preparó suficiente Mix de reacción de ligación de adaptadores agregando un 10% por cada componente de reacción para 43 muestras (Tabla 10).

Tabla 10. Componentes en la etapa de ligación de adaptadores

Componentes	1 Rxn	43 Rxns
5X DNA Ligase Buffer	3 uL	141.9 uL
50% PEG 8000	4.5 uL	212.85 uL
25X Ligación de adaptador	0.6 uL	28.38 uL
RNA ligasa	1.5 uL	70.95 uL
Agua libre de RNasa	0.4 uL	18.92 uL
Reacción total de ligación Volumen total	10 uL	473 uL

2. Se mezcló el mix de reacción de ligación de adaptadores, luego se centrifugó a 2000 RPM durante 3 segundos.
3. Se agregó 10 uL de mix de reacción de ligación para cada tubo que contiene 6.7 uL de la muestra del producto e reacción de poly(A). El volumen total es 16.7 uL por tubo.
4. Se cerró la tapa del tubo y luego se mezcló el mix del procedimiento 3.

- Se centrifugó 2000 RPM durante 3 segundos.
- Los tubos de reacción fueron colocados en el termociclador, luego se incubó siguiendo las condiciones de temperatura (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones de temperatura en la etapa de ligación de adaptadores

Pasos	Temperatura	Tiempo
Ligación	16°C	60 minutos
Hold	4°C	Hold

Proceder inmediatamente a la reacción de transcripción reversa.

Transcripción reversa

- En un tubo eppendorf de 2 mL se preparó suficiente RT Mix de reacción agregando un 10% por cada componente de reacción para 43 muestras (Tabla 12).

Tabla 12. Componentes en la etapa de Transcripción reversa.

Componentes	1 Rxn	43 Rxns
5X RT Buffer	6 uL	283.8 uL
d NTP mix (25 m M)	1.2 uL	56.76 uL
20 X Universal RT primer	1.5 uL	70.95
10 X RT mix enzima	3 uL	141.9 uL
Agua libre de RNAsas	3.3 uL	156.09 uL
Volumen total	15 uL	709.5 uL

- Se mezcló el mix de reacción de RT, luego centrifugó cuidadosamente el contenido y eliminó las burbujas de aire.

3. Se agregó 15 uL de RT Mix de reacción para cada tubo de reacción conteniendo previamente 16.7 uL de la muestra del producto de ligación de reacción. El volumen total es 31.7 uL por tubo.
4. Se cerró la tapa del tubo y luego se centrifugó el mix a 2000 RPM durante 3 segundos.
5. Los tubos de reacción fueron colocados en el termociclador, luego se incubó siguiendo las condiciones de temperatura (Tabla 13).

Tabla 13. Condiciones de temperatura en la etapa de Transcripción reversa.

Pasos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	42°C	15 minutos
Stop reaction	85°C	5 minutos
Hold	4°C	Hold

Procedió inmediatamente a la reacción de miRNA-Amp. Sin embargo, el producto de reacción se puede conservar a una temperatura de -20°C durante 2 meses.

Reacción miRNA-Amp

1. En un tubo eppendorf de 0.6 mL se preparó suficiente cantidad de miR-Amp Reaction Mix para 43 muestras.

Tabla 14. Componentes en la etapa de reacción miRNA-Amp

Componentes	1 Rxn	43 Rxns
2X miR-Amp Master Mix	25 uL	1.182 uL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 uL	118.25 uL
Agua libre de RNAsas	17.5 uL	827.75 uL
Total RT Reaction Mix volume	45 uL	2.128 uL

2. Se mezcló el mix de reacción miR-Amp, luego se centrifugó el contenido a 3000 RPM durante 4 segundos.
3. Se agregó 45 uL de miR-Amp Reaction Mix para cada tubo de reacción.
4. Se agregó 5 uL del producto de la reacción de RT. El volumen total fue 50 uL por tubo.
5. Se cerró la tapa del tubo y luego se centrifugó 3000 RPM durante 4 segundos.
6. Los tubos de reacción fueron colocados en el termociclador, luego se incubó siguiendo las condiciones de temperatura (Tabla 15).

Tabla 15. Condiciones de temperatura en la etapa de Reacción de miRNA-Amp

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	15 minutos	1
Desnaturalización	95°C	3 segundos	14
Alineamiento/Extensión	60°C	30 segundos	
Stop reacción	99°C	10 minutos	1
Hold	4°C	Hold	1

El producto de reacción de miR-Amp reacción se puede almacenar a -20°C durante 2 meses.

10.5. Cuantificación de miRNAs convertidos

Tabla 16. Componentes en la etapa de PCR digital.

Componentes	Cantidad
Master Mix dPCR	7.5 uL
Sonda FAM (miRNA-145)	0.75 uL
Sonda VIC (Cel-miR-39)	0.75 uL
cDNA (Dilución del miR producto)	2.26 uL
Agua libre de RNasas	3.74 uL
Total	15 uL

Condiciones de dPCR

Se realizó ensayos de detección del cDNA que expresa miRNA-145 y Cel-miR-39 siguiendo las condiciones de PCR digital (Tabla 17).

Tabla 17. Condiciones de PCR digital

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	96°C	10 minutos	1
Alineamiento	56°C	2 minutos	40
Elongación	98°C	30 segundos	
Extensión	60°C	2 minutos	1
Stop reaction	10°C	10 minutos	1

10.6. Gráficas de PCR digital

Los puntos azules corresponden a FAM que mide los niveles del miRNA-145, y los puntos rojos corresponden a VIC o niveles del Cel-miRNA-39 y los puntos amarillos a los no amplificados.

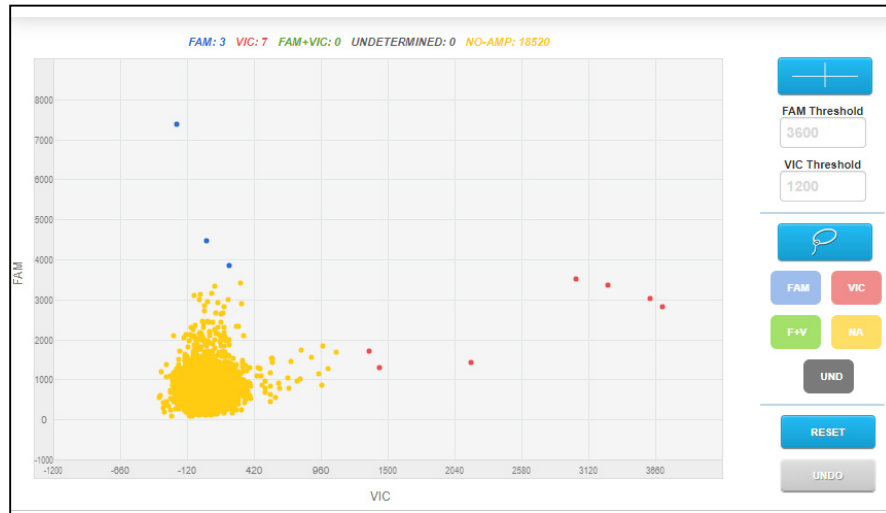


Figura 23. Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente C104R2 (Chip ID: D026D8).

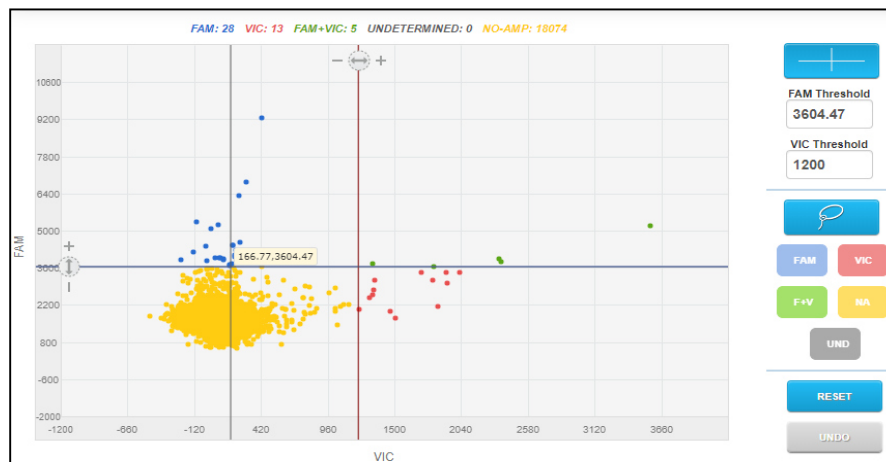


Figura 24. Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software para establecer los límites de los ensayos FAM (azul) y VIC (rojo) para miRNA-145 y Cel-miR-39, respectivamente.

Grafica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente C104R2 (Chip ID: D01M0T) para evaluar los niveles de miRNA-145. Para calcular el eje de FAM, se utilizó el valor 3604.47 y para VIC fue 1200 RFU.

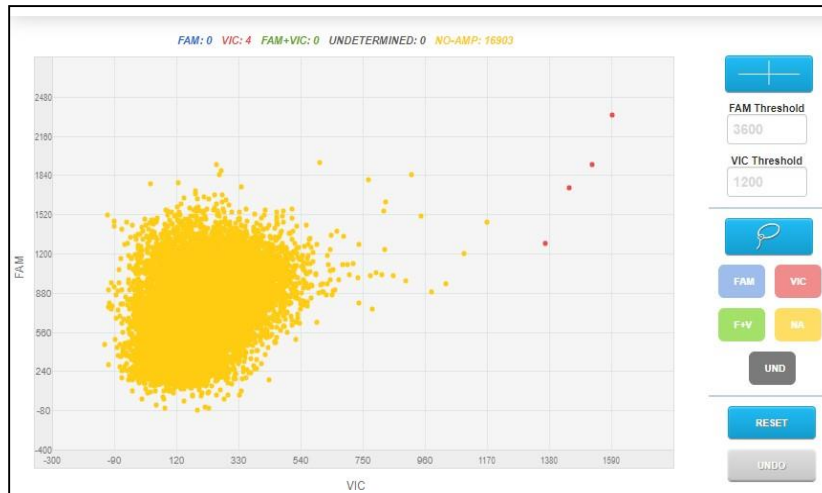


Figura 25. Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente C0FSYE (Chip ID: C093R2).

