



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES VINCULADAS CON LA PROFESIÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Determinación de la expresión de los
miRNAs en plasma de pacientes con cáncer de
mama.**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

 **Sacbe Orozco Ontiveros** 

2183067836

ASESORES

Asesor interno: Dr. Javier Aldaco Ramírez

Asesor externo: Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

México, D.F.

Fecha 11 de julio 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES VINCULADAS CON LA PROFESIÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Determinación de la expresión de los
miRNAs en plasma de pacientes con cáncer de
mama.**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Sacbe Orozco Ontiveros

2183067836

ASESORES

Asesor interno: Dr. Javier Aldeco Ramírez

Asesor externo: Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

México, D.F.

Fecha 11 de julio 2024

INFORME DE CONCLUSIÓN DE SERVICIO SOCIAL

Nombre: Sacbe Orozco Ontiveros

Licenciatura: Biología.

Nombre del proyecto: Determinación de la expresión de los miRNAs en plasma de pacientes con cáncer de mama.

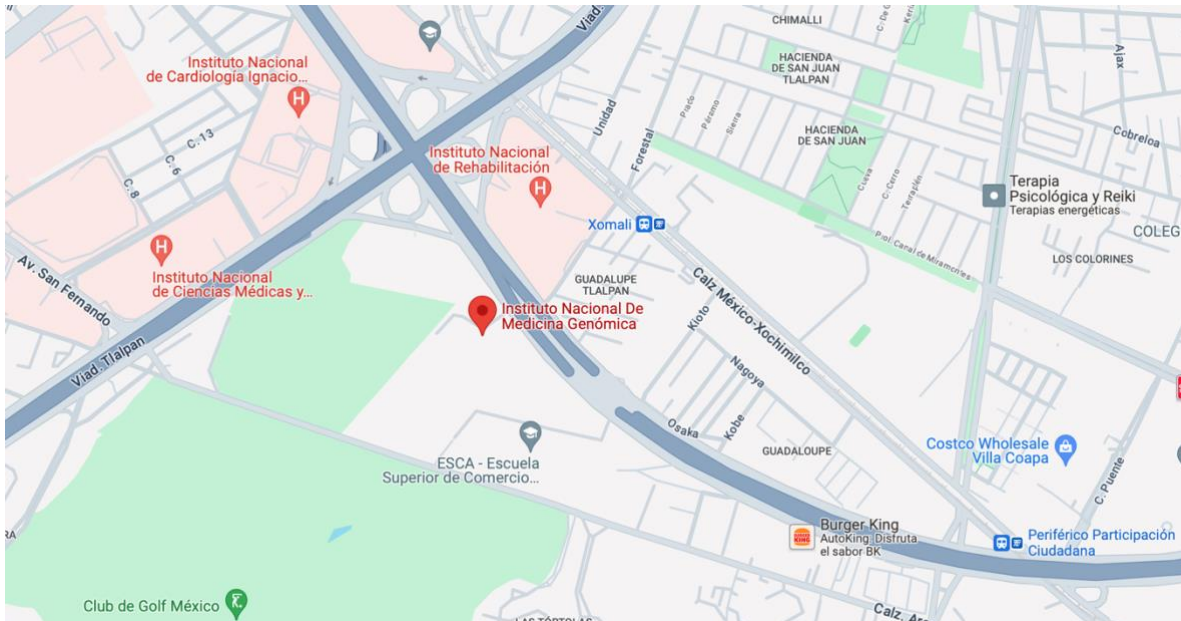
Fecha de inicio: 13/11/2023. **Fecha de conclusión:** 13/05/2024.

