

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Efecto de la sobreexpresión de miR-145 más
miR-23b, en la proliferación, migración e
invasión de líneas celulares de cáncer ovárico
epitelial: bases para el desarrollo de una
nanoformulación**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magister en
Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y memoria para optar al
Título de Bioquímico por:**

ALLISON NICOLE FREDES GARRIDO

Directores de Tesis:

Dra. Maritza Garrido Palma

Dra. Carmen Romero Osses y Dra. Eyleen Araya Fuentes

Santiago-CHILE

Marzo 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Allison Nicole Fredes Garrido

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Maritza Garrido Palma

Dra. Carmen Romero Osses

Dra. Eyleen Araya Fuentes

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes

Dra. Jenny Fiedler

Dr. Héctor Contreras

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
FINANCIAMIENTO	12
DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Cáncer ovárico	18
1.2. Causas del cáncer ovárico	19
1.3. Detección y diagnóstico	21
1.4. Tratamiento del cáncer ovárico	23
1.5. microRNAs y su relación con proteínas tumorales	24
1.6. microRNAs y cáncer	26
1.7. miR-145 en COE	27
1.8. miR-23b en COE	29
1.9. Posibles efectos de miR-145 y miR-23b en células de COE	30
2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
3. METODOLOGÍA	33
3.1. Líneas celulares	33
3.2. Cultivo celular	33
3.3. Transfección transiente	34

3.4.	Extracción de miRs, RT-PCR y qPCR	34
3.5.	Inmunofluorescencia	36
3.6.	Conteo celular	37
3.7.	Migración	37
3.8.	Invasión	39
3.9.	Western blot	40
3.10.	Estadística	43
4.	RESULTADOS	44
4.1.	Resultados del Objetivo N°1	44
4.1.1.	Medición de los niveles de miR-145 y miR-23b post transfección con la mezcla de los miRs.	44
4.1.2.	Evaluación de la proliferación celular mediante inmunofluorescencia de Ki-67 y conteo celular post-transfección con miR-145 más miR-23b.	46
4.1.3.	Evaluación de la migración e invasión celular post-transfección con miR-145 más miR-23b.	51
4.2.	Resultados del Objetivo N°2	56
4.2.1.	Determinación de los niveles de c-MYC postransfección con miR-145 más miR-23b mediante Western blot en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90.	56
4.2.2.	Determinación de los niveles de ZEB1 post-transfección con miR-145 más miR-23b mediante Western blot en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90.	59

4.2.3. Determinación de los niveles de ABCB1 post-transfección con miR-145 más miR-23b mediante Western blot en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90.	66
4.3. Resumen de resultados	70
5. DISCUSIÓN	71
6. Conclusiones	81
7. Proyección	81
8. Actividades	82
8.1. Publicaciones durante el periodo de tesis	82
8.2. Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas	82
9. ANEXOS	83
9.1. Efecto de metotrexato y microRNAs asociados a nanopartículas de oro en la proliferación de líneas celulares de cáncer ovárico epitelial.	83
9.2 Introducción	83
9.2.1. Metotrexato	83
9.2.2. Metotrexato y miRs asociados a nanopartículas de oro	85
9.3. Resultados y discusión.	88
9.3.1. Determinación de la viabilidad de células A2780 posterior al tratamiento con AuNRs-GnRH y AuNRs-FSH.	88
9.3.2. Determinación de la viabilidad de células A2780 posterior al tratamiento con AuNPs-GnRH y AuNPs-FSH.	89

9.3.3. Determinación de la viabilidad de células A2780 posterior al tratamiento con AuNRs-PEG, AuNPs-PEG y GnRH.	91
9.3.4. IC50 de metrotexato en células A2780	93
9.4. Proyecciones de la sección anexa	94
10. BIBLIOGRAFÍA	95

AGRADECIMIENTOS

Primero quisiera agradecer a mis directoras de tesis por ser un cimiento importante para llevar a cabo esta tesis. Gracias por los consejos, apoyo y enseñanzas durante estos años.

A mi comisión de tesis, profesores que definieron y aportaron en mi desarrollo profesional durante los años de carrera.

A todo el personal del Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, por la preocupación, apoyo y cada enseñanza entregada.

A mis compañeros de laboratorio, Álvaro e Ignacio por el lindo equipo que formamos y ser los mejores compañeros que alguien podría tener. Gracias por cada risa, cada chocolate y palabra de ánimo entregada durante este periodo.

A los amiguitos que conocí durante la universidad Cami, Matías, Emilio y Coni, por todo lo reído y vivido, gracias por hacer más feliz mi estadía en esta ciudad y en la universidad.

Por último, quisiera agradecer y dedicar esta tesis a mi familia quiénes con paciencia, esfuerzo, mucho amor y comprensión me dieron la posibilidad de estudiar. Gracias, mamá y papá por el apoyo en los momentos difíciles y cada sabio consejo que me ayudó a llegar hasta aquí. Un especial agradecimiento y reconocimiento a mis abuelos por enseñarme el sentido del deber y la responsabilidad, nada hubiese sido posible sin ustedes.

ABREVIATURAS

3'-UTR: Región 3' no traducida (del inglés 3' untranslated region)

ABCB1: Transportador dependiente de ATP subfamilia B miembro (del inglés ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1)

ATCC: American Type Culture Collection

AuNPs: Nanoesferas de oro

AuNRs: Nanovarillas de oro

B: Basal (medio RPMI suplementado con SFB)

BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés Bovine Serum Albumin)

C: Medio de cultivo RPMI más reactivo de transfección

CA-125: Marcador tumoral antígeno de cáncer 125

CCK8: Cell Counting Kit-8

CDK6: Quinasa dependiente de ciclina 6

c-MYC: Factor de transcripción oncogénico de la familia básico hélice-lazo-hélice (bHLH)

CO: Cáncer ovárico

COE: Cáncer ovárico epitelial

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DGCR8: Subunidad compleja de microprocesador DGCR8 (del inglés DGCR8 microprocessor complex subunit)

DHFR: Dihidrofolato reductasa

ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures

FSH: Hormona folículo estimulante (del inglés Follicle-Stimulating Hormone)

GNP: Nanopartículas de oro (del inglés gold nanoparticles)

GNP-MTX: Metotrexato asociado a nanopartículas de oro

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina (del inglés Gonadotropin-releasing hormone)

HE4: Proteína epididimal humana 4

HRP: Enzima peroxidasa de rabanito picante

IC50: Mitad de la concentración inhibitoria máxima

kDa: kiloDalton

MDR1: Proteína de resistencia a múltiples fármacos 1

miR o miR: microRNA

miR-145: miRNA -145

miR-23b: miRNA-23b

Mix: miR-145 más miR-23b

mRNA: RNAs mensajeros

MTX: Metotrexato

NGF: Factor de crecimiento nervioso

PBS: Solución tampón de fosfato (del inglés Phosphate Buffer Solution)

PD-L1: Ligando 1 de muerte celular programada

PEG: Polietilenglicol

PEG-COO⁻: PEG carboxilo

PEG-OME: PEG-OMetilo

P-gp: Glicoproteína P

PI3K: Fosfoinositol-3-cinasa (del inglés phosphatidylinositol 3-kinase)

PM: Peso molecular

Pre-miRNA: miRNA precursor

Pri-miRNA: miRNA primario

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RIPA: Buffer de radioinmunoprecipitación (del inglés Radioimmunoprecipitation assay buffer)

RISC: Complejo de silenciamiento de RNA

RNU6: RNA nuclear pequeño U6

ROMA: Algoritmo de riesgo de malignidad ovárica

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

Sc: Scramble

SEM: Error estándar de la media (del inglés standard error of the mean)

SFB: Suero fetal bovino

Sp1: Proteína de especificidad 1

TEM: Transición epitelio mesénquima

TRBP: proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación

TRKA: Receptor tirosina quinasa A (del inglés Tyrosine Receptor KinaseA)

TTBS: Solución salina de Tris con Tween (del inglés Tween Tris-Buffered Salt)

TVUS: Ecografía transvaginal

UA: Unidades arbitrarias

UP: Partidor universal (del inglés universal primer)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

ZEB1: Dedo de zinc E-box con unión a homeobox 1 (del inglés zinc finger E-box binding homeobox 1)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Posible efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en células de COE	31
Figura 2	Niveles de miR-145 y miR-23b en células de cáncer ovárico post-transfección	45
Figura 3	Número de células de COE luego del tratamiento con los controles B, C y Sc	46
Figura 4	Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en el número de células de COE	47
Figura 5	Efecto de B, C y Sc en el marcador de proliferación celular Ki-67	48
Figura 6	Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en el marcador de proliferación celular Ki-67	50
Figura 7	Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en la migración de células de COE	53
Figura 8	Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en la invasión de células de COE	55
Figura 9	Western blot de c-MYC en células de COE	58
Figura 10	Niveles de ZEB1 en líneas celulares de COE	59
Figura 11	Western blot de ZEB1 en células A2780	61
Figura 12	Western blot de ZEB1 en células SKOV-3	63
Figura 13	Western blot de ZEB1 en células OV-90	65
Figura 14	Niveles de ABCB1 en líneas celulares de COE	67
Figura 15	Western blot de ABCB1 en A2780 y SKOV-3	69
Fig. anexo 1	Esquema representativo de nanoformulaciones dirigidas a células de COE	87

Fig. anexo 2	Viabilidad de células A2780 luego del tratamiento con AuNRs	89
Fig. anexo 3	Viabilidad de células A2780 luego del tratamiento con AuNPs	90
Fig. anexo 4	Viabilidad de células A2780 luego del tratamiento con AuNRs-PEG, AuNPs-PEG y GnRH	92
Fig. anexo 5	IC 50 de metotrexato (MTX) en células A2780	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Partidores utilizados en PCR en tiempo real	35
Tabla 2	Programa usado para efectuar la reacción de PCR en tiempo real	36
Tabla 3	Anticuerpos utilizados en Western blot	42

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- Enlace de concurso FONDECYT REGULAR 2020 de la Vicerrectoría de investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile. Dra. Carmen Romero Osses.
- Proyecto FONDECYT REGULAR 1190623: Gold nanoparticles functionalized with a cleavable linker and targeted to tumor cells for controlled photothermal release of antitumor drugs. Dra. Eyleen Araya Fuentes.
- Proyecto FONDECYT REGULAR 1220479: Role of microRNAs mix and metformin as possible adjuvant therapy for epithelial ovarian cancer: A pre-clinical study. Dra. Carmen Romero Osses.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Presentación a congresos nacionales:

XXXII Reunión Anual de la SCHR D 1 al 3 de septiembre de 2021

Allison Fredes, Daniela Vera, Andrea Hernández, Ignacio Torres, Maritza Garrido, Carmen Romero.

La co-transfección de microRNA-145 más microRNA-23b disminuye la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial.

Trabajo premiado con mención honrosa.

RESUMEN

Introducción: El cáncer ovárico epitelial (COE) es una de las neoplasias ginecológicas más letales. Este se caracteriza por la aparición tardía e inespecífica de síntomas y por una quimiorresistencia en estadios avanzados. El factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés) y su receptor de alta afinidad TRKA se encuentran sobre expresados en COE promoviendo la proliferación, migración y angiogénesis a través de la expresión de proteínas oncogénicas, las cuales a su vez están reguladas por microRNAs (miRs). Los miRs corresponden a RNAs no codificantes cuya función es impedir la traducción de RNAs mensajeros (mRNAs). Los miRs participan en procesos celulares como la proliferación celular, migración e invasión, funcionando ya sea como oncogenes o supresores de tumores. En COE, se ha descrito que ocurre una disminución de diferentes miRs supresores de tumores, entre ellos miR-145 y miR-23b. Nuestro grupo ha encontrado que miR-145 y miR-23b están implicados en la progresión de COE en un mecanismo regulado por NGF. Los mRNAs blancos de miR-145 incluyen a ABCB1 (un transportador de eflujo de drogas) y c-MYC (factor transcripcional que induce proliferación celular). Se ha propuesto a miR-23b como un modulador del ciclo celular, así como también de la quimiorresistencia al actuar sobre ZEB1 (factor transcripcional que induce transición epitelio mesénquima, TEM).

Hipótesis: “La sobreexpresión de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración, invasión y niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1 en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial”

Objetivo general: “Determinar si la co-transfección de miR-145 y miR-23b disminuye la proliferación, migración, invasión y los niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1 en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial”.

Metodología: Se utilizaron tres líneas celulares de COE, las que se co-transfectaron con miR-145 más miR-23b. Posteriormente, se evaluaron los niveles de miRs mediante Real Time-PCR para controlar el proceso de transfección. Los ensayos de proliferación se realizaron mediante conteo celular e inmunofluorescencia de Ki-67, mientras que los ensayos de migración e invasión se realizaron con insertos transwell sin y con matrigel respectivamente. Los niveles de proteínas c-MYC, ZEB1 y ABCB1 se midieron a través de la técnica de Western blot.

Resultados: Al co-transfectar con miR-145 más miR-23b en células A2780, SKOV-3 y OV-90, se obtuvo una disminución en la proliferación, migración e invasión celular y también en los niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1.

Conclusión: La co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración, invasión; así como también disminuyen la abundancia de proteínas implicadas en estos procesos y en quimiorresistencia en células de COE. Estos resultados sugieren la importancia de los miRs como posibles agentes

terapéuticos y sientan las bases para el desarrollo de futuras terapias dirigidas que busquen reducir los efectos secundarios, detener la progresión del COE y reducir la quimiorresistencia.

ABSTRACT

Introduction: Epithelial ovarian cancer (EOC) is one of the most lethal gynecological neoplasms. This is characterized by the late diagnosis, nonspecific symptoms and chemoresistance in advanced stages. Nerve growth factor (NGF) and its high-affinity receptor TRKA are overexpressed in EOCs, promoting proliferation, migration, and angiogenesis through the expression of oncogenic proteins, which are regulated by microRNAs (miRs). miRs correspond to non-coding RNAs whose function prevents the translation of messenger RNAs (mRNAs). miRs participate in cellular processes such as cell proliferation, migration, and invasion, functioning as oncogenes or tumor suppressors. In COE, it has been described a decrease of different tumor suppressor miRs, including miR-145 and miR-23b. Our group has found that miR-145 and miR-23b are involved in EOC progression in a mechanism regulated by NGF. Target mRNAs for miR-145 include ABCB1 (a drug efflux transporter), and c-MYC (a transcription factor that induces cell proliferation). Besides, miR-23b has been proposed as a principal modulator of the cell cycle and chemoresistance by acting on ZEB1 (a transcriptional factor that causes the epithelial-mesenchymal transition, TEM).

Hypothesis: “The overexpression of miR-145 plus miR-23b decreases the proliferation, migration, invasion, and protein levels of c-MYC, ZEB1, and ABCB1 in epithelial ovarian cancer cell lines”

General objective: “To determine if the co-transfection of miR-145 and miR-23b decreases the proliferation, migration, invasion, and protein levels of c-MYC, ZEB1, and ABCB1 in epithelial ovarian cancer cell lines”.

Methodology: Three EOC cell lines were used, which were co-transfected with miR-145 plus miR-23b. Subsequently, the levels of miRs were evaluated by Real Time-PCR to control the transfection process. Proliferation assays were performed by cell count and Ki-67 immunofluorescence, while migration and invasion assays were performed with transwell inserts without and with matrigel, respectively. The levels of c-MYC, ZEB1, and ABCB1 proteins were measured using the Western blot technique.

Results: When co-transfecting with miR-145 plus miR-23b in A2780, SKOV-3, and OV-90 cells, a decrease in cell proliferation, migration, and invasion was obtained, as well as in c-MYC protein levels, ZEB1 and ABCB1.

Conclusion: Co-transfection of miR-145 plus miR-23b reduces proliferation, migration, and invasion, as well as decreases the abundance of proteins involved in these processes and chemoresistance in COE cells. These results suggest the importance of miRs as potential therapeutic agents and lay the groundwork for future targeted therapies that seek to reduce side effects, halt EOC progression, and reduce chemoresistance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer ovárico

El cáncer de ovario (CO) es una neoplasia maligna heterogénea que puede desarrollarse a partir de distintas células presentes en el ovario, sin embargo, el CO que se origina a partir de células epiteliales (COE), es el más común en mujeres de todos los grupos étnicos representando alrededor del 90% de todos los casos de cáncer ovárico (1). Adicionalmente, el COE puede clasificarse según la histología de las células tumorales en seroso, endometriode, mucinoso o de células claras, siendo el de tipo seroso el más común (2).

En términos epidemiológicos, el CO no es el cáncer ginecológico con mayor incidencia, sin embargo, es el cáncer femenino y la neoplasia ginecológica con menor tasa de supervivencia superando en mortalidad al cáncer de endometrio y cáncer cervical (3). En Chile, el cáncer de ovario es el octavo cáncer más común y la novena causa de muerte en mujeres (4).

La alta mortalidad observada en las pacientes con cáncer ovárico se debe a que esta neoplasia presenta sintomatología inespecífica, lo que dificulta su detección y por lo tanto el diagnóstico temprano. Como consecuencia de lo anterior, el CO se diagnostica en estadios avanzados, cuando el cáncer ha hecho metástasis y la tasa de supervivencia es de un 29%(3,5,6).

Otro de los principales problemas que afecta el pronóstico de las pacientes diagnosticadas con cáncer ovárico es el desarrollo de quimiorresistencia a muchos de los fármacos indicados para el tratamiento de este cáncer, los cuáles

además provocan una gran cantidad de efectos secundarios que deterioran la calidad de vida de las pacientes. A pesar de esto y los resultados modestos, el esquema de quimioterapia del COE no ha variado significativamente desde hace décadas (7,8). Esto, expone lo importante que es la búsqueda de nuevas terapias que complementen a los tratamientos existentes, con el fin de mejorar el pronóstico y la calidad de vida de las pacientes.

1.2. Causas del cáncer ovárico

Diversos estudios a lo largo de los años han descrito teorías e hipótesis sobre el origen del cáncer ovárico y los factores de riesgo que pueden influir en su desarrollo y progresión. Algunas de las teorías e hipótesis más aceptadas que explican el desarrollo de cáncer ovárico son:

- Ovulación incesante: La teoría de “ovulación incesante”, indica que una ovulación continua puede contribuir a una mayor incidencia de cáncer ovárico. Esto puede deberse a la proliferación de células epiteliales de la superficie del ovario como consecuencia de la ruptura del folículo y liberación del ovocito que se da en cada ciclo ovulatorio. La exposición de estas células a una elevada concentración de estrógenos en el líquido folicular, provocaría un aumento en la proliferación e invaginación de la superficie epitelial del ovario lo que lleva finalmente a la formación de quistes de inclusión en donde el ambiente estromal puede provocar mutagénesis en las células epiteliales superficiales del ovario **(9–11)**.