10.7. Tabla de secuencias de pre-miRNA-145 en diferentes especies

En la tabla 18, se obtiene el 70% de las secuencias candidatas obtiene una secuencia conservativa en diferentes especies.

Tabla 18. Tabla de secuencias de pre-miRNA-145 obtenido de miRBase. La región sombreada corresponde a la secuencia madura del miRNA-145 humano y el valor de MFE (kcal/mol) de plegamiento de su estructura secundaria.

Especie	Secuencia miRNA-145	MFE (-kcal/mol)
<i>Homo sapiens</i> hsa-mir-145	CACCUUGUCCUCACG GUCCAGUUUUUCCCAGGAAUCCCU UAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUU GAGGUCAUGGUU	-41.10
<i>Astatotilapia burtoni</i> abu-mir-145	GUCCAGUUUUUCCCAGGAAUCCCU UGACCUAUCAGAAAG GGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUU	-26.90
<i>Anolis carolinensis</i> aca-mir-145	UACUGUGUCCUCGGG GUCCAGUUUUUCCCAGGAAUCCCU UAGAUGAUAAAGAGGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUU GGGUCAUGGCUCAGCAACU	-42.50
<i>Equus caballus</i> eca-mir-145	CUCACG GUCCAGUUUUUCCCAGGAAUCCCU UAGAUGCUA AGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUUGAG	-30.30
<i>Danio rerio</i> dre-mir-145	UCAGUCUUCAUCAUUUCCUCAUCCCCGGG GUCCAGUUUU UCCCAGGAAUCCCU UGGGCAAUCGAAAGGGGGAUUCUU GGAAAUACUGUUCUUUGGGGUUGGGGCUGGACUACUGA	-51.70

<i>Gadus morhua</i> gmo-mir-145	GUCCAGUUU <u>UCCAGGAAUCCCU</u> UGUUGAACAUCAAAG CGGGAUCCUGGAAAUACUGUUCU	-25.20
<i>Chrysemys picta</i> cpi-mir-145	GUGUCCUCAGG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGG CACUAUGACGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UAGG CCAUGGCUCAGCAGCU	-41.20
<i>Pan paniscus</i> ppa-mir-145	<u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGAUGCUAAGAUGG GGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u>	-26.00
<i>Alligator mississippiensis</i> ami-mir-145	UGCUGUGUCCUCAGG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UGGGCACUGUGUUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> GGGGCCGUGGCUCAG	-43.30
<i>Microcebus murinus</i> mmr-mir-145	<u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGAUGCUAAGAUGG GGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u>	-26.00
<i>Gallus gallus</i> gga-mir-145	CGUGCUCUCAGG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAG GCGCUACGUUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UGGG GCCACGGCU	-43.10
<i>Rattus norvegicus</i> rno-mir-145	CACCUUGUCCUCACG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UGGAUGCUAAGAUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> GAGGUCAUGGCU	-39.90
<i>Ophiophagus hannah</i> oha-mir-145	UCGGG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGAAGAUAA GAAGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UGGGGUC	-31.00
<i>Oryzias latipes</i> ola-mir-145	<u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UGGGCUGUCAAAAAA GGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGAU</u>	-27.70
<i>Python bivittatus</i> pbv-mir-145	ACUAUGUCCUCGGG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> U AGAUGCUAAGAAGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UG GGUCAUGGCUC	-43.60
<i>Columba livia</i> cli-mir-145	CCGUGCCCUCAGG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UA GGCGCUACGUUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UGA GGCCACGG	-48.50
<i>Canis familiaris</i> cfa-mir-145	UGUCCUCACG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGAU GCUAAGAUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UGAGGU CAUGGUU	-36.40
<i>Otolemur garnettii</i> oga-mir-145	<u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGAUGCUAAGAUGG GGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u>	-26.00
<i>Xenopus tropicalis</i> xtr-mir-145	ACCUAUUCCUCAAG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> U GGGUGCUGUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> UG GGUGUAGGC	-44.80
<i>Sus scrofa</i> ssc-mir-145	CACCUUGUCCUCACG <u>GUCCAGUUU<u>UCCAGGAAUCCCU</u></u> UAGAUGCUGAGAUGGGGAU <u>UCCUGGAAAUACUGUUCU</u> GAGGUCAUGG	-39.30

10.8. miRNA-145 relacionado en cáncer

En la tabla 18 se presenta las principales tipos de cáncer relacionado con transcritos diana del miRNA-145.

Tabla 19. Transcritos diana regulados por miRNA-145 en las rutas de señalización en cáncer.

Transcritos diana	Tipos de cáncer
Factor del receptor de crecimiento epidermal (<i>EGFR</i>)	Cáncer colorectal
Sustrato receptor de insulina 1 (<i>IRS-1</i>)	
Proteína Kinasa C alpha (<i>PRKCA</i>)	
Factor del receptor 3 de crecimiento del fibroblasto (<i>FGFR3</i>)	Cáncer de vejiga
Interferón beta (<i>IFN</i>)	Cáncer de vejiga
Supresor de la señalización de citoquinas 7	Cáncer de vejiga
Factor del receptor de crecimiento epidermal (<i>EGFR</i>)	Cáncer de pulmón
MYC proteína de unión (<i>C-MYC</i>)	Cáncer de pulmón de células pequeñas, Cáncer de esófago, Cáncer de colon, carcinoma de células orales escamosas y Cáncer de mama
Proteína fascina actina 1 (<i>FSCN1</i>)	Melanoma metastásico y Cáncer de pulmón de células no pequeñas
ETS proto-oncogen 1, factor de transcripción (<i>ETS1</i>)	Cáncer de estómago
Matrix metalopeptidasa 1 (<i>MMP-1</i>)	Cáncer de estómago
N-cadherina (<i>CDH-1</i>)	Cáncer de estómago
Factor de transcripción de caja SRY 9 (<i>SOX9</i>)	Cáncer de cabeza y cuello
Interleuquina 6 (<i>IL-6</i>)	Cáncer de cabeza y cuello
Célula precursora neural expresada, regulada por el desarrollo 9 (<i>NEDD9</i>)	Cáncer de próstata, Glioblastoma
Factor de crecimiento del tejido conectivo (<i>CTGF</i>)	Glioblastoma
Sentrina 1 (<i>SENP1</i>)	Cáncer de Colon

Factor de crecimiento vascular endotelial (<i>VEGF</i>)	Metástasis de células de osteosarcoma, angiogénesis tumoral, Cáncer colorectal, cáncer de mama
Proteína quinasa B (<i>AKT</i>)	Cáncer de colon
Subunidad beta del factor de unión (<i>CBFB</i>)	Cáncer de colon
Interactor Clathrin1 (<i>CLINT1</i>)	Cáncer de colon
Subunidad alfa de la isoforma de la proteína fosfatasa 3 catalítica (<i>PPP3CA</i>)	Cáncer de colon

10.9. Secuencias no traducidas de los receptores de miRNA-145

Tabla 20. Secuencias 3'UTR de transcritos diana regulados por miRNA-145.

Genes	Secuencias de 3' UTR de transcritos diana
MUC1	<p>>MUC1 NM_001044393 3'UTR</p> <p>1 CAGTACCGATCGTAGCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGG</p> <p>81 CAGCCACTTCTGCCAACTTGTAGGGGCACGTCGCCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCATTCCACTCCACTCAGGT</p> <p>161 TCTTCAGGGCCAGAGCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAG TTCAGGTGGGC TGCTCACAGCCTCCTTCAGA</p> <p>241 GGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGGAAGCTCATGTGGGCCCTGAGGGC TCATGCCTGGGAAGTGTG</p> <p>321 TGGTGGGGCTCCCAGGAGGACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCCTGAACGGACTGAATAAAACGTGGTC</p> <p>401 TCCCACTGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>
	<p>>HOXA9 NM_152739 3'UTR</p> <p>1 TGCCATTTGGGCTTATTTAGAAAAAAGGGTAAGCTAGAGAGAAAAAGAAAGAACTGTCCGTCC CCCTCCGCCTTCTCCC</p> <p>81 TTCTCTACCCCCACCCTAGCCTCCACCATCCCCGCACAAAGCGGCTCTAAACCTCAGGCCA CATCTTTCCAAGGCAAA</p> <p>161 CCCTGTTCAAGGCTGGCTCGTAGGCCTGCCGCTTTGATGGAGGAGGTATTGTAAGCTTTCCA TTTTCTATAAGAAAAGGA</p> <p>241 AAAGTTGAGGGGGGGGCATTAGTGCTGATAGCTGTGTGTGTTAGCTTGTATATATATTTTTA AAAATCTACCTGTTCTG</p> <p>321 ACTTAAAACAAAAGGAAAGAACTACCTTTTTATAATGCACAACTGTTGATGGTAGGCTGTAT AGTTTTAGTCTGTGTA</p> <p>401 GTTAATTTAATTTGCAGTTTGTGCGGCAGATTGCTCTGCCAAGATACTTGAACACTGTGTTTT ATTGGTAATTATGTT</p> <p>481 TTGTGATTCAAACCTTCTGTGTACTGGGTGATGCACCCATTGTGATTGTGGAAGATAGAATTCA ATTTGAACTCAGGTTGT</p>

