



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SALIVA DE PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

DANIELA VEGA MENDOZA

Hermosillo, Sonora

Mayo del 2012.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SALIVA DE PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

**que para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOCENCIAS
presenta:**

DANIELA VEGA MENDOZA

Hermosillo, Sonora, México.

Mayo del 2012.

**EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SALIVA DE PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

DANIELA VEGA MENDOZA

Hermosillo, Sonora, México.

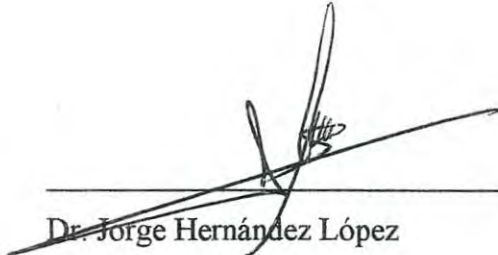
Mayo del 2012.

APROBACIÓN


Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Expresión de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama”, presentada por Daniela Vega Mendoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Biociencias.



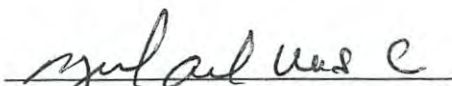
Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Asesor



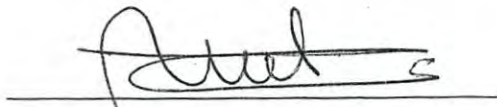
Dr. Jorge Hernández López
Sinodal



Dra. María Isabel Arámburo Rubio
Sinodal



Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias
Sinodal



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante la realización de mis estudios de maestría.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) unidad Hermosillo y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por su apoyo otorgado para la realización de la presente tesis.

A mi director de tesis Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán por brindarme su apoyo para la realización de este trabajo. A mis asesores Dr. Jorge Hernández por abrirme las puertas de su laboratorio, a la Dra. Isabel Arámburo Rubio por su gran apoyo no solo como asesora sino como amiga, a la Dra. María Burboa Zazueta y el Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias por su apoyo y sus correcciones.

Al Biol. Trinidad Encinas por enseñarme las técnicas que utilicé y por resolverme tantas dudas.

Al Dr. Iván Anduro Corona por sus conocimientos, apoyo y amistad.

A mis compañeras del posgrado Nora, Diana y Fátima por su apoyo durante el curso de la maestría, por escucharme y darme ánimos.

A mis amigas Gabriela y Erika por apoyarme siempre y darme ánimos para seguir adelante cuando más difícil se ponían las cosas. También por apoyarme con las traducciones y las gráficas, gracias.

A Edson por enseñarme hacer electroforesis, pero sobre todo por su gran apoyo y amor.

DEDICATORIA

A mi papá Raymundo Vega Ramos por su ejemplo de dedicación y responsabilidad, sé que serías el más emocionado con este logro y a mi mamá Guadalupe Mendoza Duarte por su apoyo en todos los sentidos y por estar siempre conmigo, gracias.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1 Generalidades del Cáncer de Mama.....	3
2.2 Factores Pronóstico en el Cáncer de Mama.....	5
2.3 Epidemiología del cáncer de mama	7
2.4 Diagnóstico del cáncer de mama	8
2.5 Tratamiento del Cáncer de mama	9
2.6. Marcadores Tumorales en Cáncer de Mama	10
2.7 Generalidades de los microRNAs	11
2.8 Biogénesis de los microRNAs	12
2.9 Mecanismos de acción microRNAs	15
2.10 Regulación de los microRNAs.....	18
2.11 El papel de los MicroRNAs en el cáncer.....	19
2.12 MicroRNAs circulantes en el Cáncer	22
2.13 MicroRNAs y Cáncer de Mama	24
2.14 Saliva como fluido en el diagnóstico de enfermedades	26
2.15 Estudios de la saliva en el Cáncer de Mama.....	28
2.16 Expresión de microRNAs en saliva	29
2.17 microRNAs de estudio	30

2.18 Técnicas a emplear	31
2.18.1 Reacción de transcripción reversa	31
2.18.2 PCR tiempo real	32
III. HIPOTESIS	33
IV. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo General:.....	34
4.2 Objetivos Específicos:.....	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1 Diseño experimental y muestreo.....	35
5.2.1 Obtención del sobrenadante.....	38
5.2.2 Extracción de RNA total.....	38
5.3 Síntesis de cDNA mediante la Reacción de Transcripción Reversa.....	39
5.4 Ensayos en PCR tiempo real cuantitativa (qPCR).....	41
5.4.1 Obtención de los oligonucleótidos.....	41
5.4.2 Ensayos de expresión por PCR tiempo real.....	41
5.4.3 Cálculo de la eficiencia de la reacciones de PCR	43
5.7 Procesamiento de los Datos.....	44
5.7.1 Obtención del $2^{\Delta\Delta Ct}$	44
5.7.2 Análisis estadístico	45
VI. RESULTADOS	47
6.1 Datos clínicos de las pacientes incluidas en el estudio	47
6.2 Datos patológicos de los tumores de mama.....	48
6.3 Extracción de RNA	50
6.4 Síntesis de cDNA.....	52
6.5 Análisis de expresión de microRNAs	52

6.6 Análisis de asociación de la expresión de microRNAs y variables clínico-patológicas.	61
VII. DISCUSIÓN	63
VIII. CONCLUSIONES	71
IX. RECOMENDACIONES	72
X. LITERATURA CITADA	73
ANEXO 1	82
Expression of miRNA in saliva of women with breast cancer and healthy subjects.....	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Alteraciones que conllevan al crecimiento maligno	4
2	Factores Pronósticos en Cáncer de Mama	6
3	Clasificación de los microRNAs de acuerdo a su localización en el genoma	12
4	Reconocimiento del microRNA por el mRNA ejemplo de <i>lin-4</i> que tiene como blanco <i>lin-14</i>	13
5	Biogénesis de microRNAs	15
6	Diagrama de la Metodología llevada a cabo	36
7	Número de casos por estadio tumoral estadificados mediante el sistema de TNM	50
8	Concentración de RNA en ng/μl extraída a partir de saliva en el grupo “casos” y en el grupo “control”	51
9	Gel de integridad de RNA de poliacrilamida al 13% teñido con nitrato de plata al 0.1%	51
10	Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen constitutivo RNU1A en diferentes muestras del grupo “control” (b) y del grupo “casos” (a)	53
11	Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen RNU1A, la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación	53
12	Curvas que representan la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de los genes de estudio	54
13	Mediana y el error estándar de la expresión de <i>mir-21</i> en el grupo “casos” y en el grupo “control”	55
14	Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen <i>mir-21</i>	55

15	Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen <i>mir-21</i> , la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación	56
16	Mediana y el error estándar de la expresión de <i>mir-155</i> en el grupo “casos” y en el grupo “control”	57
17	Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen <i>mir-155</i>	57
18	Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen <i>mir-155</i> , la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación	58
19	Mediana y el error estándar de la expresión de <i>mir-195</i> en el grupo “casos” y en el grupo “control”	59
20	Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen <i>mir-195</i>	59
21	Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen <i>mir-195</i> , la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación	60
22	Electroforesis de agarosa al 4% de los productos de amplificación de cada gen	60
23	Expresión de los tres genes de estudios en ambos grupos casos y controles	61

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Datos obtenidos de las participantes del grupo “casos” en el estudio	37
2	Secuencias de los microRNAs en estudio	41
3	Oligonucleótidos para los microRNAs en estudio	42
4	Ejemplo del cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$	45
5	Datos clínicos de las pacientes	48
6	Datos patológicos de los tumores de mama	49
7	Eficiencias de la reacción de PCR de los genes en estudio	54
8	Índice de cambio en la expresión del grupo “casos” respecto al grupo “control”	61
9	Asociación de la expresión de microRNAs en saliva con características clínico-patológicas (valores de p)	62

RESUMEN

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública y es la primera causa de incidencia y mortalidad por cáncer en la mujer adulta en Latinoamérica y en el ámbito mundial. La determinación de marcadores tumorales representa una de las técnicas que ayudan en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del tratamiento para este tipo de cáncer. Los microRNAs han surgido como una nueva clase de marcadores tumorales para cáncer de mama, debido a su expresión alterada en tejido canceroso respecto a tejido normal. Los microRNAs no solo se han estudiado en tejido sino que se ha logrado su aislamiento de diversos fluidos biológicos, tales como la saliva. El presente estudio se enfocó en estudiar la expresión, mediante la técnica de PCR tiempo real, de los microRNAs *21*, *155* y *195* en saliva de pacientes con cáncer de mama y en controles sanos, y se relacionó su expresión con características clínico-patológicas de la enfermedad. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *mir-195* ($p=0.02$), mostrando una menor expresión en el grupo de pacientes con cáncer de mama. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *mir-21* y *mir-155*. Se observó además que la expresión de los microRNAs estudiados está asociada con la invasión a nódulos linfáticos, la edad de la menopausia y la edad al momento del diagnóstico. El estudio de expresión de microRNAs en saliva tiene el potencial de servir como biomarcador para el pronóstico y diagnóstico del cáncer de mama, si se realizan estudios en mayor número de casos.

ABSTRACT

Breast cancer is a public health problem and is the leading cause of cancer incidence and mortality in adult women in Latin America and worldwide. The determination of tumor markers is one of the techniques that help in diagnosis, prognosis and treatment monitoring for this type of cancer. MicroRNAs have emerged as a new class of tumor markers for breast cancer because of their altered expression in cancerous tissue compared to normal tissue. MicroRNAs not only been studied in tissue but has achieved the isolation of various biological fluids such as saliva. This study focused on studying the expression, by real time PCR of microRNAs 21, 155 and 195 in saliva of patients with breast cancer and healthy controls, and its expression correlated with the clinical-pathological features of the disease. We found statistically significant difference in the expression of *mir-195* ($p = 0.02$), with less expression in the group of patients with breast cancer. There were no significant differences in gene expression of *mir-21* and *mir-155*. It was further observed that the expression of microRNAs studied is associated with the invasion of lymph nodes, age at menopause and age at diagnosis. The study of expression of microRNAs in saliva has the potential to serve as a biomarker for prognosis and diagnosis of breast cancer, if studies are conducted in more cases.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública y es la primera causa de mortalidad por cáncer en la mujer adulta en Latinoamérica y en el ámbito mundial (Marie-Knaul *et al.*, 2009). La mortalidad en la mayoría de los países latinoamericanos va en aumento, en particular en los países con historial de mortalidad relativamente baja, entre ellos México (Franco-Marina *et al.*, 2009).

Las principales herramientas de tamizaje para el diagnóstico del cáncer de mama son: la exploración clínica y las técnicas de imagenología, entre las que se encuentran la mamografía, el ultrasonido y la resonancia magnética (Franco-Marina *et al.*, 2009). Entre otras técnicas que ayudan en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del tratamiento del cáncer de mama se haya la determinación de marcadores tumorales. Un marcador tumoral es aquella molécula que se puede encontrar en el cuerpo cuando hay presencia de una neoplasia maligna, dicha molécula es producida por células cancerosas o bien, en respuesta a estas células. Dentro de los nuevos marcadores tumorales que se han identificado para cáncer de mama se encuentran los microRNAs, los cuales se han encontrado frecuentemente alterados en diversos tipos de cánceres humanos. La desregulación de microRNAs en el cáncer de mama fue demostrada por primera vez por Iorio y colaboradores (2005), y a partir de este estudio han surgido numerosas investigaciones sobre la expresión de microRNAs y su papel en el cáncer de mama (Blenkiron *et al.*, 2007; Heneghan *et al.*, 2009; Lowery *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2009b).

Los microRNAs son una familia de RNAs pequeños no codificantes involucrados en el silenciamiento genético post-transcripcional (Liu *et al.*, 2008). Los microRNAs han sido encontrados en tejido, suero, saliva y orina, entre otros fluidos corporales. Se han realizado estudios de la expresión de microRNAs en suero en pacientes con cáncer de mama, y se han encontrado alterados y correlacionando con características clínico-

patológicas (Heneghan *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Asaga *et al.*, 2010; Heneghan *et al.*, 2010b; Roth *et al.*, 2010).

La saliva es uno de los fluidos que ha recibido gran atención como medio de diagnóstico de diversas enfermedades, debido a su forma de obtención no invasiva. La saliva es un filtrado de la circulación sanguínea y contiene una amplia gama de proteínas, ácidos nucleicos, electrolitos y hormonas que se originan en múltiples sitios del cuerpo (Gao *et al.*, 2009). Los constituyentes de la sangre pueden entrar en la saliva a través de los vasos capilares, es por ello que los componentes de la saliva están relacionados con los del suero. Se ha observado que diversas proteínas como el cortisol (Lawrence, 2002), el Antígeno Específico de Próstata (Ayatollahi *et al.*, 2007), la inmunoglobulina A y el anticuerpo anti-HIV en la saliva correlacionan positivamente con proteínas del suero (Wu *et al.*, 2009). Se han realizado diversos estudios en saliva buscando marcadores tumorales para cáncer de mama, entre ellos c-erbB-2 (Streckfus y Bigler, 2005), CA15-3 (Agha-Hosseini *et al.*, 2009), VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial) y CEA (Antígeno Carcino-embriionario) (Brooks *et al.*, 2008), y se han encontrado diferencialmente expresados en pacientes con cáncer de mama respecto a controles sanos.

Aunque recientemente se logró la detección de microRNAs en saliva en casos de cáncer oral (Park *et al.*, 2009), no existen estudios sobre expresión de microRNAs en saliva para cáncer de mama. Debido a que se ha demostrado la presencia de marcadores tumorales para éste tipo de cáncer en saliva, y a la detección de microRNAs en dicho fluido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama y comparar su expresión con controles sanos, así como correlacionar su expresión con características clínico-patológicas de la enfermedad.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Generalidades del Cáncer de Mama

Cáncer es un término utilizado para enfermedades en las cuales células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos del cuerpo a través de la sangre y la linfa (Instituto Nacional de Cáncer NCI, 2009).

El cáncer es el resultado de mutaciones acumulativas que alteran genes específicos en el DNA celular, con lo que se altera la expresión de tales genes y sus productos (Sudbery, 2004; Strachan y Read, 2006). Las mutaciones claves en el proceso canceroso afectan dos tipos de genes: genes supresores de tumores y proto-oncogenes. Los supresores de tumores normalmente frenan la actividad de la célula para dividirse, y las mutaciones los deshabilitan permanentemente. El segundo tipo son los proto-oncogenes, los cuales estimulan el crecimiento y la división celular, los cuales al sufrir ciertas mutaciones pueden llegar a convertirlos en su estado activo, oncogenes (Lodish *et al.*, 2009). Por ello se dice que el cáncer es una enfermedad genética, ya que alteraciones en el DNA dotan a las células de “superpoderes”, tales como la habilidad de crecer y dividirse indefinidamente (Gibbs, 2004).

Se ha propuesto que el amplio número de genotipos en el cáncer es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, las cuales colectivamente conllevan al crecimiento maligno y son: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a los inhibidores de factores de crecimiento (factores de anti-crecimiento), evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis prolongada e invasión tisular o metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000; Herbert, 2003; Lodish *et al.*, 2009) (Figura 1)

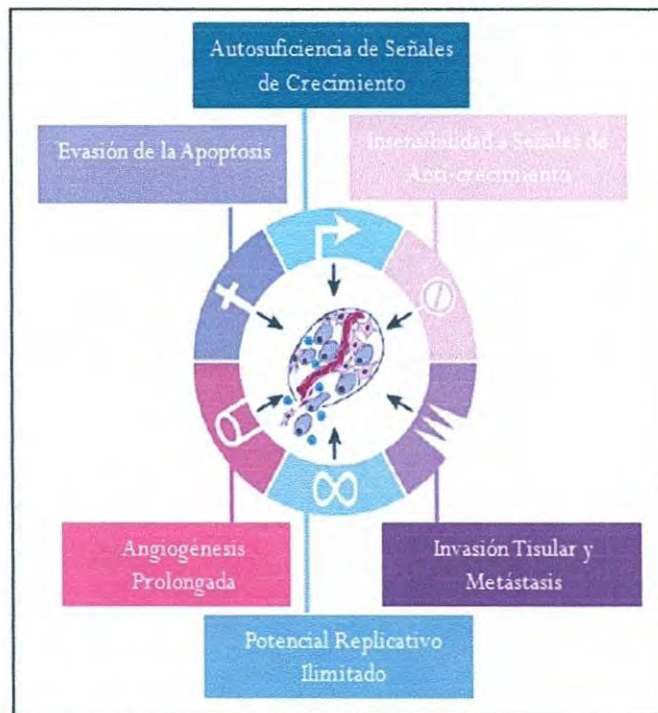


Figura 1. Alteraciones que conllevan al crecimiento maligno (Hanahan y Weinberg, 2000; Herbert, 2003).

El cáncer de mama es definido como una proliferación de células sin control en los tejidos de la mama, usualmente en los conductos (tubos que transportan la leche) y en los lóbulos (glándulas que producen la leche) (NCI, 2009). Se dice que es una enfermedad clínicamente heterogénea, porque presenta gran variabilidad genética tanto los pacientes como los tumores (Puztai, 2008; Sotiriou y Puztai, 2009).

La evolución de la enfermedad varía significativamente, dependiendo de las características pronósticas de las pacientes y sus tumores, incluyendo la edad de la paciente, estado menopáusico, tamaño e histología del tumor, estado de los nódulos, etc. La respuesta al tratamiento también depende de una serie de factores predictivos, tales como el estado de los receptores hormonales y el Factor de Crecimiento Epidermal Humano 2 (HER2). Los tratamientos actuales utilizan como guía este tipo de características para determinar el tratamiento más adecuado. Sin embargo, estas guías son imperfectas, y no siempre predicen la respuesta al tratamiento o la sobrevida de la paciente. Las nuevas tecnologías están permitiendo incrementar la cantidad de datos moleculares que se pueden obtener de los

tumores, lo cual permite tener tratamientos más personalizados. El desafío es generar más información que mejore la exactitud del pronóstico y la predicción del resultado del tratamiento para las pacientes de manera individual (Rodenhiser *et al.*, 2010).

Los cinco subtipos que han sido identificados (Luminal A, Luminal B, Tipo-Basal, *ERBB2* positivo/ER negativo y tipo-normal) representan diferentes entidades biológicas y podrían originarse de diferentes tipos de células. El *tipo-basal* llamado así debido a la semejanza con el patrón encontrado en las células epiteliales basales de la glándula mamaria normal, presenta ER (Receptor de Estrógenos) negativo, PR (Receptor de Progesterona) negativo y HER2 negativo, llamado también "*triple-negativo*" es de pobre pronóstico; *luminal A* es generalmente de bajo grado histológico (el grado histológico, que también se llama diferenciación, se refiere a la semejanza o no que tienen las células del tumor con las células normales del mismo tipo de tejido, una bajo grado histológico indica un tumor bien diferenciado), y es ER-positivo; *luminal B*, la mayoría son ER-positivos pero pueden expresar bajos niveles de receptores hormonales y son frecuentemente de alto grado histológico; y *HER-2 positivos*, los cuales presentan amplificación y alta expresión del gen *ERBB2* y otros genes relacionados con el amplicón *ERBB2* (Perou *et al.*, 2000; Sotiriou y Pusztai, 2009), es de pobre-pronóstico. El tipo- normal (*normal-like*) comparte patrones de expresión genética con el tejido de mama normal (Kao *et al.*, 2009). Los luminales se diferencian de los tipo basales en el tipo de células a las que se asemejan, los primeros se parecen a células de los conductos y son los más frecuentes, y los segundos se asemejan a células basales epiteliales (Sorlie *et al.*, 2003; Abba *et al.*, 2010).

Debido a que existen diversos tipos de cáncer de mama tanto genética como clínicamente hablando, es necesaria su adecuada clasificación ya que de ello depende el pronóstico y el tratamiento más adecuado para beneficiar a la paciente.

2.2 Factores Pronóstico en el Cáncer de Mama

Los factores pronósticos son cualquier característica del tumor o de la paciente que pueda usarse para predecir la historia natural de la neoplasia y por ende del periodo libre de

enfermedad, recidiva y sobrevida de las pacientes. En 1999 se llegó a un consenso por el Colegio Americano de Patólogos, en el cual se clasificó a los factores pronóstico en tres categorías dependiendo de si han sido probados y se ha demostrado su eficacia. La categoría I incluye aquellos que deben utilizarse de rutina y que proveen información en el manejo de la paciente; la categoría II son factores biológicos y clínicos que han sido estudiados pero que se necesita de más información estadística para validarlos y son opcionales; y la categoría III son aquellos que no se han estudiado en su totalidad. En la actualidad se ha aceptado que el oncogén HER2/*neu* sea colocado como categoría I (Fitzgibbons *et al.*, 1999; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008) (Figura 2)

CATEGORÍA I	CATEGORÍA 2	CATEGORÍA 3
Tamaño del Tumor	HER-2- <i>neu</i>	Análisis de Ploidía de DNA
Estatus Ganglionar	p53	Angiogénesis EGF
Grado Histológico	Permeación Vascular o Linfática	TGF α
Tipo Histológico	Marcadores de Proliferación Celular (Ki-67, MIB-1)	bcl-2
Expresión de RH	Análisis de DNA (Fracción de Fase)	pS2
		Catepsina D

Figura 2. Factores Pronósticos en Cáncer de Mama (Perez-Sanchez *et al.*, 2008).

Dentro de los factores pronósticos más utilizados en la práctica clínica se encuentran los siguientes:

i) Tamaño tumoral: es uno de los principales y más poderosos predictores en el cáncer de mama. La frecuencia de metástasis nodal en pacientes con tumores de menos de 1cm es del 10 al 20% y las pacientes con nódulos negativos y tumor menor de 1cm tienen una sobrevida libre de enfermedad de 10 años en el 90% de los casos.

ii) Estado ganglionar: el estatus de los ganglios linfáticos axilares ha demostrado ser repetidamente el más importante predictor de sobrevida libre de enfermedad y sobrevida total en cáncer de mama. Solo del 20 al 30% de las pacientes con nódulos negativos desarrollarán recaída dentro de los 10 años, comparados con cerca del 70% en pacientes

con invasión en nódulos axilares. El número absoluto de nódulos afectados es también de importancia pronóstica, pacientes con cuatro o más nódulos afectados tienen peor pronóstico que aquellas que tienen menos de cuatro ganglios afectados.

iii) Grado histológico: constituye un reflejo de la diferenciación celular del tumor y permite estratificar el riesgo dentro de un estado tumoral dado.

iv) Índice mitótico: definido como el número de figuras mitóticas en un área dada del tumor, es una estimación exacta de la proliferación celular del tumor. Altos índices mitóticos han sido correlacionados con pobre resultados clínicos.

v) Estatus de los Receptores Hormonales: la determinación de la expresión del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR) son procedimientos de rutina en el manejo de pacientes con cáncer de mama, primeramente como factores pronóstico de respuesta a las terapias adyuvantes hormonales. (Fitzgibbons *et al.*, 1999; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008). Las pacientes que presentan positividad para los receptores hormonales ER+/PR+ tienen mayor probabilidad de responder a las terapias hormonales y sobrevivir a la enfermedad. Aproximadamente el 40% de los tumores de mama son ER+/PR+ y se considera que éstos pacientes tienen el mejor pronóstico ya que éstos cánceres están asociados a bajo índice de proliferación celular y están bien diferenciados (Cork *et al.*, 2008).

2.3 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública y es la primera causa de incidencia y mortalidad por cáncer en la mujer adulta en Latinoamérica y en el ámbito mundial (Marie-Knaul *et al.*, 2009). En el mundo, alrededor del 1% de la carga por enfermedad en las mujeres se vincula con cáncer de mama y varía de 3.2% en los países ricos a 0.4% en los pobres (Lozano-Ascencio *et al.*, 2009).