- Exposición a gonadotrofinas: La secreción excesiva de gonadotrofinas, estimularía a las células epiteliales de la superficie ovárica (ya que expresan receptores a gonadotrofinas) provocando un mayor riesgo de desarrollar cáncer ovárico **(12)**. De esta manera, el aumento de gonadotrofinas durante la ovulación y la menopausia, podrían ser causas de desarrollo de cáncer **(13)**.
- Estimulación hormonal: La hipótesis de la estimulación hormonal sugiere que una estimulación androgénica excesiva de las células epiteliales de la superficie ovárica provocaría un mayor riesgo de cáncer, mientras que la progesterona sería un agente protector. Se ha encontrado que las píldoras anticonceptivas ejercen un efecto protector contra el desarrollo de cáncer ovárico. Cabe destacar, que los anticonceptivos orales, reducen los niveles de andrógenos y también contienen altos niveles de progestágenos **(14,15)**. Adicionalmente, inhiben las ovulaciones y por ende disminuyen las rupturas sucesivas de la pared del ovario.
- Inflamación local: Se plantea que el proceso de ovulación se asemeja a una reacción inflamatoria que implica la liberación de mediadores de la inflamación como las citoquinas, lo que induce remodelamiento celular que puede llevar al desarrollo de cáncer de ovario **(13)**.

Otra de las teorías planteadas en el último tiempo, ha propuesto que los tumores ováricos de tipo seroso surgen de la implantación de epitelio (benigno o maligno) de las trompas de Falopio. Esta teoría se basa en la estrecha relación anatómica

que existe entre el ovario y la fimbria de la trompa de Falopio y en la ruptura de la superficie ovárica debido a la expulsión del ovocito. De esta manera, las células epiteliales de las fimbrias se desprenden y se implantarían en la superficie del ovario donde ha ocurrido la ruptura, lo que da como resultado la formación de un quiste de inclusión **(16)**.

Junto con las teorías, los factores de riesgo descritos actualmente incluyen aquellos factores que son modificables como la dieta, la terapia de reemplazo hormonal y el consumo de tabaco, y aquellos no modificables dentro de los cuales se encuentran la ovulación ininterrumpida, la endometriosis, además de factores étnicos y genéticos como la mutación en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 **(17)**.

De este modo, conocer las posibles causas y factores de riesgo asociados al cáncer ovárico descritas anteriormente, permiten aplicar diferentes métodos de prevención es por ello que en pacientes con factores de riesgo, se recomienda además el uso de diferentes métodos para identificar el CO y poder realizar una detección y diagnóstico temprano **(18)**.

1.3. Detección y diagnóstico

Existen diferentes razones por la cuáles las pacientes con CO presentan un mal pronóstico y algunas de ellas son la detección y diagnóstico de CO en etapas avanzadas de la enfermedad, debido a la inespecificidad de los síntomas y la falta de métodos altamente sensibles y específicos que permitan detectar este tipo de

cáncer antes de que invada otros tejidos **(19,20)**. Esto significa que desafortunadamente, un 83% de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas cuando el cáncer ya se ha diseminado y la supervivencia es de sólo un 29% **(3,21)**.

El cáncer ovárico se diagnostica con la biopsia posterior a la cirugía citoreductiva, pero este puede sospecharse mediante algunas pruebas imagenológicas y marcadores sanguíneos. Las pruebas de detección más utilizadas son la ecografía transvaginal (TVUS) y el marcador tumoral antígeno de cáncer 125 (CA-125).

TVUS, es un examen capaz de detectar masas anormales en el ovario, sin embargo, esta prueba no es capaz de determinar si estas corresponden a masas malignas o benignas, ya que su interpretación depende de la expertise del operador, por lo que hoy en día suele complementarse este examen con marcadores tumorales como el CA-125 **(20,22)**.

CA-125 corresponde a uno de los marcadores tumorales más utilizados, especialmente para monitorear la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad, no obstante, su uso es limitado como prueba de detección y diagnóstico debido a su baja sensibilidad (50–62%) y especificidad (94–98.5%) en pacientes con CO en estadios tempranos **(20,23)**. Lo anterior, se debe a que solo aproximadamente un 50% de las pacientes con CO en estadio I (confinado en el ovario) presentan niveles elevados de este marcador **(24–26)**; sumado a esto, CA-125 puede verse aumentado en patologías benignas y en otros tipos de cánceres

disminuyendo su especificidad como marcador tumoral por lo que debe ser complementado con TVUS u otros marcadores moleculares que han surgido en el último tiempo como la proteína epididimal humana 4 (HE4) **(22,27)**.

Por su parte HE4, es un marcador tumoral prometedor debido a que presenta una sensibilidad y especificidad similar o superior que el marcador CA-125. Actualmente ambos marcadores sanguíneos son utilizados en el algoritmo de riesgo de malignidad ovárica (ROMA), el cual considera la concentración de los marcadores CA-125, HE4 y el estado menopáusico de las pacientes. Este índice ha mostrado una elevada sensibilidad, mejor que el uso de cada uno de los marcadores por separado, lo que ha mejorado la detección en estadios tempranos del CO **(28–30)**.

1.4. Tratamiento del cáncer ovárico

El tratamiento del cáncer ovárico consta de cirugía para reducir la masa tumoral (cirugía citorreductora), seguida de ciclos de tratamiento con fármacos que evitan la proliferación o diseminación de células tumorales (quimioterapia) **(31)**.

Los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer ovárico son cisplatino o carboplatino más paclitaxel **(7)**. Sin embargo, dentro de los principales problemas que afectan a las pacientes con cáncer de ovario, se encuentran los efectos secundarios provocados por esta terapia y el desarrollo de quimiorresistencia a estos fármacos de primera línea. Si bien el CO es sensible a la quimioterapia, con el tiempo las pacientes tienden a presentar una alta

recurrencia de la enfermedad, como consecuencia de la resistencia a la quimioterapia **(32,33)**.

Teniendo en consideración lo anterior, diversos estudios han postulado el uso de nuevas terapias alternativas que complementen a los fármacos de primera línea y que, además, impliquen nuevas formas de administración y distribución de las terapias. Esto, con el objetivo de mejorar la supervivencia de las pacientes y mejorar su calidad de vida al disminuir los posibles efectos secundarios **(34)**. En el último tiempo han surgido algunas alternativas, dentro de las cuáles se encuentran, el uso de sustancias producidas endógenamente que tienen efecto anti-tumoral, como los microRNAs y también la utilización de terapia dirigida mediante nanopartículas asociadas a fármacos con propiedades antitumorales, dentro de las cuáles se encuentra el metotrexato asociado a nanopartículas de oro (GNP-MTX).

Diversos investigadores han descrito y estudiado que la expresión de microRNAs se encuentra alterada en diferentes tipos de cánceres, incluyendo el CO **(35,36)**, por lo que se ha planteado su uso como marcador diagnóstico y también como terapia alternativa **(37)**.

1.5. microRNAs y su relación con proteínas tumorales

Actualmente se sabe que el COE se caracteriza por un rápido crecimiento y un elevado potencial angiogénico, procesos que están involucrados en la tumorigénesis y son promovidos por algunos factores de crecimiento como NGF

y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) **(38)**. De esta manera, NGF mediante su interacción con el receptor de tropomiosina quinasa A (TRKA), actúa sobre las células tumorales y sobre las células endoteliales promoviendo la proliferación, migración y angiogénesis a través de la expresión de algunas proteínas oncogénicas como c-MYC y VEGF **(39–42)**. c-MYC regula la expresión de ciclinas y muchas proteínas oncogénicas relacionadas con el ciclo y la muerte celular **(43)**. Importantemente, se ha descrito que todas estas proteínas pueden ser reguladas por microRNAs **(39)**.

Los microRNAs (miRs) son RNAs no codificantes de 18-25 nucleótidos que regulan RNAs mensajeros (mRNAs) postranscripcionalmente, impulsando el silenciamiento génico mediante la degradación del mRNA o impidiendo la traducción de proteínas implicadas en procesos como la proliferación, migración e invasión celular **(39,44)**.

La biogénesis de los miRs, inicia con la síntesis de un transcrito primario largo en forma de horquilla (pri-miRNA) compuesta por un tallo y un bucle, en un proceso llevado a cabo por la RNA polimerasa II a partir de genes precursores ubicados en distintas partes del DNA **(45)**.

Los pri-miRNAs son escindidos en el núcleo por el complejo formado por la endonucleasa Drosha y el cofactor DGCR8, dando como resultado miRNAs precursores (pre-miRNA), los cuales son exportados desde el núcleo al citoplasma mediante la exportina-5. En el citoplasma, los pre-miRNA son procesados por el complejo Dicer/CBP (proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación)

liberando un dúplex de miRNA de 21-24 nucleótidos. Este dúplex está compuesto de dos hebras, una de las hebras corresponderá al miRNA maduro y se unirá al complejo de silenciamiento de RNA (RISC) pudiendo silenciar un mRNA blanco regulando de forma postranscripcional la expresión de proteínas; mientras que la otra hebra será degradada **(46)**.

El miR, se une a la región no traducida tres prima (3'-UTR) del mRNA blanco para regular su traducción, esta regulación dependerá de la complementariedad, pudiendo ser la unión total o parcial. Una complementariedad perfecta o total entre el microRNA con su mRNA blanco tendrá como consecuencia la escisión o degradación del mRNA; mientras que frente a una complementariedad parcial no se lleva a cabo el proceso de corte y degradación, pero si se puede provocar la inhibición de la traducción o una desestabilización del mRNA por desadenilación de éste **(45)**.

Teniendo en consideración lo descrito anteriormente, se puede evidenciar que, a nivel celular, los miR tienen un rol fundamental en la mantención de los procesos celulares, de modo que una desregulación puede llevar al desarrollo de diferentes patologías como el cáncer **(47)**.

1.6. microRNAs y cáncer

En cáncer, los miRs tienen la capacidad de regular la proliferación, migración e invasión de células cancerígenas, siendo su desregulación un factor importante para el desarrollo de cáncer. Esto se debe principalmente a que los miRs en esta

patología pueden tener dos funciones, pueden comportarse como onco-miRs o también como miRs supresores de tumores **(48)**.

En el caso de los onco-miRs, estos regulan la traducción del mRNA de los genes supresores de tumores, mientras que los miRs supresores de tumores regulan los mRNA derivados de oncogenes. En distintos tipos de cáncer, se ha descrito que los onco-miRs se encuentran sobreexpresados (produciendo un aumento de proteínas oncogénicas), en cambio existe una disminución en la expresión de miRs supresores de tumores (disminuyendo las proteínas supresoras de tumores) **(49)**.

Definir patrones de expresión de miRs en los distintos tipos de cánceres ha sido uno de los objetivos en diferentes investigaciones. Esto permite dilucidar los miRs que se comportan como onco-miRs o como miRs supresores de tumores, pudiendo ser utilizados, tal como se mencionó anteriormente, como biomarcadores de uso diagnóstico y también como blancos terapéuticos debido a la capacidad que tienen los microRNAs de regular cientos de proteínas **(36,37)**.

1.7. miR-145 en COE

En COE, se han identificado una gran variedad de miRs que se encuentran desregulados con respecto al tejido ovárico normal. Dentro de los miRs que se encuentran sobreexpresados se encuentra miR-200, mientras que dentro de los miRs regulados a la baja destacan miRNA-145 (miR-145) y miRNA-23b (miR-23b) **(50)**.

miR-145, es un microRNA de doble hebra cuya estructura madura tiene dos formas diferentes, 5p y 3p **(51)**. El miR al que hace referencia este trabajo es a miR-145-5p, ya que se ha descrito que la hebra 5p es la hebra funcional, que disminuye las oncoproteínas blanco **(39)**.

Diferentes estudios han mostrado una regulación a la baja de miR-145 relacionándolo con un mal pronóstico en distintos tipos de cánceres, como el cáncer colorrectal **(52)**. En el caso del COE, estudios recientes realizados por nuestro grupo de laboratorio han demostrado que los niveles de miR-145 disminuyen durante la progresión del COE, mientras que una sobreexpresión de este miR, provoca una disminución en la proliferación, y en los niveles de c-MYC y VEGF (proteínas involucradas en la proliferación y angiogénesis respectivamente), así como también una disminución en los tamaños tumorales y en la presencia maligna de ascitis en un modelo animal.

Por otra parte, nuestro grupo ha mostrado que al estimular células de COE con NGF, los niveles de miR-145 disminuyen, sugiriendo que la función del NGF en la progresión del COE, estaría siendo regulada por miR-145. De este modo, miR-145 se propone como un supresor crítico de la carcinogénesis que podría ser utilizado como un tratamiento complementario a los fármacos de primera línea en COE **(39)**.

En este mismo contexto, miR-145 se ha propuesto también como un supresor de la resistencia a fármacos en distintos tipos de cánceres, en dónde se plantean diferentes mRNA blancos de miR-145 **(53)**. En el caso de COE estudios han

mostrado que miR-145 regula negativamente al transportador ABCB1, también conocido como proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1) o glicoproteína P (P-gp), mediante la inhibición de la proteína de especificidad 1 (Sp1) y la quinasa dependiente de ciclina 6 (CDK6). Cabe destacar que ABCB1 está relacionado con la resistencia a paclitaxel (quimioterapia de primera línea para el COE), al aumentar el eflujo o expulsión de la quimioterapia, por lo que se ha planteado que miR-145 puede regular la sensibilidad a paclitaxel en células de COE mediante la acumulación de fármaco al interior de las células tumorales **(54)**. Además, otros estudios recientes concluyeron que el eje miR-145 / c-MYC / PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada) contribuye a la resistencia al cisplatino en el cáncer de ovario, ya que al estar disminuido el miR-145 en COE, aumentarían c-MYC y PD-L1 **(53,55)**. Esto se condice con un análisis in-silico realizado previamente por nuestro grupo de laboratorio, en donde se observó que al aumentar o sobreexpresar miR-145 puede disminuir la expresión de c-MYC, lo que fue comprobado con estudios in-vitro **(39)**.

1.8. miR-23b en COE

Por otra parte, miR-23b es un miR de 21 pares de bases de doble hebra. La hebra que se utilizará y medirá en este trabajo es miR-23b-3p, ya que esta hebra es la encargada de la regulación post transcripcional **(56)**. La expresión alterada de este miR ha sido documentada en diversos tipos de cánceres dentro de los cuales se encuentra el cáncer de próstata, mama y cáncer cérvico uterino **(57)**.

En CO se ha encontrado que los niveles de miR-23b se encuentran disminuidos y se ha asociado con un mal pronóstico **(58)**. Nuestro grupo de laboratorio describió que los niveles de miR-23b disminuyen con la progresión del COE. Además, se evaluó el efecto de NGF sobre la expresión de miR-23b en líneas celulares de COE, en donde se observó que NGF reduce los niveles de este miR **(36)**.

miR-23b también se ha descrito como un supresor de tumores, y algunos blancos corresponden a mRNAs de proteínas oncogénicas implicadas en el inicio de la metástasis, supervivencia, migración e invasión celular del COE **(58,59)**. Una de estas proteínas es el factor transcripcional ZEB1, implicado en la transición epitelio mesénquima (TEM), en donde las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal perdiendo la capacidad de adherirse entre ellas y adquiriendo una mayor motilidad, lo que facilita el escape de las células tumorales y por lo tanto la diseminación tumoral a otros tejidos, proceso conocido como metástasis **(60–62)**. Además, ZEB1 se ha propuesto como un promotor de la quimiorresistencia a cisplatino en las células de cáncer de ovario **(63)**; por lo que miR-23b también podría estar involucrado en la resistencia a terapias en COE.

1.9. Posibles efectos de miR-145 y miR-23b en células de COE

Con los antecedentes anteriores, se puede conocer que tanto miR-145 como miR-23b son regulados por NGF/TRKA. Cada uno de estos miRs tienen sus propios RNAs mensajero blancos pudiendo regular la expresión de proteínas implicadas en diferentes procesos celulares, sin embargo, existen antecedentes de que estos

miRs también tienen algunos blancos comunes, por lo que la sobreexpresión de estos miRs en conjunto podrían presentar un efecto complementario en la disminución de la proliferación, migración e invasión e incluso la quimiorresistencia (36,39) (Figura 1).

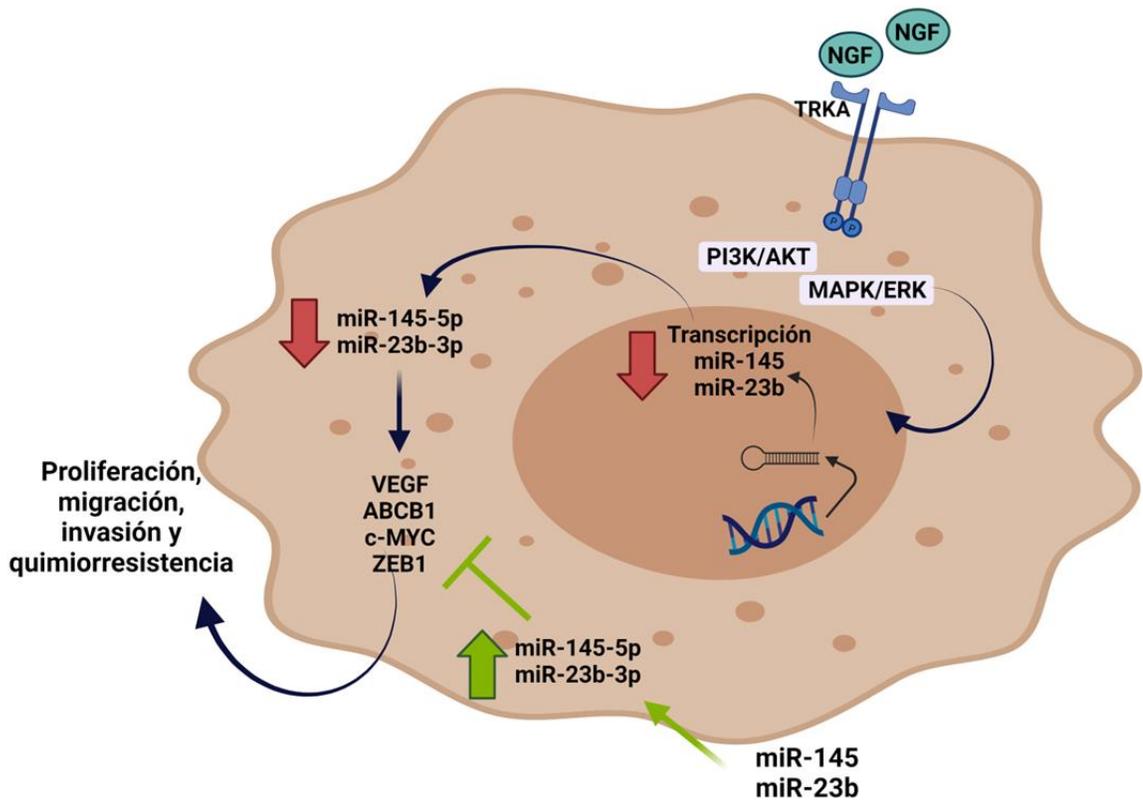


Figura 1. Posible efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en células de COE. Se postula que la co-transfección de miR-145 más miR-23b (flechas verdes) puede disminuir la progresión del COE a través de la disminución de proteínas oncogénicas como, c-MYC, ZEB1 y ABCB1 que participan en estos procesos.