<p>HOXA9</p>	<p>561 TTATGAGGGGAAAAAACAGTTGCATAGAGTATAGCTCTGTAGTGGAATATGTCTTCTGTATA ACTAGGCTGTAAACCTA</p> <p>641 TGATTGTAAAGTAGCTGTAAAGAATTTCCAGTGAAATAAAAAAATTTTAAGTGTTCCTCGGG GATGCATAGATTCATCA</p> <p>721 TTTTCTCCACCTTAAAAATGCGGGCATTAAAGTCTGTCCATTATCTATATAGTCCTGTCTTGTG TATTGTATATAATC</p> <p>801 TATATGATTAAGAAAATATGCATAATCAGACAAGCTTGAATATTGTTTTGCACCAGACGAA CAGTGAGGAAATTCGGA</p> <p>881 GCTATACATATGTGCAGAAGTTACTACC TAGGGTTTATGCTTAATTTAATTGGAG GAAATG AATGCTGATTGTAACGG</p> <p>961 AGTTAATTTTATTGATAATAAATTATACACTATGAAACCGCCATTGGGCTACTGTAGAT TTGTA TCCTTGATGAATCTGG</p> <p>1041 GGTTTCCATCAGACTGAACTTACACTGTATATTTTGAATAGTTACCTCAAGGCCTACTGAC CAAATTGTTGTGTTGAGA</p> <p>1121 TGATATTTAACTTTTTGCCAAATAAAATATATTGATTCTTTTCTAAAAA</p>
<p>EGFR</p>	<p>>EGFR NM_001346899 3'UTR</p> <p>1 CCACGGAGGATAGTATGAGCCCTAAAAATCCAGACTCTTTTCGATACCCAGGACCAAGCCACA GCAGGTCTCCATCCCAA</p> <p>81 CAGCCATGCCCGCATTAGCTCTTAGACCCACAGACTGGTTTTGCAACGTTTACACCGACTAG CCAGGAAGTACTTCCACC</p> <p>161 TCGGGCACATTTTGGGAAGTTGCATTCTTTGTCTTCAAACGTGAAGCATTACAGAAACG CATCCAGCAAGAATATTG</p> <p>241 TCCCTTTGAGCAGAAATTTATCTTTCAAAGAGGTATATTTGAAAAAAAAAAGTATATGTGA GGATTTTATTGATTG</p> <p>321 GGGATCTTGGAGTTTTTCATTGTGCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGA AGAAGCTTGCTGGTAGC</p> <p>401 ACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAGCCACAAGTCTT CCAGAGGATGCTTGATTCC</p> <p>481 AGTGGTTCTGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAACACTAAAGATCCAAGAAGGCCTTCATGGCC CCAGCAGGCCGGATCGGT</p> <p>561 ACTGTATCAAGTCATGGCAGGTACAGTAGGATAAGCC ACTCTGTCCCTTCTGGGCAAAGAA GAAACGGAGGGGATGGAA</p> <p>641 TTCTTCTTAGACTTACTTTTTGTAAAATGTCCCCACGGTACTTACTCCCACTGATGGACCA GTGGTTTCCAGTCATGA</p> <p>721 GCGTTAGACTGACTTGTGTTGTCTTCCATTCCATTGTTTTGAACTCAGTATGCTGCCCTGTC TTGCTGTATGAAATCA</p> <p>801 GCAAGAGAGGATGACACATCAAATAAATAACTCGGATTCCAGCCACATTGGATTCATCAGCA TTTGACCAATAGCCAC</p> <p>881 AGCTGAGAATGTGGAATACCTAAGGATAGCACCGCTTTTTGTTCTCGCAAAAACGTATCTCCT AATTTGAGGCTCAGATGA</p> <p>961 AATGCATCAGGTCCTTTGGGGCATAGATCAGAAGACTACAAAATGAAGCTGCTCTGAAATC TCCTTAGCCATCACCCC</p> <p>1041 AACCCCCAAAATTAGTTTGTGTTACTTATGGAAGATAGTTTTCTCCTTTTACTTCACTTCAA AAGCTTTTTACTCAAAG</p> <p>1121 AGTATATGTTCCCTCCAGGTCAGCTGCCCCCAAACCCCTCCTTACGCTTTGTACACAAAA AGTGTCTCTGCCTTGAGT</p> <p>1201 CATCTATTCAAGCACTTACAGCTCTGGCCACAACAGGGCATTTTACAGGTGCGAATGACAG TAGCATTATGAGTAGTGTG</p>

	<p>1281 GAATTCAGGTAGTAAATATGAACTAGGGTTTGAAATTGATAATGCTTTCACAACATTTGCAG ATGTTTTAGAAGGAAAA</p> <p>1361 AAGTTCCTTCCTAAATAATTTCTCTACAATTGGAA GATTGGAAGATTCAGCTAGTTAGGAGC CCACCTTTTTTCCTAAT</p> <p>1441 CTGTGTGTGCCCTGTAACCTGACTGGTTAACAGCAGTCCTTTGTAAACAGTGTTTTAAACTC TCCTAGTCAATATCCACC</p> <p>1521 CCATCCAATTTATCAAGGAAGAAATGGTTCAGAAAATATTTTCAGCCTACAGTTATGTTTCAGT CACACACACATACAAAA</p> <p>1601 TGTTCCTTTTGCTTTTAAAGTAATTTTTGACTCCCAGATCAGTCAGAGCCCCTACAGCATTGT TAAGAAAGTATTTGATT</p> <p>1681 TTTGTCTCAATGAAAATAAACTATATTCATTTCCACTCTATTATGCTCTCAAATACCCCTAAG CATCTATACTAGCCTG</p> <p>1761 GTATGGGTATGAAAGATACAAAGATAAATAAAACATAGTCCCTGATTCTAAGAAATTCACAAT TTAGCAAAGGAAATGGA</p> <p>1841 CTCATAGATGCTAACCTTAAACAACGTGACAAATGCCAGACAGGACCCATCAGCCAGGCA CTGTGAGAGCACAGAGCAG</p> <p>1921 GGAGGTTGGGTCCTGCCTGAGGAGACCTGGAA GGGAGGCCTCACAGGAGGATGACCAGG TCTCAGTCAGCGGGGAGGTGG</p> <p>2001 AAAGTGCAGGTGCATCAGGGGCACCCTGACCGAGGAAACAGCTGCCAGAGGCCTCCACTG CTAAAGTCCACATAAGGCTG</p> <p>2081 AGGTCAGTCACCCTAAACAACCTGCTCCCTCTAAGCCAGGGGATGAGCTTGGAGCATCCCA CAAGTCCCTAAAAGTTGC</p> <p>2161 AGCCCCAGGGGGATTTTGAGCTATCATCTCTGCACATGCTTAGTGAGAAGACTACACAAC ATTTCTAAGAATCTGAGAT</p> <p>2241 TTTATATTGTCAGTTAACCACTTTCATTATTCATTCACCTCAGGACATGCAGAAATATTTTCAGT CAGA ACTGGGA AACAG</p> <p>2321 AAGGACCTACATTCTGCTGTCACTTATGTGTCAAGAAGCAGATGATCGATGAGGCAGGTCA GTTGTAAGTGAGTCACATT</p> <p>2401 GTAGCATTAAATTCTAGTATTTTTGTAGTTTGAAACAGTAACTTAATAAAAAGAGCAAAAGCTA AAAAAAAAAAAAAAAA</p>
MYC	<p>>MYC NM_002467 3'UTR</p> <p>1 GGAAAAGTAAGGAAAACGATTCCCTTCTAACAGAAATGCCTGAGCAATCACCTATGAACTTGT TTCAAATGCATGATCAA</p> <p>81 ATGCAACCTCACACCTTGCTGAGTCTTGAGACTGAAA GATTTAGCCATAATGTAAACTGCC TCAAATTGGACTTTGGG</p> <p>161 CATAAAAGAACTTTTTATGCTTACCATCTTTTTTTTTCTTTAACAGATTTGTATTTAAGAATT GTTTTTAAAAAATTT</p> <p>241 TAAGATTTACACAATGTTTCTCTGTAAATATTGCCATTAATGTAAATAACTTTAATAAAACGTT TATAGCAGTTACACA</p> <p>321 GAATTTCAATCCTAGTATATAGTACCTAGTATTATAGGTACTATAAACCTAATTTTTTTTATTT AAGTACATTTTGCTT</p> <p>401 TTTAAAGTTGATTTTTTCATTGTTTTTAGAAAAATAAAATAACTGGCA AATATATCATTGAG CCAAATCTTAAAAA</p> <p>481 AAAAAAAAA</p>
	<p>>NRAS NM_002524 3'UTR</p> <p>1 CAAGATACTTTTAAAGTTTTGTCAGAAAAGAGCCACTTTCAAGCTGCACTGACACCCTGGTCC TGACTTCCCTGGAGGAG</p>