La mortalidad en la mayoría de los países latinoamericanos va en aumento, en particular en los países que contaban con una mortalidad relativamente baja, entre ellos México (Franco-Marina *et al.*, 2009). Además se observa que la mortalidad por cáncer mamario se concentra principalmente en los estados del norte de la República mexicana (Marie-Knaul *et al.*, 2009).

Según los datos más recientes (2008) del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) en México los tumores malignos son la tercera causa de muerte a nivel nacional con 67,048 muertes. El tumor maligno de la mama es la primera causa de mortalidad por cáncer en la mujer con un total de 4, 418 muertes registradas en el 2008, seguido del tumor maligno del cuello del útero con 4, 031 muertes. El estado de Sonora ocupa el 10° lugar en muertes por cáncer de mama en la mujer.

2.4 Diagnóstico del cáncer de mama

Las principales herramientas de tamizaje para el diagnóstico del cáncer de mama son: la exploración clínica y las técnicas de imagenología (Franco-Marina *et al.*, 2009). Por medio de imagenología se pueden observar las características de los tumores, entre éstas técnicas se encuentran la mamografía, el ultrasonido y la resonancia magnética. La mamografía detecta los tumores basándose en la presencia de una masa, microcalcificaciones, o distorsión de la arquitectura normal de la mama. El ultrasonido puede clasificar una masa como un quiste líquido o sólido y la resonancia magnética añade información sobre la vascularización del tumor y el flujo sanguíneo del mismo. La imagenología permanece como una herramienta integral en la detección clínica, estadificación y manejo del cáncer de mama y aunque se han logrado mejoras significativas en la resolución anatómica, la mamografía de tamizaje continúa produciendo un número significativo de estudios falsos positivos y negativos (Tafreshi *et al.*, 2010).

2.5 Tratamiento del Cáncer de mama

El tratamiento de la paciente después de la sospecha inicial de cáncer de mama incluye la confirmación del diagnóstico mediante el estudio de una biopsia o fragmento de tejido mamario. Después se evalúa el estadio de la enfermedad y se selecciona el tratamiento, el cual generalmente incluye: la extracción quirúrgica del tejido tumoral, la determinación de los receptores hormonales y aplicación de tratamientos hormonales, quimioterapias o dirigidos (NCI, 2009).

Las terapias disponibles actualmente son: la terapia endocrina (tamoxifen, inhibidores de aromatasas, gestágenos), quimioterapia (antraciclinas, taxanos, vinorelbina, etc.), terapia de anticuerpos monoclonales (trastuzumab, bevacizumab), bifosfonatos, radiación, procedimientos quirúrgicos y combinaciones de las anteriores (Gerber *et al.*, 2010).

Actualmente la investigación en cáncer de mama está siendo enfocada en el descubrimiento de células y tejidos diana que presenten receptores para una hormona o droga en particular, llamadas terapias dirigidas. Estos tejidos y células diana están conduciendo a tratamientos más sofisticados que las quimioterapias citotóxicas convencionales o las terapias basadas en hormonas. Las terapias dirigidas consisten en el blanqueo de señales en las células malignas como la maquinaria de transducción, incluyendo procesos cruciales que involucran la invasión celular, metástasis celular, apoptosis, el ciclo celular y angiogénesis relacionada al tumor. Se han utilizado terapias moleculares dirigidas en combinación con las quimioterapias convencionales y han demostrado eficacia, como ejemplos, el anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) llamado trastuzumab y el anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) llamado bevacizumab (Álvarez, 2010).

2.6. Marcadores Tumorales en Cáncer de Mama

Entre otras técnicas que ayudan en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del tratamiento del cáncer de mama se haya la determinación de marcadores tumorales. Un *marcador tumoral* es aquella molécula que se puede encontrar en el cuerpo cuando hay presencia de malignidad, es producida por células cancerosas o bien, en respuesta a estas células. Pueden ser liberadas a la circulación sanguínea, cuyos niveles séricos se modifican de acuerdo a la evolución y curso clínico del cáncer (Martínez-Cedillo, 2004).

Actualmente se dispone de algunos marcadores tumorales séricos para cáncer de mama y para otros tipos de cánceres, los utilizados principalmente son: el Antígeno Carcino-embriionario (ACE) el cual presenta niveles elevados durante el curso de la enfermedad en aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer de mama; y el Antígeno de Cáncer 15-3 (CA 15-3) el cual es un indicador más sensible y específico en la metástasis del cáncer mamario que el ACE. Sin embargo, ninguno de los dos es adecuado para detectar precozmente el cáncer de mama, además carecen de una sensibilidad y especificidad diagnósticas elevadas, por ello son incapaces de discriminar en 100% la ausencia o la presencia de tumores (Martínez-Cedillo, 2004; Ruiz-Reyes, 2004).

Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de nuevos marcadores en el cáncer de mama, los cuales sean más específicos, sensibles y además sean obtenidos mediante técnicas no-invasivas que permitan la detección oportuna y sean además útiles en el pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

Dentro de los nuevos marcadores que han surgido para el cáncer de mama y para el cáncer en general, se encuentran los microRNAs, los cuales se han encontrado frecuentemente alterados en diversos tipos de cánceres humanos. La desregulación de microRNAs en el cáncer de mama fue demostrada por primera vez por Ioro y colaboradores (2005), y a partir de éste estudio han surgido numerosas investigaciones sobre la expresión de microRNAs y su rol en el cáncer de mama. Se ha encontrado que la expresión de microRNAs correlaciona con el cáncer de mama humano, lo cual los convierte en

potenciales biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico de ésta enfermedad, y posibles blancos terapéuticos (Blenkiron *et al.*, 2007; Heneghan *et al.*, 2009; Lowery *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2009b).

2.7 Generalidades de los microRNAs

Los microRNAs o miRNAs son una gran familia de pequeños RNAs (Ácido Ribonucleico) no codificantes involucrados en el silenciamiento genético post-transcripcional, los cuales han sido encontrados en una gran variedad de organismos incluyendo los virus (Liu *et al.*, 2008). Constan de aproximadamente 21-26 nucleótidos de longitud, son de cadena simple y tienen terminaciones 5'-fosfato y 3'-hidroxilo (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; Heneghan *et al.*, 2009; MacFarlane y Murphy, 2010). Se cree que regulan más de un tercio del genoma humano a través de la regulación secuencia-específico y expresión genética mediante el marcaje de mRNAs (RNA mensajero) para su rompimiento o represión traduccional (Lowery *et al.*, 2009).

Los microRNAs se agrupan en dos clases de acuerdo a su localización en el genoma: microRNAs intergénicos (genes codificantes de microRNAs localizados entre genes codificantes de proteínas); y microRNAs intragénicos (genes codificantes de microRNAs localizados dentro de genes codificantes de proteínas “huésped”) (MacFarlane y Murphy, 2010). Y a su vez los intragénicos se subdividen dentro de las siguientes clases: intrónicos (localizados dentro de intrones de genes codificantes de proteínas huésped); exónicos (localizados dentro de exones de genes codificantes de proteínas huésped); de la región 3' no traducida (3' UTR) (localizados dentro de la región 3' UTR); y de la 5'UTR (localizados en la región 5' UTR). La mayoría pertenecen a las categoría de intergénicos (42%) e intrónicos (44%) (Wang, 2010) (Figura 3).

Cada microRNA puede suprimir múltiples blancos, se ha estimado que pueden ser aproximadamente 200, y un mRNA puede ser blanqueado por muchos microRNAs, es por ello que se encuentran involucrados en el control de un amplio espectro de procesos celulares (Asirvathama *et al.*, 2008).

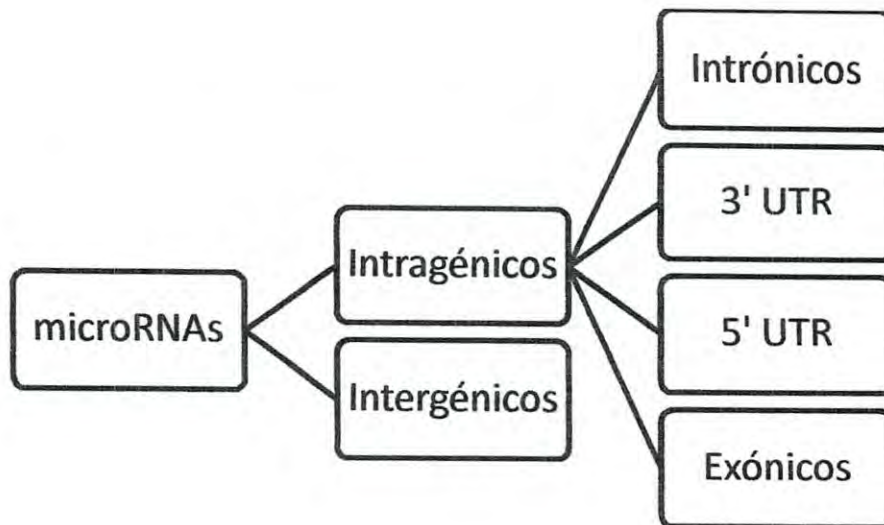


Figura 3. Clasificación de los microRNAs de acuerdo a su localización en el genoma (MacFarlane y Murphy, 2010; Wang, 2010).

La secuencia considerada crítica para que un microRNA reconozca a un mRNA blanco es llamada “secuencia semilla”, la cual consiste de 2 a 8 nucleótidos y se encuentra localizada hacia el extremo 5’ del microRNA maduro. A través de esta secuencia es como se predice mediante algoritmos y programas computacionales los posibles blancos de los microRNAs (Mendel, 2005; Márquez y McCaffrey, 2008).

Los RNAs no codificantes pequeños fueron descubiertos al estudiar el desarrollo de la larva del nematodo *Caenorhabditis elegans* en 1993. En el cual se descubrió el gen *lin-4*, el cual codifica un transcrito de RNA pequeño capaz de inhibir la traducción del mensajero de RNA de un gen diferente, *lin-14*, mediante la unión a su región 3’ UTR. *Lin-4* fue el primer gen de clase microRNA caracterizado y actualmente se han descubierto cientos de éstos genes en el humano (Boyd, 2008) (Figura 4).

2.8 Biogénesis de los microRNAs

El mecanismo de biogénesis de microRNAs consta de cinco pasos generales: 1) generación del microRNA primario (pri-microRNA) 2) generación del microRNA precursor (pre-microRNA) 3) translocación del pre-microRNA del núcleo al citoplasma 4)

generación del microRNA maduro 5) formación del miRISC (incorporación del microRNA al complejo de silenciamiento inducido por RNA) (Boyd, 2008; Shomron y Levy, 2009; MacFarlane y Murphy, 2010; Wang, 2010) (Figura 5).

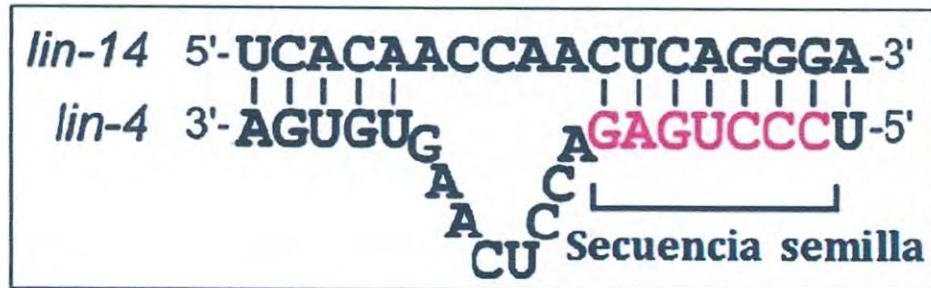


Figura 4. Reconocimiento del microRNA por el mRNA ejemplo de *lin-4* que tiene como blanco *lin-14*. El apareamiento de bases ocurre más consistentemente con los nucleótidos 2-8 del microRNA llamada "secuencia semilla" (Boyd, 2008).

1) Generación del microRNA primario (pri-microRNA)

La biogénesis comienza en el núcleo, donde los microRNAs son transcritos por una RNA polimerasa tipo II o tipo III (Wang, 2010). La transcripción del microRNA resulta en la producción de un transcrito primario monocistrónico, bicistrónico o policistrónico llamado pri-microRNA. Uno solo tiene una longitud de aproximadamente 200 nucleótidos pero pueden ser de hasta miles de pares de bases y tienen tanto 5' 7-metilguanosina (Cap), como cola 3' poli-A. (Liu *et al.*, 2008; Raza-Naqvi, 2009). Los pri-microRNAs son estructuras grandes en horquilla ("stem-loop") con extensiones de RNA de cadena simple en ambos extremos.

2) Generación del microRNA precursor (pre-microRNA)

El primer paso en la maduración del microRNA se lleva a cabo en el núcleo, y consiste en el reconocimiento del pri-microRNA por la RNasa III llamada *Drosha* y su molécula asociada DGCR8 (gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge por sus siglas en inglés) el cual libera una molécula precursora de aproximadamente 70 nucleótidos que contiene una estructura en horquilla llamada pre-microRNA, con un

monofosfato en el extremo 5' y 2 nucleótidos sobresalientes con un grupo hidroxilo en el extremo 3' (Rana, 2007; Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

3) Translocación del pre-microRNA del núcleo al citoplasma

El siguiente paso es el transporte del pre-microRNA del núcleo hacia el citoplasma, el cual es llevado a cabo mediante el ensamblaje del pre-microRNA al complejo transportador núcleo-citoplásmico formado por la proteína Exportina-5 y *RanGTP*, lo cual evita su degradación nuclear y translocación hacia el citoplasma (MacFarlane y Murphy, 2010). *RanGTP* es hidrolizado a *RanGDP* para que el pre-microRNA sea liberado del complejo exportador (Rana, 2007).

4) Generación del microRNA maduro

En el citoplasma el pre-microRNA es procesado nuevamente por una endonucleasa celular III llamada *Dicer*, la cual actúa en conjunto con sus cofactores TRBP (Proteína de Unión a la Región de Transactivación) y PACT (Activador de la Proteína Kinasa Dependiente de la Inducción por Interferón mediante RNA de doble cadena). Estas enzimas se unen a los extremos del pre-microRNA y remueven el loop terminal, produciendo microRNAs dúplex intermediarios de aproximadamente 21 nucleótidos, los cuales contienen terminaciones 5'-monofosfato y 2 nucleótidos sobresalientes con grupo hidroxilo en el extremo 3'. Los dúplex están formados por dos cadenas miRNA:miRNA* una llamada pasajera y la otra llamada guía, ésta será incorporada al complejo de silenciamiento posteriormente (Liu *et al.*, 2008; Márquez y McCaffrey, 2008; Wang *et al.*, 2008).

5) Formación del miRISC (miRNA: RISC)

La cadena microRNA “guía” es seleccionada e incorporada dentro del complejo RISC mientras que la cadena “pasajera” es liberada y degradada (Drakaki e Iliopoulos, 2009; Heneghan *et al.*, 2009). RISC es un complejo proteico muy importante que pertenece a los miembros de la familia de proteínas Ago (Argonaute) las cuales han sido involucradas en el silenciamiento genético en plantas y animales (Wang *et al.*, 2008). La selección de la cadena que será incorporada al complejo es en base a la estabilidad termodinámica de sus extremos, la que presente menor estabilidad en el extremo 5' será

incorporada al complejo y la otra será destruida (Rana, 2007; Shomron y Levy, 2009; MacFarlane y Murphy, 2010).

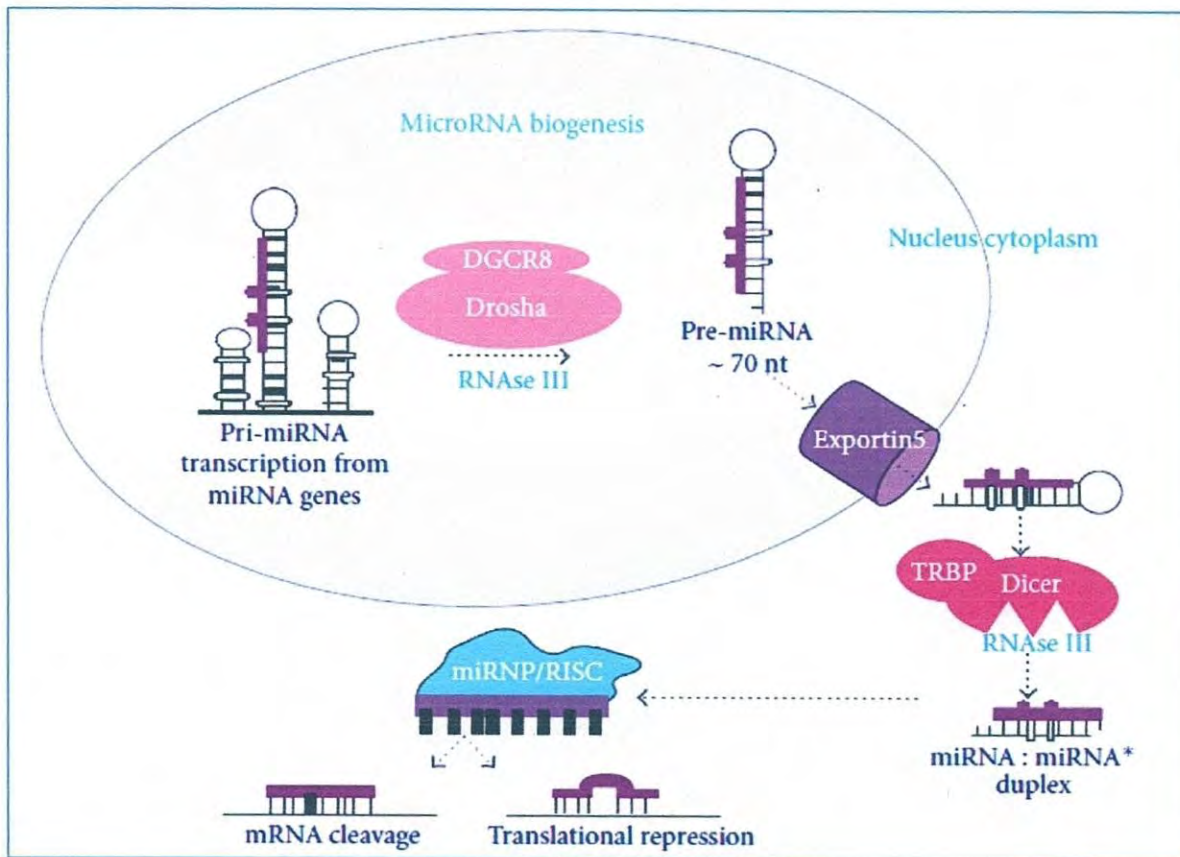


Figura 5. Biogénesis de microRNAs (Liu *et al.*, 2008; Heneghan *et al.*, 2009)

2.9 Mecanismos de acción microRNAs

Los microRNAs regulan la expresión de una gran variedad de genes mediante dos mecanismos post-transcripcionales: escisión directa del mRNA o por represión de la traducción (Bartel, 2004). Los procesos de regulación de la expresión se llevan a cabo mediante el apareamiento de bases secuencia-específico del microRNA con la región 3' UTR del mRNA blanco (Ng *et al.*, 2009a). La elección del proceso de regulación post-transcriptional está determinada por el grado y naturaleza de la complementariedad, (Wang *et al.*, 2007) por el contexto celular, la estructura secundaria del RNA y las proteínas efectoras asociadas al dúplex miRNA: mRNA (Davis y Hata, 2009).

i) Escisión directa del mRNA

El apareamiento casi perfecto de bases (apareamiento extensivo) es la clave principal para que la regulación se lleve a cabo mediante la escisión del mRNA. La escisión ocurre endonucleotídicamente en la mitad del dúplex microRNA-mRNA (Filipowicz *et al.*, 2008). La degradación directa del mRNA es llevada a cabo mediante la proteína Ago2. La degradación de mensajeros comienza con la desadenilación del mRNA para remover la cola poli(A) y posteriormente es llevado al exosoma, el cual es un complejo multiproteico con actividad exonucleasa 3'-5'. Alternativamente, el mRNA puede sufrir la eliminación del casquete de 7-metilguanilato, por las enzimas Dcp1 y Dcp2 las cuales facilitan la degradación de 5'-3' por la exonucleasa Xrn1p (MacFarlane y Murphy, 2010).

ii) Represión de la traducción

Cuando el apareamiento de bases entre el microRNA y el mRNA mensajero no es completa se lleva a cabo el proceso de represión de la traducción (Drakaki e Iliopoulos, 2009). La represión de la traducción puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos de acción: inhibir la traducción interfiriendo directamente con los factores de iniciación de la traducción o bien, mediante la interrupción de la función de la cola poli-A. (Wang *et al.*, 2007; Stefani y Slack, 2008).

El proceso de la traducción de proteínas consta de tres pasos fundamentales: iniciación, elongación y terminación. La represión de la traducción puede llevarse a cabo por diversos mecanismos entre ellos: 1) Represión en el paso de iniciación, mediante el secuestro de los mensajeros para alejarlos de la maquinaria de traducción en los llamados cuerpos P (cuerpos de procesamiento), y mediante el aceleramiento de la eliminación del casquete y la desadenilación evitando así el reconocimiento por los factores de iniciación (Filipowicz *et al.*, 2008; MacFarlane y Murphy, 2010) 2) Represión por inhibición de la subunidad 60S, esto mediante la observación de que la subunidad 60S y su eIF6 (Factor de iniciación necesario para la biogénesis de 60S) co-precipitan con los complejos Ago2-Dicer-TRBP 3) Represión en los pasos de post-iniciación, en donde se propone que los microRNAs hacen propensos a los ribosomas a la terminación prematura de la traducción (Filipowicz *et al.*, 2008).

El mecanismo de inhibición de la traducción también es llevado a cabo mediante la desadenilación del mensajero y su posterior decaimiento. Esto se ha observado en *Drosophila melanogaster*, pez cebra y en sistemas de mamíferos, donde los microRNAs aceleran la desadenilación de su mensajero diana llevándolo a la digestión exonucleotídica (Beilharz *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009).

Los procesos epigenéticos representan otro mecanismo por medio del cual los microRNAs reprimen la expresión. La epigenética está definida como los cambios genéticos hereditarios que no están acompañados por cambios en la secuencia del DNA e involucra la metilación del DNA y la modificación de las histonas, los cuales son potencialmente reversibles (Laird, 2005; Strachan y Read, 2006). Se ha observado que la maquinaria de biogénesis de microRNAs interactúa con la maquinaria de metilación de DNA y acetilación de histonas. Al subgrupo de microRNAs que tienen como blanco, directa o indirectamente, a efectores de la maquinaria epigenética se les ha denominado epi-microRNAs (Valeri *et al.*, 2009).

En un principio se describió a los microRNAs como reguladores negativos de la expresión génica y existen numerosos estudios donde se han elucidado algunos de los mecanismos de represión de la traducción; sin embargo, no fue hasta el 2006 cuando se comenzó a observar que también tiene un rol como activadores de la traducción, actuando como reguladores positivos (Li *et al.*, 2006). Se ha observado que los microRNAs pueden intensificar o reprimir la traducción de los RNAs mensajeros dependiendo del estado del ciclo celular (Vasudevan *et al.*, 2007; Buchan y Parker, 2008). Actualmente, existen más estudios acerca de éste nuevo papel que juegan en la expresión génica (Henke *et al.*, 2008; Orom *et al.*, 2008; Place *et al.*, 2008).

La habilidad de los microRNAs para regular negativamente la expresión mediante mecanismos de silenciamiento postranscripcional y su potencial para sobreexpresar genes blancos al mismo tiempo, revela su compleja naturaleza y su importancia en la regulación de la expresión génica.

2.10 Regulación de los microRNAs

Aun no se conoce ampliamente el proceso de regulación de los microRNAs se sabe que se expresan de una manera tejido y desarrollo específico. Su expresión puede estar regulada por factores de transcripción y por los mismos microRNAs en respuesta a diferentes estímulos exógenos y endógenos. Pueden ser regulados a nivel de su biogénesis, es decir, a nivel de proteínas que intervienen en cada uno de los procesos para su formación. Se ha estimado que el 10% de la expresión de microRNAs es controlada a través de procesos de metilación (MacFarlane y Murphy, 2010). La biogénesis de los microRNAs está altamente controlada y con frecuencia sujeta a una regulación por retroalimentación (“*feedback*”). Por ejemplo, algunos microRNAs regulan factores de transcripción y éstos a su vez regulan la expresión de microRNAs, formando un bucle de retroalimentación negativa doble (Siomi y Siomi, 2010).