2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado los antecedentes, la hipótesis es:

“HIPOTESIS”.

“La sobreexpresión de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración, invasión y niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1 en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial”

Objetivo General

“Determinar si la co-transfección de miR-145 y miR-23b disminuye la proliferación, migración, invasión y los niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1 en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial”

Objetivos específicos:

1. Evaluar si la co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de cáncer ovárico A2780, SKOV-3 y OV-90
2. Determinar si los niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1, post-transfección con miR-145 más miR-23b disminuyen en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90 de cáncer ovárico epitelial.

3. METODOLOGÍA

3.1. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de COE A2780, SKOV-3 y OV-90. Las células A2780 provienen de un COE primario humano, de paciente sin tratamiento con quimioterapia y fueron obtenidas de European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Las células SKOV-3 derivan de la ascitis de una paciente con COE, mientras que las células OV-90 corresponden a líneas celulares de COE humano de alto grado, provenientes de metástasis. Las células SKOV-3 y OV-90 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC).

3.2. Cultivo celular

Las células A2780, SKOV-3 y OV-90, se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% a una temperatura de 37 °C con CO₂ al 5%. Una vez las células alcanzaron un 80% de confluencia, estas se lavaron con tampón fosfato salino 1X (PBS 1X, marca) y se despegaron utilizando tripsina 1x durante 5 minutos a 37°C (para las células A2780 y SKOV-3) o durante 3 minutos a 37°C (en el caso de las células OV-90) para luego, ser resuspendidas en medio RPMI 10%. Se determinó el número de células de la suspensión celular utilizando el equipo automatizado LUNA (BioRad), para sembrar la cantidad de células adecuada en cada experimento.

3.3. Transfección transiente

Las líneas celulares se transfectaron con miR-145 (30 nM), miR-23b (30 nM) y la mezcla de ambos miRs cada uno en concentraciones de 30 nM (Integrated DNA Technologies) utilizando el reactivo de transfección Viafect en concentración de 2 μ L/mL siguiendo el protocolo del fabricante (Promega, #E498A). La transfección se realizó por 48 horas (o por el tiempo que se indique en cada experimento) en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 2%. Como Control negativo, las células se transfectaron con una secuencia scramble (Santa Cruz Biotechnology, #C-37007) en una concentración final de 10 nM, utilizando las mismas condiciones anteriores. Posterior a finalizar la transfección, su eficiencia se evaluó mediante la medición de cada microRNA mediante RT-PCR en tiempo real.

3.4. Extracción de miRs, RT-PCR y qPCR

Se sembraron 500.000 células en placas de 6 pocillos y se transfectaron como se describió en la sección 3.3.

La extracción de miRs a partir de las células sembradas se realizó mediante lisis química y mecánica utilizando 700 μ L del reactivo de lisis QIAzol (Qiagen) y un raspador de células. El producto de lisis se trasladó a un tubo eppendorff para continuar el proceso de extracción utilizando el kit miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la transcripción inversa de RNA se utilizó el kit miScript II RT (Qiagen, #218161) siguiendo el protocolo del fabricante. El kit contiene buffer Hi-Flex utilizado para la retrotranscripción de RNA total y buffer Hi-Spec utilizado para

miRs. Con el fin de optimizar la retrotranscripción de miRs se utilizó este último. Este paso, adiciona un universal tag a los miRs, el cual permite la amplificación de miARN maduro en el paso de PCR en tiempo real.

Para detectar los niveles de miR-145 y miR-23b se utilizó el kit miScript SYBR Green qPCR (Qiagen, #218076) en un termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems). El kit contiene un primer universal (UP), que corresponde a un segundo partidor necesario para amplificar el miR y su secuencia (no especificada por el proveedor) está determinada por el universal tag. Los partidores de miR-145 y miR23b utilizados para PCR en tiempo real se detallan en la tabla 1 y fueron adquiridos listos para su uso (Qiagen, #MS00003528 y #MS00031647 respectivamente),

Como miR housekeeping se usó ARN nuclear pequeño U6 (RNU6), cuya secuencia no fue especificada por el proveedor (Qiagen, #MS00033740), y como control negativo, se utilizó agua libre de nucleasas.

miRNA	Secuencia
miR-145	5' GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU -3'
miR-23b	5' AUCACAUUGCCAGGGAUUACC -3'

Tabla 1. Partidores utilizados en PCR en tiempo real.

El programa utilizado para llevar a cabo el PCR en tiempo real se observa en la tabla 2.

Programa	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación	95	15 minutos
Desnaturación	94	15 segundos
Alineamiento	55	30 segundos
Extensión	70	30 segundos
Ciclos		40
Curva de Melting	60- 95	

Tabla 2. Programa usado para efectuar la reacción de PCR en tiempo real.

3.5. Inmunofluorescencia

Se sembraron células de COE en cubreobjetos redondos depositadas en placas de 24 pocillos (50.000 células / pocillo). Posteriormente fueron transfectadas con miR-145, miR-23b o su combinación, según se describió en la sección 3.3.

Transcurridas 48 horas de transfección, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 15 minutos. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% durante 10 minutos y se bloquearon con fosfato-albúmina de suero bovino 2% en PBS (PBS-BSA 2%) durante 5 minutos con el fin de evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario. Las muestras se incubaron durante toda la noche con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology, # SC-23900) en una dilución de 1:300 en PBS-BSA 2%. Como anticuerpo

secundario, se utilizó un anticuerpo fluorescente anti-ratón (Molecular Probes, #A11005) en una dilución 1:200 en PBS-BSA 2% durante 1 hora a 37°C.

Para el montaje de los cubreobjetos se utilizó ProLong Gold Antifade con DAPI (Cell Signaling Technology, #8961S) que permite además visualizar los núcleos celulares. La inmunofluorescencia se evaluó obteniendo el área marcada de 4 a 6 imágenes por condición, con el software informático Image Pro-Plus 6.2 (Media Cybernetics Inc).

3.6. Conteo celular

Utilizando las imágenes obtenidas de los ensayos de inmunofluorescencia de Ki-67, se realizó un conteo de células utilizando el programa Fiji Image J. Se analizaron de 4 a 6 imágenes por condición.

3.7. Migración

Para evaluar el efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b sobre la capacidad de migrar de las células de COE, se sembraron 800.000 células en placas de 6 pocillos, las cuales se transfectaron como se describe en la sección 3.3 durante 48 horas (en el caso de las células A2780) o durante 4 horas (en el caso de las células SKOV-3 y OV-90). Transcurrido el tiempo de transfección, se evaluó la migración utilizando el kit BioCoat (Corning inc), que consiste en insertos tipo transwell o cámaras que en su interior tienen una membrana con poros de 8 µm de diámetro. En la parte superior de la membrana, se agregan células resuspendidas en medio sin suero para que migren hacia la parte inferior que estará en contacto con medio RPMI 10% el cual funcionará como un atrayente.

El día anterior al ensayo de migración, la parte externa de la membrana de los insertos transwell se recubren con fibronectina. Se utilizaron 0.003 mg/mL de fibronectina en células A2780 y SKOV-3 y 0,01 mg/mL de fibronectina en células OV-90.

El día del ensayo, 100.000 células de COE transfectadas con los miRs y resuspendidas en medio RPMI sin SFB se agregaron a la cámara superior. Las células migraron a 37°C durante 8 horas en el caso de las células A2780, mientras que las células SKOV-3 y OV-90 se dejaron migrar por 4 horas y 24 horas respectivamente.

Para fijar y teñir las células que migraron, se retiró la suspensión celular de la parte superior de los insertos y estos se posicionaron sobre cristal violeta 0,1% P/V en metanol 99,8% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente los insertos se lavaron con agua destilada y con un hisopo humedecido, se retiraron completamente las células de la parte interna del inserto (células que no atravesaron la membrana del inserto). Luego, los insertos se dejaron secar durante 1 hora a temperatura ambiente y se observaron bajo un microscopio óptico (Olympus BX51TF). Se tomaron fotografías (6-8 imágenes para cada condición experimental) de las células unidas a la superficie inferior de la membrana (que atravesaron el inserto). Posteriormente, se contaron todas las células presentes en cada fotografía utilizando el programa Fiji Image J.

3.8. Invasión

Se sembraron 800.000 células de COE en placas de 6 pocillos, las cuales se transfectaron de la misma forma descrita en los experimentos de migración.

Para evaluar la invasión de las células, se utilizó el kit comercial BioCoat (Corning Inc) que consiste en insertos transwell recubiertos con matrigel, el cual constituye una barrera que imita la matriz extracelular y puede ser atravesada por células con alta capacidad invasiva (como las de COE).

El inserto con matrigel se hidrató durante 2 horas a 37 °C con medio RPMI sin SFB, previo a su uso. Posteriormente los insertos se posicionaron en una placa de 24 que contenían 500 µL de RPMI 10% SFB como atrayente. En la parte superior del inserto se agregaron 100.000 células previamente transfectadas en medio RPMI sin SFB. El ensayo de invasión se efectuó por 16 horas (SKOV-3) o 24 horas (A2780 y OV-90) a 37°C. A continuación, las células que invadieron se fijaron con 500 µL de metanol (-20 °C) durante 2 min y se tiñeron con 500 µL de azul de toluidina al 1% durante toda la noche, luego el interior del inserto se limpió con un hisopo humedecido. Los insertos se observaron bajo un microscopio óptico (Olympus BX51TF). Se tomaron fotografías (6-8 imágenes para cada condición experimental) de las células unidas a la superficie inferior de la membrana (que atravesaron el inserto), las que se analizaron utilizando el programa Fiji Image J.

3.9. Western blot

Para la obtención de proteínas, se sembraron 500.000 células de COE las cuales se transfectaron durante 48 horas con miR-145 y/o miR23-b según lo descrito en la sección 3.3. Luego, las células se lavaron con PBS 1X para proceder con la extracción de proteínas. Para ello, se utilizó un raspador de células y 150 μ L de tampón de lisis Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA), más un cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasa 1X (Thermo Scientific, #1861284). Las placas se rasparon sobre hielo durante 5 minutos para transferir el producto de lisis a tubos eppendorf de 1.5 mL, los que se dejaron en hielo durante 20 minutos y luego se sonicaron para completar la lisis.

Para calcular la concentración de las proteínas extraídas, se utilizó el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, #23227) y un estándar de albúmina de suero fetal bobino (BSA) de 1 mg/mL. El producto colorimétrico se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 562 nm y las absorbancias de las muestras fueron interpoladas en una curva estándar de absorbancia versus concentración de BSA, lo que permitió obtener finalmente los microgramos (μ g) de proteínas totales presentes en cada condición experimental.

Luego de cuantificar, se procedió a separar las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE. Para ello, se prepararon soluciones que contenían el volumen correspondiente a 50 o 80 μ g y el mismo volumen de buffer de carga. Estas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos, para posteriormente ser cargadas en un gel de poliacrilamida al 8%. Como referencia, se cargó un marcador de peso

molecular (MaestroGen, #02102-250). La electroforesis de las muestras se realizó utilizando un tampón tris-glicina 1X a 60 voltios durante 40 minutos para concentrar las proteínas, luego, para realizar la separación se aumentó a 100 voltios durante 150 minutos.

Las proteínas separadas en gel de poliacrilamida fueron transferidas mediante transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (Protran Perkin #NBA0858001EA) utilizando un tampón de transferencia 1X (tampón tris-glicina en metanol 20%) a 0,45 amperios durante 140 minutos. Para comprobar la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se tiñó con Rojo Ponceau.

Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en tampón Tris Tween Buffer Saline (TTBS) a temperatura ambiente durante una hora, para luego ser incubadas con anticuerpo primario (Tabla 3) diluido en Leche 5% a una temperatura de 4°C y en agitación constante durante toda la noche. A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rabanito picante (HRP), en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora.

El revelado de las membranas se realizó mediante quimioluminiscencia. Para ello, se utilizó un kit de revelado (Cyanagen, #XL5063,0250) el cual contiene un sustrato que reacciona con HRP (luminol). De este modo la membrana se sumergió en la solución de luminol y peróxido de hidrógeno en proporción 1:1. La señal quimioluminiscente producto de la reacción enzimática se detectó utilizando el equipo Image Quant LAS 500 (General Electric). Para la semi-cuantificación de

las bandas obtenidas, se utilizó el programa Fiji Image J (National Institutes of Health), el cual realiza un análisis densitométrico de la intensidad de las bandas, entregando resultados en unidades arbitrarias (UA). Los resultados de cada muestra fueron normalizados con respecto a la intensidad de la banda de la proteína constitutiva β -Actina correspondiente.

Proteína	Marca y número de catálogo	Tipo de Anticuerpo	PM (kDa)	Dilución
c-MYC	Cell Signaling, D84C12	Monoclonal de conejo	57-65	1:350
ZEB1	Cell Signaling, E2G6Y	Monoclonal de conejo	200	1:350
ABCB1	Cell Signaling, D3H1Q	Monoclonal de conejo	130-180	1:250
B-Actina	Sigma-Aldrich A5441	Monoclonal de ratón	42	1:10000
Anti-Rabbit	Jackson Inmunoresearch, 111-035-003	Secundario Acoplado a HRP	-	1:5000
Anti-Mouse	Jackson Inmunoresearch, 115-035-003	Secundario Acoplado a HRP	-	1:5000

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Western blot. Se especifican características como, tipo de anticuerpo, peso molecular (PM) de la proteína y dilución de los anticuerpos primarios y secundarios usados.

3.10. Estadística

El cálculo muestral se realizó con la fórmula de comparación de medias, $n = (2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2) / d^2$, asumiendo un α de 0.05, β de 0.2, una desviación estándar de 0.13 y una diferencia de las medias (d) de un 25%, obteniendo un número muestral (n) igual a 4.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa “Graph Pad Prism 8.0.1”. Según se indique, se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar dos grupos y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos, seguido de una prueba de Dunn. Todos los resultados se consideraron significativos con un $p < 0,05$ y se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM).

4. RESULTADOS

4.1. Objetivo específico N°1

“Evaluar si la co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de cáncer ovárico A2780, SKOV-3 y OV-90”

4.1.1. Medición de los niveles de miR-145 y miR-23b post transfección con la mezcla de los miRs.

Para poder determinar el efecto de la co-transfección de los miRs en la proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de COE, en primer lugar, se evaluó si existía incorporación de los miRs al utilizar el protocolo de transfección descrito anteriormente. Para ello, se midieron los niveles de miR-145 y miR-23b que alcanzaron las células, posterior a la transfección con una secuencia RNA Scramble (Sc), miR-145, miR-23b y la mezcla de ambos miRs. Esto fue evaluado mediante RT-PCR en tiempo real.

Los resultados muestran que la transfección con miR-145, miR-23b y la co-transfección con la mezcla de ambos miRs (Mix) produjeron un aumento significativo de los niveles de miR-145 y miR-23b en todas las líneas celulares de COE (Figura 2). Estos resultados indican que el protocolo de transfección efectivamente produce la sobreexpresión transiente de estos miRs.

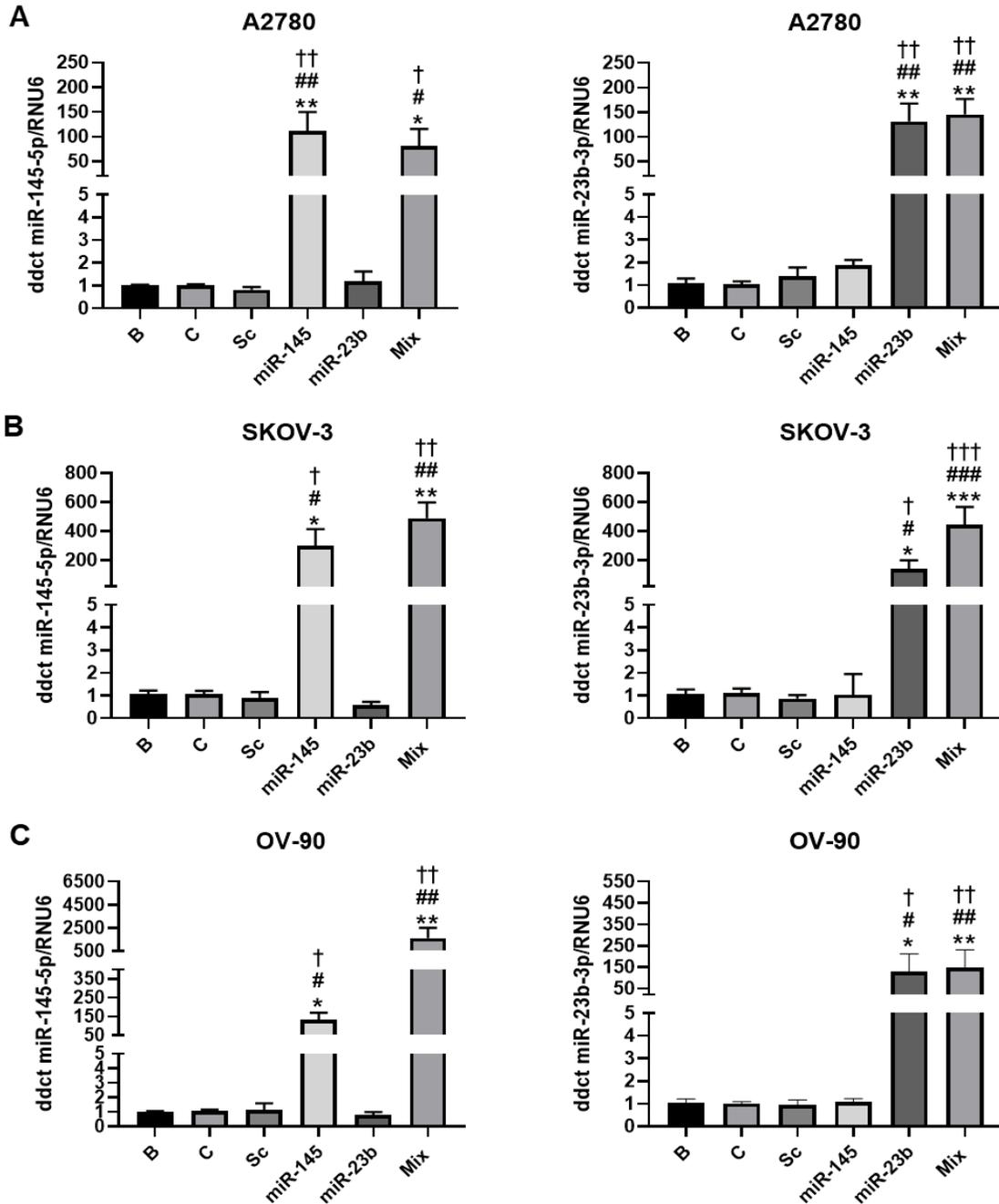


Figura 2. Niveles de miR-145 y miR-23b en células de cáncer ovárico post-transfección. Las células A2780, SKOV-3 y OV-90 fueron transfectadas con miR-145, miR-23b, la mezcla de ambos miRs (Mix) y una secuencia aleatoria de miRs (Scramble, Sc) por 48 horas a 37°C. Se utilizaron como control las condiciones B (Basal, sin estímulo), C (Control, sólo reactivo de transfección) y Sc. Se utilizó el RNA nuclear pequeño U6 (RNU6) como control de qPCR. N=3 para las células A2780, SKOV-3 y OV-90. Para (A), (B) y (C): † = $p < 0.05$, †† = $p < 0.01$ y ††† = $p < 0.001$ respecto a la condición B; # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$ y ### = $p < 0.001$ con respecto a C; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$ respecto a la condición Sc (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Los resultados se expresan como error estándar de la media (SEM).