NRAS	81 AAGTATTCCTGTTGCTGTCTTCAGTCTCACAGAGAAGCTCCTGCTACTTCCCCAGCTCTCAGT AGTTTAGTACAATAATC
	161 TCTATTTGAGAAGTTCTCAGAATAACTACCTCCTCACTTGGCTGTCTGACCAGAGAATGCAC CTCTTGTTACTCCCTGTT
	241 ATTTTTCTGCCCTGGGTTCTTCCACAGCACAAACACACCTCTGCCACCCAGGTTTTTCATCT GAAAAGCAGTTCATGTC
	321 TGAAACAGAGAACCAAACCGCAAACGTGAAATTCTATTGAAAACAGTGTCTTGAGCTCTAAA GTAGCAACTGCTGGTGAT
	401 TTTTTTTTTCTTTTTACTGTTGAACTTAGAACTATGCTAATTTTTGGAGAAATGTCATAAATTAC TGTTTTGCCAAGAAT
	481 ATAGTTATTATTGCTGTTTGGTTTGTATAATGTTATCGGCTCTATTCTCTAAACTGGCACTCT GCTCTAGATTCATAAA
	561 TACAAAAATGAATACTGAATTTTGAAGTCTATCCTAGTCTTCACAACTTTGACGTAATTAATCC AACTTTCACAGTGAAG
	641 TGCCTTTTTCTAGAAGTGGTTTGTAGACTTCCTTTATAATTTTCAGTGAATAGATGTCTCA AAAATCCTTATGCATG
	721 AAATGAATGTCTGAGATACGTCTGTGACTTATCTACCATTGAAGGAAAGCTATATCTATTTGA GAGCAGATGCCATTTTG
	801 TACATGTATGAAATTGGTTTTCCAGAGGCCTGTTTTGGGGCTTCCCAGGAGAAAGATGAAA CTGAAAGCACATGAATAA
	881 TTTCACTTAATAATTTTTACCTAATCTCCACTTTTTTCATAGGTTACTACCTATAACAATGTATGT AATTTGTTTCCCCTA
	961 GCTTACTGATAAACCTAATATTCAATGAACTTCCATTTGTATTCAAATTTGTGTCATACCAGAA AGCTCTACATTTGCAG
	1041 ATGTTCAAATATTGTAACACTTTGGTGCATTGTTATTTAATAGCTGTGATCAGTGATTTTCAA CCTCAAATATAGTATA
	1121 TTAACAAATTACATTTTCACTGTATATCATGGTATCTTAATGATGTATATAATTGCCTTCAATC CCCTTCTACCCACC
	1201 CTCTACAGCTTCCCCCACAGCAATAGGGGCTTGATTATTTTCAGTTGAGTAAAGCATGGTGCT AATGGACCAGGGTCACAG
	1281 TTTCAAACCTTGAACAATCCAGTTAGCATCACAGAGAAAGAAATCTTCTGCATTTGCTCATT GCACCAGTAACTCCAGC
	1361 TAGTAATTTTGTAGGTAGCTGCAGTTAGCCCTGCAAGGAAAGAAGAGGTCAGTTAGCACA AACCTTTACCATGACTGG
	1441 AAAACTCAGTATCACGTATTTAAACATTTTTTTTTCTTTAGCCATGTAGAACTCTAAATTA GCCAATATTCTCATT
	1521 GAGAATGAGGATGTCTCAGCTGAGAAACGTTTTAAATTCTCTTTATTCATAATGTTCTTTGAA GGGTTTTAAACAAGATG
	1601 TTGATAAATCTAAGCTGATGAGTTTGTCAAACAGGAAGTTGAAATTGTTGAGACAGGAAT GGAAATATAATTAATTG
1681 ATACCTATGAGGATTTGGAGGCTTGGCATTTTAATTTGCAGATAATACCCTGGTAATTCTCAT GAAAAATAGACTTGGAT	
1761 AACTTTTGATAAAGACTAATCCAAAATGGCCACTTTGTTCTGTCTTTAATATCTAAATACT TACTGAGGTCCTCCAT	
1841 CTTCTATATTATGAATTTTCATTTATTAAGCAAATGTCATATTACCTTGAAATTCAGAAGAGAA GAAACATATACTGTGT	
1921 CCAGAGTATAATGAACCTGCAGAGTTGTGCTTCTTACTGCTAATTCTGGGAGCTTTCACAGT ACTGTATCATTGTTGAAA	
2001 TGGAAATTCTGCTTTTCTGTTTCTGCTCCTTCTGGAGCAGTGCTACTCTGTAATTTTCTGAG GCTTATCACCTCAGTCA	

	<p>2081 TTTCTTTTTTAAATGTCTGTGACTGGCAGTGATTCTTTTTCTTAAAAATCTATTAATTTGATG TCAAATTAGGGAGAAA</p> <p>2161 GATAGTTACTCATCTTGGGCTCTTGTGCCAATAGCCCTTGTATGTATGTACTTAGAGTTTTCC AAGTATGTTCTAAGCAC</p> <p>2241 AGAAGTTTCTAAATGGGGCCAAAATTCAGACTTGAGTATGTTCTTTGAATACCTTAAGAAGTT ACAATTAGCCGGGCATG</p> <p>2321 GTGGCCCGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGAGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTCAACC CAGGAGGTGGAGGTTACAGT</p> <p>2401 GAGCAGAGATCGTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAAGAGAGACTTGTCTCCAAAAAA AAAGTTACACCTAGGTGTG</p> <p>2481 AATTTTGGCACAAGGAGTGACAACTTATAGTTAAAAGCTGAATAACTTCAGTGTGGTATA AAACGTGGTTTTTAGGCT</p> <p>2561 ATGTTTGTATTGCTGAAAAGAATTCTAGTTTACCTCAAATCCTTCTCTTTCCCAAATTA GTGCCTGGCCAGCTGTC</p> <p>2641 ATAAATTACATATTCCTTTTGGTTTTTTTAAAGTTACATGTTCAAGAGTGAAAATAAGATGTT CTGTCTGAAGGCTACC</p> <p>2721 ATGCCGGATCTGTAATGAACCTGTTAAATGCTGTATTTGCTCCAACGGCTTACTATAGAAT GTTACTTAATACAATATC</p> <p>2801 ATACTTATTACAATTTTTACTATAGGAGTGAATAGGTAAAATTAATCTCTATTTTAGTGGGCC CATGTTTAGTCTTTCA</p> <p>2881 CCATCCTTTAAACTGCTGTGAATTTTTTTGTCATGACTTGAAAGCAAGGATAGAGAAACACTT TAGAGATATGTGGGGTT</p> <p>2961 TTTTTACCATTCCAGAGCTTGTGAGCATAATCATATTTGCTTTATATTTATAGTCATGAACTCC TAAGTTGGCAGCTACA</p> <p>3041 ACCAAGAACCAAAAAATGGTGCCTTCTGCTTCTTGTAAATCATCTCTGCTAATAAATTATAAG AAGCAAGGAAAATTAGG</p> <p>3121 GAAAATATTTTATTTGGATGGTTTCTATAACAAGGGACTATAATTCTTGTACATTATTTTCA TCTTTGCTGTTTCTTT</p> <p>3201 GAGCAGTCTAATGTGCCACACAATTATCTAAGGTATTTGTTTTCTATAAGAATTGTTTTAAAA GTATTCTTGTACCAGA</p> <p>3281 GTAGTTGTATTATATTTCAAACGTAAGATGATTTTTAAAAGCCTGAGTACTGACCTAAGATG GAATTGTATGAACTCTG</p> <p>3361 CTCTGGAGGGAGGGGAGGATGTCCGTGGAAGTTGTAAGACTTTTTATTTTTTTGTGCCATCA AATATAGGTAAAAATAATT</p> <p>3441 G TGCAATTCTGCTGTTTAAACAGGAA CTATTGGCCTCCTGGCCCTAAATGGAAGGGCCGA TATTTAAGTTGATTATT</p> <p>3521 TATTGTAATTAATCCAACCTAGTCTTTTTAATTTGGTTGAATGTTTTTCTTGTTAAATTGAT GTTTTAAAAATAAAAA</p> <p>3601 CTGGAAGTTCTTGGCTTAGTCATAATTCTT</p>
	<p>>BRAF XM_005250045 3'UTR</p> <p>1 CCACCATCATGGCAGCATCTGCTCTTATTTCTTAAGTCTTGTGTTTCGTACAATTTGTTAACATC AAAACACAGTTCTGTT</p> <p>81 CCTCAAATCTTTTTTAAAGATACAAAATTTCCAATGCATAAGCTGATGTGGAACAGAATGGAA TTTCCCATCCAACAAA</p> <p>161 AGAGGAAAGAATGTTTTAGGAACCAGAATTCTCTGCTGCCAGTGTTCCTCAACAAAAATACC ACGAGCATACAAGTCTG</p>