Dentro de los factores de transcripción involucrados en la regulación de los microRNAs se encuentra la proteína c-myc, la cual se ha involucrado en la activación de la transcripción del grupo mir-17-62, la cual es importante en la neovascularización del tumor. Otra proteína que funciona como factor de transcripción es NF- κ B (Factor de transcripción kappa B), la cual induce la expresión de mir-146 (Chuang y Jones, 2007).

Los microRNAs pueden ser regulados en cualquiera de las diferentes etapas del procesamiento y conducir a una disminución o incremento en sus niveles. Los niveles alterados de microRNAs pueden ser causados por proteínas regulatorias que influyen en el procesamiento, por variaciones adquiridas en el transcrito y por cambios en la eficiencia de la exportación nuclear. Además de éstos mecanismos regulatorios, también se ha encontrado que los Polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism: SNPs*, por sus siglas en inglés) tienen un efecto importante en la eficiencia de la maquinaria de procesamiento de microRNAs (Slezak-Prochazka *et al.*, 2010).

Existen otros mecanismos propuestos en los cuales los microRNAs son regulados por mecanismos epigenéticos (MacFarlane y Murphy, 2010). Se ha propuesto la

hipermetilación de islas CpG (regiones con alta concentración de citosina y guanina) de microRNAs supresores de tumores como un importante mecanismo de tumorigénesis. Estas observaciones derivan de estudios en los cuales se ha observado que ciertos microRNAs se sobreexpresan en líneas celulares cancerosas versus normales después de tratamientos con agentes demetilantes del DNA (5-Aza-20-deoxicitidina) e inhibidores de histonas deacetilasas (ácido fenilbutírico) (Chuang y Jones, 2007; Rouhi *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008) y se ha propuesto que la metilación del DNA podría actuar como un mecanismo protector mediante el silenciamiento de microRNAs con función oncogénica (Valeri *et al.*, 2009).

2.11 El papel de los MicroRNAs en el cáncer

Lin-4 fue identificado en 1993 como un factor esencial en el desarrollo post-embriónico de *C. elegans* y posteriormente se describió como un gen que transcribe para un microRNA. En el 2003 se identificó el gen *bantam* en *Drosophila* el cual codificaba para un microRNA de 21 nucleótidos que simultáneamente promovía la proliferación celular y prevenía la apoptosis (Brennecke *et al.*, 2003). Estos dos descubrimientos arrojaron las primeras evidencias del posible rol de los microRNAs en procesos celulares tan importantes como el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis, mecanismos cruciales en el desarrollo del cáncer (Sassen *et al.*, 2008).

Las primeras evidencias que indicaron una vinculación de los microRNAs con el cáncer en humanos, provienen de estudios donde se observó que los genes de microRNAs humanos se encuentran frecuentemente localizados en sitios frágiles y regiones de inestabilidad genómica (donde ocurren deleciones o amplificaciones frecuentes), la cual es una característica de diversos tipos de cánceres. Se estima que más del 50% de los genes de microRNAs se encuentran localizados en estas regiones (Calin *et al.*, 2004; Iorio *et al.*, 2005; Huppi *et al.*, 2007; Vecchione *et al.*, 2010).

Actualmente se ha demostrado que los microRNAs están involucrados en la regulación de procesos tales como la diferenciación celular, proliferación y apoptosis

(Hanahan y Weinberg, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Mendel, 2005). Ahora se conoce que los microRNAs juegan un importante papel en la tumorigénesis, sin embargo, aún no se ha esclarecido si su alteración es causa o consecuencia del proceso canceroso (Kent y Mendell, 2006; Sassen *et al.*, 2008).

El primer estudio que demostró que la alteración en la expresión o función de los microRNAs juega un importante rol en la tumorigénesis fue realizado por Calin y colaboradores en el 2002, en el cual se demostró que los microRNAs *16* y *15* estaban localizados en el cromosoma 13q14, una región que se encuentra deletada en más de la mitad de las leucemias linfocíticas crónicas de células B (B-CLL) (Dohner *et al.*, 2000). Más tarde se demostró que la expresión de *mir-15-1* y *mir-16-1* correlacionaba inversamente con la expresión de la proteína anti-apoptótica *bcl2* (*B cell leukemia* por sus siglas en inglés) en B-CLL y que ambos microRNAs regulan de forma negativa y a nivel postranscripcional. La represión de *bcl2* por éstos microRNAs induce la apoptosis en líneas celulares leucémicas (Cimmino *et al.*, 2005).

Estudios recientes sugieren que la desregulación de microRNAs en el cáncer puede ser atribuida a los siguientes mecanismos: deleciones, amplificaciones o translocaciones cromosomales; por alteraciones epigenéticas, tales como la metilación del DNA y la deacetilación de histonas (Lodes *et al.*, 2009); por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y mutaciones que pueden afectar la maduración de los microRNAs; anormalidades en el número de copias de DNA; y la disfunción o desregulación de proteínas clave en el camino del procesamiento de microRNAs (Song y Chen, 2011).

Dentro de los mecanismos propuestos más recientes responsables de la desregulación de los microRNAs se encuentran los SNP's. La presencia de SNP's en los microRNAs puede afectar su maduración, la maquinaria de silenciamiento, la estructura o los niveles de expresión del microRNA maduro y el apareamiento de bases con el sitio blanco (Ryan *et al.*, 2010).

Se han reportado alteraciones en el número de copias de DNA de genes de microRNAs en cáncer de ovario, mama y melanoma; y el cambio en el número de copias correlaciona con la expresión del microRNA. Se han encontrado además alteraciones en el número de copias en genes claves en la regulación de los microRNAs como las proteínas Argonaute y Dicer (Zhang *et al.*, 2006).

Varios experimentos sugieren que los microRNAs funcionan como una nueva clase de oncogenes y genes supresores de tumores (Gregory y Shiekhattar, 2005; Lotterman *et al.*, 2008). Para describir un microRNA como gen supresor tumoral o como oncogén se debe especificar el tipo de célula o tejido y en cual contexto celular es crucial su función (Croce, 2009).

Aquellos microRNAs cuya expresión se encuentran incrementada en tumores pueden considerarse oncogenes, también se les conoce como “*oncomirs*”, y están involucrados en el desarrollo tumoral por inhibición negativa de genes supresores de tumores y/o genes de la apoptosis y el control de la diferenciación celular (Manikandan *et al.*, 2008). Por el lado opuesto están los microRNAs cuya expresión se encuentra baja en células cancerosas, éstos se consideran *genes supresores de tumores* ya que generalmente previenen el desarrollo tumoral mediante la inhibición negativa de oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación celular y la apoptosis (Esquela-Kerscher y Slack, 2006; Drakaki e Iliopoulos, 2009).

Se ha demostrado en diversas investigaciones que la expresión de microRNAs está frecuentemente alterada en tejido tumoral respecto a tejido normal. Takamizawa y colaboradores (2004), demostraron que la expresión del microRNA *let-7* estaba reducida en el cáncer de pulmón en humanos. Iorio y colaboradores (2005) estudiaron la expresión de microRNAs en tejido de cáncer de mama y lo compararon con tejido normal de mama encontrando que había una expresión diferencial, que logró claramente identificar los tejidos cancerosos de los normales. Encontrando que los microRNAs *mir-125b*, *mir-145*, *mir-21* y *mir-155* fueron lo que presentaron la mayor desregulación y que su expresión correlacionaba con características patológicas del cáncer de mama, tales como la expresión

de receptores hormonales, estadio tumoral, invasión vascular e índice de proliferación. Michael y colaboradores (2003) estudiaron 28 secuencias de microRNAs en adenocarcinomas de colón y en mucosa normal, encontrando que dos secuencias, *mir-143* y *mir-145*, exhibían una reducción en su expresión en los casos de cáncer.

Volinia y colaboradores (2005) demostraron que en los cánceres sólidos los perfiles de expresión de microRNAs difieren de los perfiles de expresión en células normales. Compararon tumores de pulmón, estómago, mama, próstata, colon y páncreas y encontraron 26 microRNAs sobreexpresados y 17 con expresión baja, de 137 microRNAs que se midieron. Sus datos arrojaron evidencia acerca del papel que juegan los microRNAs en la patogénesis del cáncer en tumores sólidos.

Se ha demostrado que perfiles de expresión de microRNAs son capaces de clasificar exitosamente tumores pobremente diferenciados mientras que los perfiles de RNA mensajeros no son tan exactos. Además se ha observado que los perfiles de microRNAs reflejan el estado de diferenciación de los tumores y el linaje de donde se desarrollaron (Lu *et al.*, 2005). Su potencial para clasificar tumores sugiere que pueden ser utilizados para identificar el tejido primario de donde se originó el cáncer (Rosenfeld *et al.*, 2008).

Recientemente se ha comenzado la búsqueda de la expresión de microRNAs en diversos fluidos biológicos, debido a su facilidad de obtención a diferencia del tejido. Se han realizado estudios en suero, plasma, saliva y orina, para distintos tipos de cánceres humanos; sin embargo, la mayor parte de los estudios se han centrado en el suero.

2.12 MicroRNAs circulantes en el Cáncer

Lawrie y colaboradores (2008) fueron de los primeros en reportar microRNAs circulantes, ellos compararon los niveles de los microRNAs *155*, *210* y *21* en el suero de pacientes con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) con el suero de controles sanos, y encontraron que los niveles fueron más altos en los pacientes enfermos que en los

controles. Observaron que la expresión de *mir-21* estaba asociada con sobrevida libre de enfermedad, sugiriendo que pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico no invasivos para éste tipo de cáncer y posiblemente para otros.

Mitchell y colaboradores (2008) demostraron la presencia de microRNAs en plasma humano en una forma estable, la cual es protegida de la actividad RNasa endógena. Además, encontraron que los niveles séricos de *mir-141* podían distinguir a pacientes con cáncer de próstata de sujetos sanos.

Chen y colaboradores (2008) demostraron que los microRNAs están presentes en el suero y plasma de humanos y otros animales como ratones, ratas, fetos bovinos, terneros y caballos y sus niveles son estables, reproducibles y consistentes entre individuos de la misma especie. También estudiaron perfiles de expresión de microRNAs para cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, y pacientes con diabetes y en sujetos sanos, proponiendo que los perfiles de expresión de microRNAs en suero (no un solo o un par de microRNAs) constituyen huellas de las condiciones fisiológicas o de enfermedad, lo cual puede tener un gran impacto en el diagnóstico y la medicina personalizada en el futuro.

Ng y colaboradores (2009b) encontraron que *mir-92* estaba significativamente incrementado en el plasma de pacientes con cáncer colorrectal en comparación con sujetos sanos, con lo cual se demostró su potencial uso como marcador molecular no invasivo para el tamizaje del cáncer colorrectal.

Se han utilizado microRNAs en plasma para detectar otras enfermedades aparte del cáncer. Zhang y colaboradores (2010) estudiaron muestras de plasma de pacientes con infecciones virales por hepatitis crónica B, pacientes con enfermedades del músculo esquelético y controles sanos, así como modelos animales. Dentro de los microRNAs candidatos que se identificaron, se encontró que *mir-122* presentaba cambios en la concentración dependientes de la severidad de la enfermedad tanto en pacientes como en los modelos animales. Estos cambios eran más específicos en daño hepático que en daño a otros órganos y era más confiable, porque los cambios correlacionaban con el estadio histológico del hígado. Los resultados sugirieron que *mir-122* circulante tiene potencial

como marcador en sangre novedoso, predictivo y confiable para el daño hepático inducido por virus, alcohol y químicos.

2.13 MicroRNAs y Cáncer de Mama

Iorio y colaboradores (2005) fueron los primeros en demostrar la desregulación de los microRNAs en el cáncer de mama. Comparando tejido normal de mama con tejido canceroso observaron que los microRNAs presentaban una expresión aberrante, entre los más alterados se encontraban los microRNAs: *125b*, *145*, *21* y *155*. Además identificaron microRNAs cuya expresión correlacionaba con características patológicas de los tumores.

Se ha demostrado que la expresión de microRNAs en tejido de cáncer de mama correlaciona con los subtipos moleculares, con la presencia de receptores hormonales ER y PR, con el estadio tumoral, la invasión vascular y el índice de proliferación (Iorio *et al.*, 2005; Blenkiron *et al.*, 2007; Lowery *et al.*, 2009).

Volinia y colaboradores (2005), llevaron a cabo un estudio a gran escala donde analizaron muestras de tejido tumoral de 540 tumores cancerosos de mama, colon, páncreas, pulmón, próstata y estómago. Se estudió la expresión de 137 microRNAs diferentes y se encontró que las muestras tumorales de cáncer de mama expresaban niveles alterados (bajos y altos respecto a muestras control) de los microRNAs *21*, *17-5p*, *29b-2*, *146*, *155* y *181b-1*.

A partir de estos estudios se ha abierto un campo de investigación para implementar los perfiles de microRNAs en el diagnóstico del cáncer de mama. Los estudios más recientes en el campo se han orientado a correlacionar la expresión de microRNAs con el pronóstico de la enfermedad y con las respuestas a los tratamientos.

Dentro de los microRNAs estudiados en el cáncer de mama, se han identificado genes de microRNAs supresores de tumores y oncogénicos. Dentro de los más estudiados se encuentran: *mir-27a*, *mir-10b*, *mir-21*, *mir-155* (considerados como oncogenes); *mir-17-*

5p, *mir-27b*, *mir-125a*, *mir125b*, *mir-200c*, *mir-206*, *mir-101* (considerados como supresores de tumores) (Blenkiron *et al.*, 2007; Shenouda *et al.*, 2009).

No sólo se han llevado a cabo estudios en tejido tumoral de mama, sino que ahora se está orientando la investigación a estudiar la expresión de microRNAs en fluidos biológicos como el suero. De los primeros estudios se encuentra el realizado por Zhu y colaboradores (2009), donde se estudiaron muestras de suero de pacientes con cáncer de mama y de controles sanos, siendo posible su detección en el suero. Sin embargo, ninguno de los tres microRNAs probados *mir-16*, *-145*, y *155* mostró expresión diferencial en pacientes con cáncer respecto a los controles sanos. Pero se logró observar que *mir-155* estaba diferencialmente expresado en el suero de mujeres con cáncer sensibles a las hormonas comparado con las que eran insensibles hormonas.

Roth y colaboradores (2010) determinaron el potencial de los microRNAs en suero como biomarcadores en cáncer de mama, analizando las concentraciones relativas de los microRNAs: *mir-10b*, *mir-34a*, *mir-141* y *mir-155*, en suero de 89 pacientes con cáncer de mama primario (MO, n=59) y enfermedad metastásica (M1, n=30) y en 29 mujeres sanas mediante el ensayo microRNA TaqMan. Encontrando que las concentraciones relativas de RNA total y *mir-155* en suero significativamente discriminaban a pacientes MO de mujeres sanas, mientras que *mir-10b*, *mir-34a* y *mir-155* discriminaban a pacientes M1 de controles sanos. En pacientes con cáncer de mama, los cambios en los niveles de RNA total, *mir-10b*, *mir-34a* y *mir-155* correlacionaban con la presencia de metástasis. El estudio mostró evidencia de que los microRNAs asociados a tumor están elevados en sangre de pacientes con cáncer de mama y están asociados a la progresión del tumor.

Heneghan y colaboradores (2010a) encontraron que había un incremento sistémico en los niveles de *mir-195* en sangre de pacientes con cáncer de mama. También encontraron que los niveles de *mir-195* y *let-7a* disminuían en pacientes con cáncer después de la resección del tumor (post-operativamente) si se comparaban con controles sanos. Y además demostraron que los microRNAs circulantes correlacionaban con ciertas variables clínico-patológicas como el estado de los nódulos linfáticos y el estado del receptor de

estrógenos. Heneghan y colaboradores (2010b) encontraron que la elevación de *mir-195* en circulación podía diferenciar a pacientes con cáncer de mama de otros cánceres y de controles con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 91%.

Utilizando la técnica de qPCR-RT (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa) Asaga y colaboradores (2010) midieron los niveles de *mir-21* circulante en suero de 102 pacientes con diferentes estadios de cáncer de mama y en 20 mujeres sanas. En un análisis multivariado que incluía factores pronóstico clínico-patológicos, y se encontró que las altas concentraciones circulantes de *mir-21* correlacionaban significativamente con metástasis visceral.

2.14 Saliva como fluido en el diagnóstico de enfermedades

La saliva es producida y secretada por las glándulas salivales en la cavidad oral. Los humanos tienen tres principales glándulas salivales: glándulas parótidas (PG), glándulas submandibulares (SMG) y glándulas sublinguales (SLG), y las glándulas salivales menores. Cada una de las glándulas secretan distintas composiciones de proteínas. Los cambios en el proteoma de la saliva proporcionan información acerca de la salud de todo el cuerpo y de la oral, ya que la saliva total contiene proteínas que pueden ser informativas para detectar enfermedades bucales. Las proteínas salivales tienen numerosas funciones importantes tales como almacenar iones, la acción de lubricar, acción de buffer, clarificación, actividad antimicrobiana, procesos digestivos, agregación de microorganismos y protección de la superficie dental (Yamada *et al.*, 2009).

Los múltiples componentes que se encuentran dentro de la saliva no sólo protegen la integridad de los tejidos orales, sino que también proveen pistas para enfermedades y condiciones locales y sistémicas. Estos “biomarcadores salivales” están siendo explorados para monitorear el estado de salud general y el diagnóstico temprano de enfermedades. Los desórdenes y enfermedades en las cuales la saliva podría ayudar en el diagnóstico de acuerdo a los estudios que existen, incluyen -pero no se limitan- al virus de inmunodeficiencia adquirida, cáncer y partos prematuros. En el pasado, el suero ha sido el

fluido más frecuentemente utilizado para el diagnóstico; sin embargo, la saliva tiene varias ventajas frente al suero (Lawrence, 2002), como por ejemplo:

- La colección de la muestra es simple
- Es un método no invasivo
- Causa poca molestia al paciente
- Los costos de obtención y transportación son bajos (Segal y Wong, 2008; Gao *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010)

La saliva es un filtrado de la circulación sanguínea y contiene una amplia gama de proteínas, ácidos nucleicos, electrolitos y hormonas que se originan en múltiples sitios del cuerpo (Gao *et al.*, 2009). Por ello ha sido referida como el “*espejo del cuerpo*” ya que refleja el estado de salud del individuo, al contener diversas sustancias indicadoras de procesos patológicos. La variación de los constituyentes de la saliva está influenciada por cambios fisiopatológicos en el cuerpo, es por esto que la saliva puede ser utilizada para monitorear el estatus clínico y para predecir enfermedades sistémicas (Segal y Wong, 2008; Lee *et al.*, 2009).

Los constituyentes de la sangre pueden entrar en la saliva a través de los vasos capilares, es por ello que los componentes de la saliva están relacionados con los del suero (Wu *et al.*, 2009). Se ha observado que diversas proteínas esenciales en la saliva correlacionan positivamente con proteínas del suero, como el cortisol (Lawrence, 2002), el Antígeno Específico de Próstata (Ayatollahi *et al.*, 2007), la inmunoglobulina A y el anticuerpo anti-HIV (Wu *et al.*, 2009).

Existen estudios sobre el análisis del transcriptoma (estudio de los perfiles de expresión de todos los genes en el genoma) en saliva, uno de ellos fue llevado a cabo por Li y colaboradores (2004), en el cual se analizó mediante microarreglos el mRNA en saliva de pacientes con cáncer oral. En él se encontró que 1,679 genes estaban significativamente diferentes en su expresión en saliva de pacientes con cáncer cuando se comparó con controles. Con lo cual se demostró la utilidad del transcriptoma salival en el diagnóstico del cáncer oral. Otro estudio fue llevado a cabo por Sugimoto y colaboradores (2010) donde

identificaron 57 metabolitos principales en saliva que podrían ser utilizados para predecir con exactitud la probabilidad de estar afectado por alguna de las enfermedades que estudiaron: cáncer oral, cáncer pancreático y cáncer de mama, así como controles sanos, mediante espectrometría de masas.

La utilidad de estudiar los ácidos nucleicos en la saliva radica en que éstos pueden ser originados por células secretoras y células muertas de cualquier parte del cuerpo e ingresar a la saliva a través de la circulación. Además se ha demostrado que los ácidos nucleicos salivales, al igual que los séricos, están protegidos de la degradación por asociación con macromoléculas y podrían ser utilizados como biomarcadores no solo de cáncer oral sino de otras enfermedades. (Park *et al.*, 2006).

2.15 Estudios de la saliva en el Cáncer de Mama

Recientemente se han descrito proteínas relacionadas con cáncer de mama diferencialmente expresadas en saliva en un análisis del proteoma entre mujeres sanas y aquellas diagnosticadas con tumores de mama benignos. De 130 proteínas analizadas en especímenes de saliva, se encontró que 49 estaban diferencialmente expresadas entre controles sanos, tumores benignos y pacientes con cáncer de mama. El estudio sugiere que la saliva es un fluido cubierto de un solubilizado de productos de la expresión oncogénica y que éstas proteínas pueden ser moduladas secundariamente al DCIS (Carcinoma Ductal In Situ). Además, podría haber un perfil de proteínas que sea único para DCIS y para fibroadenomas (Streckfus *et al.*, 2008).

Se ha descrito la detección del fragmento soluble de la proteína c-erbB-2 (HER-2) en saliva de pacientes con cáncer de mama pero no se encontró en pacientes sanos control ni en pacientes con tumores benignos (Streckfus y Bigler, 2005).

Se demostró que los niveles de CA15-3 (Antígeno de Cáncer 15-3) en suero y saliva correlacionaron con el estadio del tumor. El resultado sugiere que CA15-3 salival puede ser utilizado para la detección inicial de cáncer de mama en mujeres (Agha-Hosseini *et al.*, 2009).

En otro estudio se analizaron las proteínas VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial) y CEA (Antígeno Carcino-embriionario), las cuales mostraron niveles significativamente incrementados en saliva de pacientes con cáncer de mama en comparación con sujetos sanos (Brooks *et al.*, 2008).

Streckfus y colaboradores (2000) examinaron los marcadores tumorales para cáncer de mama c-erbB-2, el antígeno de cáncer CA15-3 y la proteína supresora de tumores p53 en saliva de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, en controles sanos y en pacientes con tumores benignos. Encontraron que los niveles estaban significativamente altos en pacientes con cáncer en comparación con los controles y los tumores benignos.

2.16 Expresión de microRNAs en saliva

Los exosomas son pequeñas vesículas de aproximadamente 40 a 100 nanómetros de tamaño que son liberadas por diferentes tipos de células desde un compartimento endosomal tardío. Su función es transportar diferentes compuestos y moléculas señalizadoras de un lugar a otro, permitiendo la comunicación celular. Pueden ser encontrados en varios fluidos biológicos incluyendo el plasma, líquido ascítico maligno, orina, fluido amniótico y saliva. Los exosomas contienen proteínas, microRNAs y mRNA que pueden servir como una plataforma novedosa para el diagnóstico de diversas enfermedades (Valadi *et al.*, 2007; Zomer *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2011).

Recientemente ha sido reportado el exitoso aislamiento de exosomas de saliva de sujetos sanos y de pacientes con síndrome de Sjogren (enfermedad autoinmune sistémica que afecta las glándulas exocrinas). Los microRNAs extraídos de la fracción exosomal fueron suficientes para realizar una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) cuantitativa y un perfil de expresión por microarreglos. Lo cual resulta prometedor para el desarrollo de futuros marcadores para el diagnóstico y pronóstico de varias patologías de las glándulas salivales, entre ellas el cáncer oral (Michael *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009).