4.1.2. Evaluación de la proliferación celular mediante conteo celular e inmunofluorescencia de Ki-67 post-transfección con miR-145 más miR-23b.

Para evaluar si la co-transfección de miR-145 más miR-23b produce cambios en la proliferación de las líneas celulares de cáncer ovárico epitelial, se realizó conteo celular (utilizando imágenes de inmunofluorescencia de Ki-67) y se detectaron los niveles de Ki-67 mediante inmunofluorescencia.

Los resultados de conteo celular mostrados en la Figura 3, indican que no existen diferencias significativas en el número de células entre las condiciones controles B, C y Sc en las líneas celulares de cáncer ovárico epitelial. Esto, también se puede evidenciar en las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 5).

Teniendo en cuenta estos resultados, los datos fueron normalizados con respecto a la condición C, con el fin de facilitar el análisis estadístico de los resultados de conteo celular posterior a la transfección con los miRs (Figura 4).

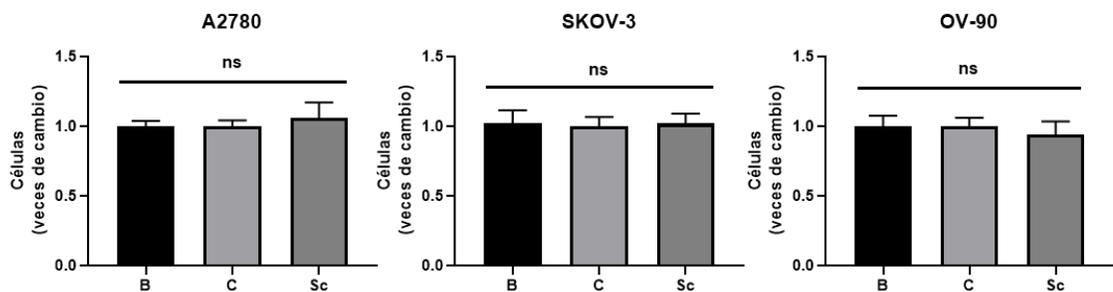


Figura 3. Número de células de COE luego del tratamiento con los controles B, C y Sc. El conteo de células de COE se realizó a partir de imágenes de inmunofluorescencia de Ki-67 utilizando el programa Fiji Image J (Se analizaron 3-4 fotos de inmunofluorescencia de Ki-67 por condición en magnificación de 400X). Los grupos experimentales se muestran normalizados con respecto a la condición C. N= 4 para A2780, SKOV-3 y OV-90. Las condiciones se compararon mediante test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn. Los resultados se expresan como error estándar de la media (SEM).

Por otra parte, los resultados de los experimentos de conteo celular posterior a la transfección con miRs, muestran diferencias significativas en el número de células A2780 con respecto a C al transfectar con miR-145, miR-23b y la mezcla de ambos miRs, disminución que fue de un 43%, 53% y 57% respectivamente (Figura 4A).

En el caso de las células SKOV-3 y OV-90, la disminución en el número de células se observó sólo al transfectar con miR-23b y la condición mix, obteniéndose una disminución de un 32% (miR-23b) y 29 % (mix) en el caso de las células SKOV-3, mientras que, en el caso de las células OV-90 esta reducción fue de 34% (miR-23b) y 42% (mix) con respecto a la condición control (Figura 4B y 4C).

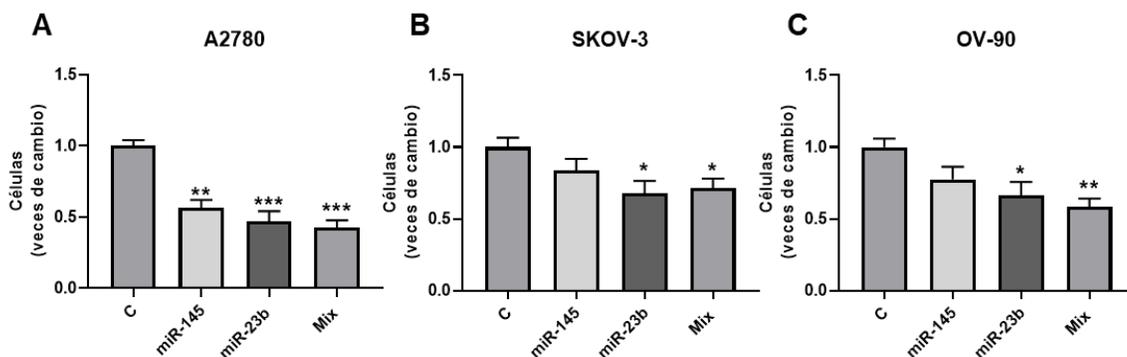


Figura 4. Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en el número de células de COE. El Conteo de células de COE se realizó a partir de imágenes de inmunofluorescencia de Ki-67 utilizando el programa Fiji Image J (Se analizaron 3-4 fotos por condición en magnificación de 400X. Las condiciones se normalizaron con respecto a la condición C. N= 4 para A2780 (A), SKOV-3 (B) y OV-90 (C). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Los resultados se expresan como error estándar de la media (SEM).

En el caso de los resultados de inmunofluorescencia de Ki-67, se pudo determinar que no existen diferencias significativas en la inmunodetección del marcador de

proliferación celular Ki-67 entre las condiciones controles B, C y Sc (Figura 5). Por consiguiente, los datos fueron normalizados con respecto a C, al igual que en el experimento anterior.

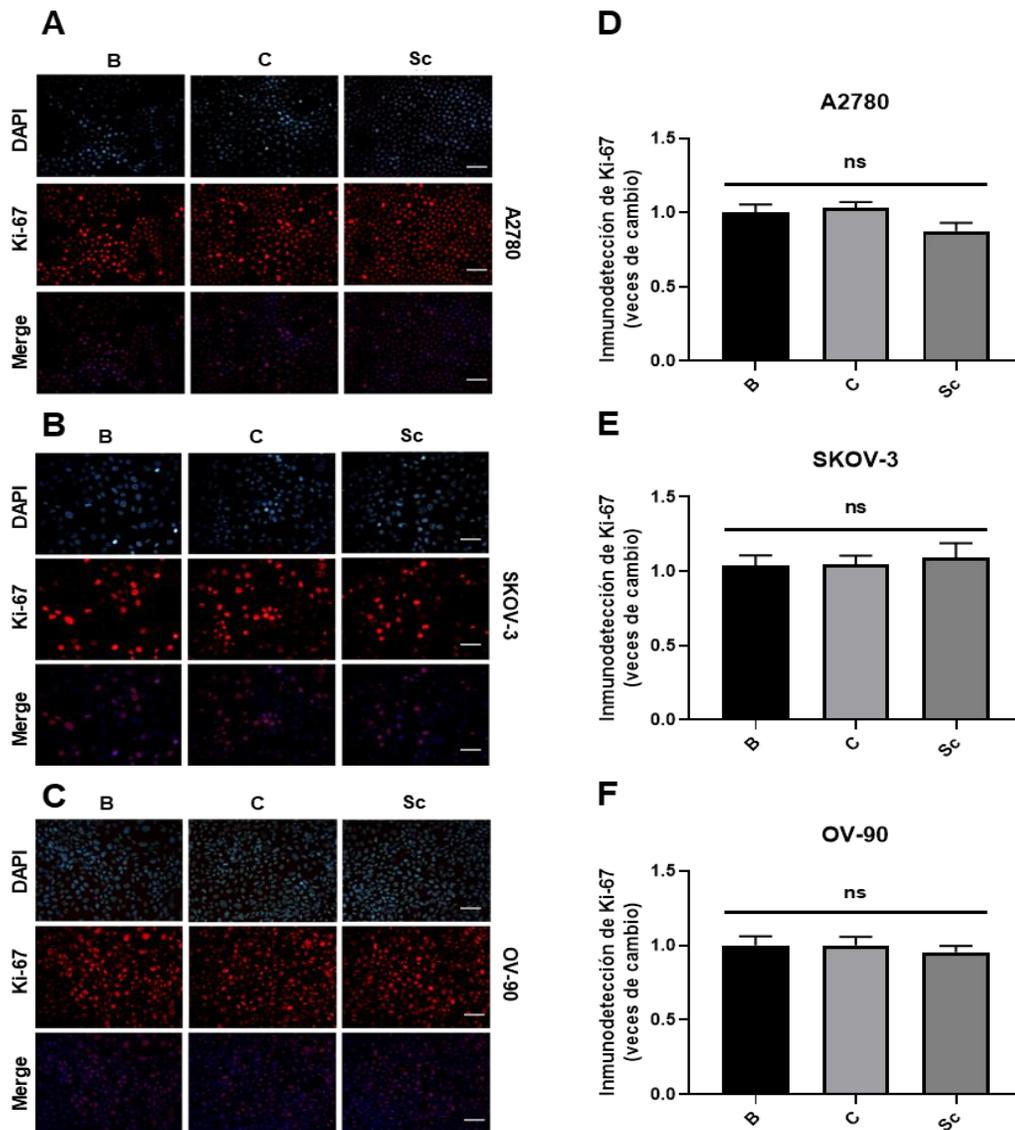


Figura 5. Efecto de B, C y Sc en el marcador de proliferación celular Ki-67. La proliferación de las células fue medida mediante inmunofluorescencia de Ki-67. **(A)**, **(B)** y **(C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Ki-67 (rojo). Las imágenes se obtuvieron utilizando un aumento de 400x. Las barras corresponden a 50 μ m. **(D)**, **(E)** y **(F)** Análisis de inmunofluorescencia de Ki-67 en células de cáncer de ovario. La inmunofluorescencia se evaluó con el software informático Image Pro Plus 6.2. Las condiciones se normalizaron con respecto a la condición control, C. N= 4 (4–6 fotos por condición). Test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn. Los resultados se expresan como error estándar de la media (SEM).

Los resultados de inmunofluorescencia posterior a la transfección con miRs en células A2780 (Figura 6A y 6D), muestran que la transfección con miR-145, miR-23b y la co-transfección de miR-145 más miR-23b (mix), disminuyen de manera significativa la inmunodetección del marcador de proliferación celular Ki-67 con respecto a la condición control. Por otra parte, en las líneas celulares SKOV-3 (Figura 6B y 6E) y OV-90 (Figura 6C y 6F), sólo se puede observar una disminución significativa de Ki-67 al sobreexpresar miR-23b y la combinación de miR-145 más miR-23b.

Si bien la sobreexpresión de miR-145 y miR-23b por separado puede disminuir la abundancia de Ki-67, los resultados indicarían que esto depende de la línea celular de COE sobre la cual se esté realizando el tratamiento, ya que no todas las líneas celulares disminuyen su proliferación cuando se transfectan los miRs por separado, por el contrario, al transfectar con la mezcla de ambos miRs, la disminución del marcador de proliferación celular Ki-67 se puede observar en las tres líneas celulares llegando a disminuir en un 49%, 37% y 33% con respecto a C en células A2780, SKOV-3 y OV-90 respectivamente (Figura 6).

En conjunto, los resultados de inmunofluorescencia de Ki-67 y conteo celular, indican que la co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación en células de COE.

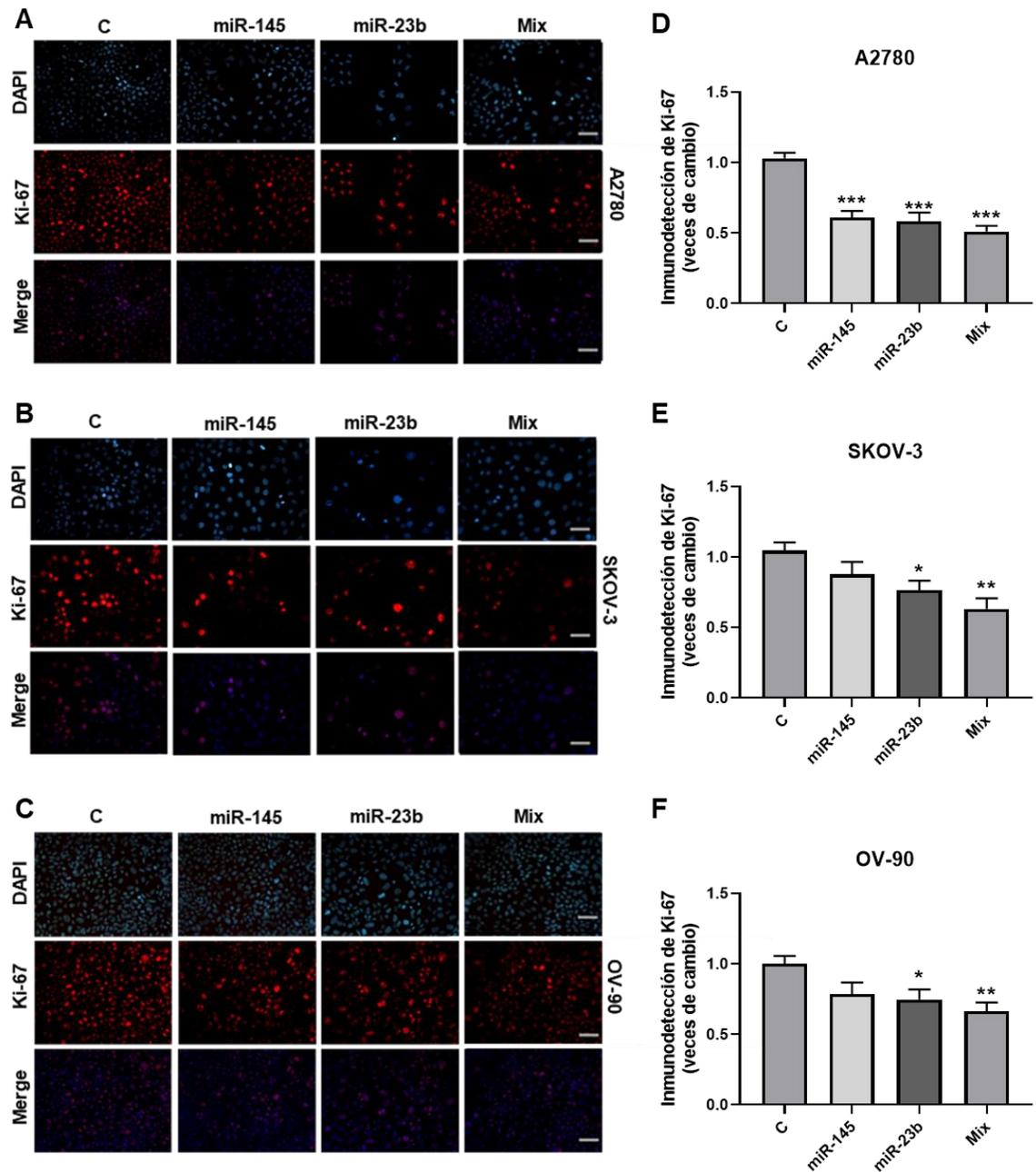


Figura 6. Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en el marcador de proliferación celular Ki-67. La proliferación de las células fue medida mediante inmunofluorescencia de Ki-67. **(A), (B) y (C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Ki-67 (rojo) bajo las respectivas condiciones. Las imágenes se obtuvieron utilizando un aumento de 400x. Las barras corresponden a 50 μ m. **(D), (E) y (F)** Análisis de inmunofluorescencia de Ki-67 en células de cáncer de ovario. La inmunofluorescencia se evaluó con el software informático Image Pro Plus 6.2. Para la semi-cuantificación de la fluorescencia, los datos fueron normalizados con respecto a la condición control, C. N= 4 (4–6 fotos por condición). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Los resultados se expresan como error estándar de la media (SEM).

4.1.3. Evaluación de la migración e invasión celular post-transfección con miR-145 más miR-23b.

Las células de cáncer, además de proliferar activamente, tienen la capacidad de migrar e invadir facilitando el escape de células tumorales a otros tejidos, promoviendo la progresión del cáncer. Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-145 más miR-23b en la capacidad de migrar e invadir de las células de COE, se realizaron ensayos de migración e invasión utilizando insertos transwell.

Es importante considerar que se determinó el efecto de las condiciones controles anteriormente mencionadas (B, C y TR) en la migración e invasión de las células de COE, corroborando que no existen diferencias significativas entre estas condiciones. Por consiguiente, se consideró a la condición C como control para los resultados descritos a continuación.

Los resultados de migración para las células de COE se muestran en la Figura 7. En el caso de las células A2780 (Figura 7A y 7D), se puede evidenciar una disminución significativa de la migración celular con respecto a la condición control, tanto al transfectar con los miRs por separado, como también con el mix. De esta manera, la migración celular de las células A2780 se redujo en un 29%, 23% y 44% al trasfectar con miR-145, miR-23b y mix respectivamente. Esta diferencia significativa también se observó al comparar miR-23b con la condición mix, obteniendo una disminución mayor en la migración celular al co-transfectar con ambos miRs (figura 7D).

En células SKOV-3 (Figura 7B y 7E) se pudo determinar una disminución significativa de la migración al transfectar con miR-145, miR-23b o su combinación con respecto a la condición control. De este modo, Los resultados indican que la sobreexpresión de los miR redujo la migración de las células SKOV-3 en un 24% (miR-145), 34% (miR-23b) y 38% (mix), con respecto a la condición control. Esta disminución también se pudo observar entre el grupo transfectado solo con el miR-145 y el grupo transfectado con ambos microRNAs, obteniéndose una mayor disminución al transfectar con el mix que con miR-145 (Figura 7E).

Por otra parte, en las células OV-90, se puede constatar una disminución significativa en la migración celular por efecto de la co-transfección (mix), no sólo con respecto a la condición control, sino también, con respecto a la transfección con miR-145 y miR-23b por sí solos (Figura 7C y 7F). Con respecto a C la migración disminuyó en un 23% (miR-145), 27% (miR-23b) y 40% (mix).