Introducción

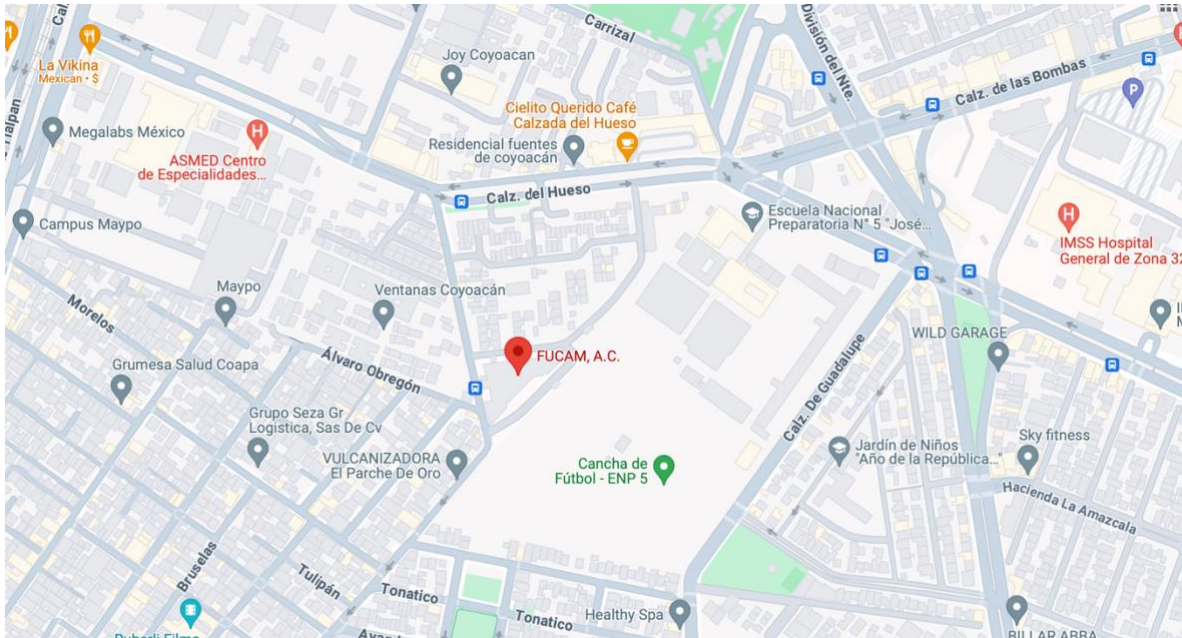
En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos del trabajo realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Este trabajo consistió en determinar la expresión de los microRNAs (miRNAs) en plasma de pacientes con cáncer de mama a través del convenio del Instituto Nacional de Medicina Genómica y la Fundación de Cáncer de Mama (FUCAM).

Lugar de realización

Instituto Nacional de Medicina Genómica



Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 Ciudad de México, CDMX
Fundación de Cáncer de mama (FUCAM)



Av El Bordo 100, Coapa, Ejido Viejo de Sta Úrsula Coapa, Coyoacán, 04980 Ciudad de México, CDMX.

FUCAM A.C es la primera y única institución privada sin fines de lucro en México que ofrece tratamiento integral y seguimiento especializado de cáncer de mama, mediante su unidad hospitalaria de alta especialidad en la Ciudad de México, nuestras sedes en Morelos, Oaxaca y Chiapas nos permiten estar más cerca de las comunidades que necesitan de nuestros servicios (FUCAM, 2024).

Marco teórico

El cáncer de mama es la causa de muerte mayormente relacionada con el cáncer entre las mujeres de los países industrializados (Cuk et al., 2012), siendo el tipo de cáncer más común con el 25.2% de incidencia de los casos en mujeres en el mundo (Gradishar, 2020). En 2020 hubo más de 2.3 millones de casos y 685,000 muertes en el mundo, además, se predice que para 2040 se incrementará a más de 3 millones de nuevos casos y un millón de muertes cada año (Allemani, 2018).

Los factores con mayor impacto en la supervivencia de las pacientes con esta enfermedad son: la detección oportuna, la etapa clínica y el tratamiento óptimo.

Una de las técnicas moleculares para la detección oportuna es la utilización de los miRNAs como bioindicadores de cáncer de mama que juegan un papel importante en procesos de desarrollo, crecimiento, metástasis y resistencia a medicamentos (Graveel et al., 2015). Los miRNAs son ARN pequeños no codificantes (de entre 18 y 25 nucleótidos de longitud) que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional al degradar las moléculas de ARNm o bloquear su traducción (Cuk et al., 2012). La expresión de microARN está relacionada con el desarrollo de diferentes patologías como el cáncer, donde pueden actuar como supresores de tumores, además de que también se pueden utilizar para clasificar tumores humanos (Romero, 2012).