En otro estudio se analizó saliva total y sobrenadante, de controles sanos y pacientes con cáncer oral, y se encontró que contenían decenas de microRNA estables. Los microRNAs salivales pueden ser utilizados para la detección del cáncer oral. Así mismo, encontraron que *mir-125a* y *mir-200a*, estaban presentes en niveles significativamente más bajos en saliva de pacientes con carcinoma oral de células escamosas que en sujetos control (Park *et al.*, 2009).

Existe evidencia de la posible detección de biomarcadores específicos para cáncer de mama en saliva. Aunado al hecho de que la saliva es un filtrado de la circulación sanguínea y a que ha sido comprobada la existencia de microRNAs específicos para cáncer de mama en suero (Pink *et al.*, 2009), proponemos que los microRNAs pueden ser medidos en saliva y servir como marcadores para el cáncer de mama.

2.17 microRNAs de estudio

En nuestro estudio elegimos los microRNAs: *mir-21*, *mir-155* y *mir-195*, debido a que se ha reportado su expresión tanto en tejido de cáncer de mama como en suero de pacientes con dicho padecimiento. Diversos estudios han encontrado alteraciones en su expresión al compararse con controles sanos y su expresión correlaciona con características patológicas y clínicas (Iorio *et al.*, 2005; Asaga *et al.*, 2010; Heneghan *et al.*, 2010a; Roth, *et al.*, 2010). A la fecha no existen estudios en saliva para estos microRNAs y su relación con cáncer de mama, sin embargo, nos basamos en el hecho de que la saliva es un filtrado de la circulación sanguínea y a que se ha encontrado correlación entre los componentes de la sangre y la saliva para realizar este estudio (Gao *et al.*, 2009). Algunos hallazgos importantes reportados en la literatura sobre éstos microRNAs se presentan a continuación:

i) *Mir-21*

Su expresión correlaciona significativamente con el estadio clínico avanzado, metástasis a nódulos linfáticos y pobre pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Yan *et al.*, 2008). *Mir-21* actúa como un factor anti-apoptótico en diversos cánceres (Qi *et al.*, 2009) y se han identificado algunos blancos posibles: BCL2 (Leucemia linfocítica crónica

de células B/Linfoma 2), NTF3 (neutrofina 3), PDCD4 (Programador de Muerte Celular 4), RAB6A (Miembro de la familia de oncogenes RAS), RAB6C (Miembro de la familia de oncogenes RAS), RASA 1 (Activador de la proteína p21), RHOB (Homólogo de la familia de genes RAS, miembro B), SKI (V-ski homólogo del oncogén viral del sarcoma), TGFBI (Factor transformador del crecimiento beta inducido), TGFBR2 (Factor transformador del crecimiento beta, receptor II, TIMP3 (Inhibidor de tejido de la metaloproteinasa 3) (Yan *et al.*, 2008). Se ha reportado que *mir-21* participa en la invasión y la metástasis, en parte, mediante el blanqueo de genes supresores de tumores relacionados con la metástasis, tales como el gen *TPM1* (tropomiosina) y el gen de la *maspina* (Zhu *et al.*, 2008).

ii) *Mir-155*

Mir-155 se encuentra frecuentemente sobreexpresado en cáncer de mama. Se ha reportado que *mir-155* tiene una función anti-apoptótica mediante la inhibición directa del factor de transcripción FOXO3a (Kong *et al.*, 2010). Otros blancos reportados son: FGF7 (factor de crecimiento de fibroblastos 7), GDF (factor de diferenciación del crecimiento 6), TP53INP1 (Proteína nuclear 1 inductora de la proteína tumoral p53) (Yan *et al.*, 2008).

iii) *Mir-195*

Liu y colaboradores (2010) compararon la expresión de *mir-195* en 81 tejidos de cáncer colorrectal contra tejidos de mucosa no neoplásica, y encontraron que *mir-195* estaba bajo en su expresión en el tejido canceroso y sugieren como posible blanco a la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo que sugiere su importante rol en la apoptosis. Además se han identificado como nuevos blancos a los genes *raf-1* (homólogo del oncogén de la leucemia viral murina) y *Ccdn1* (Ciclina-D) (Li *et al.*, 2011).

2.18 Técnicas a emplear

2.18.1 Reacción de transcripción reversa

La reacción de transcripción reversa consiste en la síntesis de de cDNA (DNA complementario) a partir de RNA total o RNA poliadenilado utilizando una enzima llamada

transcriptasa reversa (RT). El primer paso en la síntesis de cDNA puede realizarse utilizando hexámeros al azar como primers, oligo (dT), o primers para genes específicos. La transcripción reversa combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha ofrecido un poderoso método para la cuantificación de la expresión genética y es considerada hoy en día como la prueba estándar de oro para una medición sensible, exacta y rápida de la expresión génica (Livak y Schmittgen, 2001).

2.18.2 PCR tiempo real

Dentro de las técnicas utilizadas para medir la expresión de microRNAs, se encuentra la PCR en tiempo real. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite que secuencias específicas de un templado de DNA o cDNA puedan ser copiadas, o “amplificadas”, miles hasta millones de veces. En la técnica de PCR tiempo real cuantitativa (qPCR) la cantidad de DNA es medido después de cada ciclo mediante el uso de marcadores fluorescentes que son incorporados en el producto de PCR. El incremento en la señal de fluorescencia es directamente proporcional al número de moléculas de producto (amplicón) generado durante la fase exponencial de la reacción. Mediante el graficado de la fluorescencia contra el número de ciclo en el que se produce un aumento significativo de la fluorescencia (Ct o ciclo umbral) el instrumento de PCR tiempo real genera una curva de amplificación que representa la acumulación del producto durante la duración de la reacción de PCR completa (PCR Handbook, Invitrogen).

III. HIPOTESIS

Existe una expresión diferencial de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama respecto a controles sanos y su expresión correlaciona con características clínico-patológicas de la paciente.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Evaluar la expresión de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama con respecto a controles sanos.

4.2 Objetivos Específicos:

- Medir la expresión de los microRNAs: *mir-21*, *mir-155* y *mir-195* en saliva de pacientes con cáncer de mama y en controles sanos mediante la técnica de PCR Tiempo Real Cuantitativa.

- Evaluar la correlación entre la expresión de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama y características clínico-patológicas del tumor y la paciente.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño experimental y muestreo

El diseño experimental fue de tipo analítico prospectivo de casos y controles y las variables de estudio fueron: como variable dependiente la expresión de *mir-21*, *mir-155* y *mir-195* en saliva, y como variables independientes el estadio tumoral, el tamaño del tumor, invasión a nódulos linfáticos, la edad al momento del diagnóstico y la edad al momento de la menopausia.

Se llevó a cabo un muestreo por conveniencia donde se incluyó un total de 19 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama primario estadio I, II y III (con fecha del diagnóstico no mayor a 18 meses) y un total de 19 mujeres aparentemente sanas que se habían practicado una mamografía reciente, dentro de los 6 meses anteriores al reclutamiento, con un Birads (*Breast Imaging Reporting and Data System* por sus siglas en inglés) 1 y 2 que indican hallazgos mamográficos benignos, es decir, una mamografía normal, del Hospital General Regional No. 2 y del Hospital de Gineco- Pediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social de Hermosillo. De las 38 pacientes incluidas en el estudio se obtuvo su firma del consentimiento informado, en el cual las pacientes consienten donar una muestra de saliva y autorizan la consulta de su expediente clínico (Figura 6).

El acceso a datos de las participantes como: nombre, dirección, números telefónicos, fecha de nacimiento y datos correspondientes al expediente clínico, se manejaron con absoluta confidencialidad. Los documentos generados durante el transcurso de ésta investigación, así como los especímenes biológicos fueron almacenados en el Laboratorio de Genómica y Diagnóstico Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Los procedimientos llevados a cabo en ésta investigación están de acuerdo con las normas éticas especificadas en el

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Diario Oficial de la Federación, 1983) y a las especificaciones de la Comisión de Bioética e Investigación del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora.

A cada una de las participantes en el estudio se le realizó una entrevista en absoluta confidencialidad, donde se obtuvieron datos personales, datos referentes a la patología y datos clínicos (Tabla 1).

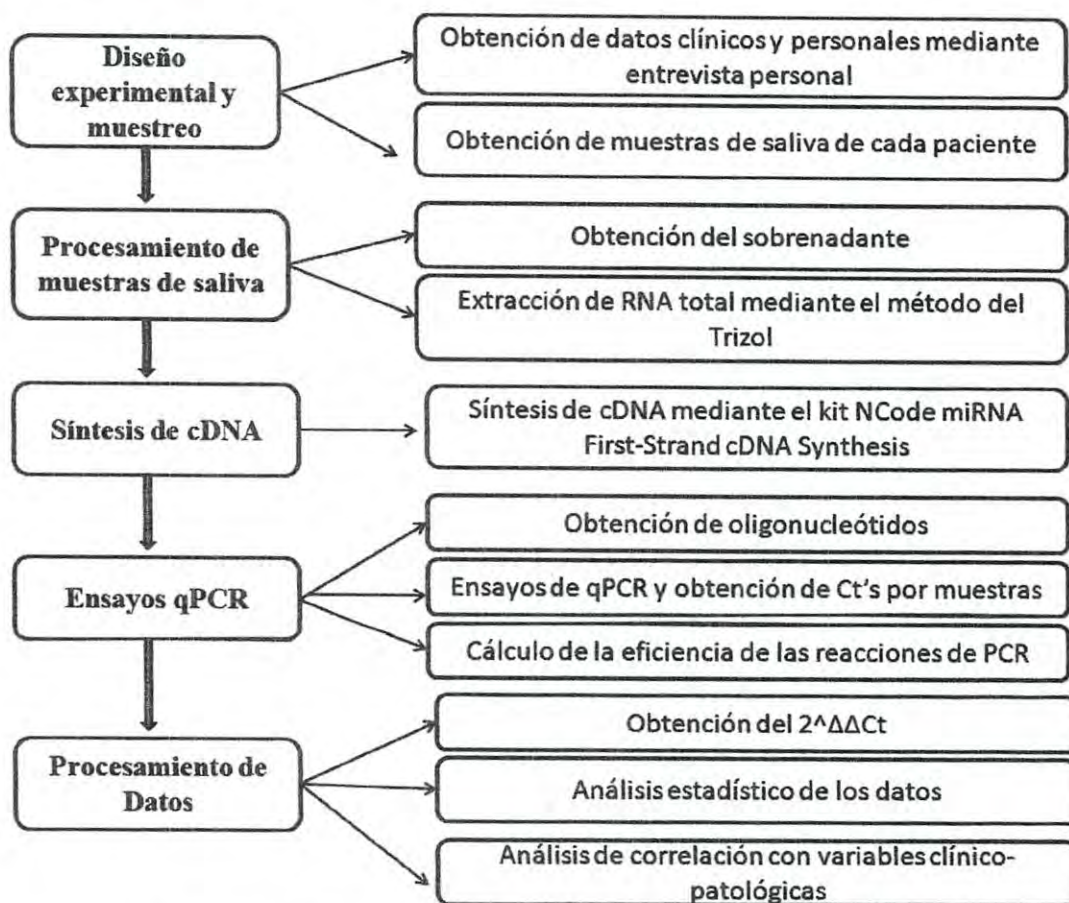


Figura 6. Diagrama de la Metodología llevada a cabo.

Se obtuvieron de 2-5mL de saliva sin estimulación en un tubo de 45mL (Marca VWR) estéril. La indicación previa a la paciente fue no haber ingerido alimentos ni bebidas al menos una hora antes de la toma. La muestra fue transportada inmediatamente hasta el

laboratorio, en hielo, donde se depositó en microtubos de 1.5mL (Marca Eppendorf) estériles libres de RNasas y DNasas.

Tabla 1. Datos obtenidos de las participantes del grupo “casos” en el estudio.

Datos personales	Datos referentes a la patología *	Datos clínicos
Nombre	Fecha de diagnóstico del Cáncer de Mama	Si recibió quimioterapia
Teléfono	Tipo histológico de Cáncer de Mama	Edad, peso y estatura
Domicilio	Tamaño del tumor	Estado menopáusico (edad del último período menstrual)
	Estadio tumoral (TNM)	Edad de la menarquía
	Invasión a nódulos linfáticos (positivo o negativo) y cuantos nódulos se afectaron	Utilización de anticonceptivos hormonales
	Presencia de metástasis	Recepción de tratamiento hormonal
	Resección del tumor (antes o después de la toma de muestra)	Hijos
	Tipo de procedimiento quirúrgico (mastectomía radical o cirugía conservadora) y fecha de la cirugía	Historia familiar de cáncer de mama

*Los datos recolectados referentes a la patología en cuestión fueron corroborados mediante la consulta del expediente clínico de la paciente y con el médico tratante.

5.2 Procesamiento de muestras de saliva

5.2.1 Obtención del sobrenadante

La muestra fue centrifugada a 2,600 x g durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga Heraeus Megafue 16R (Marca Thermo Scientific), se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5mL nuevo y estéril, de donde se extrajo inmediatamente el RNA.

5.2.2 Extracción de RNA total

Se llevó a cabo la extracción de RNA total a partir de 400µl de sobrenadante de la saliva procesada anteriormente, utilizando el método del Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

A los 400µl de sobrenadante se agregó 1mL de Trizol (Invitrogen), se mezcló por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 15 minutos para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente se agregaron 200µl de cloroformo, se cerraron adecuadamente los tubos y se agitó vigorosa y manualmente durante 15 segundos, luego se dejó incubar 3 minutos. Se centrifugó a 11,900 x g por 15 minutos a 4°C. Después de este paso la mezcla se separa en fases: una fase roja en la parte inferior del tubo, fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa incolora donde se encuentra el RNA ; de ésta última se transfirieron 500µl a un vial nuevo estéril de 1.5ml. Posteriormente se precipitó el RNA de la fase acuosa mediante la adición de 500µl de alcohol isopropílico y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11,900 x g durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el pellet fue lavado una vez con 1ml de etanol al 75% (frio a 4°C), se agitó la muestra por vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 7,500 x g durante 10 minutos a 4°C. Después se desechó el sobrenadante y se dejó secar el tubo sobre papel absorbente 15 minutos. Se resuspendió el pellet en 50µl de agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato) estéril. Por último las muestras se incubaron a 55°C durante 10 minutos. Los reactivos utilizados

en el proceso fueron grado biología molecular, las soluciones se hicieron con agua DEPC libre de RNasas, todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Para determinar la concentración de RNA total se midió la absorbancia a 260nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) y se determinó el índice de pureza utilizando el siguiente criterio: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$; $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ (Puerta y Ureña, 2005).

Para la determinación de la integridad del RNA obtenido se corrieron geles de poliacrilamida al 13% teñidos con solución de nitrato de plata al 0.1% (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1998) y las imágenes se capturaron en un equipo de fotodocumentación (Kodak).

5.3 Síntesis de cDNA mediante la Reacción de Transcripción Reversa

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se utilizó el kit NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen), el cual consta de dos pasos: la adición de la cola poli-A y la posterior síntesis de cDNA mediante una transcriptasa reversa, la cual añade nucleótidos para formar el correspondiente cDNA a partir de un primer oligo-DT que contiene una secuencia tag universal en el extremo 5' el cual permitirá la amplificación posterior por PCR tiempo real.

El kit está compuesto por un buffer de reacción 5X, Cloruro de manganeso ($MnCl_2$) 25mM, ATP 10Mm, Poli A polimerasa, agua DEPC, buffer de alineación, primer RT universal (25 μ M), 2X First Strand buffer de reacción y SuperScript III RT/RNaseOUT enzyme mix.

Primeramente se añadió la cola poli-A al RNA de la siguiente manera: se adicionaron adeninas al extremo 3' de las moléculas de microRNAs (ya que no contienen cola poli-A como los mRNAs); esto se hizo agregando a un vial estéril de 0.2 ml a temperatura ambiente los siguientes componentes: 5 μ l de RNA (50 ng/ μ l), 5 μ l de buffer

de reacción miRNA 5X, 2.5 μ l de $MnCl_2$ (25 mM), 0.5 μ l de Poli A polimerasa, 11 μ l de agua DEPC estéril y 1 μ l de ATP (1 mM) para un volumen final de 25 μ l. Después de adicionar los componentes se incubaron las muestras en el termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) a 37 °C durante 15 minutos, después se procedió inmediatamente a la síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se agregaron 4 μ l de la reacción de poliadenilación y los siguientes componentes en un tubo de reacción de 0.2 ml: 1 μ l de Buffer de alineación, 3 μ l de Primer RT Universal (25 μ M) para un volumen final de 8 μ l. Se incubaron las muestras a 65 °C durante 5 minutos en el termociclador, se sacaron y se colocaron en hielo por un minuto. Después se agregaron 10 μ l de mezcla de reacción 2X First-Strand y 2 μ l de SuperScript III RT/RNaseOUT Enzyme Mix, para llevar la reacción a un volumen final de 20 μ l.

Para el caso de los controles negativos RT, se utilizó 1 μ l de agua destilada estéril y 1 μ l de Inhibidor de Ribonucleasa Recombinante RNaseOUT (Invitrogen) en vez de la mezcla de enzimas. Después de agregar los componentes se transfirieron al termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) precalentado a 50°C y se incubaron durante 50 minutos, después a 85 °C durante 5 minutos y finalmente para parar la reacción, se colocaron en hielo.

Para determinar la concentración de cDNA se midió la absorbancia a 260nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) y se determinó el índice de pureza utilizando el siguiente criterio: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$; $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$. Posteriormente se diluyeron las muestras a una concentración de 100 ng/ μ l y se guardaron a -20°C hasta su posterior uso.

5.4 Ensayos en PCR tiempo real cuantitativa (qPCR)

5.4.1 Obtención de los oligonucleótidos

Se obtuvo la secuencia de cada uno de los microRNAs a evaluar de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los microRNAs en estudio.

MicroRNA	Secuencia
<i>hsa-mir-21</i>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
<i>hsa-mir-155</i>	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
<i>hsa-mir-195</i>	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGC

Los oligonucleótidos sentido fueron extraídos del programa NCode™ miRNA Database (Invitrogen), los cuales constan de la secuencia completa del microRNA maduro. Posteriormente fueron comprados a la casa comercial SIGMA-ALDRICH (Tabla 3).

Como oligonucleótido antisentido se utilizó el complementario al primer universal (el cual consta de 20-25 adeninas) (de la casa comercial Invitrogen) utilizado en la reacción de adición de poli-A en el paso de transcripción reversa o síntesis de cDNA.

5.4.2 Ensayos de expresión por PCR tiempo real

La evaluación de la expresión por PCR tiempo real se llevó a cabo mediante el kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), el cual consiste de un coctel listo para utilizarse con todos los componentes excepto los oligonucleótidos específicos para la amplificación. Este sistema combina la tecnología “hot-start” de la polimerasa Platinum Taq con UDG integrado y el fluoróforo SYBR Green I, los cuales proveen una excelente sensibilidad en la cuantificación de las secuencias blanco.

Tabla 3. Oligonucleótidos para los microRNAs en estudio.

Gen	Oligonucleótido sentido	Longitud (pb)	% GC	Tm °C	Dímeros	Grado de pureza
hsa-mir- 21	CGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGA	25	44	60	NO	HPLC
hsa-mir- 155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGTA	24	38	57	NO	HPLC
hsa-mir- 195	GATAGCAGCACAGAAATATTGGC	23	43	60	NO	HPLC

hsa: homo sapiens; pb: pares de bases; %GC: porcentaje de guaninas y citosinas en la secuencia del primer; Tm: temperatura de fusión (por sus siglas en inglés *melting temperature*); HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés *High-performance liquid chromatography*).

La mezcla contiene los siguientes componentes: Platinum Taq DNA polimerasa a una concentración 2X, el fluoróforo SYBR Green I, Tris-HCl, KCl, MgCl₂ 6 Mm, 400 μM dGTP, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 800 μM dUTP, uracilo DNA glicosilasa (UDG) y estabilizadores.

Para la amplificación del gen *mir-195* se añadieron los siguientes componentes al tubo de reacción de 0.2 ml: 12 μl de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG, 0.5 μl del oligonucleótido sentido (10 μM), 10 μl del oligonucleótido antisentido (10 μM), 1 μl de CDNA (100 ng/μl) sintetizado previamente y 10.5 μl de agua DEPC, para un volumen final de reacción de 25 μl.

Para la amplificación de los microRNAs *21* y *155* se añadieron los siguientes componentes al tubo de reacción de 0.2 ml: 7.5 μl de IQ SYBR Green QPCR mix, 0.5 μl del oligonucleótido sentido (10 μM), 0.5 μl del oligonucleótido antisentido (10 μM), 1 μl de CDNA y 5.5 μl de agua DEPC, para un volumen final de reacción de 15 μl.

Posteriormente se colocaron las muestras en el termociclador en tiempo real de la marca Corbett (Software Rotor-Gene Versión 6.1) y se corrieron las muestras en las

siguientes condiciones: 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 30 segundos a la temperatura de alineación según el primer (Tabla 3). En cada corrida se llevó a cabo una curva de disociación (Melt), para verificar que lo que amplificó fuera realmente el producto que se está buscando, ya que el fluoróforo utilizado (SYBR Green I) se une a cualquier DNA de doble cadena y pudiera dar falsos positivos. Además se corrieron los productos en geles de agarosa al 4% para confirmar los resultados.

El nivel de expresión relativa se midió utilizando el gen constitutivo *RNU1A* (Qiagen) debido a que ha sido demostrada su expresión estable en distintas muestras en varias publicaciones, y ha mostrado ser un buen normalizador para microRNAs, además presentó una expresión estable en todas las muestras probadas. El gen constitutivo se midió en las mismas condiciones en las que se midieron los genes de estudio y en las mismas corridas de PCR (Li *et al.*, 2011; Yaman-Agaoglu *et al.*, 2011).

5.4.3 Cálculo de la eficiencia de la reacciones de PCR

Para la obtención de la eficiencia de las reacciones de PCR, se realizaron curvas con diluciones seriadas que iban desde los 0.01 ng de cDNA hasta los 100 ng y se llevaron a cabo reacciones de PCR en las mismas condiciones experimentales, posteriormente se graficó el log de la concentración de cDNA en ng/μl contra los Ct por dilución. Seguido se obtuvo la pendiente de la recta y el coeficiente de variación. Para obtener los valores de eficiencia se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de la reacción de PCR} = 10^{(-1/\text{PENDIENTE})} - 1$$

El intervalo para determinar una buena eficiencia va de los 1.8 a los 2.2, cuyos valores representan una eficiencia de reacción de los 80-90%. La eficiencia representa la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA o cDNA en cada ciclo. Para evitar sesgos estadísticos se recomienda que la eficiencia del gen normalizador y el gen problema sean cercanos (Schmittgen y Livak, 2008).

5.7 Procesamiento de los Datos

5.7.1 Obtención del $2^{\Delta\Delta Ct}$

La determinación del nivel de expresión se realizó mediante el método del $\Delta\Delta Ct$ propuesto por Schmittgen y Livak (2008). Para cada uno de los genes ensayados en el estudio se obtuvo un valor de Ct proporcionado por el software del equipo de PCR tiempo real. Se normalizó la expresión de cada gen utilizando el ΔCt , el cual se obtiene restando el Ct del control interno (gen constitutivo, *RNU1A*) al Ct del gen blanco (problema o de interés), de acuerdo a la fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ del control interno})$$

Se obtiene un valor de ΔCt para cada una de las muestras estudiadas, tanto las del grupo “casos” como las del grupo “control”. Posteriormente se obtiene la media del grupo “control” y se utiliza para aplicar el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$, el cual se obtiene de la siguiente manera: primeramente se resta la media del ΔCt del grupo “control” a cada uno de los ΔCt del grupo “casos” y con esto tenemos el $\Delta\Delta Ct$, luego se aplica la exponencial $2^{\Delta\Delta Ct}$. Este valor representa la expresión del gen en estudio en la muestra tumoral respecto a las muestras normales. Los valores obtenidos mediante el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$ se denominan unidades de expresión relativa. El último paso es obtener la mediana (debido a que tenemos un número de muestra menor de 30) de todos los valores del $2^{\Delta\Delta Ct}$ y esto representa el índice de cambio en la expresión (*fold-change*) del gen respecto al grupo “control”.