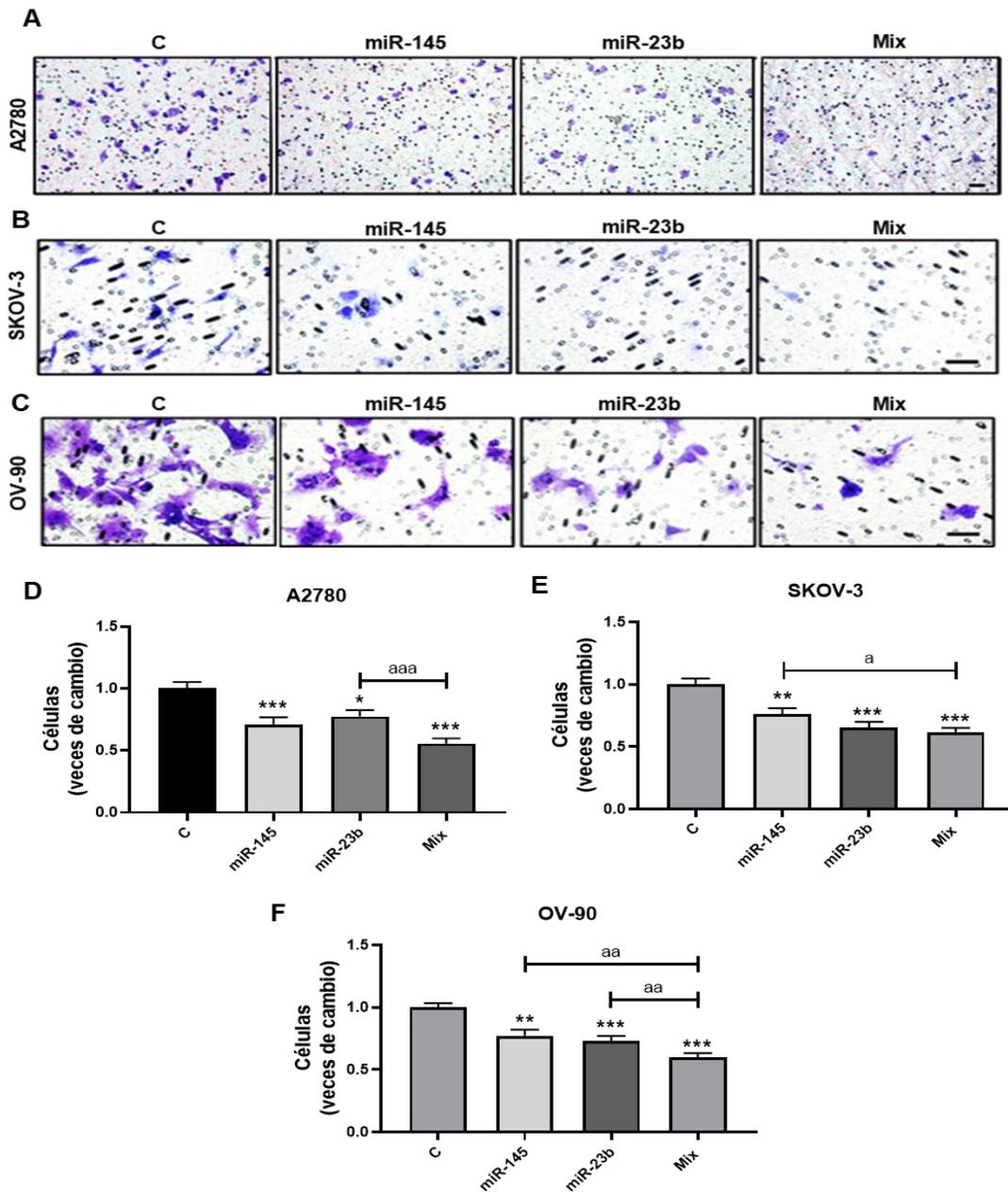


Figura 7. Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en la migración de células de COE. La migración se realizó utilizando insertos transwell, según lo descrito en la sección metodología. **(A), (B) Y (C)** Imágenes representativas de ensayos de migración posterior al tratamiento con las diferentes condiciones. Las células migraron a 37 °C durante 8 horas (A2780), 4 horas (SKOV-3) y 24 horas (OV-90). Barras corresponden a 50 μ m. **(D), (E) y (F)**. Los gráficos fueron expresados como veces de cambio con respecto a la condición control, C. N=3 (6-8 fotos por condición). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$ (test de Mann-Whitney). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).

Considerando que los resultados de migración en células de COE indican un efecto similar o incluso mejor en la inhibición de la migración al co-transfectar con la mezcla de miRs, para llevar a cabo los ensayos de invasión en las células de COE se consideraron solo las condiciones control (C) y mix.

Los resultados de invasión en células A2780, SKOV-3 y OV-90, muestran una disminución significativa en la invasión celular al transfectar con la mezcla de ambos miRs ($p < 0.001$) con respecto a la condición control en las tres líneas celulares (Figura 8). De esta manera, en células A2780 (Figura 8A y 8B) la invasión disminuyó en más de un 80% al cotransfectar con los miRs, mientras que, en el caso de las células SKOV-3 (Figura 8C y 8D) y OV-90 (Figura 8E y 8F) la invasión disminuyó aproximadamente en un 44% y 55% respectivamente comparado con la condición control.

Por consiguiente, los resultados indican que la mezcla de miR-145 más miR-23b provoca una significativa disminución en la capacidad de migrar e invadir de las células de COE. Adicionalmente, los resultados indican que existe un mayor efecto inhibitorio en la migración celular al utilizar la mezcla de miR-145 más miR-23b comparado con la sobreexpresión de los miRs por separado.

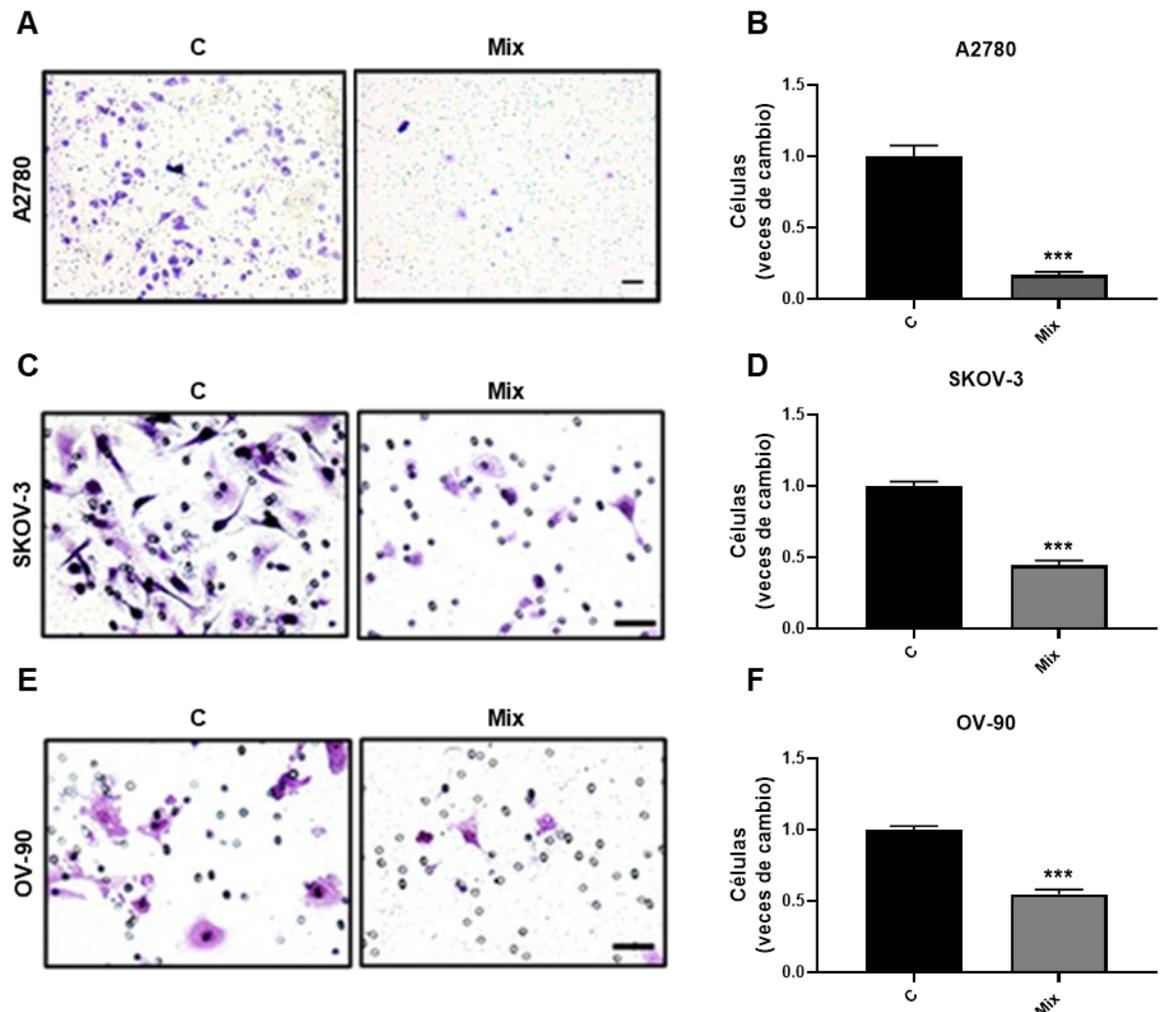


Figura 8. Efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b en la invasión de células de COE. La invasión se realizó utilizando insertos transwell recubiertos con matrigel, de acuerdo con lo descrito en la sección metodología. **(A), (C) Y (E)** Imágenes representativas de ensayos de invasión posterior al tratamiento con miRs. Las células invadieron a 37 °C durante 24 horas (A2780 y OV-90) y 16 horas (SKOV-3). Barras corresponden a 50 μ m. **(B), (D) y (F)**. Los resultados fueron expresados como veces de cambio con respecto a la condición control, C. N=3 (10 fotos por condición). *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Mann-Whitney). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).

4.2. Objetivo específico N°2

“Determinar si los niveles proteicos de c-MYC, ZEB1 y ABCB1, post-transfección con miR-145 más miR-23b disminuyen en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90 de cáncer ovárico epitelial”

Para llevar a cabo estos ensayos, en primer lugar, se comparó el efecto de las condiciones control (B, C y Sc) en los niveles de c-MYC, ZEB1 y ABCB1 de células A2780, SKOV-3 y OV-90. Se determinó que no existen diferencias significativas en los niveles de ninguna de las proteínas estudiadas entre estas condiciones control. Considerando esto, los resultados de la semi-cuantificación de los western-blot se normalizaron con respecto a la condición C.

4.2.1. Determinación de los niveles de c-MYC postransfección con miR-145 más miR-23b mediante Western blot en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90.

Los resultados respecto a los niveles de c-MYC en células A2780 posterior a la transfección (Figura 9A y 9B), muestran una disminución significativa en los niveles de este factor transcripcional al sobreexpresar miR-145, miR-23b o la mezcla de ambos con respecto a la condición control. De este modo, al transfectar células A2780 con miR-145, los niveles de c-MYC disminuyeron en un 34%, mientras que al transfectar con miR-23b y mix, los niveles de c-MYC disminuyeron en un 36% y 42% respectivamente.

Un efecto similar se pudo constatar en las células SKOV-3 (Figura 9C y 9D) y OV-90 (Figura 9E y 9F), donde se obtuvo una disminución significativa de los niveles de c-MYC sólo en las condiciones miR-23b y mix, con respecto a la condición control. Al sobreexpresar los microRNAs, los niveles de esta oncoproteína disminuyeron en un 35 % (con miR-23b) y 46% (con el mix) en las células SKOV-3. En tanto, c-MYC se redujo en un 51% y 54% al tratar células OV-90 con miR-23b y mix respectivamente.

Estos resultados permiten concluir que la mezcla de miR-145 más miR-23b disminuye los niveles de c-MYC en las tres líneas celulares de COE.

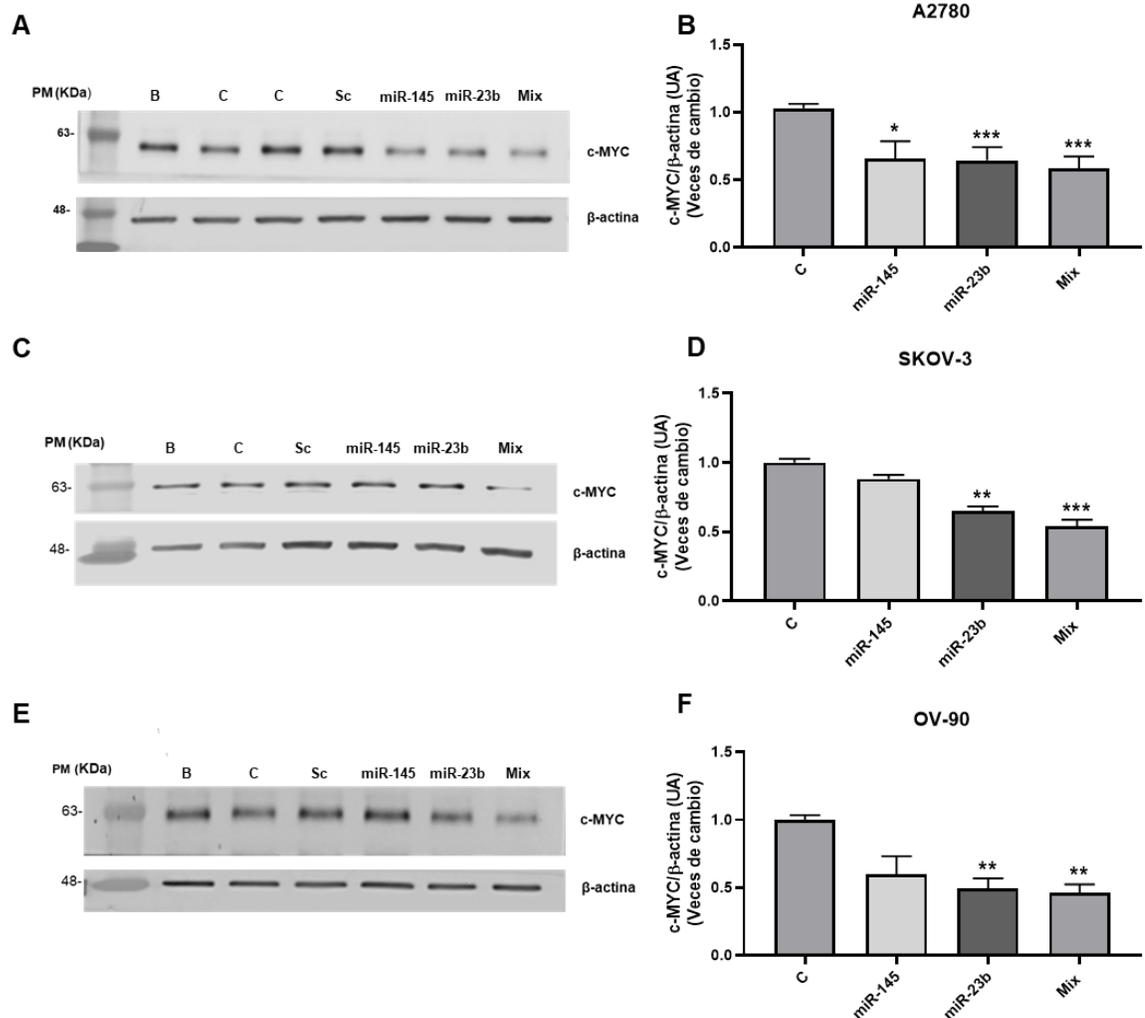


Figura 9. Western blot de c-MYC en células de COE. (A), (C) y (E) Imágenes representativas de niveles proteicos de c-MYC (57-65 kDa) en células A2780 (A), SKOV-3 (C) y OV-90 (E). Se cargaron 50 μ g proteínas (A2780 y OV-90) y 80 μ g de proteínas (SKOV-3). Como control de carga, se utilizó β -actina (42 kDa). PM, peso molecular en Kilodalton (kDa). (B), (D) y (F) Análisis semicuantitativo de las bandas de Western blot en células de COE posterior a la transfección con las diferentes condiciones. Los resultados fueron normalizados con respecto a β -actina y estos fueron expresados como veces de cambio respecto a la condición control, C. UA, unidades arbitrarias. N=4 en duplicado. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).

4.2.2. Determinación de los niveles de ZEB1 post-transfección con miR-145 más miR-23b mediante Western blot en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90.

ZEB1 es un factor transcripcional cuyo peso molecular (PM) es de 200 KDa, sin embargo, al realizar los ensayos Western blot, se pudo evidenciar la presencia de bandas adicionales, al cargar 50 µg de proteína de la condición basal. Estas fueron más intensas en células SKOV-3 comparada con la banda de 200 kDa y a su vez, con las observadas en células A2780 y OV-90 (Figura 10A). En el caso de las células OV90, estas bandas extra se pudieron visualizar al cargar 80 µg de proteína (Figura 10B), lo que indica que las células OV-90 presentan menores niveles basales de ZEB1 que las células A2780 y SKOV-3.

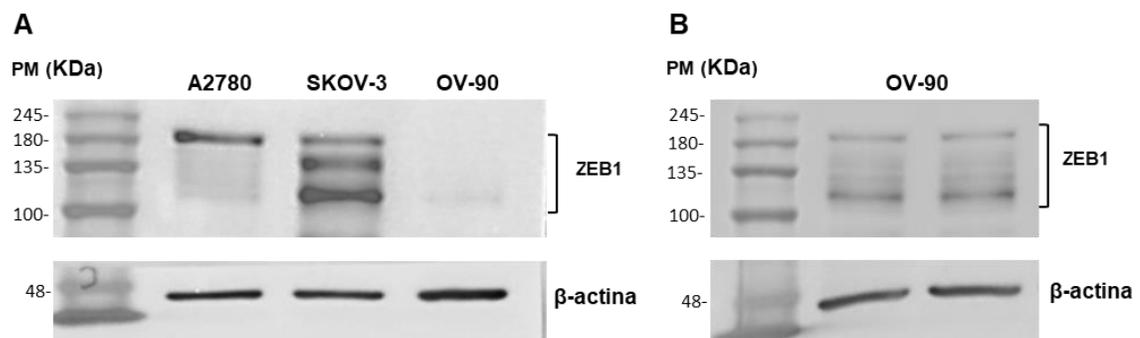


Figura 10. Niveles de ZEB1 en líneas celulares de COE. (A) Imagen representativa de niveles basales de ZEB1 (200 kDa) en células A2780, SKOV-3 y OV-90. Se cargaron 50 µg de proteínas. **(B)** Niveles basales de ZEB1 en células OV-90 al cargar 80 µg de proteínas. Se realizó un duplicado de la condición basal. Para **(A)** y **(B)** se utilizó β-actina (42 kDa) como control de carga.

Debido a que se ha descrito que estas bandas corresponderían a isoformas de ZEB1 en células de COE (64) y con el fin de determinar el efecto de la co-

transfección de miR-145 y miR-23b sobre esta oncoproteína, se realizó la semi-cuantificación y el análisis de datos de las bandas ubicadas entre 100 y 200 kDa.

Los resultados en células A2780 se muestran en la figura 11. Se puede observar la presencia de 3 bandas en células A2780 (Figura 11A) siendo más intensa la de 200 kDa (isoforma 1). El análisis de datos para la isoforma 1, muestra una disminución de los niveles de ZEB1 en las condiciones miR-145, miR-23b y mix comparado con la condición control. De este modo, los niveles de ZEB1 disminuyeron en un 29% al sobreexpresar miR-145, 39% al sobreexpresar miR-23b y 41% al sobreexpresar ambos microRNAs (Figura 11B).