BRAF	241 CCCAGTCCCAGGAAGAAAGAGGAGAGACCCCTGAATTCTGACCTTTTGATGGTCAGGCATGATGGAAAGAAACTGCTGCTA
	321 CAGCTTGGGAGATTTGCTATGGAAAGTCTGCCAGTCAACTTTGCCCTTCTAACCACCAGATCAATTTGTGGCTGATCATC
	401 TGATGGGGCAGTTTCAATCACCAAGCATCGTTCTCTTCTGTTCTGGAATTTGTTTTGGAGCTCTTTCCCCTAGTGAC
	481 CACCAGTTAGTTTCTGAGGGATGGAACAAAAATGCAGCTTGCCCTTCTATGTGGTGCCTGTTCAGGCCTTGACAGATTT
	561 TATCAAAGGAAACTATTTTATTTAAATGGAGGCTGAGTGGTGAAGTAGATGTGTCTTGGTATGAGGAAAAGGGCATGCT
	641 GCATCTTCTTCTGACCTCCGGGGTCTCTGGCCTTTTGTTCCTTGTCTACTGAGGGGTCTGTCTAACCAAGCAGGCTAG
	721 ATAGTGCTGGCACACATTGCCTTCTTCTCATTGGGTCCAGCAATGAAGATAAGTGTGGTTTTTTTTTTTTCTCCA
	801 CAATGTAGCAAATTCTCAGGAAATACAGTTTATATCTTCTCCTATGCTCTTCCAGTCACCAACTACTTATGCGGCTACT
	881 TTGTCCAGGGCACAAAATGCCGTGGCAGTATCTAACTAAACCCCCACAAAATGCTTAATAACAGTTTTGAATGTGAGAA
	961 ATTTAGATAATTTAAATATAAGGTACAGGTTTTAATTTCTGAGTTTCTTCTTTCTATTTTTATTAAAAAGAAAATAATT
	1041 T TCAGATTTAATTGAATTGGAA AAAAACAATACTCCCACCAGAATTATATATCCTGAAAATTGTATTTTTGTTATATAA
	1121 ACAACTTTTAAGAAAGATCATTATCCTTTTCTCTACCTAAATATGAGGAGTCTTAGCATAATGACAAATATTTATAATTT
	1201 TTCAATTAATGGTACTTGCTGGATCCACACTAACATCTTTGCTAATAATCTCATTGTTTCTTCAACTGATTCCTAACAC
	1281 TATATCCACATCTTCTTTCTAGTCTTTTATCTAGAATATGCAACCTAAAATAAAAATGGTGGCGTCTCCATTCAATTCTC
	1361 CTTCTTCTTTTTTCCCAAGCCTGGTCTTCAAAGGTTGGGCAATTTGGCAGCTGAATTCCCAGACAGAGAATAGAGCAA
	1441 TTTTAGGGATATTAGGACTGAGGGAGGGTGTGGGAAAGCTGTCATCAG TTGTTTTTATAGAAAGAACTGGCA TTCATTAA
	1521 GAACCTAAATCTTATCTTTGCACAAATGGAAAATATAACCTAGTTATAGCTTCCCTTTGGCCTTATTAAGGGTAATATC
	1601 AATCACAGTCATAGCAAAGAAAGCGGATGTATTAATGGCAAATTAATGGAAAACCTCCCTTATCAGGAATCTAGACTCAG
	1681 AATTTAGGAACACAAATCAAATCAGACCAACCAAGCTATAGCCAAGGACTTGAAAGAAATTAACAAGACCCAGAATAAA
	1761 TCAAGGAATTAGAAATTGTTATTTAAAAATTTAGATTGTAACCTCAGGCCCTGCTGTCTATATTGCAGCCACTAAAAGC
1841 TCACTACCATTAGATTTTTGCTAACATACATGTATTCAGAAGAAAGCCTATTGAAATTTTCATTGTCTTGAAAAGGTTG	
1921 TCCTAGTAAAATGGAAAAGATCCTTAAGTTATTAATCAGTTTGAAAAGCAAATTTGTTTTTAAATTTTACATCAGCAGGG	
2001 CAGTGTCTTACAAAATTCAGAAATTGCAAAGGTGGAAATAATTCACGCTGATTTGAAGAACA TCTTCTGTGCAATAATAC	
2081 TGCCTCTTTGAAAAGCATTGGCTGTTTTTTCTTTTTAAATATATCTCTAGATGCTTTTAAATGTGGCTGTGTTCCCTTT	
2161 ACCAAGATTGGCTTCAAGTTTCCGCAGGTAGAGAGACCTGGGCTTGAACAAGAGGATGTGTTTCATGTCCTGCTGAGGAG	