Ejemplo del cálculo (Tabla 4): se resta el ΔCt del grupo “control” (columna C) a cada uno de los valores del ΔCt del grupo “casos” (columna A) ($6.045 - 6.133421 = -0.0884421$) este valor representa el $\Delta\Delta Ct$ (columna D), posteriormente se obtiene el exponencial de este valor que representaría el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (columna E) ($2^{-0.0884421} = 1.063205888$). Así se obtienen los valores del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para todas las muestras del grupo casos, una vez obtenida la columna E, se obtiene su mediana y ese valor representa el índice de cambio en la expresión del gen en cuestión.

Tabla 4. Ejemplo del cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Columna A ΔCt casos	Columna B $2^{-\Delta Ct}$ (Expresión ΔCt)	Columna C ΔCt control	Columna D $\Delta\Delta Ct$	Columna E $2^{-\Delta\Delta Ct}$
6.045	0.015145153	6.133421	-0.088421	1.063205888
8.37	0.003022588	6.133421	2.236579	0.212188886

Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mayores que uno indican una sobreexpresión del gen en el grupo “casos” respecto al grupo “control” y valores menores que uno indican que hay una expresión más baja en el grupo “casos”.

5.7.2 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos clínicos, patológicos y epidemiológicos se utilizó la media y la desviación estándar. Para las comparaciones de expresión de medianas entre el grupo “control” y el grupo “casos”, se realizaron pruebas no paramétricas de U Mann-Whitney ya que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad y la muestra es menor de 30. La normalidad de los datos fue determinada mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov por el software NCSS, 2007.

Se llevaron a cabo análisis estadísticos para evaluar posibles asociaciones entre las variables de expresión y las variables clínico-patológicas: estadio tumoral, invasión a nódulos linfáticos, la edad al momento del diagnóstico y la edad al momento de la menopausia. Primero se obtuvo la mediana de todos los datos y se agruparon en muestras con baja y alta expresión de acuerdo al siguiente criterio: en el grupo de baja expresión se agruparon las muestras que presentaban valores mayores a la mediana y en el grupo de alta expresión se agruparon las muestras que presentaron valores iguales o menores que la mediana. La asociación con las variables estadio tumoral e invasión a nódulos linfáticos se evaluó mediante la prueba de Fisher (Yan *et al.*, 2008; Roth *et al.*, 2010) y las asociación con las variables edad al momento del diagnóstico y edad al momento de la menopausia se evaluaron mediante pruebas de comparación de medianas por U de Mann-Whitney (Mendenhall *et al.*, 2008).

Todos los análisis estadísticos realizados se llevaron a cabo mediante los programas estadísticos NCSS versión 2007, STATA versión 11.0 y GraphPad Prisma versión 5.0.

VI. RESULTADOS

6.1 Datos clínicos de las pacientes incluidas en el estudio

Para el grupo “control” el promedio de edad fue de 54.9 ± 5.52 años (media \pm desviación estándar). Todos los controles en el estudio se seleccionaron porque se habían practicado una mamografía dentro de los 6 meses anteriores a la toma de la muestra de saliva y había sido reportada como Birads 1 y 2, es decir, presentaban una mamografía normal, además se les había realizado una exploración física por parte del médico ginecólogo encontrándose aparentemente libres de lesiones en los senos. El 94.7% (18) de las pacientes del grupo “control” se encontraban en estado menopáusico y la edad promedio al momento de la menopausia fue de 43 ± 8.16 años.

Para el grupo “casos” el promedio de edad fue de 52.7 ± 11.94 años y habían sido diagnosticadas con cáncer de mama mediante biopsia de tejido dentro de los 18 meses anteriores al reclutamiento. El 68.42% (13) de las pacientes se encontraban en estado menopáusico y la edad promedio al momento de la menopausia fue de 47.5 ± 3.92 años. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para edad, edad de la menopausia e índice de masa corporal (Tabla 5).

Tabla 5. Datos clínicos de las pacientes

GRUPO	Edad	Edad de la menopausia (años)	Índice de masa corporal
Casos n=19	52.7 ± 11.94	47.5 ± 3.92	27.08±4.47
Control n=19	54.9 ± 5.52	43 ± 8.16	29.82±4.33
Prueba de t	0.6968	-1.9296	1.8656
Valores de p	0.1039	0.4554	0.4415

6.2 Datos patológicos de los tumores de mama.

Sólo uno de los casos incluidos en el estudio fue de tipo histológico medular, el resto fueron del tipo ductal. El estadio del tumor lo realizó un patólogo y se hizo mediante el sistema de estadificación TNM, el cual está basado en la extensión del tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M) distante. Un número se añade a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y el grado de diseminación del cáncer. Este sistema ha sido aceptado por la *International Union Against Cancer*, UICC, y por el *American Joint Committee on Cancer*, AJCC (NCI, 2010) (Tabla 6) (Figura 7).

Tabla 6. Datos patológicos de los tumores de mama.

Muestra	Tamaño del tumor (mm)	Estadio del tumor (TNM)*	Nódulos afectados	Tipo Histológico
1	15	I	Negativo	Ductal
2	30	IIA	Negativo	Ductal
3	30	IIA	Negativo	Ductal
4	20	IIIA	Positivo	Ductal
5	40	IIA	Negativo	Ductal
6	50	IIIA	Positivo	Ductal
7	20	I	Negativo	Ductal
8	40	IIIC	Positivo	Ductal
9	30	IIA	Negativo	Ductal
10	10	I	Negativo	Ductal
11	20	I	Negativo	Ductal
12	60	IIIA	Positivo	Ductal
13	43	IIA	Negativo	Medular
14	28	IIB	Positivo	Ductal
15	80	IIIB	Positivo	Ductal
16	120	IIIC	Positivo	Ductal
17	75	IIIA	Positivo	Ductal
18	60	IIB	Positivo	Ductal
19	ND	IIIB	Positivo	Ductal

ND: No disponible.

TNM: extensión del tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M).

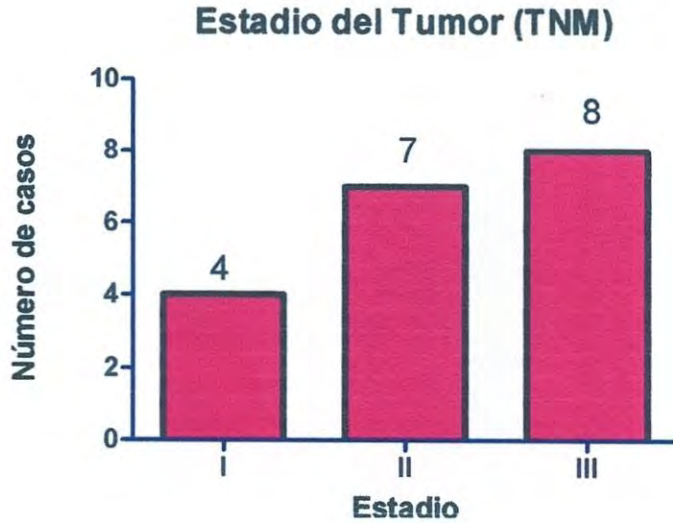


Figura 7. Número de casos por estadio tumoral estadificados mediante el sistema de TNM.

6.3 Extracción de RNA

La cantidad de RNA total extraída a partir de 400 μL de sobrenadante fue en promedio de 98.8 ± 39.72 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en 50 μL con un índice A260/280 de aproximadamente 1.8 para el grupo “casos”; para el grupo “control” fue de 71.5 ± 54.09 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a partir de 400 μL de sobrenadante con un índice A260/280 también de aproximadamente 1.8.

Se realizó una prueba de t para determinar si existía una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de RNA extraído del grupo “casos” y del grupo “control”, y se encontró que si hubo diferencia significativa ($p = 0.0165$). Se obtuvo mayor concentración de RNA en el grupo de casos (Figura 8).

Concentración de RNA extraída a partir de saliva

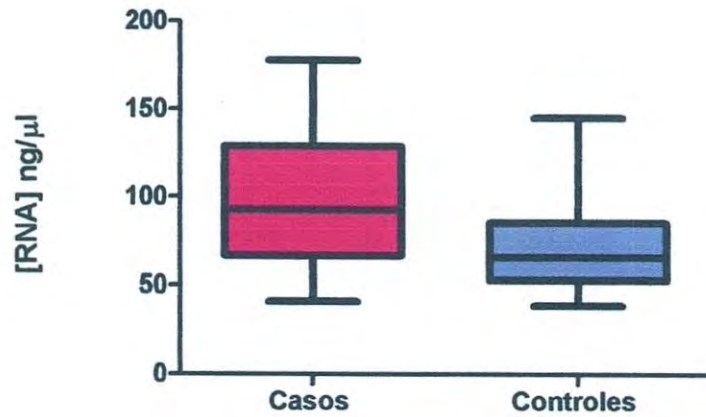


Figura 8. Concentración de RNA en ng/μl extraída a partir de saliva en el grupo “casos” y en el grupo “control”.

La integridad del RNA fue determinada mediante geles de electroforesis al 13% de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata al 0.1% (Figura 9).

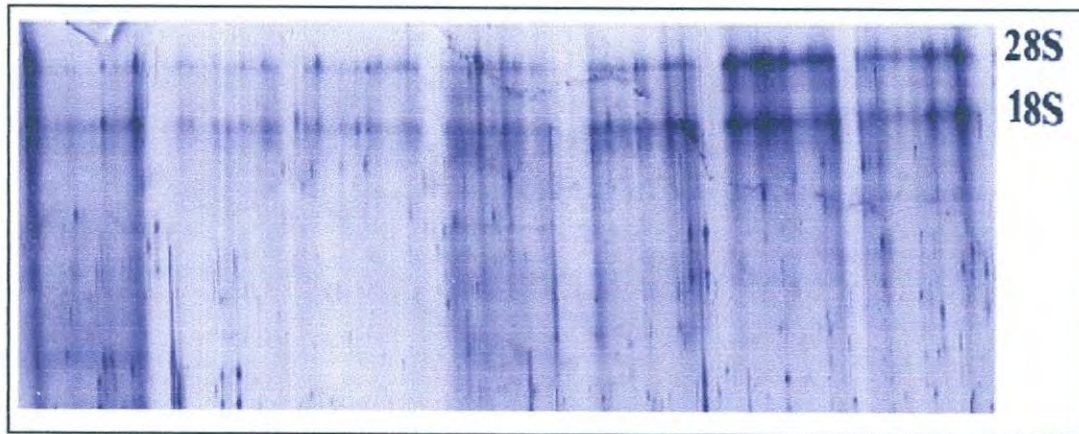


Figura 9. Gel de integridad de RNA de poliacrilamida al 13% teñido con nitrato de plata al 0.1%.

6.4 Síntesis de cDNA

La cantidad promedio de cDNA sintetizada a partir de 250 ng de RNA total fue de 711.45 ± 193.35 ng de cDNA para el grupo “control” y un promedio de 704.07 ± 202.79 ng para el grupo “casos”.

Se realizó una prueba de t para la concentración de cDNA obtenido en el grupo “casos” y el grupo “control”, y se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05143$).

6.5 Análisis de expresión de microRNAs

Para la normalización se utilizó la expresión del gen constitutivo *RNU1A*, el cual es un RNA pequeño nuclear que participa en las reacciones de edición y maduración del RNA mensajero. El gen *RNU1A* mostró una expresión constante en todas las muestras, tanto del grupo “casos” como del grupo “control”, presentando un Ct promedio de 22.7 ± 1.9 , lo que nos permitió utilizarlo como gen constitutivo normalizador (Figura 10 y 11). Además, el gen constitutivo mostró tener una eficiencia de reacción similar a la de los genes problema, dentro del rango aceptado de 1.8-2.2 (Schmittgen y Livak, 2008) (Tabla 7 y Figura 12).

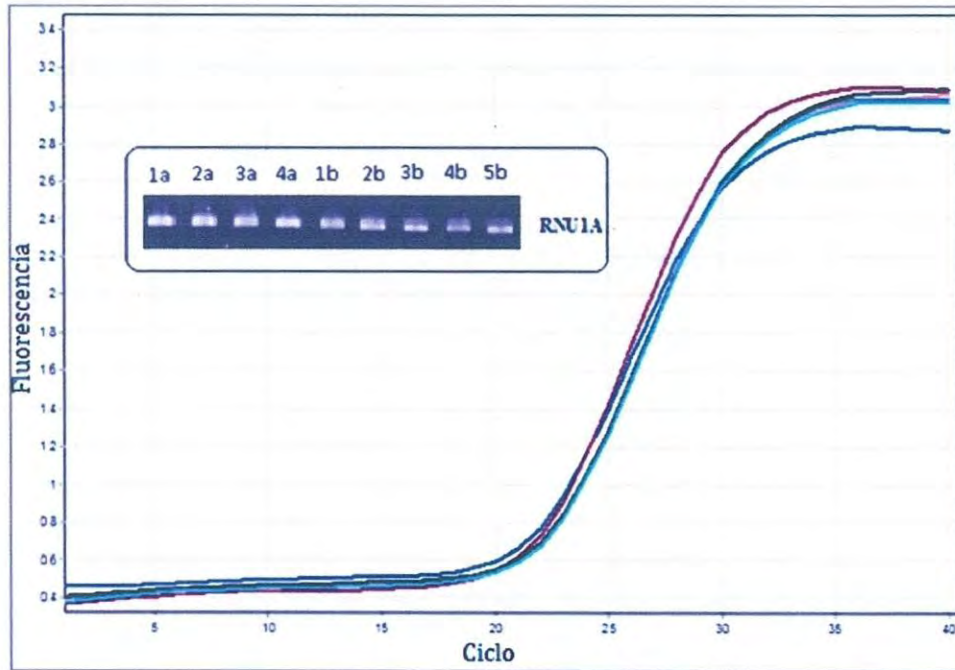


Figura 10. Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen constitutivo *RNU1A* en diferentes muestras del grupo “control” (b) y del grupo “casos”(a).

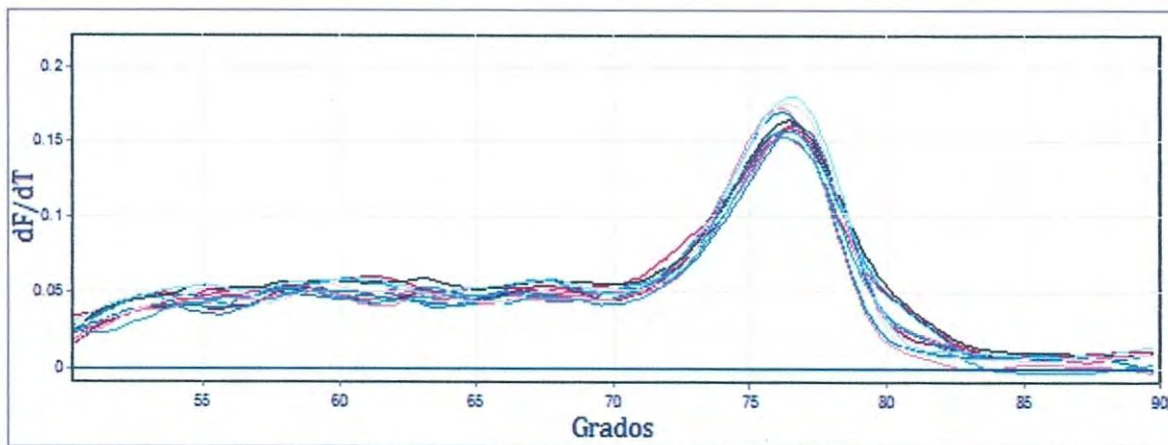


Figura 11. Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen *RNU1A*, la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación.

Tabla 7. Eficiencias de la reacción de PCR de los genes en estudio.

Gen	Pendiente	R ²	Eficiencia
RNU1A	-3.0286	0.9233	2.13
<i>mir-155</i>	-3.0029	0.8839	2.15
<i>mir-195</i>	-3.0014	0.8859	2.15
<i>mir-21</i>	-3.0171	0.9172	2.14

Curvas de eficiencia de los genes de estudio

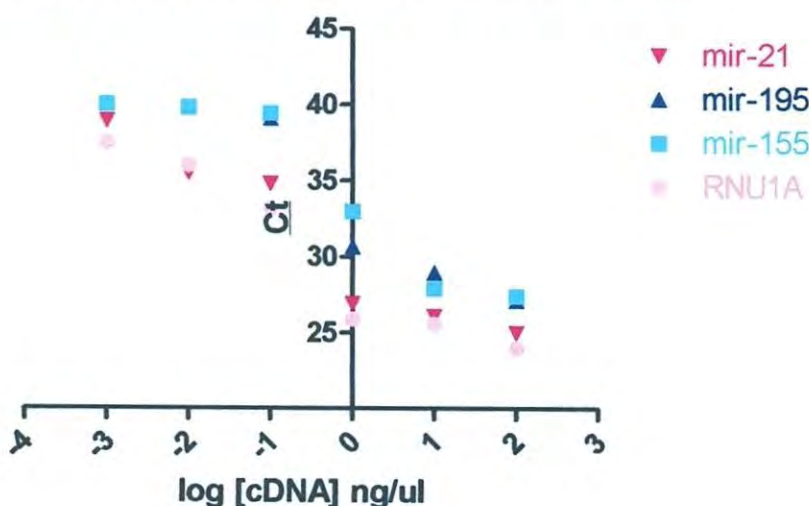


Figura 12. Curvas que representan la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de los genes de estudio.

Mir-21

Se obtuvo el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por muestra para *mir-21* como se indicó en la sección de materiales y métodos. El índice de cambio (“*fold change*”) fue de 0.762294832. Esto nos indica que el gen *mir-21* está bajo en su expresión en el grupo con cáncer con respecto al grupo “control”. Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney para determinar si la diferencia entre las medianas de la expresión del grupo “casos” y del grupo “control” fue significativa, ya que los datos no presentaron una distribución normal. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en las medianas de ambos grupos ($p=0.32$) (Figura 13, 14 y 15).

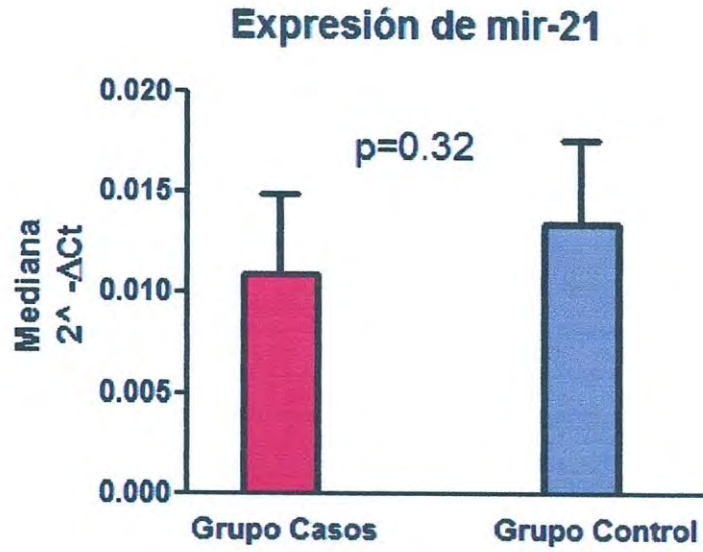


Figura 13. Mediana y el error estándar de la expresión de *mir-21* en el grupo “casos” y en el grupo “control”.

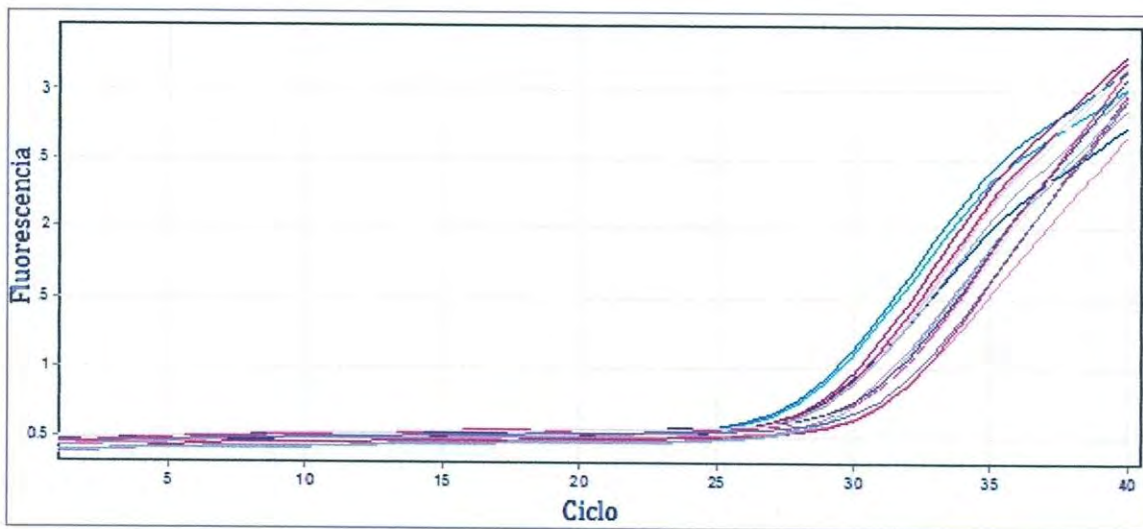


Figura 14. Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen *mir-21*.

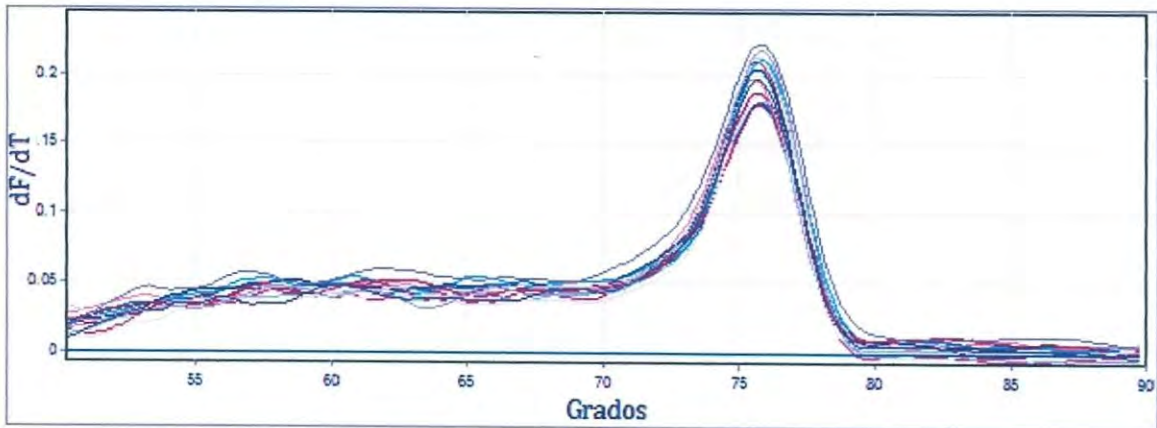


Figura 15. Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen *mir-21*, la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación.

Mir-155

Se obtuvo el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por muestra para *mir-155* como se indicó en la sección de materiales y métodos. El índice de cambio (“*fold change*”) fue de 0.703503741. Esto nos indica que el gen *mir-155* está bajo en su expresión en el grupo con cáncer con respecto al grupo “control”. Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney para determinar si la diferencia entre las medianas de la expresión del grupo “casos” y del grupo “control” fue significativa, ya que los datos no presentaron una distribución normal y no se encontró diferencia estadísticamente significativa en las medianas de ambos grupos ($p=0.95$) (Figura 16, 17 y 18).