En el caso de las isoformas 2 (Figura 11C) sus niveles también fueron afectados por la transfección de miR-23b y mix. De este modo, los niveles de la isoforma 2 de ZEB1, disminuyó en un 32% y 56% al transfectar con miR-23b y mix respectivamente. En el caso de la isoforma 3 (Figura 11D) esta presentó una disminución de un 27% (miR-23b) y 41% (mix) con respecto a la condición control.

Con los datos de las tres isoformas, se realizó un gráfico de ZEB1 total (Figura 11E), en donde se observa una disminución significativa de los niveles proteicos de ZEB1 al transfectar con miR-23b y mix con respecto al control. Su abundancia disminuyó a un 26% transfectando con miR-23b y a un 46% Con la mezcla de ambos microRNAs.

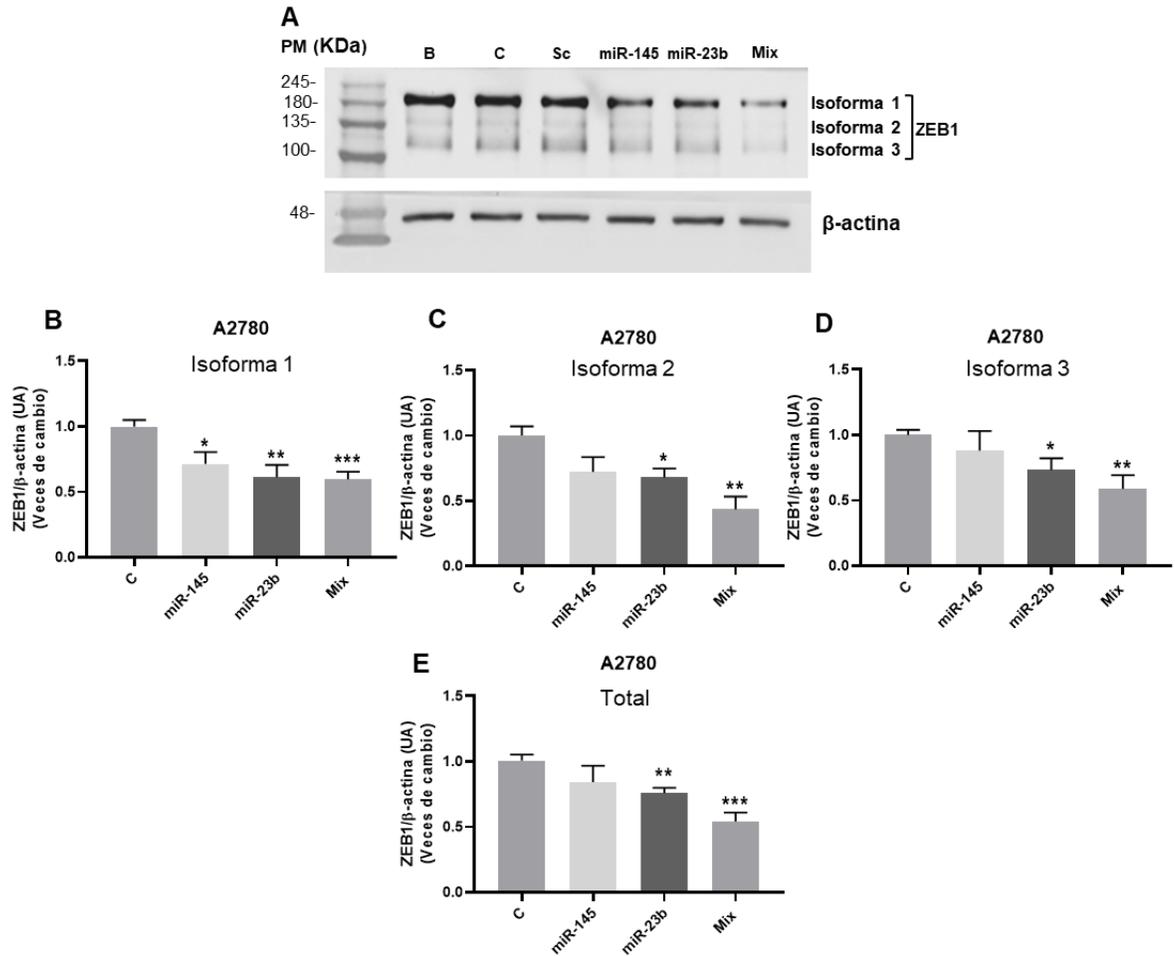


Figura 11. Western blot de ZEB1 en células A2780. (A) Imagen representativa de niveles proteicos de ZEB1 (200 kDa) en células A2780. Se cargaron 50 μ g de proteínas. Como control de carga, se utilizó β -actina (42 kDa). **(B), (C), (D)** y **(E)** Análisis semicuantitativo de las bandas de Western blot en células A2780 posterior a la transfección con las diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con respecto a β -actina y expresados como veces de cambio respecto a la condición control, C. N=4. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ con respecto a C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).

En el caso de las células SKOV-3, se pudieron evidenciar 3 isoformas, sin embargo, a diferencia de lo observado en las células A2780, la isoforma 1 de aproximadamente 200 kDa, es menos intensa comparado con las isoformas 2 y 3 que presentan una mayor densidad (Figura 12A).

Al realizar el análisis estadístico de la isoforma 1 de ZEB1 en células SKOV-3, se obtuvo una disminución significativa en los niveles de este factor transcripcional luego de transfectar con miR-23b y mix comparado con C. De este modo, los niveles de la isoforma 1 de ZEB1 disminuyeron en un 35% (miR-23b) y en un 41% (mix) con respecto a la condición control (Figura 12B). En el caso de la isoforma 2, los niveles de esta proteína disminuyeron en un 57% cuando se transfectó con mix (Figura 12C).

Por otra parte, la sobreexpresión de los miRs mostró diferencias en la isoforma 3 de ZEB1, que es la isoforma más intensa (Figura 12A). El análisis estadístico indica diferencias significativas en las condiciones miR-23b y mix comparado con la condición control, obteniendo una reducción aproximada de un 30% y 50% respectivamente en los niveles de esta isoforma de ZEB1 (Figura 12D).

Con los datos de las tres isoformas, se realizó un gráfico de ZEB1 total (Figura 12E), en donde se observó una disminución significativa de los niveles proteicos al transfectar con miR-23b y mix con respecto a la condición control. De este modo, ZEB1 total disminuyó a un 38% y 55% al transfectar con miR-23b y ambos miRs respectivamente.

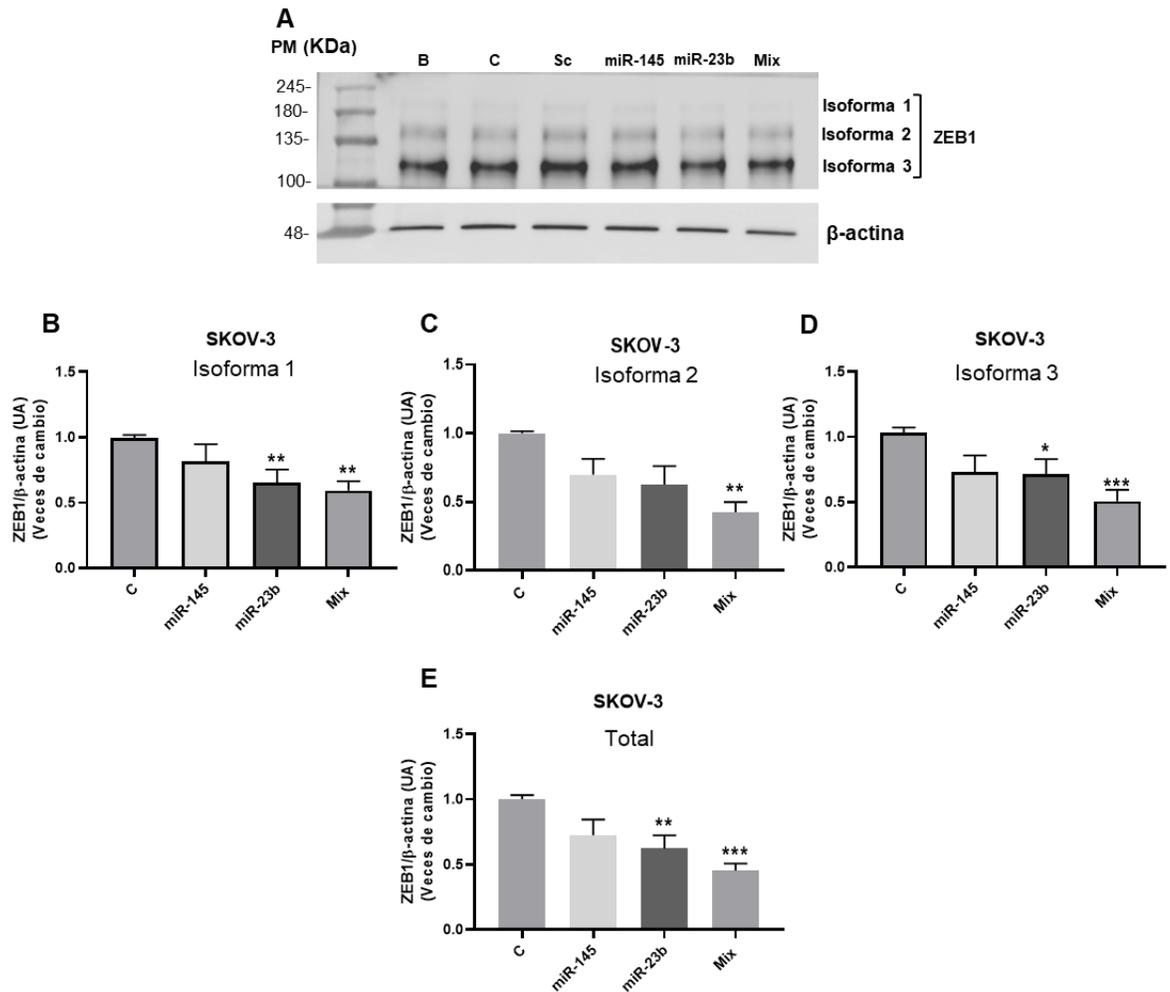


Figura 12. Western blot de ZEB1 en células SKOV-3. (A) Imagen representativa de niveles proteicos de ZEB1 (200 kDa) en células SKOV-3. Se cargaron 50 μ g de proteínas. Como control de carga, se utilizó β -actina (42 kDa). (B), (C), (D) y (E) Análisis semicuantitativo de las bandas de Western blot en células SKOV-3 posterior a la transfección con las diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con respecto a β -actina y C. N=4. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).

Por otra parte, en las células OV-90, se pueden apreciar dos isoformas principales de ZEB1 (Figura 13A). Una de éstas tiene un peso aproximado de 200 kDa (isoforma 1) mientras que la otra se puede visualizar entre los 100 y 135 kDa (isoforma 2).

En el caso de la isoforma 1 de ZEB1 en células OV-90, se puede observar una disminución significativa de sus niveles al transfectar con miR-145, miR-23b y mix con respecto a la condición control. De este modo, la isoforma disminuyó en un 46%, 29% y 60% al transfectar con miR-145, miR-23b y mix respectivamente (Figura 13B).

Por otra parte, en la isoforma 2 de ZEB1, las diferencias significativas sólo se pudieron observar al transfectar con mix, condición en la que se observó un 57% de disminución respecto al control (Figura 13C).

Con los datos de las dos isoformas, se realizó un gráfico de ZEB1 total (Figura 13D), en dónde se observó una disminución significativa de los niveles proteicos al transfectar con miR-145 y mix con respecto al control. De esta manera, ZEB1 total en células OV-90 disminuyó en un 37% y 70% al transfectar con miR-145 y mix respectivamente.

En conjunto, los resultados indican una disminución en los niveles de ZEB1 posterior a la co-transfección de miR-145 más miR-23b en las líneas celulares de COE.

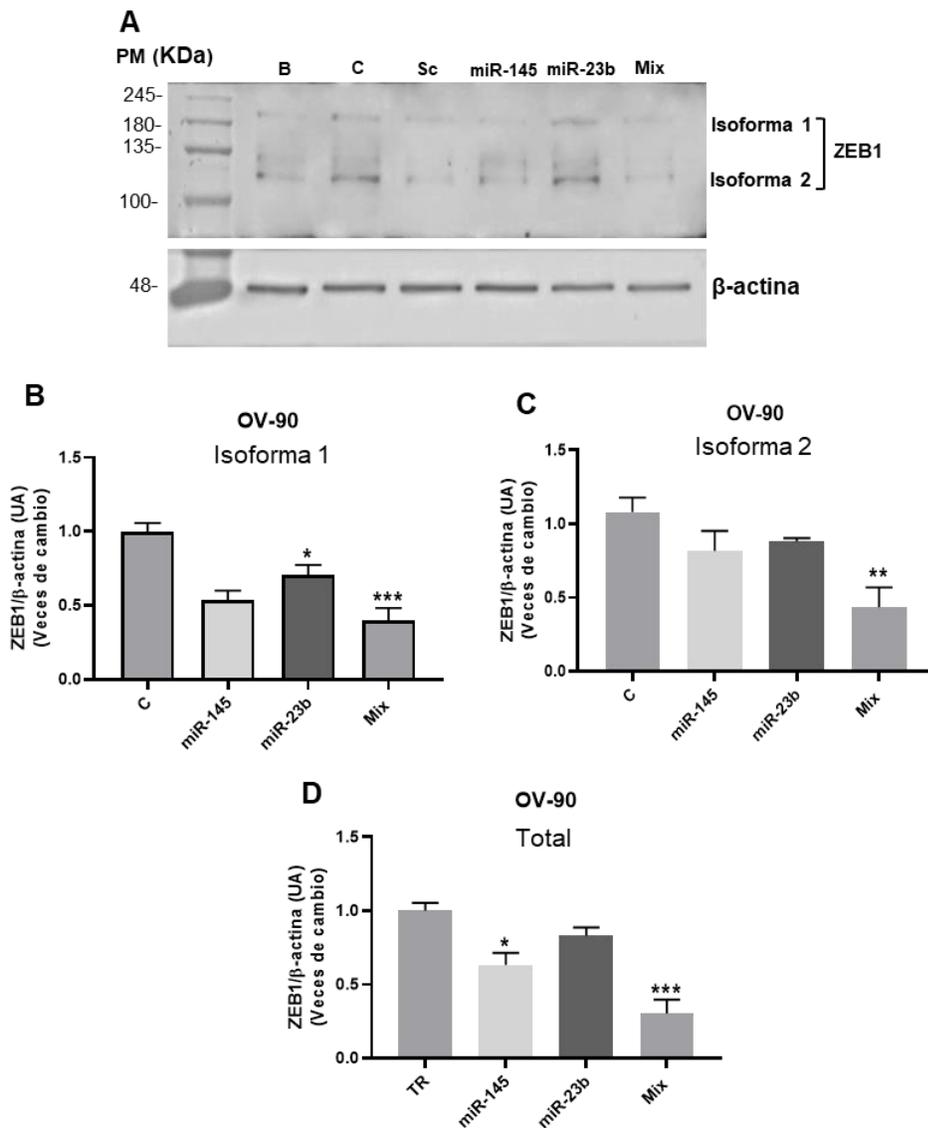


Figura 13. Western blot de ZEB1 en células OV-90. (A) Imagen representativa de niveles proteicos de ZEB1 (200 kDa) en células OV-90. Se cargaron 80 µg de proteínas. Como control de carga, se utilizó β-actina (42 kDa). (B), (C) y (D) Análisis semicuantitativo de las bandas de Western blot en células OV-90 posterior a la transfección con las diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con respecto a β-actina y C. N=4. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).

4.2.3. Determinación de los niveles de ABCB1 post-transfección con miR-145 más miR-23b mediante Western blot en líneas celulares A2780, SKOV-3 y OV-90.

ABCB1 es una proteína con un peso molecular que oscila entre los 130-180 kDa. En la figura 14, se muestran los niveles de ABCB1 en células de COE al cargar 80 µg de proteínas de la condición basal. En células SKOV-3 se puede evidenciar la presencia de dos bandas, una banda tenue entre los 135-180 kDa y otra banda más intensa entre los 75-100 kDa, por lo que se consideraron estas dos bandas para la semi-cuantificación y análisis estadístico posterior (65). En el caso de las células A2780, sólo se observa una banda entre los 135-180 kDa, mientras que en las células OV-90 se observa una banda tenue alrededor de los 100 kDa, Además, se hace evidente que las células OV90 expresan menores niveles de ABCB1 comparado con las otras 2 líneas celulares.

Debido a que las células OV-90 presentan niveles muy bajos de ABCB1 de forma basal, no fue posible determinar los niveles de esta proteína mediante Western blot, por lo que lo que se trabajó sólo con las células A2780 y SKOV-3.

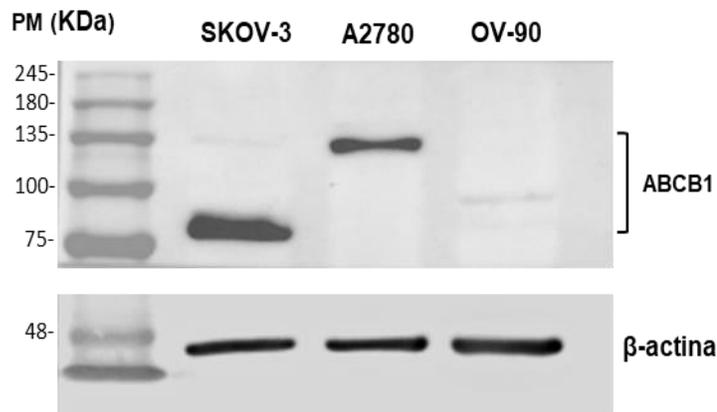


Figura 14. Niveles de ABCB1 en líneas celulares de COE. Imagen representativa de niveles basales de ABCB1 (130-180 kDa) en células SKOV-3, A2780 y OV-90. Se cargaron 80 μ g de proteínas. Se utilizó β -actina (42 kDa) como control de carga.

En el caso de los niveles de ABCB1 en células A2780, se puede observar una disminución en los niveles de la proteína al transfectar con miR-145, miR-23b y mix con respecto a la condición control (Figura 15A y 15B). De este modo, ABCB1 se redujo en un 34% al sobreexpresar con miR-145 y miR-23b por separado, mientras que al transfectar con la mezcla de ambos miRs los niveles del transportador de eflujo de fármacos disminuyeron en un 56%.

En células SKOV-3, se pueden observar dos bandas, las cuales se indican como isoforma 1 y 2 de ABCB1 (Figura 15C). Los resultados para la isoforma 1, muestran una disminución en los niveles de la proteína cuando se transfecta con los miRs, comparado con la condición control. Esta disminución alcanzó un 40%, 63% y 78% al transfectar con miR-145, miR-23b y mix respectivamente (Figura 15D).

En el caso de la isoforma 2 de ABCB1, se observó una disminución en los niveles proteicos luego de transfectar con la condición mix comparado con la condición control, alcanzando un 60% de reducción (Figura 15E).