2241 GTAGAACATGTGCAGCCTGGGTCCGGGACTGCCTCCGTGGGGCAGGGGCAGGGGCGGTA
CCATTAGGGAGGAAGCTTAGC

2321 ATTTTCAGTTTCTTAAACAATATTCAGGGTGATACACTTTTTCTCCCTTGCAATTTAGAAATAGG
CTGGTATCTCATTGTA

2401 ACGGGGGAGCAGACTTGATCTCAAATGAAGCTGTGCCCAGGAGCCAGGCTTAGCATATTG
AGATTTTTATAGATACCTTA

2481 AAAAATAAAATATTTAAACCTCTCTTTTCTTCTTTTTCTATGAAATAGGTTTTTCTCTAGTTT
ACAAATGACATGAAA

2561 ATAGGTTTTATTTGTGTTTTATCTGCTTTATTTTTTGATGCTTAGACAACAGTTAGACTTACTG
AGCTCCTAAAAAACG

2641 AGGAAGAAGTCCTTATTTGTGAAAAGCACTTTATGAGTAATTGTATAGACAGTATGTGGCTG
CGTCACTGATCATCTTGT

2721 AAGGGTGTAACAGTCTTGCTGTAAAGTGGCTGCAGTGCCTTCTGTAGTGTGTTTTATTTTT
GGTAGGGAGAGGTGAAGC

2801 CTTCTGAAAAATTTGAGAGCAACTACAGAGGATTGTTTGTAACTGTGTAGTATTCCTGATGG
ACTTTTTTCATCGTTAGA

2881 GTCAAGGACCTAGACTTTTGCCACTGAAATAATATTGACCAAAAAAATAGTTTATAAAAGGG
ATTTGTGAATAGAAAATT

2961 CAGTGTGATCATTGTTGTTAATGTGCACCTTAAAGAAGATTCTGTCTAGCTGTCAAATTCT
GGTCCCGAATATCTCA

3041 CCCCTGATTGATTTGAGATCTAGTAGGGCATACTGGGGCATTTTAGAAGATAAAATCCCAT
ACAAATGATATATGCTAT

3121 ATTTATGTTGGTGTGGAGAAGAAAGAGCAGTATATAAAGAATAATTCAAGACTGCAGCAC
TGCAACCTGAAACTTTG

3201 TAAATATTTCTAGCTTCTGGTTTGGTGCGGTGACAGCACTTTCATCACAGGATGTTACCTT
GTATTCACCAGGCGGAGT

3281 GCGAGCTGCTGCACATCCTCCTCAGATCTCACCTGTCCCACTGTACATCCACCCGCCAGC
TGCTTGCAAACCTCATCTC

3361 TAGCTTTAGTTCGAAACCACATTGCAGGGTTCAGGTGACCTCTACAAAAAATACCTCTTCA
GAATGAGGTAATGAATAG

3441 TTATTTATTTTAAATATGAAAAGTCAGGAGCTCTAGAACATGACGATGATTTAAGATTTTAA
CTTTTTGTGTAATTGT

3521 ATTTGAGCACTCTCATTGTTGCTTAAAGGGCATTATACATTTAAGCAGTAATACTGTAAAAAA
ATGTGTTGCTCGGAATA

3601 TCTGAATGTTGTTGAAAGTGGTGCCAGAACCGGTTTAGGGGTACGTTTCAGAATCTTAACCT
TGAGTCAATTGCATGAAA

3681 TAAATAGCTGTGGTATCACTTCACTAACAGTGATGTAATTTAATTTTTCAGTAGGCTTGGA
TGACAGTACATCCTCAT

3761 AATGAGTTTGCTGCAGCTTTGTCACATGCACAGGCATTATAGAAAGACCACCCAGCTAAG
AGGGTAGAATGATTAATTCT

3841 TTTTGCAAGATTCTCTTTGTCCAAGTTGGCATTGTTAGTGTAGGAATACCAGCACCTT
GAGACGAGCAGATTCCAA

3921 CCATTAGGCTATAAACACCATAGCCAGAGATGGAAGGTTTACTGTGAGTATGAACAGCAAAT
AGCTTACAGGTCATGAGT

4001 TGAATGGTGTAGGTGAGGCTCTAGAAAATACCTTGACAATTTGCCAAATGATCTTACTGT
GCCTTCATGATGCAATAA

4081 AAAAGCTAACATTTTAGCAGAAATCAGTGATTTGTGAAGAGAGCAGCCACTCTGGTTTAACT
CAGCTGTGTTAATAATT

4161 TTAGAGTGCAATTTAGACTGCATAGGTAAATGCACTAAAGAGTTTATAGCCAAAATCACATTT
ACAATGAGAAAACACA

4241 CAGGTAAATTTTCAGTGAACAAAATTATTTTTTAAAGCACATAATCCCTAGTATAGTCAGAT
ATATTTATCACATAGAG

4321 CAACTAGGTTGCAAATATAGTTCAGTGACATTTCTAGAGAACTTTTTCTACTCCCATAGGCT
CTTCAAAGCATGGA

4401 TTTATACAACAGAAATGTTGACAGAAATTGCTGTAGTTTAGGGTTGAAGTACTGTATGATGG
GCAGCAATCATGTATTAA

4481 CTTAGAAGGGGAAATTGAAATATAGGACCGAATTTGGTTTTATCAGTTTCCAGAGTACTGCT
GCCAACCTAGACACTGAT

4561 TTTTCAGAGTTTGAAATGTAAATTTCTCCCGGGA **CTTGATTGCACATGAAGCTGGAC**TGCG
TTAGTCATCCTGTCCCAA

4641 AGCGCTGTGGGGGCCAGGGTGGAGGTCTCAAGGCATCCTTTATGACCTGGCCATTGGATG
TAAAAGAAAACATATTCCAT

4721 GCTGTGGTTCTTGTATCTTGTTCATTCCCTACCATTGAAAGAGAAAGTCCATGTATTGTCTC
CAGCACATCCTTGAAT

4801 GTTATACTGGGATGGATTACTGATGCCCATCGGTAGTTGAGCCCCAGAAGAGGGTAGTAGC
ATCTCTGCCTCAGGTGATG

4881 ATTTGTAGCTTGCCAGAGGAGAGCGGAGTCACCAGTATATCTGTGGTCCATGTTGCTAGC
TCTGGTAAAATTAATA

4961 CTGGTAAGATGTTTGTATTATTAGTACACTAGACAGTAAGCTCTGTTTTGTTGTTTTCAAATA
ACCTATTTCACTTTTG

5041 TTTGGCAAAGACATTTAAATTGAAATTC AATTTCTAATTTTTGTTAATTGTGGAAAGGGTAATT
AACAGTTCCTATCAGG

5121 TATTTTTAATGTGGAAAAGGACAGAAACCCAACTCCTAAAATCTTAAATTAAGGTAACAGTGC
TTAAAAAAAAAAAAATG

5201 CATGGGGCAATTAGTCGGCAACTCAATGAGTGACTAAAGTACTTTTATTTAACATCCACAAC
TTCAACTGTTAAGTTTTA

5281 TTAATTAATAAATCAGCTTTTATTAATAATGTTGACATTTATTTAGCTATTTTGAATAATTATAGTG
ACTTGACGAGTGTGT

5361 ATGAGGACACAGCCAATGTAAGCCAGTGTATCCATTTTTTAGAGGTGCATTTTTTTTTAAAGA
ATTCTGTAGATAGAAGT

5441 GCTCTGAAAACAATAAATATGTTTATTCATGGTAGTATCAAAAAATGTTTGTACAAACCAT
CTGCTTCTCCCGCCAG

5521 CCGAGTTCATTCTCCAGCACCGTGACCGCTGGTTCTCATGTACAGCACATATGCGGGAGAG
TTGGCAGAAAATTTGTGAA

5601 GAGATGCCGCAAAGGAAGGGTCTGTTGACGGGTGGGATTGGGGTTTTGATGAAGTTGCT
TAGTCCTGGTTTTGTTTTGA

5681 AAATTAAGTGCATTTTTGTGTTAAGTTTTGAACCCACGTGTGTTTTGGTGGAGTATGA
GTTGGAAGTCACTGCAA

5761 ACTAGCATAAACAACAAGCTCACAGAGTAGGCACAGATGTAGAGAACAGAGACCAAAATG
GGGTGAGGTGGCAGTAAAT

5841 CTAGGATAGGGAAAAATTAATGTGAGGGTGGGAAATAAACTGTAATTACCTGAAATCAAATG
TAAGAGTGCAATAAGTAT

5921 GCTTTTTATTCTAAGCTGTGAACGGTTTTTTTTAAGAATCATTCCCTCCTAATACATTTGTGTAT
GTTCCATAGCTGATTA

6001 AAACCAGCTATATCAACATATAATGCCTTTTTATTCATGTTAATGACCAACGTAAGTGGCTAG
CCTTTATGTCTTATTTA

6081 TCTTCATGTTATGTTAGTTTACATACAGGGGTGTATGTCTCTGTGCTGTCCCCTTCTCCTGC
CTTCATTTTAAATGCAT

6161 CCATGGGTCTCCGTGTTTCCTTTGGCCATGCCACATATATAGACTCAGTTTGGCCTTCATG
ATATCGCCTGATTTTTGA

6241	GGACTGTATCACAGTGATATGTATTTGTGGTAATCTCATTTGTTGGTTGTACATCTGATCCTT TCCTCAACATGGCAATT
6321	GCTGCCTTTCCTAAGATAGGATCATACAAGTATCAGGGGATTGAATTTGATCATTATCAA CATGTGTCTCTGAATTTT
6401	ATTCAGTAGTTGTCATTGCTCTTTGGTTTAGACCAAGAAAAAGGAAATCCCCCTTTTCATGT ATCCTTGGTTTGAGGA
6481	CATGACTCCTGTAAGGGAGAGGAAAGGGAGATGCTTCCTGTTTGAAGTGCAGTGAATTCAC GGTTCCTGTTTACCACCTC
6561	CAAACCTTATGGCGACTCACACACACATTCCTCTTTTCTGTTACTGCCAAAGGTTCTGGGTTT AGTACACTTCAGTTCCAC
6641	TCAAGCATTGAAAAGGTTCTCGTGGAGTCTGGGGCGTGCCAGTGAAAAGATGGGGACTTT TTAATTGTCCACAGACCTC
6721	TCTATACCTGCTTTGCAAAAATTACAATGGAGTAACTATTTTTAAAGCTTATTTTTCAATTCAT AAAAAGACATTTATT
6801	TTCAGTCAAATGGATGATGTCTCCCTCTTTTCCCCTATTCTCAATGTTTGCTTGAATCTTTTAT TATTTTTTTAATTCT
6881	CCCCATACCCACTTCCTGATACTTTGGTTCTCTTCTGCTCAGGTCCCTTCATTTGTAATT TGGAGTTTTTCTCATGT
6961	AAATTTGTATAACAGAAAATATTGTTTCAGTTTGGATAGAAAGCATGGAGAATAAAAAAGATA GCTGAAATTCAGATTGA
7041	AGAAATTTATTTCTGTGTAAGTTATTTAAAAACTGTATTATATAAAAGGCCAAAAAAGTTCTA TGTAATTGATGTGAAT
7121	ATGCGAATACTGCTATAATAAAGATTGACTGCATGGAGAAGTC

10.10. Gráfico de interacción entre miRNA-145 y transcritos diana

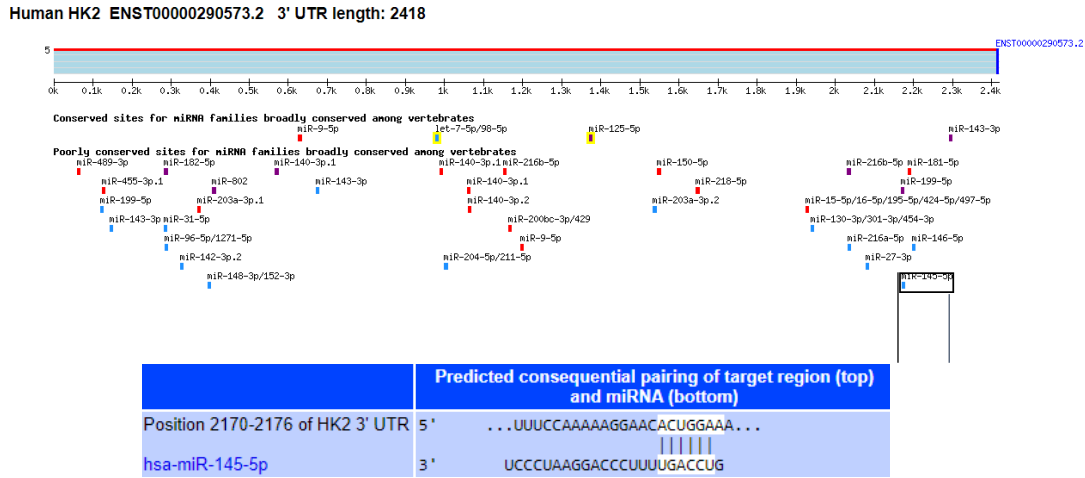


Figura 26. Gráfico de interacción entre miRNA-145 y transcrito diana hexoquinasa 2. Modificado de <http://www.targetscan.org/>

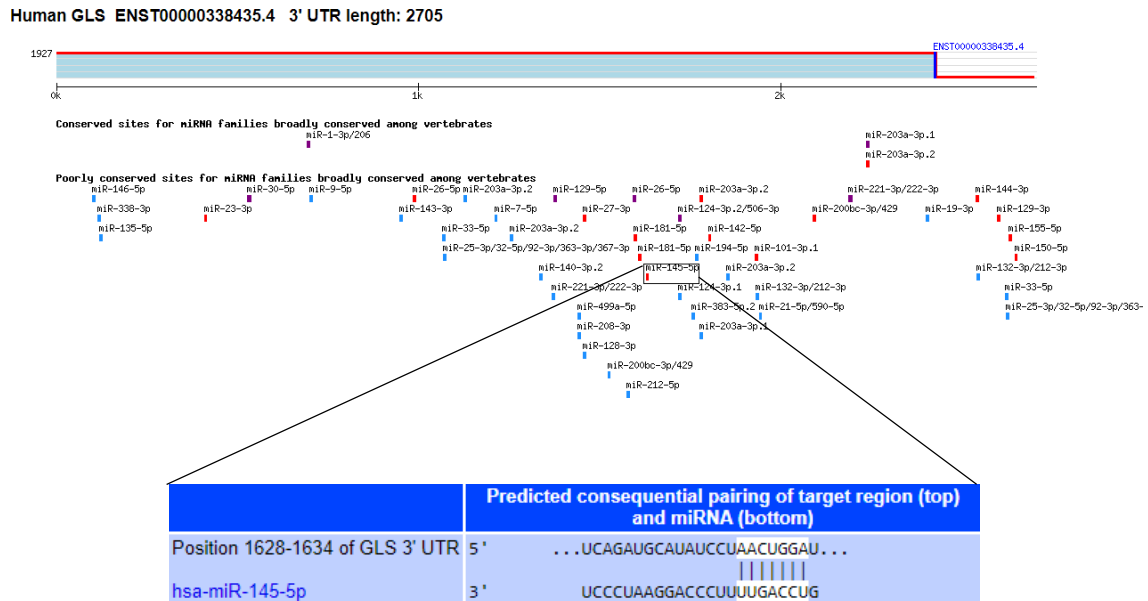


Figura 27. Gráfico de interacción entre miRNA-145 y transcrito diana glutaminasa GLS. Modificado de <http://www.targetscan.org/>