Expresión de mir-155

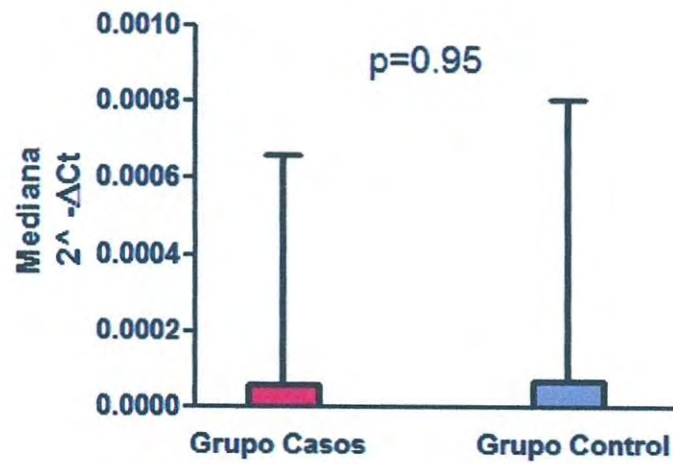


Figura 16 Mediana y el error estándar de la expresión de *mir-155* en el grupo “casos” y en el grupo “control”.

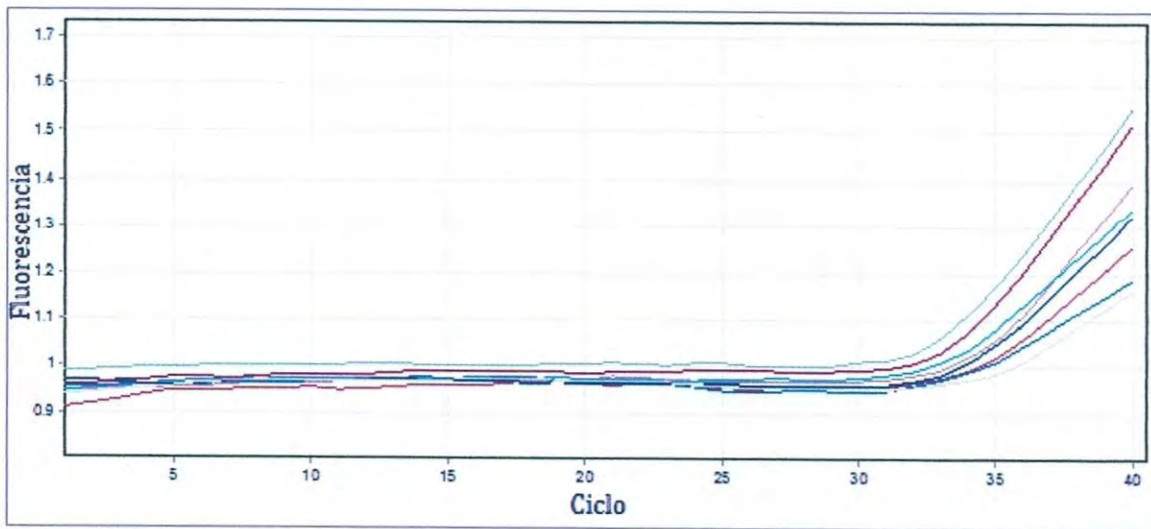


Figura 17. Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen *mir-155*.

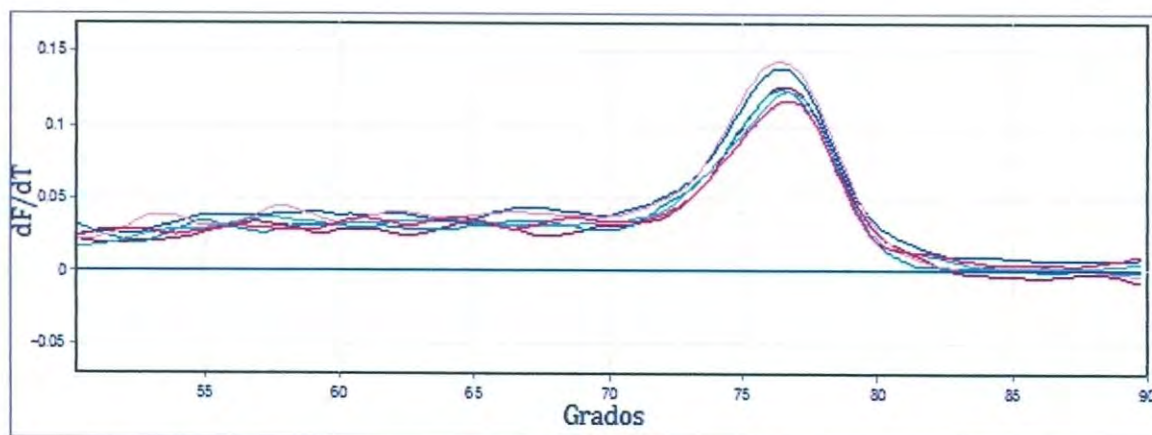


Figura 18. Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen *mir-155*, la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación.

Mir-195

Se obtuvo el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por muestra para *mir-195* como se indicó en la sección de materiales y métodos. El índice de cambio (“*fold change*”) fue de 0.370386905. Esto nos indica que el gen *mir-195* está bajo en su expresión en el grupo con cáncer con respecto al grupo “control”. Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney para determinar si la diferencia entre las medianas de la expresión del grupo “casos” y del grupo “control” fue significativa, ya que los datos no presentaron una distribución normal y sí se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las medianas de ambos grupos ($p=0.02$) (Figura 19, 20 y 21).

Expresión de mir-195

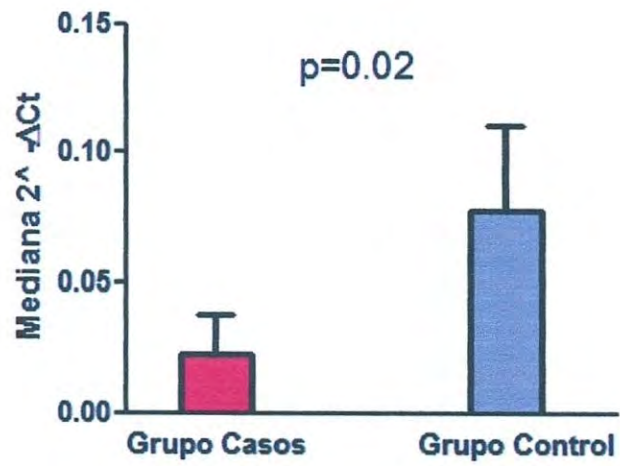


Figura 19. Mediana y el error estándar de la expresión de *mir-195* en el grupo “casos” y en el grupo “control”.

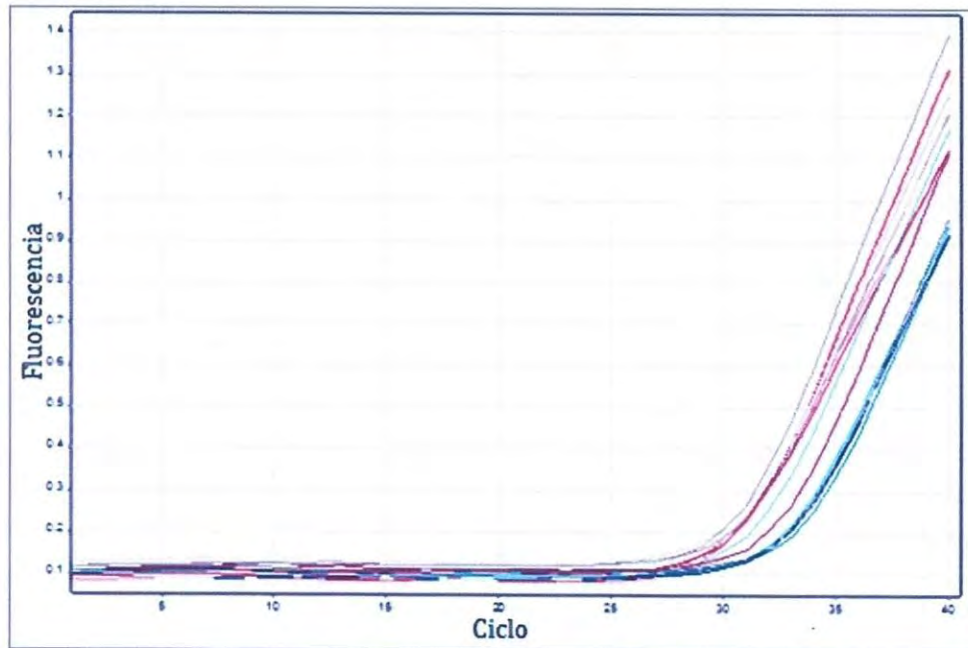


Figura 20. Número de ciclo contra la fluorescencia de la expresión del gen *mir-195*.

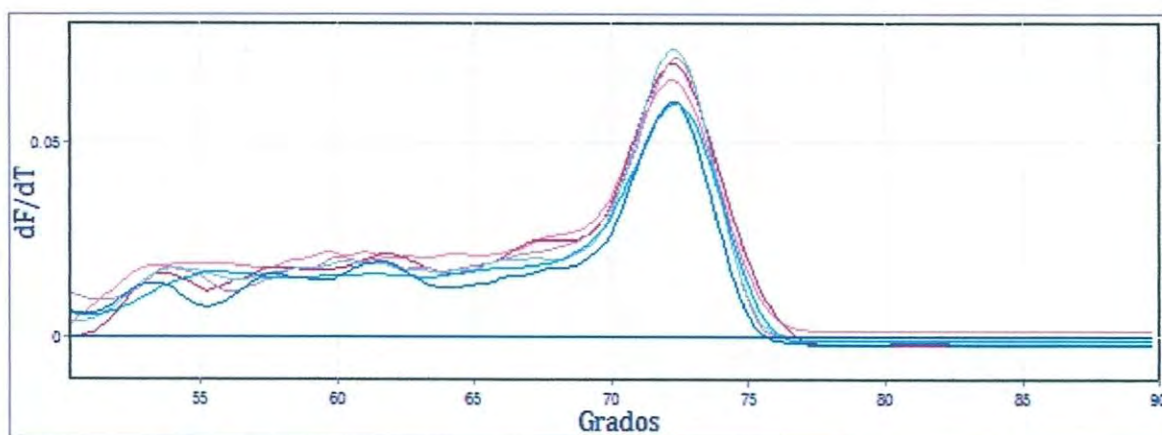


Figura 21. Curva de disociación (melt) de los productos formados durante la amplificación del gen *mir-195*, la cual nos indica que tenemos un solo producto de amplificación.

Además de las curvas de disociación también se llevó a cabo la electroforesis de los productos de amplificación de cada gen en geles de agarosa al 4% para asegurar que teníamos una sola banda (un solo producto de amplificación) (Figura 22).

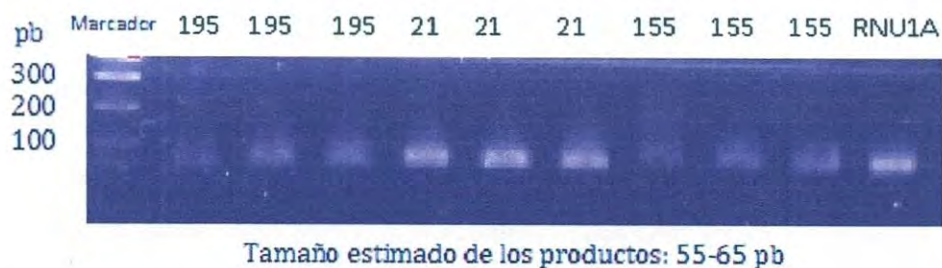


Figura 22. Electroforesis de agarosa al 4% de los productos de amplificación de cada gen.

Los tres genes de microRNAs estudiados presentaron una baja expresión en el grupo “casos” respecto al grupo “control”; sin embargo, sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa en el gen *mir-195*. A continuación se muestra el índice de cambio en la expresión del grupo “casos” respecto al grupo “control” ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para cada uno de los genes de estudio (Tabla 8 y figura 23).

Tabla 8. Índice de cambio en la expresión del grupo “casos” respecto al grupo “control”.

Gen	Índice de cambio en la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	p
<i>Mir-21</i>	0.762294832	0.32
<i>Mir-155</i>	0.703503741	0.95
<i>Mir-195</i>	0.370386905	0.02*

* $p < 0.05$. Se realizó una prueba de U Mann-Whitney para comparar medianas y se consideró estadísticamente significativo si $p < 0.05$.

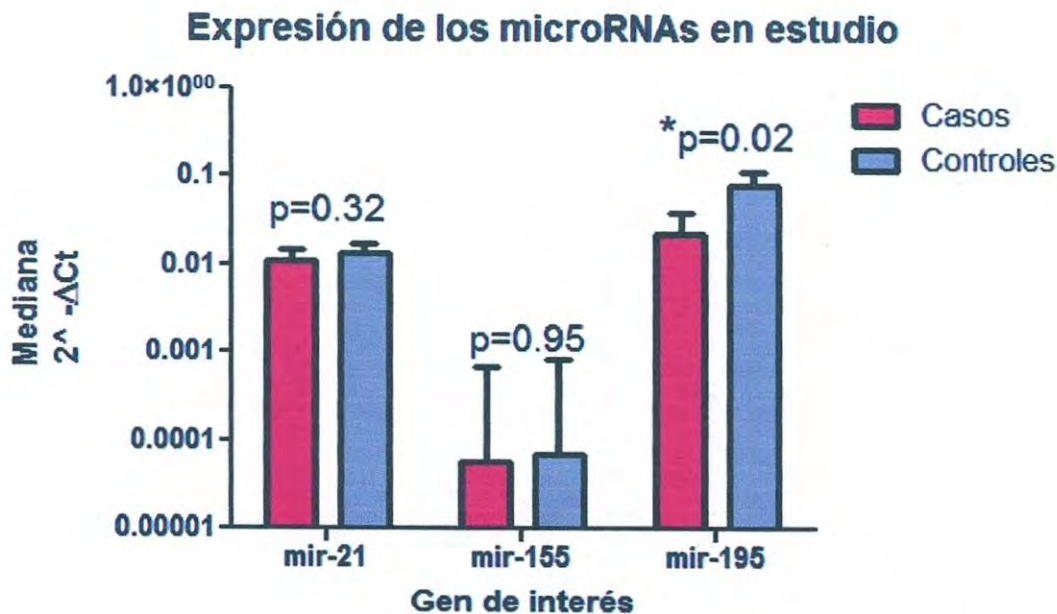


Figura 23. Expresión de los tres genes de estudios en ambos grupos casos y controles. Se graficó la mediana y el error estándar. * $p < 0.05$ estadísticamente significativo.

6.6 Análisis de asociación de la expresión de microRNAs y variables clínico-patológicas.

Se realizaron análisis de asociación entre la expresión de cada uno de los microRNAs en estudio y las variables clínico-patológicas: estadio del tumor I, II, II, presencia de metástasis a nódulos linfáticos (positivo o negativo), edad a la menopausia y edad al momento del diagnóstico, mediante pruebas de U Mann Whitney y Fisher (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación de la expresión de microRNAs en saliva con características clínico-patológicas (valores de p)

	Estadio tumoral	Metástasis a nódulos linfáticos	Edad de la menopausia	Edad al diagnóstico
<i>Mir-21</i>	1.00	0.656	0.0117*	0.3908
<i>Mir-155</i>	0.170	0.179	0.9379	0.0371*
<i>Mir-195</i>	0.181	0.020*	0.6141	0.4375

*p<0.05 se considera estadísticamente significativo

Para el estadio tumoral y la metástasis a nódulos linfáticos se utilizó la prueba de Fisher, y para la edad de la menopausia y edad al momento del diagnóstico se aplicaron pruebas de U de Mann-Whitney comparando los grupos de mayor y menor expresión del gen en estudio.

Se encontró que había una mayor expresión del gen *mir-21* en pacientes que presentaron la menopausia a menor edad (p=0.0117).

Se observó que las pacientes que fueron diagnosticadas a mayor edad presentaban una mayor expresión del gen *mir-155* en comparación con las que fueron diagnosticadas a menor edad (p=0.0371).

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del gen *mir-195* y la positividad a nódulos linfáticos, observándose que las pacientes con nódulos positivos presentaban menor expresión del gen, mientras que las pacientes con nódulo negativos presentaban alta expresión del gen (p=0.020). No hubo más hallazgos estadísticamente significativos, sin embargo, se pueden observar algunas tendencias en los datos analizados. En el caso de *mir-155* y la invasión a nódulos linfáticos, se observa la tendencia de que las pacientes que presentan baja expresión del gen presentan además nódulos positivos y las que tienen alta expresión tienen nódulos libres de invasión. Además, las pacientes con mayor estadio tumoral (III) presentan menor expresión del gen que las que presentan estadio I y II (p=0.170). Se observó además que aquellas pacientes que presentan menor expresión del gen *mir-195* tienen estadios más avanzados de la enfermedad (p=0.181).

VII. DISCUSIÓN

Los métodos de diagnóstico actuales para cáncer de mama carecen de especificidad y sensibilidad (Tafreshi *et al.*, 2010), además de ser invasivos, por ello la importancia de buscar nuevos métodos que permitan determinar marcadores tumorales para la oportuna y adecuada detección del cáncer de mama en estadios tempranos de la enfermedad, además que sean obtenidos mediante técnicas no invasivas o mínimamente invasivas.

Los microRNAs circulantes encontrados en diversos fluidos corporales, tales como el suero y la saliva, han surgido recientemente como potenciales marcadores para distintos tipos de cáncer. En diversas publicaciones se ha demostrado que la expresión de microRNAs circulantes se encuentra alterada en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, por lo cual han surgido diversas investigaciones para determinar su utilidad como marcadores de diagnóstico y pronóstico de ésta enfermedad (Chen *et al.*, 2008; Lawrie *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2009b; Zhu *et al.*, 2009; Asaga *et al.*, 2010; Heneghan *et al.*, 2010a; Roth *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Recientemente se reportó que la expresión de microRNAs en suero se encontraba alterada en pacientes con cáncer de mama (Zhu *et al.*, 2009; Asaga *et al.*, 2010; Heneghan, *et al.*, 2010a); además, Park y colaboradores (2009) reportaron el aislamiento y análisis de expresión de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer oral. Debido a que la saliva es un filtrado de la circulación sanguínea (Gao *et al.*, 2009), este trabajo se enfocó en estudiar la expresión de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama. La investigación consistió en estudiar la expresión de los microRNAs 21, 155 y 195 (fueron elegidos debido a que se han reportado consistentemente alterados en tejido y suero de cáncer de mama) en saliva de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y relacionar su expresión con características clínico-patológicas, con el fin de estudiar su potencial uso como marcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

Hasta la fecha no existe ningún estudio donde se haya medido la expresión relativa de microRNAs en saliva de pacientes con cáncer de mama, por lo que este estudio representó un piloto para observar cómo se comportaba la variable expresión de microRNAs en saliva. Como no existen estudios previos al presente trabajo no se pudo realizar comparaciones con estudios similares, por lo que, apoyándonos en el hecho de que la saliva es un filtrado de la sangre y que existe una correlación entre los componentes de la sangre y la saliva (Gao *et al.*, 2009), las comparaciones las realizamos en estudios de microRNAs en sangre.

Concentración de RNA en saliva

El presente estudio consistió en analizar la expresión de microRNAs en saliva de 19 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y en 19 controles sanos libres de lesiones en los senos. Al comparar ambos grupos se encontró que había mayor concentración de RNA en el grupo de pacientes con cáncer de mama respecto al grupo “control”, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0165$). Ha sido reportado en estudios anteriores niveles elevados de ácidos nucleicos circulantes (DNA/RNA) en sangre de pacientes respecto a controles sanos en distintos tipos de cánceres (Stroun *et al.*, 1989; Anker *et al.*, 1999; Swarup y Rajeswari, 2007). Para explicar los altos niveles de ácidos nucleicos circulantes en pacientes con cáncer se han propuesto diversas hipótesis entre las más aceptadas tenemos dos: la primera señala que pueden ser liberados de células provenientes de la masa tumoral que experimentan necrosis o apoptosis; y la segunda sugiere que hay una constante liberación de ácidos nucleicos provenientes de las células cancerosas hacia el torrente sanguíneo como una forma nueva de comunicación celular (Swarup y Rajeswari, 2007; Pinzani *et al.*, 2010).

En el presente estudio se logró extraer RNA íntegro de las muestras de saliva y llevar a cabo estudios de expresión mediante la técnica de PCR tiempo real. Todas nuestras muestras tuvieron expresión de los tres microRNAs ensayados. El hecho de que se pueda realizar este tipo de estudios en fluidos con altas cantidades de RNAsas, como la saliva, se puede explicar debido a que los microRNAs circulantes son estables y resistentes a la

degradación por éste tipo de enzimas degradativas y por condiciones adversas de almacenamiento, como las altas temperaturas y diversos períodos de congelamiento-descongelamiento. La resistencia que presentan los microRNAs ha sido explicada por el hecho de que los microRNAs se encuentran inmersos en vesículas lipídicas resistentes a RNasas, tales como exosomas y cuerpos apoptóticos (Iguchi *et al.*, 2010). Se ha reportado que el origen de los RNA en saliva pueden provenir de diversas fuentes y existen dos posibles explicaciones de cómo llegan a la saliva: por medio de la lisis celular (muerte) de los conductos salivales o del epitelio oral; y por secreción activa de células en cualquier parte del cuerpo, los cuales viajan a través del sistema circulatorio, y después son secretados dentro de la saliva (Park *et al.*, 2006).

Ensayos de expresión de los microRNAs de estudio

En este trabajo se logró medir la expresión de los microRNAs 21, 155 y 195, mediante PCR en tiempo real, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *mir-195* ($p = 0.02$) entre el grupo “casos” y el grupo “control”, encontrándose sub-expresado en el grupo con cáncer de mama. Sin embargo, no se lograron detectar diferencias significativas en la expresión de *mir-21* ($p = 0.32$), ni en la expresión de *mir-155* ($p = 0.95$).

Existen estudios controversiales acerca de la expresión de *mir-195* en el cáncer de mama, Li y colaboradores (2011) reportaron que se encontraba bajo en su expresión en tejido y células de cáncer de mama lo que coincide con lo encontrado en nuestro estudio. Sin embargo, Heneghan y colaboradores (2010b) reportaron niveles incrementados de *mir-195* en suero de pacientes con cáncer de mama respecto a un grupo “control”. Lo que esperábamos encontrar era un incremento en la expresión de este gen en el grupo de casos, puesto que se han reportado niveles incrementado en suero; sin embargo, nuestro grupo de estudio se comportó de manera inversa, quizás se pueda deber a diversos factores que hemos identificado.

El grupo “casos” estaba conformado por pacientes a las cuales ya se les había practicado la resección del tumor antes de la toma de la muestra de saliva (11), mientras que otras aun no habían sido operadas (8). Creemos que dicho factor pudo influir en nuestros resultados, ya que se ha reportado una disminución en los niveles de expresión de *mir-195* en pacientes post-operadas respecto a los niveles antes de la operación (Heneghan *et al.*, 2010a). Al realizar una estratificación de pacientes operadas y no operadas a la toma de la muestra, encontramos que había una diferencia significativa en la expresión de *mir-195* entre ambos grupos ($p= 0.0389$), presentando mayor expresión las pacientes que no habían sido operadas, lo cual no coincide con lo encontrado por Heneghan y colaboradores (2010a).

El gen *mir-21* ha sido reportado como altamente expresado en suero de pacientes con cáncer de mama por Asaga y colaboradores (2010), quienes también reportaron que su expresión correlacionaba con factores pronóstico clínico-patológicos como la metástasis visceral; sin embargo, en nuestro estudio no logramos detectar diferencias significativas en la expresión del gen ni asociaciones con dichas características. En dicho estudio se midieron 102 muestras de suero, en nuestro estudio fueron 19 muestras de saliva, lo cual pudo haber influido en no detectar diferencias estadísticamente significativas.