Con los datos de las dos isoformas, se realizó un gráfico de ABCB1 total (Figura 15F). Los resultados muestran una disminución en los niveles de ABCB1 total en la condición miR-23b y mix comparado con la condición control. De esta manera, ABCB1 total en células SKOV-3 disminuyó en aproximadamente un 45% y 70% al transfectar con miR-23b y mix respectivamente.

Los resultados permiten concluir que la co-transfección de miR-23b y miR-145 disminuyen los niveles del transportador de eflujo de fármacos ABCB1 en líneas celulares de COE.

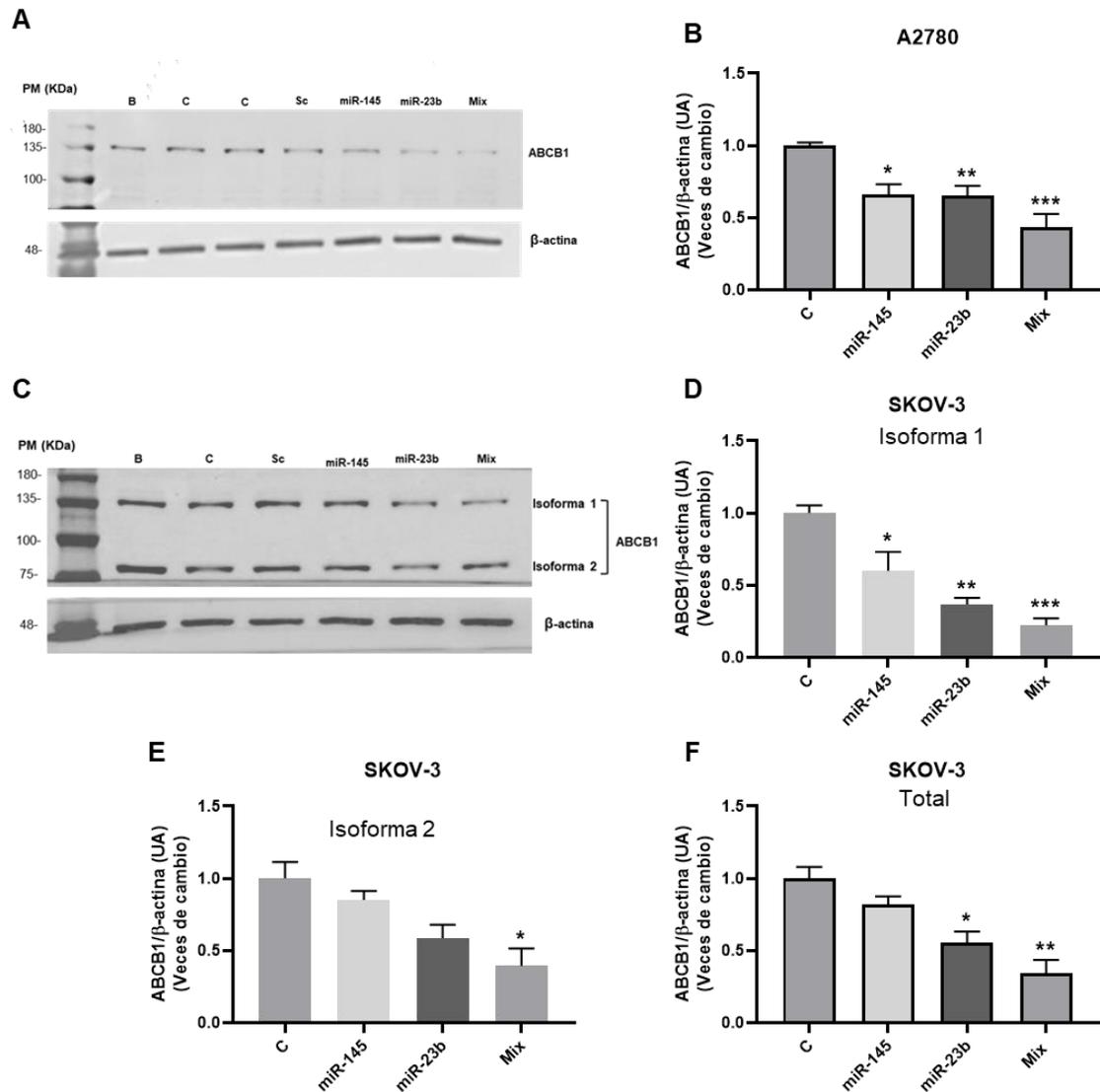


Figura 15. Western blot de ABCB1 en A2780 y SKOV-3. (A) y (C) Imágenes representativas de niveles proteicos de ABCB1 (130-180 kDa) en células A2780 (A) y SKOV-3 (C). Se cargaron 80 µg proteínas. Como control de carga, se utilizó β-actina (42 kDa). (B), (D), (E) y (F) Análisis semicuantitativo de las bandas de Western blot en células de COE posterior a la transfección con las diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con respecto a β-actina y C. N=4. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ comparados con respecto a la condición C (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn). Resultados expresados como error estándar de la media (SEM).}

4.3. Resumen de resultados

Luego de realizar la transfección con miR-145, miR-23b y la mezcla de ambos miRs en células de COE, se pudo corroborar la sobreexpresión de miR-145 y miR-23b al utilizar el protocolo de transfección transiente.

Posteriormente se evidenció que la sobreexpresión de miR-145 más miR-23b disminuye no sólo la proliferación de las células de COE, sino también su migración e invasión. Estos resultados coinciden con la cuantificación de las proteínas oncogénicas que están involucradas en estos procesos, en dónde se observó una disminución de las proteínas c-MYC y ZEB1 al co-transfectar con mi-145 más miR-23b. Además, en el presente trabajo se determinó el efecto de miR-145 y miR-23b en ABCB1, proteína asociada a quimiorresistencia en células de COE, evidenciando una disminución en los niveles de este transportador al co-transfectar con ambos miRs.

De este modo, miR-145 más miR-23b disminuyen la proliferación, migración e invasión y los niveles de proteínas oncogénicas c-MYC, ZEB1 y ABCB1 en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial.

5. DISCUSIÓN

El cáncer ovárico epitelial es una neoplasia ginecológica que se caracteriza por su alta mortalidad. La baja supervivencia de las pacientes con CO se debe a que la enfermedad se diagnostica en estadios muy avanzados como una consecuencia de la sintomatología inespecífica y la falta de métodos diagnósticos adecuados que permitan una detección más temprana **(20)**. Sumado a esto, la quimioterapia en las pacientes con COE avanzado no muestra los resultados esperados **(7)**. Esto puede deberse a la existencia de otros factores moleculares que podrían estar participando en la progresión del cáncer de ovario, los cuales no están siendo considerados como blancos moleculares en la quimioterapia actual.

Nuestro grupo de laboratorio pudo determinar que NGF se encuentra sobre expresado en cáncer ovárico y este puede unirse al receptor TRKA, provocando un aumento en la expresión de proteínas oncogénicas que promoverán la proliferación, migración, invasión y quimiorresistencia. Actualmente se conoce que NGF promueve la progresión del cáncer ovárico debido a que disminuye la transcripción de miRs como miR-145 y miR-23b, los cuales regulan la expresión de proteínas oncogénicas **(36,39)**. De este modo, la disminución de miR-145 y de miR-23b se ha relacionado con mal pronóstico en una gran variedad de cánceres incluyendo cáncer colorrectal y de endometrio, entre otros **(66–70)**.

En cáncer ovárico nuestro grupo pudo observar que los niveles tanto de miR-145 como de miR-23b disminuyen con la progresión del cáncer ovárico, siendo

menores los niveles de estos miRs en biopsias de pacientes con cáncer ovárico de alto grado o pobremente diferenciado con respecto a las biopsias de tumores de ovario benigno **(36,39)**. Esto también se pudo comprobar en las líneas celulares de cáncer ovárico A2780 y SKOV-3 las cuales derivan de pacientes en estadios diferentes del cáncer, en el caso de las A2780, estas células derivan de tumor primario, mientras que las células SKOV-3 derivan de una paciente con ascitis, por lo que sus niveles de miR-145 se encuentran más reducidos **(39,71,72)**. Si bien aún no existen estudios que consideren a las células OV-90 en esta comparación, estas células son representativas de cáncer ovárico de alto grado, que es el tipo más agresivo de la enfermedad **(73)**, lo que puede llevar a deducir que los niveles de miRs supresores de tumores en estas células son menores que en células SKOV-3 y aun mucho menores que los presentados en A2780 y células HOSE (células de epitelio superficial del ovario no tumorales).

Teniendo en consideración que miR-145 y miR-23b son dos miRs que se encuentran disminuidos en cáncer ovárico epitelial y debido a que pueden modular una gran cantidad de proteínas, en este trabajo se quiso estudiar el efecto de la co-transfección de estos dos miRs supresores, en células de cáncer ovárico epitelial.

Para ello, los resultados fueron comparados con respecto a tres controles: B, C y Sc, correspondientes a tratamientos sólo con medio de cultivo, medio de cultivo más reactivo de transfección y la transfección con una secuencia aleatoria de miRs respectivamente. Si bien la condición Sc, es considerada el mejor control

entre éstos para evidenciar que el efecto obtenido no se debe a la incorporación de una secuencia aleatoria de miRs, en el presente trabajo se demostró que no existen diferencias significativas entre los tres controles en los ensayos realizados. Considerando además que los resultados fueron normalizados con respecto a la condición C desde el principio y con el fin de facilitar el análisis estadístico de los resultados, se consideró a la condición C como control.

Los resultados luego de la transfección con miR-145, miR-23b y la mezcla de ambos miRs en células de COE, mostraron la sobreexpresión de miR-145 y miR-23b al utilizar el protocolo de transfección transiente. El aumento en los niveles de miR-145 y miR-23b conseguido con la transfección parece ser 4 a 5 veces mayor mayor en células SKOV-3 y OV-90, comparado con las células A2780, en especial cuando se transfecta con la mezcla de ambos miRs. Esto podría explicarse debido a que SKOV-3 y OV-90 corresponden a células que pueden expresar menores niveles de miRs supresores de tumores (como miR-145) tal como se describió anteriormente. Este efecto de la co-transfección de miR-145 más miR-23b, puede deberse a que miR-145 puede regular la expresión de otros miRs, tal como se ha descrito en células de cáncer de páncreas en dónde la transfección con miR-145 provocó cambios en la expresión de 120 miRs **(74)**. El efecto de miR-145 sobre la modulación de otros miRs en cáncer ovárico epitelial, aún no está del todo claro, por lo que, los resultados de esta tesis sugieren que miR-145 modula la expresión de miR-23b. Investigaciones previas realizadas por nuestro grupo de investigación permitirían proponer un posible mecanismo **(39)**. Estudios in-silico muestran que

los mRNA de NGF, PI3K y Akt entre otras proteínas son blancos de miR-145 **(39)**. De este modo, cuando se transfecta con la condición mix, el miR-145 presente en la muestra podría reducir la expresión de NGF y, por consiguiente, disminuir la concentración de este factor de crecimiento, el que se uniría en menor proporción al receptor TRKA, disminuyendo con esto la activación de sus vías de señalización. Esto podría implicar una menor represión en la transcripción de los miRs supresores de tumores, provocando finalmente un aumento en los niveles de miR-145 y miR-23b en las líneas celulares de cáncer ovárico epitelial. Cabe recordar que en cáncer ovárico, NGF disminuye los niveles de miR-145, proceso que podría estar siendo regulado vía PI3K/Akt, tal como se ha comprobado en cáncer de pulmón de células no pequeñas **(75)**. De este modo la sobreexpresión de miR-145 podría inhibir la vía PI3K/Akt (la cual reprime su transcripción y la de otros miR supresores de tumores), aumentando con esto la transcripción de miR-145 y mi-23b. Estos mecanismos podrían actuar de forma complementaria en los modelos estudiados.

El aumento en los niveles celulares de miR-145 y de miR-23b luego de la co-transfección de ambos miRs, sumado a que ambos miRs tienen sus propios mRNAs oncogénicos como blancos, coincide con los resultados mostrados en esta tesis, en dónde la sobreexpresión de miR-145 más miR-23b disminuyó la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial y este efecto mostró ser mayor que el producido por la transfección de los miRs de manera independiente en los ensayos de migración.

Si bien, estudios realizados por nuestro grupo mostraron que la sobreexpresión de miR-145 y miR-23b por separado tienen efectos antitumorales **(39,76)**, estos estudios no se realizaron en líneas celulares de cáncer ovárico de alto grado (línea celular OV-90), que es el más frecuente y con mayor tasa de mortalidad **(73)**, por lo que el efecto de estos miRs en células representativas de la forma más agresiva de la enfermedad, hasta el momento era una incógnita. En el presente trabajo, se pudo observar que la transfección de los miRs en las células OV-90 produjo menores efectos antitumorales comparado con el efecto de éstos en las otras líneas celulares. Por ejemplo, en células A2780 (células consideradas menos metastásicas que las otras líneas celulares) se pudo observar una disminución de la proliferación y migración celular al transfectar con miR-145, miR-23b y también al co-transfectar con la mezcla de ambos miRs, mientras que en células OV-90 (modelo representativo de COE de alto grado) no siempre se pudo evidenciar efecto sobreexpresando los miR por separado. Esto sugiere que la magnitud del efecto de los miRs parece ser dependiente de la línea celular trabajada, por lo que el tratamiento con estos miRs podría tener mejores resultados en células de cáncer ovárico de bajo grado y, por consiguiente, en estadíos más tempranos del cáncer. A pesar de lo anterior, la sobreexpresión de miR-145 más miR-23b en conjunto, disminuyó la proliferación no solo en células de COE de bajo grado, sino también afectó a células de COE representativas de alto grado. Estos resultados coinciden con lo encontrado al evaluar diferentes oncoproteínas. Por ejemplo, la co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuye los niveles de c-MYC, que es un factor transcripcional oncogénico, que promueve la proliferación celular. Esto

concuenda con publicaciones realizados por el grupo de laboratorio en dónde se ha determinado que la sobreexpresión de miR-145 disminuye los niveles de este factor transcripcional **(39)**. Por otra parte, también se encuentra descrito que c-MYC es uno de los blancos moleculares de metformina, fármaco que disminuye la proliferación en células de COE. Interesantemente, metformina aumenta los niveles de miR-145 y miR-23b en células de cáncer ovárico epitelial, por lo que se ha propuesto que el aumento de estos miRs producirían la disminución de c-MYC entre otros efectos antitumorales que se le atribuyen a este fármaco **(76)**.

Por otra parte, se pudo observar que la co-transfección de miR145 más miR-23b disminuye la migración e invasión en células de cáncer ovárico epitelial, efecto que parece ser mucho mayor que la transfección de los miRs por separado en el caso de la migración. El efecto de miR-145 y miR-23b sobre la migración e invasión ya ha sido reportado en células de cáncer ovárico de bajo grado y en una gran variedad de otros cánceres **(39,58,77–81)**. Cabe destacar que el presente trabajo, mostró que la mezcla de ambos miRs pudo disminuir la proliferación y migración de manera significativa en las células de cáncer ovárico. Pero, además, el efecto que tiene este tratamiento sobre la invasión parece ser de mayor magnitud que el mostrado al evaluar proliferación y migración celular. Esto puede deberse a que tanto miR-145 como miR-23b pueden disminuir la expresión de ciertas metaloproteinasas (las cuáles son necesarias para la degradación proteínas de matriz extracelular), disminuyendo con ello la invasión de las células de COE **(82–84)**. Considerando esta información, decidimos estudiar la proteína

ZEB1, debido a que participa en el proceso de TEM y por consiguiente, en migración e invasión celular **(85)**.

Se observó que la co-transfección de miR-145 y miR-23b disminuyó los niveles proteicos de ZEB1, factor transcripcional que participa en la TEM, cuya expresión se ha relacionado con una menor supervivencia y su silenciamiento con una menor migración e invasión en cáncer ovárico epitelial **(86)**. Análisis in-silico efectuado en células de cáncer ovárico y cáncer de vejiga, muestran que ZEB1 es un blanco de miR-23b y la sobreexpresión de este miR, disminuye los niveles de este factor transcripcional **(36,60)**. Por otra parte, la disminución de ZEB1 luego de la transfección con miR-145 fue un resultado inesperado ya que no se encontró evidencia en la literatura que relacionara a miR-145 con este factor transcripcional, sin embargo, existen reportes en cáncer de próstata y cáncer pancreático en donde la sobreexpresión de miR-145 reprimió la expresión de ZEB1 **(87,88)**, lo que sugiere que miR-145 regula los niveles de ZEB1 directa o indirectamente.

Cabe destacar que en los ensayos Western blot para la determinación de ZEB1 en este trabajo, mostraron la presencia de bandas adicionales que también se ven disminuidas por efecto de la co-transfección de los miRs y que corresponderían a isoformas de ZEB1. Esta afirmación se basa en el hecho de que se han descrito 5 isoformas de ZEB1 producidas por empalme alternativo y algunos de los pesos moleculares reportados en estas isoformas concuerdan con las bandas adicionales de los ensayos **(64)**. Lamentablemente, existen escasos estudios que adviertan la presencia de isoformas de ZEB1 y el rol de estas en cáncer. En un

estudio realizado en células de cáncer de páncreas, se describió la presencia de diferentes transcritos de ZEB1 producidos por una poliadenilación alternativa de la transcripción, proceso que puede no sólo acortar regiones codificadas, sino que además puede provocar el acortamiento de la región 3' no codificada (3' UTR), luego del tratamiento con un quimioterapéutico. Lo interesante de esto, es que muchas de las regiones afectadas por este acortamiento, corresponden a los sitios de unión de miRs supresores de tumores que reprimen la traducción de ZEB1, por lo tanto, estos transcritos más cortos pueden estar en constante traducción y promover la TEM **(89,90)**. Esto se correlaciona con lo encontrado en el presente trabajo donde se pudieron observar bandas de menor peso molecular de manera más intensa que la banda de 200 kDa en células SKOV-3. Cabe mencionar que estas células son consideradas como altamente metastásicas, lo que podría deberse a la constante traducción de ZEB1 **(91)**. A pesar de esto, la co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuyó los niveles de las isoformas de ZEB1, concordando con la disminución de la migración e invasión en líneas celulares de COE.