10.11. Gráfico de anotación de transcritos diana y miRNAs en KEGG.

Breast cancer

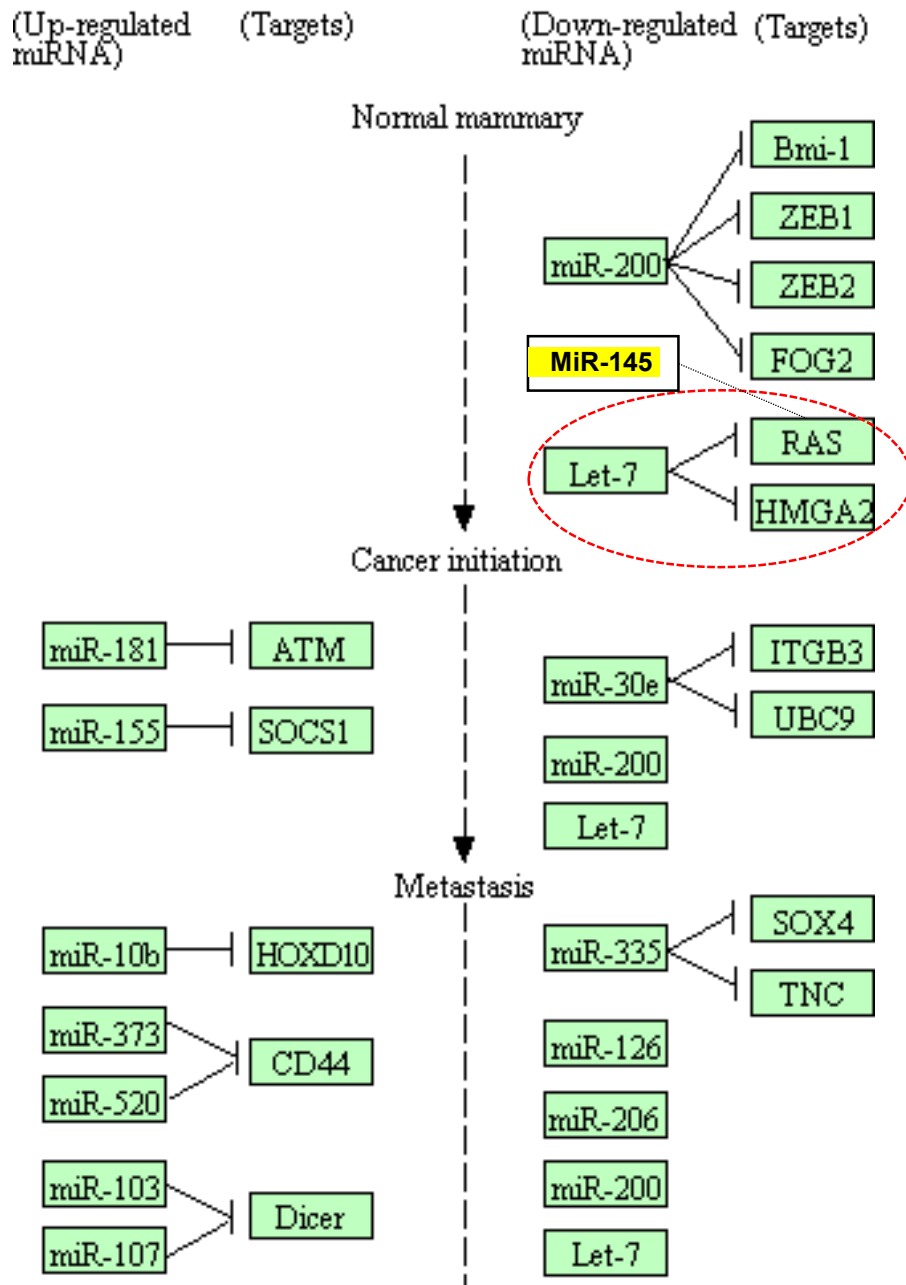


Figura 28. Ruta de señalización del miRNA-145 y terapia dirigida en las dianas moleculares en cáncer de mama. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

Epithelial ovarian cancer

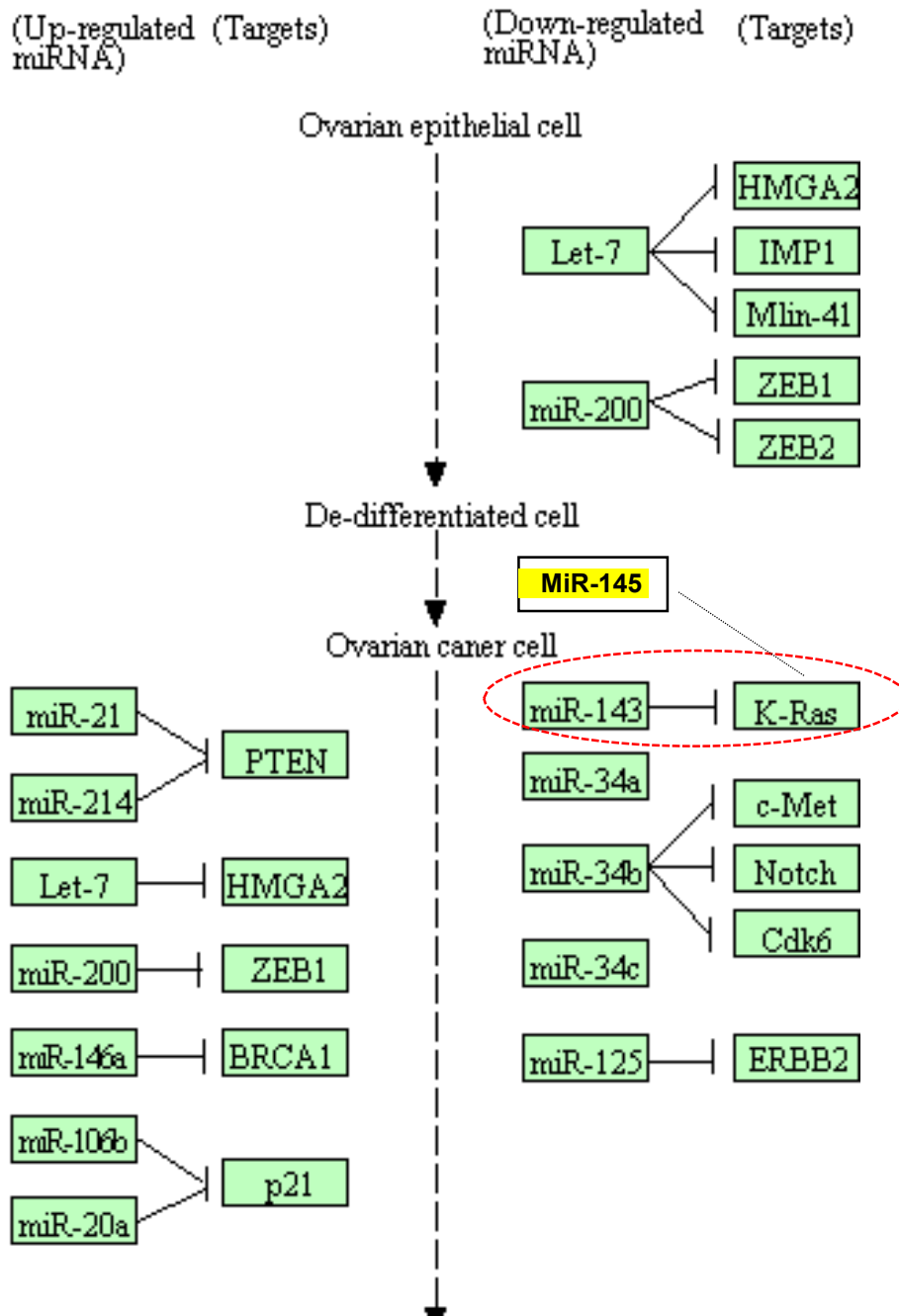


Figura 29. Ruta de señalización del miRNA-145 y terapia dirigida en las dianas moleculares en cáncer epitelial ovárico. Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>