Metodología

Durante los 6 meses de servicio social se llevaron a cabo varias actividades con el fin de poder determinar la expresión de los miRNAs en plasma de pacientes con cáncer de mama.

Dichas actividades se dividieron en etapas I (primero tres meses) y II (últimos tres meses).

Durante la etapa I: se leyeron artículos con experimentos ya reportados con esta metodología y se leyó sobre biología molecular para tener las bases necesarias de esta investigación.

Los artículos revisados se obtuvieron de revistas como Nature, Science, Cancers, Cancer Biology and Therapy, El Servier, entre otras. Además de leer, se colectaron las muestras asistiendo al FUCAM por las muestras de sangre para su posterior procesamiento en el laboratorio. Al escoger las muestras adecuadas para esta investigación, se tomaron ciertos criterios para que los resultados salieran como se esperaba. A continuación se encuentra la tabla de los criterios a considerar para las pacientes candidatas con cáncer de mama:

Crterios	Control positivo	Control negativo
Inclusión	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo femenino • Mujeres mexicanas • Dx de cáncer de mama 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo femenino. • Mujeres de 55-65 años de edad. • Mujeres mexicanas. • Que cuenten con mastografía no mayor a 1 año y en la que no se <u>detecten</u> anomalidades.
Exclusión	<ul style="list-style-type: none"> • Dx carcinoma in situ 	<ul style="list-style-type: none"> • Familiares de primera línea con antecedentes de cáncer mama y/o cualquier otro tipo de cáncer. • Que se encuentre con tratamiento hormonal actual, ya sea anticonceptivo o de cualquier otro tipo. • Mujeres embarazadas.
Eliminación	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen insuficiente de muestra • Muestras contaminadas • Muestras incorrectamente etiquetas 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestras hemolizadas. • Volumen insuficiente de muestra.

Tabla 1. Criterios de selección de pacientes para la extracción de RNA en plasma

Durante la etapa II se realizaron los experimentos correspondientes como el procesamiento de la sangre de las pacientes, la extracción de RNA, realizar la cuantificación para que todas las muestras estuvieran uniformes al momento de hacer la PCR, y por último la cuantificación de los microRNAs en el plasma.

A continuación, el procedimiento de cada paso para la identificación de microRNAs en plasma de pacientes con cáncer de mama:

1. Extracción y procesamiento de sangre periférica.

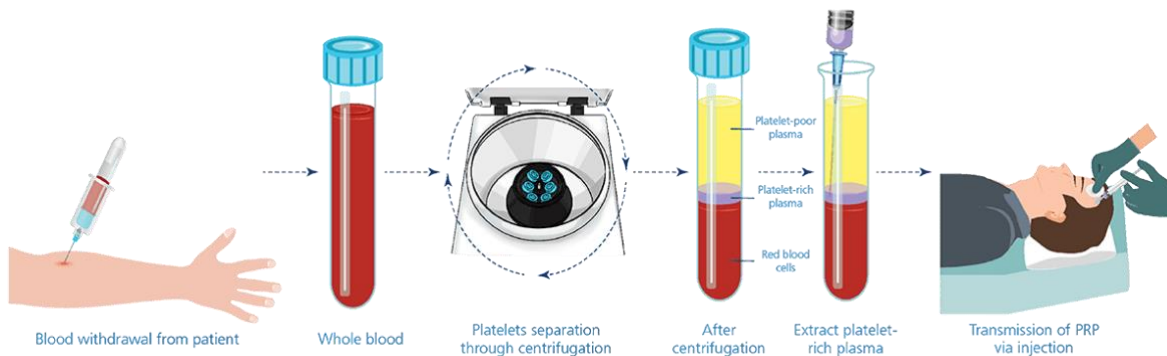


Imagen 1. Extracción de plasma, Esco Lifesciences, 2022.

Para la extracción de sangre, primero se informó a la paciente con un consentimiento sobre la investigación y se le pidió si podía donar dos tubos EDTA de su sangre. Después se llevaron las muestras al laboratorio para su procesamiento. Se realizó el mismo procedimiento con todas las muestras.

Procedimiento: Se centrifugaron los tubos a 2000g x 10 min a 4°C. Después se extrajo todo el plasma posible y se centrifugó nuevamente a 3250 g x 20 min a 4°C.