Para *mir-155* no se logró detectar diferencias entre ambos grupos al igual que el estudio realizado por Zhu y colaboradores (2009) quienes reportaron que no encontraron diferencias significativas en la expresión de *mir-155* en suero. Ellos obtuvieron valores de Ct promedio de 34.87 para el grupo “control” y 34.98 para el grupo “casos”, lo que concuerda con los valores obtenidos en nuestro estudio, que fueron de 33.48 ± 2.99 para el grupo “control” y de 34.35 ± 2.19 para el grupo “casos”. Sin embargo, Roth y colaboradores (2010) reportaron que *mir-155* se encontraba significativamente incrementado en suero de pacientes con cáncer de mama respecto a controles sanos y que su concentración correlacionaba con la progresión del tumor. En nuestro estudio esperábamos encontrar incrementada la expresión en el grupo “casos”, sin embargo, no se logró detectar dicho incremento. Esto se pudiera deber a la baja expresión que mostró tener el gen *mir-155* en saliva de ambos grupos (casos y controles).

Asociaciones entre la expresión de microRNAs y características clínico-patológicas

En cuanto a las asociaciones con características clínico-patológicas como el estadio del tumor, la invasión a nódulos linfáticos, la edad de la menopausia y la edad al momento del diagnóstico, encontramos algunas diferencias estadísticamente significativas.

El estradiol es la forma de estrógeno más importante que se encuentra en el cuerpo, cuando se llega a la menopausia los niveles de estradiol disminuyen notablemente. Se ha reportado que el estradiol inhibe la expresión de *mir-21* en líneas celulares de cáncer de mama. Se ha observado que la disminución en la expresión de *mir-21* mediada por estradiol, correlaciona con un incremento en la expresión de las proteínas PTEN, Bcl-2 y PDCD4, las cuales son reguladas negativamente por *mir-21* (Wickramasinghe *et al.*, 2009). En nuestro estudio encontramos que había una mayor expresión del gen *mir-21* en las pacientes que presentaban la menopausia a menor edad ($p = 0.0117$), esto puede deberse a que dichas pacientes estuvieron menor tiempo expuestas al estradiol que aquellas pacientes con mayor edad a la menopausia, lo que incrementó el nivel de expresión de *mir-21*, ya que ésta es inhibida por el estradiol.

En el presente estudio también se encontró que la expresión de *mir-155* es mayor en aquellas pacientes que tenían mayor edad al momento de ser diagnosticadas con cáncer de mama ($p = 0.0371$). Se ha sugerido que la edad es un factor que puede influir de manera indirecta en el pronóstico del cáncer de mama, es decir, a través de otros factores que influyen en la supervivencia, como la afección a ganglios, el estado de los receptores hormonales. Se ha sugerido por lo observado en diversas investigaciones que la mayor edad de las pacientes se asocia a un comportamiento menos agresivo de los tumores y, por tanto, con un pronóstico más favorable, independientemente de la extensión de la enfermedad (Gava *et al.*, 2002). Sin embargo, no está catalogado como un factor pronóstico para cáncer de mama debido a que los datos arrojados por diversas investigaciones siguen siendo controversiales. Podríamos sugerir que la alta expresión de *mir-155* está asociada con una menor agresividad de los tumores.

Además se encontró que las pacientes con baja expresión del gen *mir-195* presentan positividad a nódulos linfáticos y las que presentan alta expresión presentan nódulos libres de invasión ($p=0.020$). También encontramos, aunque sin asociación estadísticamente significativa ($p=0.181$), la tendencia de que cuando *mir-195* se encuentra bajo en su expresión las pacientes presentan mayor estadio tumoral que aquellas en las que se encuentra alto en su expresión. Lo anterior sugiere que la baja expresión de *mir-195* podría ser un potencial marcador de mal pronóstico para cáncer de mama, ya que el estado de los nódulos linfáticos y el estadio tumoral son poderosos factores pronóstico para cáncer de mama de categoría I (Perez-Sanchez *et al.*, 2008), aunque se requieren quizás de mayor número de muestras para corroborar estadísticamente esta tendencia.

Aunque no se lograron detectar más asociaciones estadísticamente significativas entre los microRNAs y las características clínico-patológicas, se observaron algunas tendencias en los comportamientos de la expresión. En el caso de *mir-155* y la invasión a nódulos linfáticos, se observa la misma tendencia que para *mir-195*. Las pacientes que presentan baja expresión del gen tienen nódulos positivos a invasión ($p = 0.179$) y presentan mayor estadio tumoral (III) ($p = 0.170$), mientras que aquellas pacientes con alta expresión tienen nódulos libres de invasión y menor estadio tumoral (I y II). Esto sugiere que si lográramos detectar significancia estadística la expresión de *mir-155* pudiera servir como un potencial factor pronóstico para cáncer de mama.

Posibles factores que influyeron en nuestros resultados

El que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión entre el grupo “casos” y el grupo “control” para *mir-21* y *mir-155*, como en otras investigaciones realizadas en suero, puede deberse a varios factores, entre ellos y el que creemos pudo influir más en nuestros resultados fue el número de muestra. En nuestra investigación estudiamos 19 casos por grupo lo que no cumplió con ser una muestra grande estadísticamente, esto fue debido a que fue una muestra de conveniencia debido a la falta de tiempo para reclutar pacientes y a los costos para procesar las muestras. Creemos que

aumentando el número de muestra sería posible detectar diferencias entre la expresión de ambos grupos y en las distintas asociaciones con características de las pacientes.

Otro factor que influyó fue la falta de estratificación de las pacientes, ya que el cáncer de mama es una enfermedad clínicamente heterogénea, debido a que presentan una gran variabilidad genética tanto de las pacientes, como los tumores (Pusztai, 2008; Sotiriou y Pusztai, 2009). Pudiera estar afectando el hecho de que nuestro grupo de pacientes era heterogéneo en cuanto a características clínicas y patológicas y no se pudo estratificar al final del reclutamiento por el número de muestra pequeño. Dentro de los factores referentes a la falta de estratificación tenemos: el estadio tumoral, ya que en nuestro grupo había pacientes con estadios tumorales I, II y III, y se ha reportado que los niveles de expresión correlacionan con el estadio tumoral (Blenkiron *et al.*, 2007); la invasión a nódulos, había pacientes con nódulos positivos (10) y pacientes con nódulos negativos (9), igualmente se ha reportado correlación con este factor y la expresión de microRNAs (Ioro *et al.*, 2005); los tiempos de evolución de la enfermedad, ya que las pacientes fueron reclutadas a distintos tiempos de evolución de la tumoración; el factor resección del tumor, ya que había pacientes operadas y no operadas a la toma de la muestra, y se ha reportado que niveles de microRNAs *mir-195* y *let-7* disminuyen en el suero después de la resección del tumor (Heneghan *et al.*, 2010a).

El índice de flujo de la saliva es un factor más que pudo influir en la expresión de los microRNAs. Se ha reportado que el flujo de la saliva no estimulada, y por ende la composición de la saliva, puede variar por diversas causas como: desordenes orales, enfermedades sistémicas, medicamentos, quimioterapia, radioterapia, por la hora del día a la que se tome la muestra ya que tiene un ciclo circadiano teniéndose la mayor parte del flujo en la mitad del día (Rantonen, 2003). Lo anterior sugiere que los resultados se pudieron ver afectados por el flujo salival, ya que no estandarizó la hora de la toma, es decir, la mayor parte de las muestras fueron tomadas antes de las 11 de la mañana, pero hubo algunas que si fueron tomadas por la tarde, algo que pudiera estar alterando nuestros resultados. Además, había 11 pacientes que estaban recibiendo quimioterapia, mientras que 8 aun no recibían, sería ideal estratificar el grupo en pacientes que recibían y las que no

recibían quimioterapia al momento de la toma de la muestra para evitar variaciones en el flujo salival y en los componentes de la saliva.

VIII. CONCLUSIONES

- Se encontró diferencia significativa en la expresión del gen *mir-195* entre el grupo de pacientes con cáncer de mama y el grupo de controles libres de la enfermedad.
- No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *mir-21* y *mir-155* entre el grupo de pacientes con cáncer de mama y el grupo de controles libres de la enfermedad.
- Se encontró asociación entre la expresión del gen *mir-195* y la invasión a nódulos linfáticos, pudiendo ser este gen un factor pronóstico para cáncer de mama.
- Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el gen *mir-21* y la edad al momento de la menopausia y entre el gen *mir-155* y la edad al momento del diagnóstico.
- Los tres genes estudiados pudieran servir como potenciales factores pronóstico y diagnóstico en saliva para el cáncer de mama por su correlación con características clínico-patológicas si se estudian en un mayor número de casos.

IX. RECOMENDACIONES

Al ser el cáncer de mama un problema de salud pública es necesario continuar la búsqueda de marcadores tumorales que nos permitan la adecuada detección de la enfermedad de una manera económica y fácil, que provoque poca molestia y sean de fácil acceso para las pacientes. Es necesario y recomendable realizar más estudios en saliva ya que representa un fluido de fácil obtención y arroja gran cantidad de información sobre la salud de la paciente. También es recomendable realizar más estudios de expresión de microRNAs ya que han demostrado ser potenciales marcadores para cáncer de mama por su expresión alterada en ésta enfermedad y por su elevada estabilidad tanto en suero y saliva como en otros fluidos corporales.

Se recomienda complementar el presente estudio de la siguiente manera: aumentando el número de muestra, aumentando el tiempo de reclutamiento de casos y controles; estandarizar el tiempo en el que se toma la muestra respecto al tiempo en que la paciente haya sido diagnosticada; estandarizar la hora a la que se toma la muestra ya que pudiera afectar si se toma por la mañana o por la tarde por la diferente composición de la saliva a distintas horas; estratificar el grupo de pacientes a reclutar en pacientes con distintos subtipos de cáncer de mama, con invasión o sin invasión a nódulos linfáticos, menopáusicas y pre-menopáusicas, por estadio tumoral, por grupos de edad y por grupos de pacientes recibiendo quimioterapia y las que no reciben quimioterapia; y llevar a cabo la extracción de microRNAs con kits específicos para saliva para mejorar el rendimiento de la extracción.

X. LITERATURA CITADA

- Abba, M.C., Lacunza, E., Butti, M. y Aldaz, C.M. 2010. Breast Cancer Biomarker Discovery in the Functional Genomic Age: A Systematic Review of 42 Gene Expression Signatures. *Journal of Biomarker Insights* 5: 103–118.
- Agha-Hosseini F., Mirzaii-Dizgah, I., Rahimi, A. 2009. Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 14(10): 521-524.
- Álvarez, R.H. 2010. Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. *Breast Cancer Research* 12(2): 1-18.
- Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X.Q. y Stroun, M. 1999. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer and Metastasis Reviews* 18(1): 65-73.
- Asaga, S., Kuo, C., Nguyen, T., Terpenning, M., Giuliano, A.E. y Hoon, D.S. 2010. Direct Serum Assay for *microRNA-21* Concentrations in Early and Advanced Breast Cancer. *Clinical Chemistry* 57: 84-89.
- Asirvathama, A.J., Gregoriea, C.J., Hub, Z., Magnera, W.J. y Tomasi, T.B. 2008. MicroRNA Targets in Immune Genes and the Dicer/Argonaute and ARE Machinery Components. *Molecular Immunology* 45(7): 1995–2006.
- Ayatollahi, H., Mahboub, M. R. D., Mohammadian, N., Parizadeh, M. R., Kianoosh, T., Khoob, M. K. y Kamalian, F. 2007. Ratios of Free to Total Prostate-Specific Antigen and Total Prostate-Specific Antigen to Protein Concentrations in Saliva and Serum of Healthy Men. *Urology Journal* 4(4): 238-241.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116: 281–297.
- Beilharz, T.H., Humphreys, D., Clancy, J.L., Thermann, R., Marti, D.I.K., Hentze, M.W. y Preiss, T. 2009. MicroRNA-Mediated Messenger RNA Deadenylation Contributes to Translational Repression in Mammalian Cells. *Public Library of Science* 4(8): 6783- 6783.
- Blenkiron, C., Goldstein, L.D., Thorne, N.P., Spiteri, I., Chin, S.F., Dunning, M.J., Barbosa-Morais, N.L., Teschendorff, A.E., Green, A.R., Ellis, I.O., Tavaré, S., Caldas, C. y Miska, E.A. 2007. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biology* 8(10): R214.
- Boyd, S.D. 2008. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory Investigation* 88: 569–578.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. y Cohen, S.M. 2003. *Bantam* encodes Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113: 25-36.
- Brooks, M.N., Wang, J., Li, Y., Zhang, R., Elashoff, D., Wong, D.T. 2008. Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients. *Molecular Medicine Reports* 1(3): 375–378.
- Bryant, S. y Manning, D.L. 1998. Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. *Methods in Molecular Biology* 86: 69-72.

- Buchan, J.R. y Parker, R. 2008. The Two Faces of miRNA. *Science* 318(5858): 1877-1888.
- Caetano-Anollés, G. y Gresshoff, P.M. 1994. Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. *Promega Notes Magazine* 45: 13-21.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. y Croce, C.M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(24): 15524-15529.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. y Croce, C.M. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(9): 2999-3004.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J. y Zhang, C.Y. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18: 997-1006.
- Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P. 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Research* 33: 1290-1297.
- Chuang, J.C. y Jones, P.A. 2007. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research* 61(5): 24R-29R.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T.J., Negrini, M. y Croce, C.M. 2005. *MiR-15* and *miR-16* induce apoptosis by targeting *BCL2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(39): 13944-13949.
- Cork, D.M.W., Lennard, T.W.J. y Tyson-Capper, A.J. 2008. Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Research* 10(3): 207.
- Croce, C.M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature* 10: 704-714.
- Davis, B.N. y Hata, A. 2009. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling* 7:18.
- Diario Oficial de la Federación, 1983.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M. y Lichter, P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 343(26): 1910-1916.
- Drakaki, A. e Iliopoulos, D. 2009. MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis. *Current Genomics* 10: 35-41.
- Esquela-Kerscher, A. y Slack, F.J. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6(4): 259-269.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M. y Izaurralde, E. 2009. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA Journal* 15(1):21-32.

- Filipowicz, W., Bhattacharya, S.N. y Sonenberg, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature* 9: 102-114.
- Fitzgibbons P.L., Page D.L., Weaver D., Thor, A.D., Allred, C., Clark, G.M., Ruby, S.G., O'Malley, F., Simpson, J.F., Connolly, J.L., Hayes, D.F., Edge, S.B., Lichter, A. y Schnitt, S.J. 1999. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists. Consensus Statement *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 124: 966-78.
- Franco-Marina, F., Lazcano-Ponce, E., López-Carrillo, E. 2009. Breast cancer mortality in Mexico. An age-period-cohort analysis. *Salud Pública México* 51(2): 157-164.
- Gao, K., Zhou, H., Zhang, L., Lee, J.W., Zhou, Q., Hu, S., Wolinsky, L.E., Farrell, J., Eibl, G. y Wong, D.T. 2009. Systemic Disease-Induced Salivary Biomarker Profiles in Mouse Models of Melanoma and Non-Small Cell Lung Cancer. *Public Library of Science* 4(6): 5875.
- Gava, R.R., Corte, M.G., Vizoso, F., Rodríguez, J.C., Vázquez, J., Lamelas, M.L. 2002. Importancia de la edad como factor pronóstico determinante de la variabilidad de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama. *Medifam [revista en la Internet]* 12(6): 29-40.
- Gibbs, W.W. 2004. The roots of cancer. *Scientific American Magazine Online* 3-10.
- Gregory, R.I. y Shiekhattar, R. 2005. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Research* 65(9): 3509-3512.
- Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Heneghan, H.M., Miller, N., Kelly, R., Newell, J. y Kerin, M.J. 2010a. Systemic *miRNA-195* Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease. *Cancer Diagnostics and Molecular Pathology Oncologist* 15(7): 673-682.
- Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., Kerin, M.J. 2009. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *Journal of Oncology*.
- Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., Newell, J., Kerin, M.J. 2010b. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of Surgery* 251(3): 499-505.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J. Song, Y., Schu, C.G., Fehr, C., Junemann, C. y Niepman, M. 2008. *microRNA-122* stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *European Molecular Biology Organization Journal* 27: 3300-3310.
- Herbert, B.S. 2003. Advances in breast cancer therapy and chemoprevention: current strategies and new approaches. *Cancer Therapy* 1: 363-371.
- Huppi, K., Volfovsky N., Mackiewicz, M., Runfola, T., Jones, T.L., Martin, S.E., Stephens, R. y Caplen, N.J. 2007. MicroRNAs and Genomic Instability. *Seminars in Cancer Biology* 17(1): 65-73.
- Iguchi, H., Kosaka, N. y Ochiya, T. 2010. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Communicative e Integrative Biology* 3(5): 478-481.
- Instituto Nacional de Cáncer, 2009. <http://www.cancer.gov>.
- Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Riccardo, S., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J.P., Rosenbert, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M. y Croce, C.M. 2005. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 65(16): 7065-7070.

- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., Kweil, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F. Minna, J.D. y Pollack, J.R. 2009. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *Public Library of Science* 4(7): 6146.
- Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A.K., Janssen, J.W.G. y Altevogt, P. 2011. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *Journal of Translational Medicine* 9: 86.
- Kent, O.A. y Mendell, J.T. 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 25: 6188–6196.
- Kong, W., He, L., Coppola, M., Guo, J., Esposito, N.N., Coppola, D. y Cheng, J.Q. 2010. *MicroRNA-155* Regulates Cell Survival, Growth and Chemosensitivity by Targeting *FOXO3a* in Breast Cancer. *The Journal of Biological Chemistry Papers* 285: 17869–17879.
- Laird, P. W. 2005. Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics* 14(1): R65–R76.
- Lawrence, H.P. 2002. Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health. *Journal of the Canadian Dental Association* 68(3): 170-174.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., Hatton, C.S., Harris, A.L. 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology* 141(5): 672-675.
- Lee, J.M., Garon, E., Wong, D.T. 2009. Salivary diagnostics. *Orthodontics and Craniofacial Research* 12(3): 206-211.
- Li, D., Zhao, Y., Chen, X., Qi, Y., Jiang, Y., Zou, C., Zhang, X., Liu, S., Wang, X., Zhao, D., Sun, Q., Zeng, Z., Dress, A., Lin, M.C., Kung, H.F., Rui, H., Liu, L.Z., Mao, F., Jiang, B.H. y Lai, L. 2011. Analysis of *Mir-195* and *Mir-497* expression, regulation and role in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 17(7): 1722-1730.
- Li, L.C., Okino, S.T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R.F., Urakami, S., Enokida, H. y Dahiya, R. 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(46): 17337–17342.
- Li, X., Sanda, T., Look, T., Novina, C.D., Boehmer, V. 2011. Repression of tumor suppressor *miR-451* is essential for *NOTCH1*-induced oncogenesis in T-ALL. *The Journal of Experimental Medicine* 32(3): 583-588.
- Li, Y., St. John, M.A.R., Zhou, X., et al. 2004. Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research* 10: 8442–8450.
- Liu, L., Chen, L., Xu, Y., Li, R. y Du, X. 2010. *microRNA-195* promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400(2): 236-40.
- Liu, Z., Sall, A. y Yang, D. 2008. MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool. *International journal of molecular sciences* 9: 978-999.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lodes, M.J., Caraballo, M., Suci, D., Munro, S., Kumar, A. y Anderson, B. 2009. Detection of Cancer with Serum miRNAs on an Oligonucleotide Microarray. *Public Library of Science* 4(7): e6229.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L. y Darnell, J. 2009. *Biología Celular y Molecular*. 5ta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina 935-943.
- Lotterman, C.D., Kent, O.A. y Mendell, J.T. 2008. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle* 7(16): 2493–2499.
- Lowery, A.J., Miller, N., Devaney, A., McNeill, R.E., Davoren, P.A., Lemetre, C., Benes, V., Schmidt, S., Blake, J., Ball, G. y Kerin, M.J. 2009. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Research* 11(3): R27.
- Lozano-Ascencio, R., Gómez-Dantés, H., Lewis, S., Torres-Sánchez, L., López-Carrillo, L. 2009. Tendencias del cáncer de mama en América Latina y El Caribe. *Salud Pública México* 51(2): 147-156.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, R. y Golub, T.R. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(9): 834-838.
- MacFarlane, L.A. y Murphy, P.R. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics* 11: 537-561.
- Manikandan, J., Aarthi, J.J., Kumar, S.D. y Pushpara, P.N. 2008. Oncomirs: The potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformatics* 2(8): 330-334.
- Marie-Knaul, F., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., Frenk, J. 2009. Cáncer de Mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública México* 51(2): 335-344.
- Márquez, R.T. y McCaffrey, A.P. 2008. Advances in MicroRNAs: Implications for Gene Therapists. *Human Gene Therapy* 19(1): 27–38.
- Martínez-Cedillo, J. 2004. Marcadores tumorales séricos. Aplicación clínica. *Gaceta Mexicana de Oncología* 3(3): 76-80.
- Mendel, J.T. 2005. Critical Regulators of Development, Cellular Physiology and Malignancy. *Cell Cycle* 4(9): 1179-1184.
- Mendenhall, W., Beaver, R.J. y Beaver, B.M. 2008. *Introducción a la probabilidad y estadística*. 12a edición México, D. F. 387, 629-660.
- Michael, A., Bajracharya, S.D., Yuen, P.S.T., Zhou, H., Star, R.A., Illei, G.G. y Alevizos, I. 2009. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases* 16(1): 34 – 38.
- Michael, M.Z., O' Connor, S.M., Van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., y James, R.J. 2003. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Molecular Cancer Research* 1: 882-891.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.Q., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.Q., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Jennifer Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Linl, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B. y Tewari, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(30): 10513–10518.
- Ng, E.K.O., Chong, W.W.S., Jin, H., Lam, E.K.Y., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C.W., Ng, S.S.M. y Sung, J.J.Y. 2009b. Differential expression of microRNAs in plasma of

- patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *International Journal of Gastroenterology and Hepatology* 58: 1375-1381.
- Ng, E.K.O., Wong, C.L.P., Ma, E.S.K., Kwong, A. 2009a. MicroRNAs as New Players for Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets in Breast Cancer. *Journal of Oncology* 1-6.
- Orom, U.A., Nielsen, F.C., y Lund, A.H. 2008. *MicroRNA-10a* Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular Cell* 30: 460-471.
- Park, N.J., Li, Y., Yu, T., Brinkman, B.M.N. y Wong, D.T. 2006. Characterization of RNA in Saliva. *Clinical Chemistry* 52(6): 988-994.
- Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E., Abemayor, E. y Wong, D.T. 2009. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research* 15(17): 5473-5477.
- Pérez-Sánchez, V.M., Vela-Chávez, T.A. y Mora-Tiscareño, A. 2008. Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria. *Cancerología* 3: 7-17.
- Perou, C.M., Surlie, T., Eisen, M.B., Van de Rin, M., Jeffreyk, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. y Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.
- Pink, R., Simeka, J., Vondrakovab, J., Faberb, E., Michla, P., Pazderaa, J. y Indrak, K. 2009. Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical Papers of Medicine Faculty University Palacky Olomouc Czech Republic* 153(2): 103-110.
- Pinzani, P., Salvianti, F., Pazzagli, M. y Orlando, C. 2010. Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. *Methods* 50: 302-307.
- Place, R.F., Li, L.C., Pookot, D., Noonan, E.J. y Dahiya, R. 2008. *MicroRNA-373* induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(5): 1608-1613.
- Puerta, C.J. y Ureña, C.P. 2005. *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia 22-23.
- Pusztai, L. 2008. Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. *The Oncologist* 13: 350-360.
- Qi, L., Bart, J., Tan, L.P., Platteel, I., Sluis, T., Huitema, S., Harms, G., Fu, L., Hollema, H. y van den Berg, A. 2009. Expression of *miR-21* and its targets (*PTEN*, *PDCD4*, *TMI*) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma *in situ* and invasive carcinoma. *BioMed Central Cancer* 9: 163.
- Rana, T.M. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 23-36.
- Rantonen, P. 2003. Salivary flow and composition in healthy and diseased adults. Institute of Dentistry, University of Helsinki, Department of Oral and Maxillofacial Diseases.
- Raza-Naqvi, A., Islam, N., Choudhury, N.R. y Rizwanul, Q.M. 2009. The Fascinating World of RNA Interference. *International Journal of Biological Sciences* 5(2): 97-117.