10.12. Gráfico de anotación de rutas de metabólicas en GO.

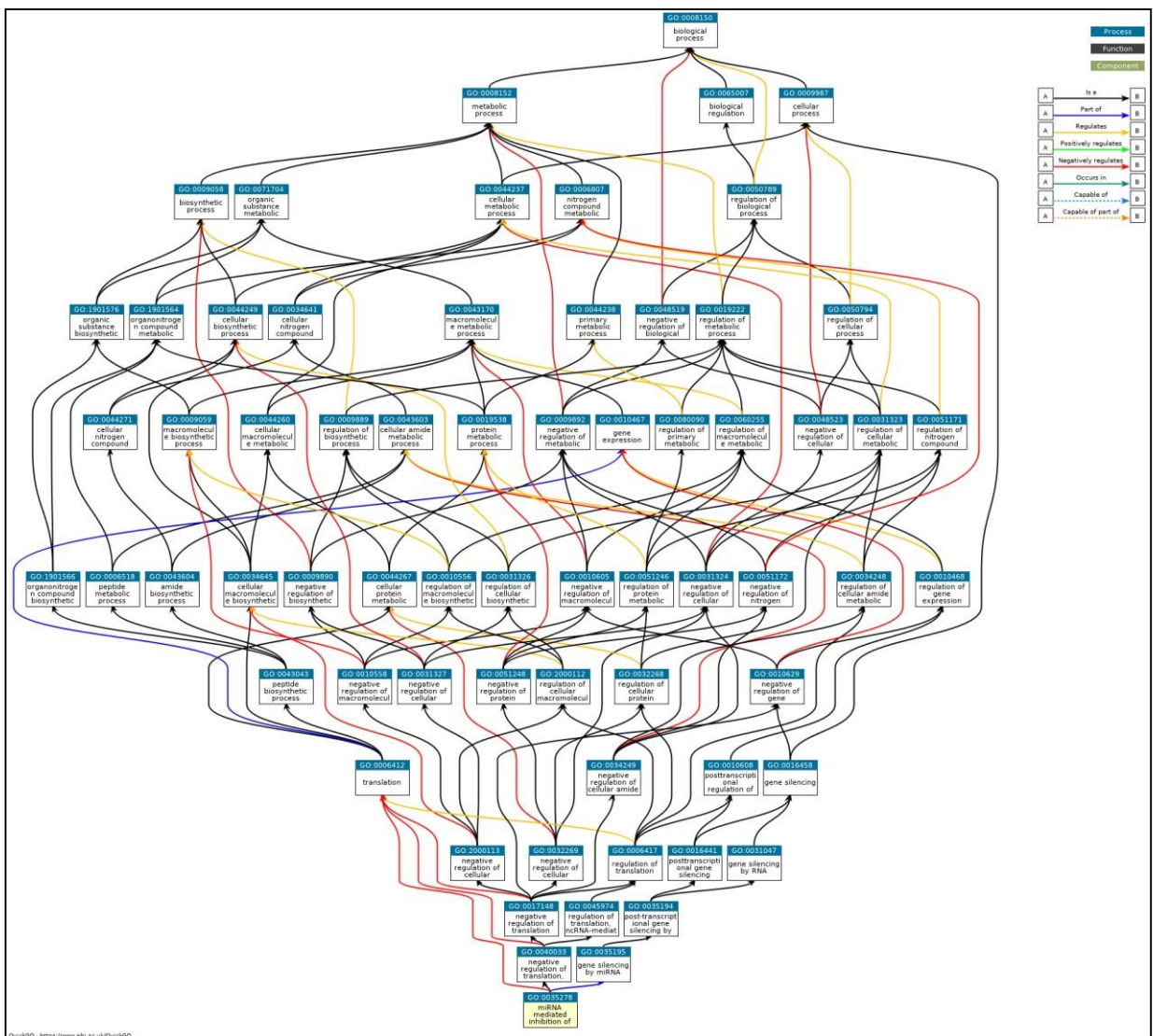


Figura 30. Anotación esquemática de la regulación del miRNA en las rutas metabólicas de células tumorales. Modificado de <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>

10.13. Gráfico de anotación de rutas metabólicas de la glutamina y glucosa en cáncer.

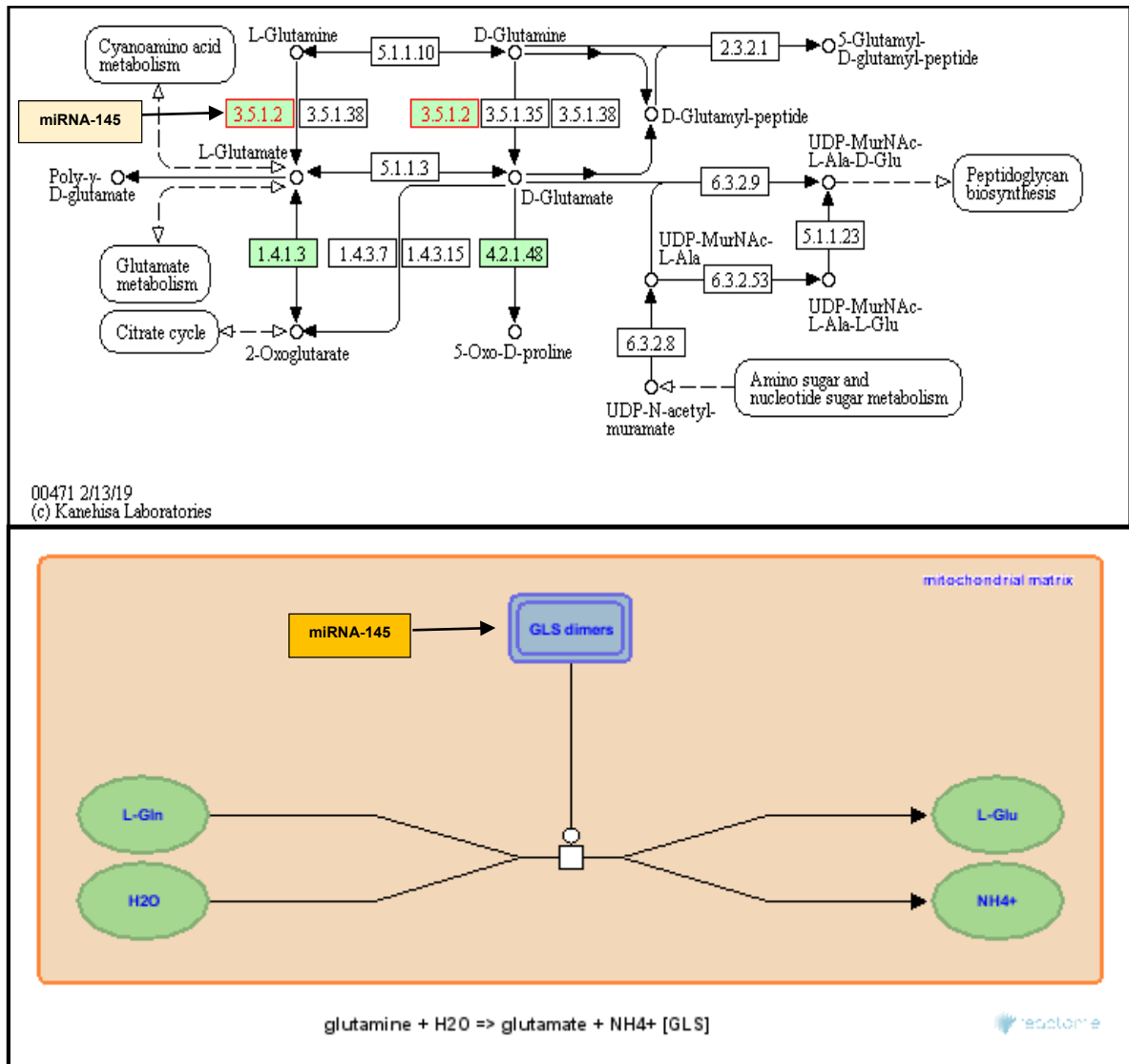


Figura 31. Anotación de las rutas metabólicas de la glutamina.

Modificado de KEGG y Reactome.

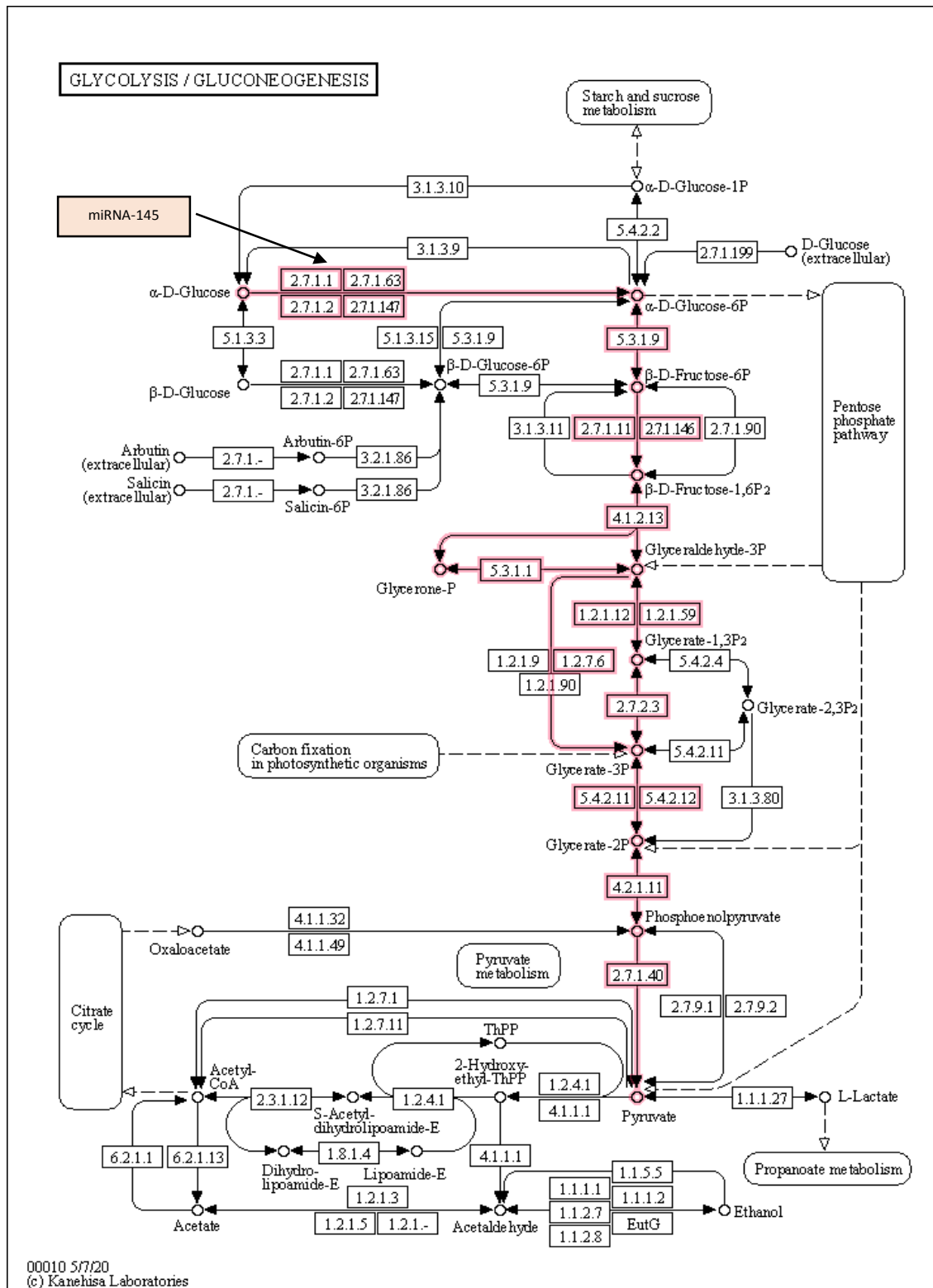


Figura 32. Anotación de las rutas metabólicas de la glucólisis y gluconeogénesis.

Modificado de <https://www.genome.jp/kegg/>