Al finalizar, se tomaba todo el plasma evitando los leucocitos y se centrifugaba una tercera vez a 3250 g x 30 min a 4°C. Se alicuotaba el plasma en criotubos de 2ml previamente rotulados con la información de la paciente y la fecha de colecta. Para terminar, se almacenaban los criotubos a -80°C hasta su procesamiento.

2. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA se necesitaron los leucocitos o el buffy coat, extraído también del mismo procedimiento que el del plasma, diferenciándose algunos pasos. La criopreservación del buffy coat se realizó con el suero DNA/RNA Shield.

El procedimiento se llevó a cabo mediante el método de extracción con TriZol. Para comenzar se les añadió a las muestras ya criopreservadas 500µl de TriZol frío, y se dejó incubar durante 5 min en frío.

Después se agregaron 100 µl de cloroformo para luego incubarlo en hielo x 10 min. Se centrifugaron las muestras a 13 000 g x 15 min a 4°C. Después de esta centrifugación, se pudieron observar las separaciones de las tres fases:

- ⇒ Fase acuosa (RNA)
- ⇒ Interfase (DNA)
- ⇒ Fase orgánica (proteínas)

Se recuperó la fase acuosa y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 ml tratado con DEPC para ponerlo en hielo. Se agregó 1000 µl de isopropanol frío y se mezcló. Después se dejó incubar a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 13 000 g x 25 min a 4°C para luego lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75% en DEPC. Se centrifugó nuevamente a 13 000 x 5 min a 4°C.

3. Cuantificación de ácidos nucleicos

Se cuantificaron las muestras con el Espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop para poder observar su pureza y su concentración. Muchas de las muestras iniciales salieron contaminadas con proteínas (entre 0.20 – 0.90) y sales (alrededor de 1.01). Sin embargo, conforme fueron aumentando las muestras, ya contaban con una concentración de 2.0 para proteínas y de 1.8 – 2.0 para sales, que era lo esperado.



Imagen 2. Espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop. Thermo Fisher Scientific, 2024.

4. Electroforesis

La electroforesis en gel es el método más sencillo para la obtención de información sobre macro-moléculas como proteínas, enzimas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), en mi caso se utilizó para identificación de ácidos nucleicos, donde se acomodan en función de su forma y tamaño, generando conjuntos de bandas características. Estas bandas son resaltadas y capturadas como una imagen para su estudio. Las macro-moléculas se separan utilizando una diferencia de potencial eléctrico, provocando un desplazamiento ya sea por su masa y carga eléctrica (Salazar *et. al*, 2017).

Los geles que se realizaron fueron los siguientes:

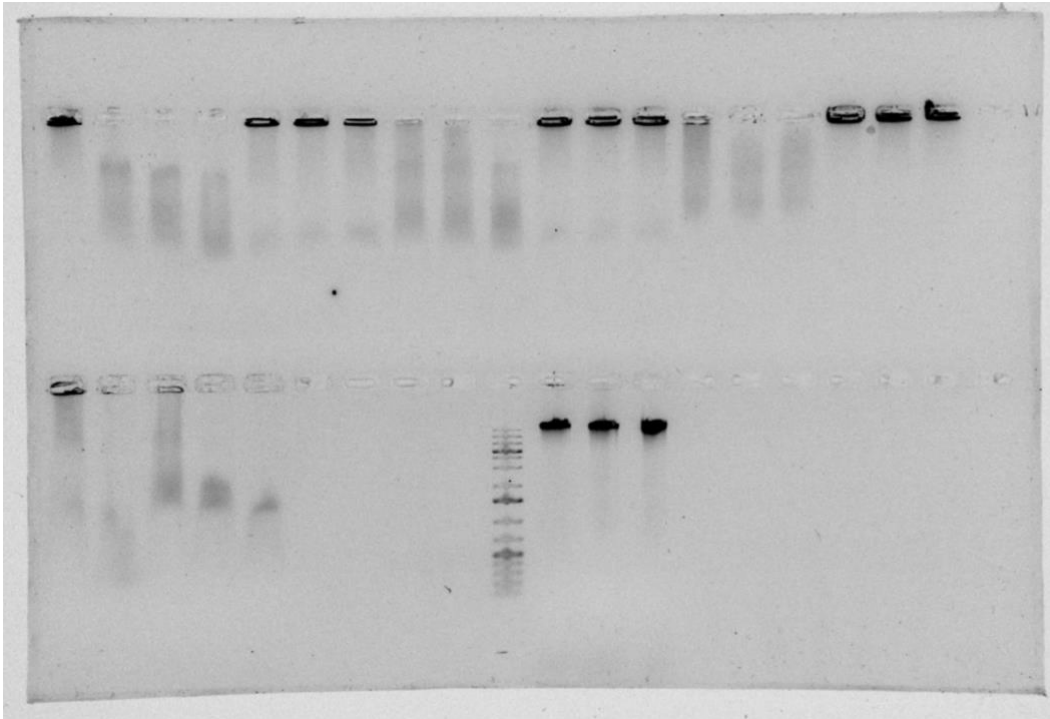


Imagen 3. Gel de agarosa para electroforesis de leucocitos.

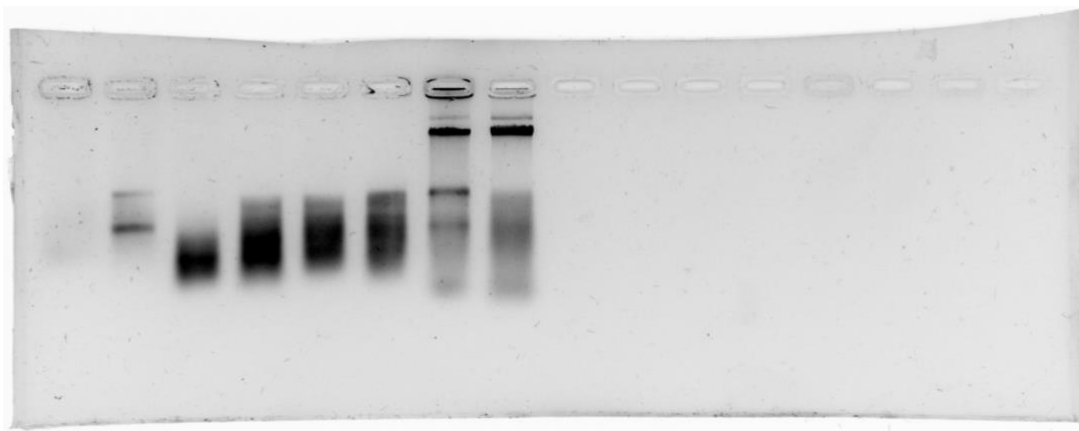


Imagen 4. Gel de agarosa para electroforesis para leucocitos.

5. PCR en tiempo real

La prueba se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) donde un fragmento de ADN conocido es copiado y amplificado billones de veces. El producto del PCR (punto final) es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra (Facultad de química, 2022).

La PCR en tiempo real es una modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: “En tiempo real” esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que el miRNA que se eligió para buscarse en el plasma de las pacientes que fue el miRNA-16, extraído del gusano *Caenorabditis elegans*, fue encontrado en las muestras analizadas de las pacientes.

Se sabe que las células liberan biomoléculas de diversa naturaleza a su entorno para comunicarse con las células vecinas. Entre dichas moléculas, secretan elementos más complejos como las vesículas; estructuras compuestas por bicapas lipídicas con proteínas transmembranales que encierran un contenido hidrofílico. Los exosomas son un subtipo pequeño de estas vesículas (de 30 a 150 nm), producidos por una amplia variedad de tipos celulares como las neuronas, células tumorales, células epiteliales y células del sistema inmunológico (Maravillas, 2017). Algunas de las moléculas que tienen son proteínas, lípidos, ARNm y otras especies de ARN, como ARN largo no codificante, ARN circular y microARN (miARN) (Ni *et al.*, 2018). En el presente trabajo se estudiaron los microRNAs presentes en los exosomas del plasma de las pacientes seleccionadas, encontrando un aumento de

los microRNAs, específicamente del mir-16, coincidiendo con lo reportado por Shin y colaboradores en 2015 donde estudiaron miRNAs circulantes libres de células como biomarcador del cáncer de mama triple negativo, descubriendo que mir-16 se expresaba más en plasma, que en muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Además demostraron que miR-16 tiene una expresión en cáncer de mama triple negativo (Shin, 2015.)