- Rodenhiser, D.I., Andrews, J.D., Vandenberg, T.A. y Chambers, A.F. 2010. Gene signatures of breast cancer progression and metastasis. *Breast Cancer Research* 13: 201.
- Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., Lebanony, D., Goren, Y., Silberschein, E., Targan, N., Ben-Ari, A., Gilad, S., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Feinmesser, M., Kharenko, Nativ, O., Nass, D., Perelman, M., Yosepovich, A., Shalmon, B., Polak-Charcon, S., Fridman, E., Avniel, A., Bentwich, I., Bentwich, Z., Cohen, D., Chajut, A. y Barchack, I. 2008. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature Biotechnology* 26: 462-469.
- Roth, C., Rack, B., Muller, V., Janni, W., Pantel, K. y Schwarzenbach, H. 2010. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 12: R90.
- Rouhi, A., Mager, D.L., Humphries, K. y Kuchenbauer, F. 2008. MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mammalian Genome* 19:517-525.
- Ruiz-Reyes, G. 2004. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. 287-290pp.
- Ryan, B.M., Robles, A.I. y Harris, C.C. 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Review Cancer* 10(6): 389-402.
- Sassen S., Miska, E.A. y Caldas, C. 2008. MicroRNA: Implications for cancer. *Virchows Archive Journal* 452: 1-10.
- Schmittgen, T.D. y Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3(6): 1101-1108.
- Segal, A. y Wong D.T. 2008. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *European Journal of Dental Education* 12(1): 22-29.
- Shenouda, S.K. y Alahari, S.K. 2009. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and Metastasis Reviews* 28: 369-378.
- Shomron, N. y Levy, C. 2009. MicroRNA-Biogenesis and Pre-mRNA Splicing Crosstalk. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1-6.
- Siomi, H. y Siomi, M.C. 2010. Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Molecular Cell* 38: 323-332.
- Sistema Nacional de Información en Salud, 2008. <http://sinais.salud.gob.mx/>
- Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B.J. y Van Den Berg, A. 2010. MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing. *RNA* 16: 1087-1095.
- Song, F.J. y Chen, K.X. 2011. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer. *Chinese Journal of Cancer* 30(6): 381-391.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L. y Botstein, D. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(14): 8418-8423.
- Sotiriou, C. y Puztai, L. 2009. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 360(8): 790-800.
- Stefani, G. y Slack, F.J. 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 219-230.
- Strachan, T. y Read, A.P. 2006. *Genética Humana*. 3ra edición. McGraw Hill. México. 294-296, 490-492pp.

- Streckfus, C. y Bigler, L. 2005. The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Advances in Dental Research* 18: 17-24.
- Streckfus, C., Bigler, L., Tucci, M. y Thigpen, J.T. 2000. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Investigation Journal* 18(2): 101-109.
- Streckfus, C.F., Mayorga-Wark, O., Arreola, D., Edwards, C., Bigler, L. y Dubinsky, W.P. 2008. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Investigation* 26(2): 159 – 167.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. y Beljanski, M. 1989. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46(5): 318-322.
- Sudbery, P. 2004. *Genética Molecular Humana*. Prentice Hall. 2da edición. España. 168-170pp.
- Sugimoto, M., Wong, D.T., Hirayama, A., Soga, T. y Tomita, M. 2010. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 6:78–95.
- Swarup, V. y Rajeswari, M.R. 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters* 581: 795–799.
- Tafreshi, N.K., Kumar, V., Morse, D.L., y Gatenby, R.A. 2010. Molecular and Functional Imaging of Breast Cancer. *Cancer Control* 17(3): 143-155.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. y Takahashi, T. 2004. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research* 64: 3753–3756.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. y Lotvall, J.O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9(6): 654-659.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J. y Parker, R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development* 20: 515-524.
- Valeri, N., Vannini, I., Fanini, R., Calore, F., Adair, B., y Fabbri, M. 2009. Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mammalian Genome* 20: 573–580.
- Vasudevan, S., Tong, Y. y Steitz, J.A. 2007. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* 318(5858): 1931-1934.
- Vecchione, A. y Croce, C.M. 2010. Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill. *Endocrine-Related Cancer* 17: F37–F50.
- Wang, W.X., Nelson, P.T. y Tang, G. 2008. RNA Interference, Mechanisms and Proteins Involved in. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* 1-10.
- Wang, Y., Stricker, H.M., Gou, D. y Liu, L. 2007. MicroRNA: past and present. *Frontiers in Bioscience* 12: 2316-2329.
- Wang, Z. 2010. MicroRNA: A matter of life or death. *World Journal of Biological Chemistry* 1(4): 41-54.
- Wickramasinghe, N.S., Manavalan, T.T., Dougherty, S.M., Riggs, K.A., Li, Y. y Klinge, C.M. 2009. Estradiol downregulates *mir-21* expression and increases *mir-21* target

- gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Research* 37(8): 2584–2595.
- Wu, Z.Z., Wang, J.G. y Zhang, X.L. 2009. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 15(7): 865-870.
- Yamada, N., Yuji, R. y Suzuki, E. 2009. The Current Status and Future Prospects of the Salivary Proteome. *Journal of Health Science* 55(5): 682-688.
- Yaman-Agaoglu, F., Kovancilar, M., Dizdar, Y., Darendeliler, E., Holdenrieder, S., Dalay, N. y Gezer, U. 2011. Investigation of *miR-21*, *miR-141*, and *miR-221* in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumor Biology* 32(3): 583-588.
- Yan, L.X., Huang, X.F., Shao, Q., Huang, M.Y., Deng, L., Wu, Q.L., Zeng, Y.X y Shao, J.Y. 2008. MicroRNA *mir-21* overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14: 2348–2360.
- Yang, N., Coukos, G. y Zhang, L. 2008. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: One step forward in diagnosis and treatment. *International Journal of Cancer*: 122: 963–968.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O'brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L. y Coukos, G. 2006. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(24): 9136–9141.
- Zhang, Y., Jia, Y., Zheng, R., Guo, Y., Wang, Y., Guo, H., Fei, M. y Sun, S. 2010. Plasma *MicroRNA-122* as a Biomarker for Viral-, Alcohol-, and Chemical-Related Hepatic Diseases. *Clinical Chemistry* 56(12): 1830-1838.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S. y Mo, Y.Y. 2008. *MicroRNA-21* targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Research* 18: 350-359.
- Zhu, W., Qin, W., Atasoy, U. y Sauter, E.R. 2009. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BioMed Central* 2:89.
- Zomer, A., Vendrig, T., Hopmans, E.S., van Eijndhoven, M., Middeldorp, J.M. y Pegtel, D.M. 2010. Exosomes Fit to deliver small RNA. *Communicative & Integrative Biology* 3(5): 447-450.

ANEXO 1

Journal: **BMC Research Notes**
Manuscript ID: 1860153413727570
Submitted: 8 May 2012
Peer review status: Under review

Expression of miRNA in saliva of women with breast cancer and healthy subjects

Vega-Mendoza, Daniela¹; Gutiérrez-Millán, Luis Enrique*¹; Hernández-López, Jorge²; Arámburo-Rubio, Ma. Isabel³; Burboa-Zazueta, María Guadalupe¹; Valdez-Covarrubias, Miguel Ángel⁴

Address: ¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Hermosillo, Son., México, ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Hermosillo, Son., México, ³Instituto Mexicano del Seguro Social, Hermosillo, Son., México, ⁴Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora.

Email: Vega-Mendoza, Daniela – dvega86@hotmail.com; Gutiérrez-Millán, Luis Enrique- legtz@guaymas.uson.mx; Hernández-López, Jorge- jhlopez04@cibnor.mx; Arámburo-Rubio, Ma. Isabel- isabelaramb@hotmail.com; Burboa-Zazueta, María Guadalupe- mburboa@correom.uson.mx; Valdez-Covarrubias, Miguel Ángel- miguel.valdez@correo.fisica.uson.mx.

* Corresponding author

Abstract

Background: It has been demonstrated that blood circulated microRNAs (abbreviated miRNAs) can function as markers for breast cancer. However, due to the fact that saliva is a filtrate from blood circulation and miRNAs should be present in this fluid; our hypothesis was that there is a differential expression of miRNAs from the saliva of patients with breast cancer in comparison with healthy subjects and this expression correlates with the clinicopathologic features from the disease.

Findings: Expression of miRNAs 195, 21 and 155 was measured in saliva from patients with breast cancer through the technique of real time PCR. There was a differential expression in mir-195, that was down-regulated in the group of patients with breast cancer, in comparison to the control group ($p = 0.02$); mir-21 ($p = 0.32$) and mir-155 ($p = 0.95$) expression was similar in both group of patients. In addition, there was found that the expression of those miRNAs was associated with the invasion of the lymph nodes (mir-195, $p = 0.020$), menopause age (mir-21, $p = 0.0117$) and with the age at the moment of diagnose (mir-155, $p = 0.0371$).

Conclusion: mir-195 showed a differential expression between the group of patients with breast cancer and the control group, and this could be used as a marker for diagnose of this disease; we suggest that these finding should be tested in a greater number of cases. On the

other hand, the three miRNAs studied in this project have the potential to work as new prognostic markers for human breast cancer, because they showed a direct correlation with the clinicopathologic features from the disease.

Background and research hypothesis

miRNAs are a large family of small noncoding RNAs involved in post-transcriptional gene silencing, which have been found in a variety of organisms [1]. It has been observed that miRNAs exhibit aberrant expression in breast tumor tissue compared to non-cancerous tissue [2]. It has also been found that its expression correlates with molecular subtypes of breast cancer, the presence of estrogen and progesterone receptors (ER and PR), with tumor stage, vascular invasion and tumor proliferation index [3-4]. The studies have been done in tissue and in serum of patients with breast cancer, where they were altered and correlate with clinicopathological features [6-7]. Another fluid that has been studied for miRNAs is saliva, which can be obtained non-invasively, has called a strongly attention as a biomarker for diagnosis of various diseases. Recently, it was reported the isolation of miRNAs in saliva and its testing by real-time PCR expression of healthy controls and patients with oral cancer [8]. Saliva is a filtrate of blood circulation and contains a wide range of proteins, nucleic acids, electrolytes and hormones originated from multiple body sites. It has been demonstrated the detection of proteins associated with breast cancer in saliva, that prove the detection of soluble fragment of HER-2 and CA15-3 in saliva of patients with breast cancer and its expression has been differential when compared with control groups [9-10]. With the above, it's shown that there is evidence of the possible detection of specific biomarkers for breast cancer in saliva. Because saliva is a filtrate of the blood circulation as it has proven the existence of specific miRNAs in blood breast cancer, we propose that miRNAs can be measured in saliva of patients with breast cancer and its expression correlates with clinicopathologic features, so that miRNAs 21, 155 and 195 were studied, which have shown to be altered in expression in serum and breast cancer tissue [7, 11-12].

Methods

Research subjects

A total of 19 women were recruited, diagnosed with primary breast cancer stage I (4 cases), II (7 cases) and III (8 cases) and a total of 19 healthy women free of breast lesions that had been practiced a recent normal mammogram within 6 months prior to recruitment, with a BIRADS 1 and 2, indicating benign mammographic findings, ie, a normal mammogram, Regional General Hospital No. 2 and Gyneco-Pediatry Hospital from the Mexican Institute of Social Security in Hermosillo, Sonora, Mexico. Our study was previously approved by the Medical School Institutional Review Board (IRB) at University of Sonora , as well as the IRB's Regional Hospital No. 2 in Hermosillo Sonora IMSS. From all the patients included in the study were obtained written informed consent where they consented to donate a sample of saliva and authorized us to view their medical record.

Saliva collection

There were obtained 2-5 mL of saliva without stimulation, indicating to the patient to not eat any food or beverages at least an hour before the sampling. The sample was centrifuged at 2,600 g for 15 minutes at 4 °C, the supernatant was separated from which RNA was extracted immediately.

RNA isolation

Extraction of total RNA was carried out from 400 µl of supernatant of saliva using the method of Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. To determine the concentration of total RNA it was measured by absorbance at 260nm in a spectrophotometer NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). For determining the integrity of the RNA obtained, polyacrylamide gels were run at 13% stained with silver nitrate solution at 0.1%.

Reverse transcription (RT) and Quantitative PCR (qPCR)

To carry out the cDNA synthesis we used the kit NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) in 20 µl reactions in a thermal cycler (Eppendorf). For amplification of the genes under study was used Platinum SYBR Green qPCR system SuperMix-UDG (Invitrogen) and the IQ system master mix (Biorad) and the reactions were carried out in 25 µl. The genes were run on a real-time thermal cycler (Corbett Rotor-Gene) and was conducted under the following conditions: 2 minutes at 50 ° C, 2 minutes at 95 ° C and 40 cycles of 15 seconds to 95 ° C and 30 seconds at a temperature of alignment according to the primer (mir-21 and mir-195 at 60 ° C and mir-155 at 57 ° C). With each run there was carried out a dissociation curve to verify the amplification products. Relative expression level was measured using the RNU1A constitutive gene under the same conditions that the genes from the study were measured. The determination of the expression level was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method [13]. For each of the genes tested in the study we had a C_t value provided by the computer software. The expression of each gene was normalized using the housekeeping gene C_t from the RNU1A constitutive gene. For obtaining the ΔC_t values there was subtracted the internal control C_t (housekeeping gene) to the target gene C_t (problem or interest). For the obtaining of $\Delta\Delta C_t$ it was used the control group as normalizer.

Statistical Analysis

For comparisons between the control group and the cases group, nonparametric Mann-Whitney U test was performed because the data did not meet the assumption of normality. To evaluate the correlation between clinicopathologic variables and expression of genes under study, we used the Fisher test. The statistically significance was considered at p less than 0.05. Analyses were performed in the statistical software NCSS (2007).

Results and Discussion

Clinicopathologic features of patients

The cases and the control groups showed no statistically significant differences in mean age ($p = 0.1039$) and age at menopause ($p = 0.4554$). The average age for the group of patients with breast cancer was 52.7 ± 11.94 years (mean \pm standard deviation), while for the control group was 54.9 ± 5.52 years. The 68.42% of the patients in the cases were in menopausal status and the average age at menopause was 47.5 ± 3.92 years. In the control group 94.7% of patients were in menopausal status and the average age at menopause was 43 ± 8.16 years.

RNA extraction

The amount of total RNA extracted of supernatant was 98.8 ± 39.72 ng/ μ L for case group, while for the control group was 71.5 ± 54.09 ng/ μ L. We found a statistically significant difference ($p = 0.0165$) between RNA concentrations between groups, resulting in a higher concentration of RNA in the case group. It has been reported in previous studies elevated levels of circulating nucleic acids (DNA/RNA) in blood of patients compared to healthy controls in different types of cancers [14-15], which coincides with the findings in our study. Several hypotheses have been proposed to explain the high concentrations of nucleic acids in circulation, one of them tells us they are released from cells from the tumor undergoing necrosis or apoptosis, and another suggests that there is a constant release of nucleic acids from cancer cells into the bloodstream as a new form of cell communication [16].

Analysis of expression of miRNAs

In our study, it was possible to measure the expression of miRNAs 21, 155 and 195, using real-time PCR. We found a statistically significant difference in the expression of mir-195 ($p = 0.02$) between breast cancer group and the control group, being down-regulated in the first group. However, we were not able to detect significant differences in the expression of mir-21 ($p = 0.32$) and mir-155 ($p = 0.95$) (Table 1, Figure 1).

MiRNA	Expression change index ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	p
Mir-21	0.762294832	0.32
Mir-155	0.703503741	0.95
Mir-195	0.703503741	0.02*

Table 1. Expression change index from the control and the cases group. * $p < 0.05$. Mann-Whitney U test for the comparison of medians, considered statistically significant at $p < 0.05$.

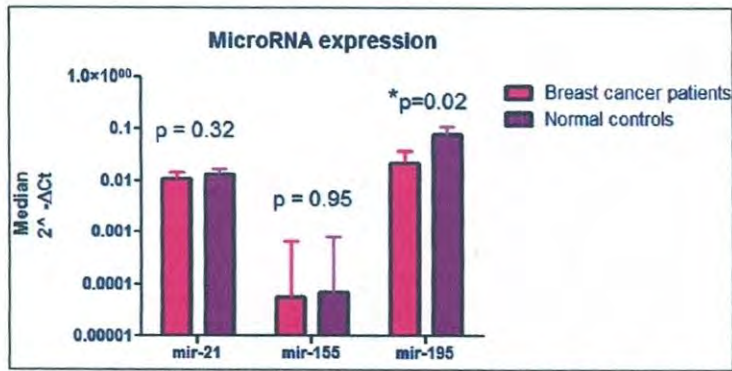


Figure 1. Expression of the three genes from the study in the control and the cases group. It includes the median and the standard error. *p<0.05 statistically significant

There are controversial studies about the expression of mir-195 in breast cancer. It has been reported low expression of miR-195 in tissue and breast cancer cells [17], which agrees with the findings in our study. However, another study reported increased levels of miR-195 in serum of patients with breast cancer compared to a control group [18]. About what we would expect was for saliva, for being a serum filtrate, we'll find this gene with an increased expression; nevertheless, in our study we had an inverse behavior. Several factors have affected our results, including the lack of stratification of the patients, since in our group we had patients who had been operated (11) and the rest haven't had the extraction of the tumor yet (8), and there have been reported changes in expression after tumor resection [19]. With most of the patients have been operated we may think that mir-195 levels were low and therefore we failed to detect overexpression in the cancer group.

Mir-21 gene was reported to be highly expressed in serum of patients with breast cancer when compared with healthy controls [7], as mir-155 [12]. However, in our study there wasn't able to detect differences between groups, perhaps due to small sample size, since these studies were done in large samples.

Association with clinicopathologic features

Association analyzes were performed between the expression of individual miRNAs in the study and the clinicopathologic variables: tumor stage, lymph nodes metastasis, age at menopause and age at diagnosis, by Mann Whitney U test and Fisher (Table 2).

	Tumoral stage	Lymph node metastasis	Age at menopause	Age at diagnosis
Mir-21	1.00	0.656	0.0117*	0.3908
Mir-155	0.170	0.179	0.9379	0.0371*
Mir-195	0.181	0.020*	0.6141	0.4375

Table 2. Association of the miRNAs expression from saliva with the clinical-pathological features (p values). *p<0.05 statistically significant. For the tumoral stage and lymph node metastasis it was used the Fisher test, and for age at menopause and age at diagnosis, it was used Mann-Whitney U test, for the comparison of the groups with the biggest and lowest gene expression in the study.

We found increased expression of mir-21 gene in patients with lower age at menopause ($p = 0.0117$). It has been reported that estradiol, the most important estrogen in the body that decreases at menopause, inhibits the expression of mir-21 in cell lines of breast cancer [20]. The findings of our study may be because these patients were exposed to estradiol less time than those patients with older age at menopause, increasing the level of expression of mir-21, since it is inhibited by this hormone.

We found that expression of mir-155 is greater in those patients who were older at the time of being diagnosed with breast cancer ($p = 0.0371$). It has been suggested that age is a factor that may indirectly influence the prognosis of breast cancer, that is, through other factors that influence survival, such as the condition of nodes and hormone receptor status. It has been suggested by several investigations that in older patients there are less aggressive tumors and therefore with a more favorable prognosis regardless of the extent of the disease [21]. We could suggest that high expression of miR-155 is associated with less aggressive tumors as occurs in patients diagnosed at older age.

It was observed that patients with low expression of miR-195 presented positivity in lymph nodes and those with high expression had invasion-free nodules ($p = 0.020$). The status of lymph nodes has repeatedly been proven to be the most important prognostic factor for disease-free survival and overall survival in breast cancer. Only 20 to 30% of node negative patients develop recurrence within 10 years, compared with about 70% in patients with axillaries node invasion [22]. The association between miR-195 and node status suggests that this gene could be a potential prognostic marker for breast cancer if studied in more cases. There were no statistically significant associations between the expression of miRNAs and tumor stage (mir-21, $p = 1.00$, mir-195, $p = 0.181$, mir-155, $p = 0.170$).

Conclusion

It was possible to detect miRNAs in saliva of both breast cancer patients and healthy controls, and the testing of expression by real time PCR. We found statistically significant differential expression for miR-195. Associations were found between the expression of miRNAs studied and clinicopathologic features such as lymph node status, age at diagnosis and age at menopause, making them potential biomarkers for breast cancer in saliva if they are studied in more cases.

Abbreviations

mi-, mRNA-: micro-, messenger- ribonucleic acid; ER (estrogen receptor); PR (progesterone receptor); PCR (polymerase chain reaction); HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2); CA15-3 (cancer antigen 15-3).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

The work presented here was carried out in collaboration between all authors. VMD and GMLE designed methods and experiments. VMD carried out the laboratory experiments, analyzed the data, interpreted the results and wrote the paper. HLJ provided scientific and technical insight. ARMI, BZMG and VCMA provided scientific insight and reviewed the manuscript. All authors have contributed to, seen and approved the manuscript.

References

1. Liu Z, Sall A, Yang D: **MiRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool.** *Int. J. Mol. Sci.* 2008, **9**: 978-999.
2. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Riccardo S, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Campigliio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenbert A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM: **MiRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**(16): 7065-7070.
3. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al.: **MiRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer.** *Breast Cancer Research* 2009, **11**(3): R27.
4. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, et al.: **MiRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype.** *Genome Biology* 2007, **8** (10): 214.
5. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al.: **MiRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer.** *Breast Cancer Research* 2009, **11**(3): R27.
6. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ: **Circulating miRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer.** *Annals of Surgery* 2010, **251**(3):499-505.
7. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DS: **Direct Serum Assay for miRNA-21 Concentrations in Early and Advanced Breast Cancer.** *Clin Chem* 2010, **57**: 84-9.
8. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Abemayor E, Wong DT: **Salivary miRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(17): 5473-5477.
9. Streckfus C, Bigler L: **The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study.** *Advances in Dental Research* 2005, **18**:17-24.
10. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Rahimi A: **Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer.** *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2009, **14** (10): 521-4.
11. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ: **MiRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer.** *Journal of Oncology* 2010, ID. 950201.
12. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H: **Circulating miRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer.** *Breast Cancer Research* 2010, **12**:R90.
13. Schmittgen TD, Livak KJ: 2008. **Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method.** *Nature Protocols* 2008, **3** (6): 1101-1108.

14. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M: **Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients.** *Cancer and Metastasis Reviews* 1999, **18**(1):65-73.
15. Swarup V, Rajeswari MR: **Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases.** *FEBS Letters* 2007, **581**: 795–799.
16. Pinzani P, Salvianti F, Pazzagli M, Orlando C: **Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy.** *Methods* 2010, **50**: 302–307.
17. Li D, Zhao Y, Chen X, Qi Y, Jiang Y, Zou C, Zhang X, Liu S, Wang X, Zhao D, Sun Q, Zeng Z, Dress A, Lin MC, Kung HF, Rui H, Liu LZ, Mao F, Jiang BH, Lai L: **Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer.** *Clinical Cancer Research* 2011, **17** (7): 1722-30.
18. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ: **Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease.** *Cancer Diagnostics and Molecular Pathology Oncologist* 2010, **15**(7): 673-82.
19. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ: **Circulating miRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer.** *Annals of Surgery* 2010, **251**(3):499-505.
20. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM: **Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells.** *Nucleic Acids Research* 2009, **37**(8): 2584–2595.
21. Gava RR, Corte MG, Vizoso F, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML: **Importancia de la edad como factor pronóstico determinante de la variabilidad de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama.** *Medifam* 2002, **12**(6): 29-40.
22. Pérez-Sánchez VM, Vela-Chávez TA, Mora-Tiscareño A: **Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria.** *Cancerología* 2008, **3**: 7-17.