Conclusión

La carga de microARN (miARN) en exosomas que participan en la comunicación celular es un proceso selectivo. El estudio que realicé durante mi estancia de seis meses investiga si el enriquecimiento de miARN en exosomas refleja la patogénesis del cáncer de mama (BC). Demostrando y reafirmando que mir-16 se puede utilizar como un biomarcador de la sangre, en este caso específicamente en el plasma de pacientes con cáncer de mama, ayudando a continuar con la investigación de un diagnóstico temprano del cáncer de mama.

Referencias

Fucam (2024) *FUCAM*. Disponible en: <https://fucam.org.mx/> (Revisado el 12 julio 2024).

Cuk, K., Zucknick, M., Heil, J., Madhavan, D., Schott, S., Turchinovich, A., Arlt, D., Rath, M., Sohn, C., Benner, A., Junkermann, H., Schneeweiss, A., & Burwinkel, B. (2013). Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *International journal of cancer*, 132(7), 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ijc.27799>

Gradishar, W. J., Anderson, B. O., Abraham, J., Aft, R., Agnese, D., Allison, K. H., Blair, S. L., Burstein, H. J., Dang, C., Elias, A. D., Giordano, S. H., Goetz, M. P., Goldstein, L. J., Isakoff, S. J., Krishnamurthy, J., Lyons, J., Marcom, P. K., Matro, J., Mayer, I. A., Moran, M. S., ... Kumar, R. (2020). Breast Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National*

Comprehensive Cancer Network : *JNCCN*, 18(4), 452–478.
<https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0016>

Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., Bonaventure, A., Valkov, M., Johnson, C. J., Estève, J., Ogunbiyi, O. J., Azevedo E Silva, G., Chen, W. Q., Eser, S., Engholm, G., Stiller, C. A., Monnereau, A., Woods, R. R., Visser, O., Lim, G. H., ... CONCORD Working Group (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet (London, England)*, 391(10125), 1023–1075. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3)

Graveel, C. R., Calderone, H. M., Westerhuis, J. J., Winn, M. E., & Sempere, L. F. (2015). Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 7, 59–79. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S43799>

Romero-Cordoba, S., Rodriguez-Cuevas, S., Rebollar-Vega, R., Quintanar-Jurado, V., Maffuz-Aziz, A., Jimenez-Sanchez, G., Bautista-Piña, V., Arellano-Llamas, R., & Hidalgo-Miranda, A. (2012). Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PloS one*, 7(3), e31904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031904>

Ltd, E. M. P. (s. f.). *How Platelet-Rich plasma treatment work | ESCO Scientific*. <https://www.escolifesciences.com/news/platelet-rich-plasma-treatment-how-does-it-work>

Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/One^C Espectrofotómetro de microvolúmenes de UV-Vis con Wi-Fi -. (s. f.). <https://www.fishersci.es/shop/products/nanodrop-one-onec-microvolume-uv-spectrophotometer/p-6524184>

Salazar-Centeno, C. A., Niño-Niño, C. A., & Díaz-Suárez, R. A. (2017). Detección de bandas en color en una imagen de electroforesis en gel de una dimensión usando un algoritmo de localización basado en máximos y mínimos. *Iteckne*, 14(2), 122. <https://doi.org/10.15332/iteckne.v14i2.1766>

Facultad de Química. (2022, 4 agosto). *PCR en tiempo real - Facultad de Química*. <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/#:~:text=Los%20protocolos%20de%20la%20PCR,establece%20la%20cantidad%20de%20microorganismos>

Maravillas-Montero, José Luis, & Martínez-Cortés, Ismael. (2017). Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas. *Revista alergia México*, 64(4), 463-476. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.285>

Ni, Q., Stevic, I., Pan, C. *et al.* Different signatures of miR-16, miR-30b and miR-93 in exosomes from breast cancer and DCIS patients. *Sci Rep* 8, 12974 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31108-y>

Shin, V., Siu, J., Cheuk, I. *et al.* Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. *Br J Cancer* 112, 1751–1759 (2015). <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.143>