Finalmente, se observó en células A2780 y SKOV-3 que miR-145, miR-23b y la co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuyen los niveles del transportador de eflujo de fármacos ABCB1. Esto concuerda con estudios realizados en cáncer ovárico donde se observó que la sobreexpresión de miR-145 disminuye los niveles de este transportador **(54)**, sin embargo, el efecto de la transfección de miR-23b sobre el transportador ABCB1 no ha sido reportado en cáncer ovárico ni en otros

tipos de cáncer. Es importante mencionar que en células SKOV-3 se observaron dos bandas, que pueden corresponder a isoformas o variante mutantes de este transportador originadas por polimorfismos o por empalme alternativo al igual que lo observado en el caso de ZEB1 **(65)**. Estudios realizados en distintos tipos de células, incluyendo líneas celulares de carcinoma hepatocelular, pudieron identificar 5 variantes transcripcionales de ABCB1 con diferentes longitudes. En las variantes más pequeñas, se observó un acortamiento de la región 3' UTR, región que contiene los sitios de unión para miRs supresores de tumores como miR-145. Este artículo además menciona que células resistentes a fármacos, presentan mayoritariamente variantes de ABCB1 más cortas que además pueden tener regiones 3' UTR más cortas, las cuáles al no tener o tener disminuidos los sitios de unión de los miRs supresores de tumores, se traducen de manera descontrolada **(92)**. Este puede ser el caso de las células SKOV-3, las cuáles son resistentes a una gran variedad de fármacos **(72)** y tal como se pudo observar en el presente estudio, parecen presentar altos niveles de una variante de ABCB1 de menor peso molecular. A pesar de esto, la co-transfección de miR-145 más miR-23b logró disminuir los niveles de las diferentes isoformas de ABCB1 en líneas celulares de COE. De este modo, considerando que ABCB1 se ha relacionado con la resistencia a múltiples fármacos y que su disminución puede restaurar la sensibilidad a la terapia, no sólo en cáncer ovárico, sino también en otros tipos de cánceres **(93–95)**, los miRs y en específico la mezcla de mi-145 más miR-23b puede ser una posible terapia que complemente a los fármacos existentes o a

nuevas formulaciones, evitando la expulsión de estos al reducir los niveles de uno de los principales transportadores que induce quimiorresistencia en cáncer (95).

Algo que cabe mencionar, es que en la presente investigación se observó que los niveles basales de ABCB1 están más aumentados en las líneas células A2780 y SKOV-3, las cuáles además tienen mayores niveles de factor transcripcional ZEB1 comparado con las células OV-90 (células con niveles reducidos de ABCB1 y ZEB1), lo que podría indicar una posible regulación entre estas dos proteínas oncogénicas y, por consiguiente, podría potenciar los procesos de metástasis y quimiorresistencia en COE. Cabe destacar que ZEB1, puede inducir el aumento del transportador de eflujo de fármacos ABCC1 en cáncer prostático (96).

Según lo presentado, la mezcla de miR145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión y los niveles de proteínas c-MYC, ZEB1 y ABCB1 en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial. Por lo tanto, la presente investigación permite plantear esta mezcla de miRs como una posible terapia que complemente a fármacos existentes, debido a su potencial como un posible supresor de tumores y a que al corresponder a moléculas endógenas que se encuentran disminuidas en cáncer, su administración puede no producir los efectos secundarios de la terapia convencional, mejorando con ello la calidad de vida de las pacientes. Considerando esto, es que se ha planteado la administración de miRs y metotrexato, asociados a nanopartículas de oro en células de cáncer ovárico epitelial (Sección 8. Anexo).

6. Conclusiones

1. La co-transfección de miR-145 más miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial.
2. Esta disminución se asocia con la reducción en los niveles de proteínas oncogénicas c-MYC y ZEB1 luego de la co-transfección de miR-145 más miR-23b.
3. Adicionalmente la mezcla de ambos miRs disminuye la proteína de eflujo de fármacos ABCB1.

7. Proyección

Considerando que la mezcla de miR-145 más miR-23b disminuye los niveles la proliferación, migración e invasión e incluso podría llegar a disminuir la quimiorresistencia de células de COE, la mezcla de ambos miRs podría utilizarse en nuevas formulaciones para el tratamiento del cáncer ovárico.

8. Actividades

8.1. Publicaciones durante el periodo de tesis

“Role of Mitochondria in Interplay between NGF/TRKA, miR-145 and Possible Therapeutic Strategies for Epithelial Ovarian Cancer”.

Daniela B. Vera, **Allison N. Fredes**, Maritza P. Garrido and Carmen Romero. *Life* 2022, 12, 8. <https://doi.org/10.3390/life12010008>.

“Current Treatments and New Possible Complementary Therapies for Epithelial Ovarian Cancer”.

Maritza P. Garrido, **Allison N. Fredes**, Lorena Lobos-González, Manuel Valenzuela-Valderrama, Daniela B. Vera and Carmen Romero. *Biomedicines* 2022, 10, 77. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010077>.

8.2. Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas

“La co-transfección de microRNA-145 más microRNA-23b disminuye la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial”.

Allison Fredes, Daniela Vera, Andrea Hernández, Ignacio Torres, Maritza Garrido y Carmen Romero. XXXII Reunión Anual de la SCHR. 1 al 3 de septiembre de 2021.

Trabajo premiado con mención honrosa.

9. ANEXOS

9.1. Efecto de metotrexato y microRNAs asociados a nanopartículas de oro en la proliferación-de líneas celulares de cáncer ovárico epitelial.

Con los resultados presentados con anterioridad se planteó que los miRs se podrían administrar a células de COE a través de una nanoformulación.

La nanoformulación que se plantea, busca unir un fármaco antitumoral como el metotrexato (usado para el tratamiento del COE) y miRs a nanopartículas de oro, con el objetivo de potenciar el efecto de metotrexato y disminuir los efectos secundarios de este fármaco uniendo a la formulación péptidos que puedan dirigirse específicamente a las células de COE, sin embargo, hasta el momento sólo se han realizado estandarizaciones las cuáles son necesarias antes de poder evaluar el efecto de esta nanoformulación sobre las células de COE.

Los antecedentes que llevaron al planteamiento de esta formulación y las estandarizaciones realizadas se presentan a continuación.

9.2. Introducción

9.2.1. Metotrexato

El metotrexato (MTX), es un fármaco antagonista del ácido fólico utilizado actualmente como inmunosupresor en enfermedades autoinmunes y también para el tratamiento de diversos tipos de cánceres como cáncer de mama, cerebro, pulmón y cáncer de ovario (97,98).

En cáncer, el mecanismo de acción de MTX consiste en la inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima que cataliza la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato **(98,99)**. Tetrahidrofolato es un cofactor derivado del ácido fólico que actúa como donante de grupos de un solo carbono para la síntesis de intermediarios involucrados en la formación de bases nitrogenadas, como 5,10-metilentetrahidrofolato y 10-formiltetrahidrofolato, necesarios para la síntesis de pirimidinas y purinas respectivamente **(100,101)**. De este modo, MTX al inhibir DHFR, disminuye los niveles de tetrahidrofolato y con ello la síntesis de nucleótidos, provocando efectos citotóxicos y citostáticos en las células cancerígenas **(97,100)**, lo que da cuenta de las ventajas que puede tener el uso de MTX como quimioterapéutico.

A pesar de lo anterior, metotrexato al igual que otros fármacos indicados para el tratamiento del cáncer de ovario, presenta gran cantidad de efectos no deseados debido a su baja especificidad, ya que afecta no sólo a las células tumorales sino también a los demás tejidos, provocando efectos secundarios a nivel sistémico **(102)**.

De este modo, con el objetivo de disminuir los efectos adversos del metotrexato se han desarrollado nuevas formas de administración que permiten mantener el control espacial y temporal de su liberación, una de estas alternativas es el uso de metotrexato asociado a nanopartículas de oro (GNP-MTX).

9.2.2. Metotrexato y miRs asociados a nanopartículas de oro

El uso de nanopartículas de oro (GNP) asociadas a diferentes fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer ha surgido como una importante alternativa debido a que la superficie de las nanopartículas de oro es altamente modificable lo que permite que estas nanopartículas no sólo se pueda unir a diferentes fármacos sino también se puedan fusionar con moléculas que confieran direccionalidad y especificidad por cierto tejidos **(103)**. De esta manera el uso de nanopartículas podría potenciar el efecto de un determinado fármaco antitumoral y junto con ello, disminuir los efectos adversos de la quimioterapia mejorando la calidad de vida de las pacientes con cáncer de ovario.

Recientes estudios de nano formulaciones conformadas por nanopartículas de oro unidas a metotrexato mediante enlazadores como aductos de Diels Alder y polietilenglicol (PEG) han demostrado estabilidad, incorporación celular y efecto terapéutico **(104–107)**. Adicionalmente, se ha demostrado que el polietilenglicol, puede unirse covalentemente a análogos GnRH o FSH dirigidos a receptores GnRH o FSH respectivamente los cuáles, además, se encuentran sobre expresados en COE **(108–113)**. De este modo se pueden obtener nanopartículas de oro fusionadas tanto con moléculas terapéuticas como con péptidos que pueden ser reconocidos por las células cancerígenas. Una vez reconocida la nano formulación, ésta puede ingresar por endocitosis mediada por receptor al interior de las células en dónde moléculas con propiedades antitumorales como el metotrexato pueden ejercer su efecto **(114)**.

Sin embargo, debido a que en una variedad de cánceres incluyendo el cáncer de ovario existen antecedentes de mecanismos de resistencia a metotrexato debido a la sobreexpresión del transportador de eflujo de drogas ABCB1, el cual disminuye la acumulación de metotrexato al interior de células de cáncer **(115–117)**; se plantea que, la administración de GNP-MTX en conjunto con miRs, los cuáles además pueden unirse a las nanopartículas de oro mediante PEG **(118)**; podría ser una gran ventaja para evitar así la expulsión de metotrexato una vez que ha sido liberado en el interior de la célula. De esta manera, la administración de GNP/MTX/miR-23/miR-145 podría potenciar de mejor manera el efecto supresor de tumores que tendría la utilización de solo GNP-MTX o solo la mezcla de miRs.

Con el fin de establecer un nanosistema que sea adecuado para unir metotrexato, miR-145 y miR-23b y dirigido a células de cáncer ovárico, se plantean 4 nanoformulaciones (Figura anexo 1). Estas consisten en nanoesferas de oro (AuNPs) y nanovarillas de oro (AuNRs) unidas a análogos GnRH o FSH mediante PEG-COO⁻ y estabilizadas mediante PEG-OMetilo (PEG-OME).

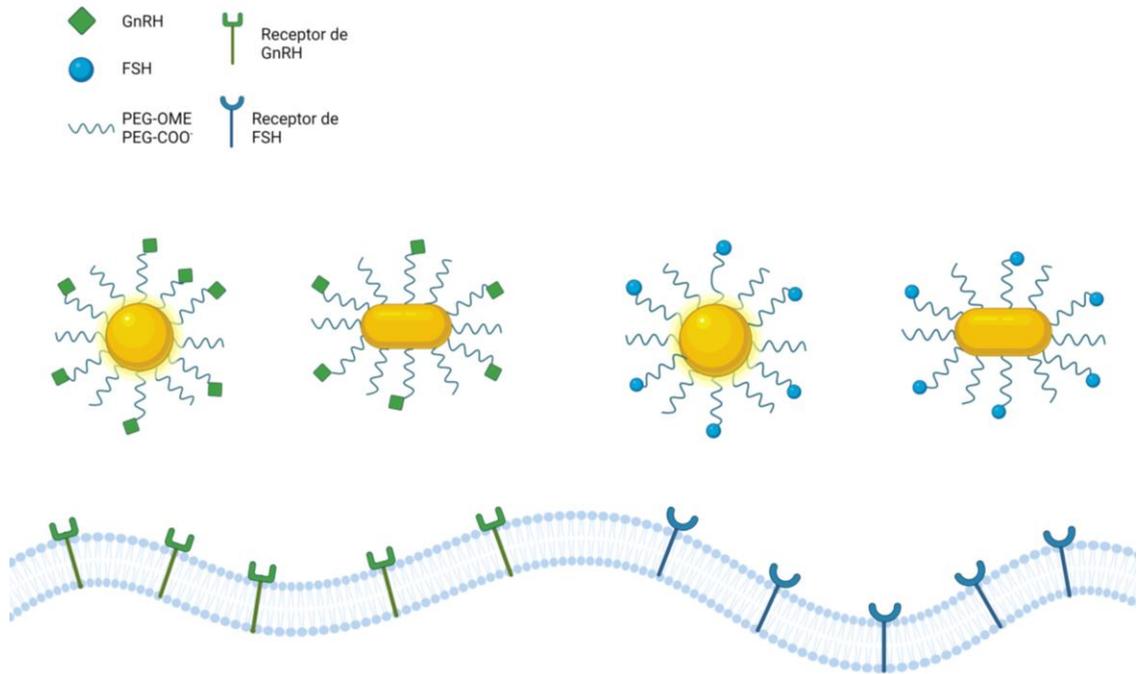


Figura anexo 1. Esquema representativo de nanoformulaciones dirigidas a células de COE. Los nanosistemas consisten en AuNPs y AuNRs unidas a GnRH o FSH dirigidos a receptores GnRH o FSH según corresponda.

9.3. Resultados y discusión.

Con el objetivo de determinar la concentración adecuada de AuNPs-GnRH, AuNRs-GnRH, AuNPs-FSH, AuNRs-FSH, se sembraron pocillos con 5000 células A2780 las cuáles fueron tratadas con concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 pM de nanopartículas durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con medio RPMI 5% SFB durante 48 horas. Finalmente, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando el reactivo Cell Counting Kit-8 (CCK8, #HY-K0301).

Los resultados para cada formulación se muestran a continuación.

9.3.1. Determinación de la viabilidad de células A2780 posterior al tratamiento con AuNRs-GnRH y AuNRs-FSH.

Los resultados de viabilidad celular se muestran en la figura anexo 2. Se puede observar una aparente disminución en la viabilidad celular a partir de 50 pM tanto en AuNRs-GnRH (figura anexo 2A) como en AuNRs-FSH (figura anexo 2B).

De este modo, la viabilidad de las células A2780 decae a un 28% y 42% al ser tratados con 50 pM y 100 pM de AuNRs-GnRH respectivamente (figura anexo 2A).

Algo similar estaría ocurriendo en el caso de AuNRs-FSH (figura anexo 2B) dónde se observó una disminución en la viabilidad celular de un 18% (50 pM) y 37% (100 pM).

Estos resultados podrían estar indicando un posible efecto tóxico de AuNRs unidas a GnRH o FSH en células A2780.

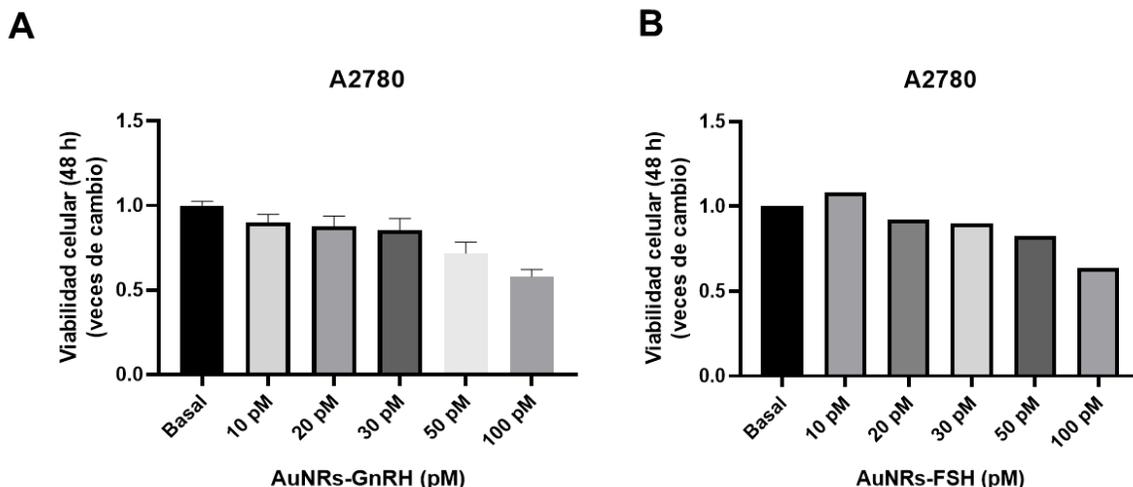


Figura anexo 2. Viabilidad de células A2780 luego del tratamiento con AuNRs. Las condiciones se normalizaron con respecto a la condición basal (medio RPMI 5% SFB). Cada condición se realizó en triplicado. A N=3 y B N=2. Los resultados se expresan como error estándar de la media (SEM).

9.3.2. Determinación de la viabilidad de células A2780 posterior al tratamiento con AuNPs-GnRH y AuNPs-FSH.

En la figura anexo 3, se muestran los resultados de viabilidad posterior al tratamiento con AuNPs-GnRH y AuNPs-FSH.

En el caso de AuNPs-GnRH, se puede observar una aparente disminución de la viabilidad celular luego del tratamiento con 50 pM y 100 pM de nanopartículas. Esta disminución es de un 30% y un 56% respectivamente (figura anexo 3A).

Por otra parte, resultados similares se pueden observar para AuNPs-FSH, dónde se obtuvo una aparente disminución de un 23% y 21% al tratar células A2780 con 50 pM y 100 pM de nanopartículas respectivamente (figura anexo 3B).

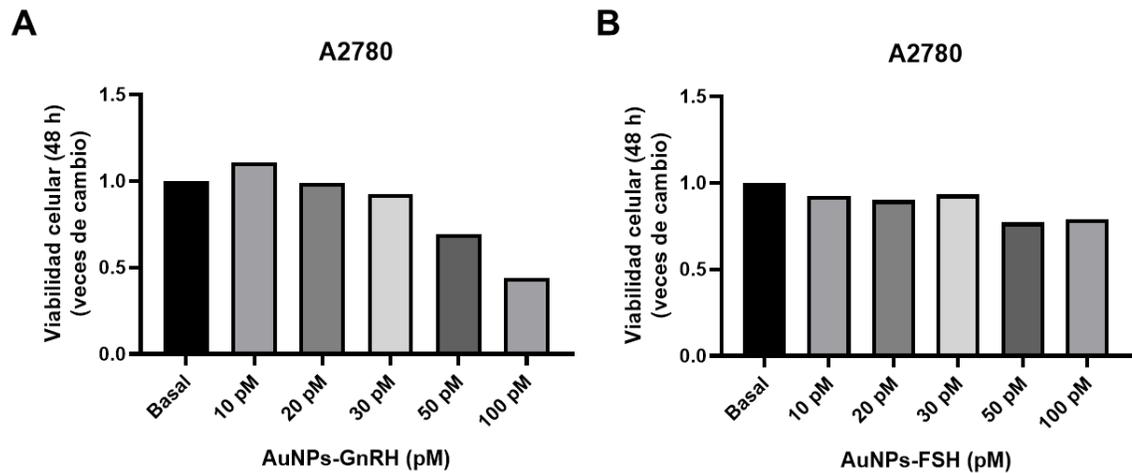


Figura anexo 3. Viabilidad de células A2780 luego del tratamiento con AuNPs. Las condiciones se normalizaron con respecto a la condición basal (medio RPMI 5% SFB). Cada condición se realizó en triplicado. **A** N=1 y **B** N=1.

Los resultados para las cuatro formulaciones estarían indicando una disminución en la viabilidad de células A2780 frente a bajas concentraciones de nanopartículas, disminución que parece ser mayor al tratar con AuNRs-GnRH y AuNPs-GnRH.

Existen antecedentes de efectos tóxicos de GNP en diferentes tipos celulares, lo que se suma a estudios en dónde se indican efectos anti proliferativos de análogos GnRH en células de cáncer ovárico epitelial (42,119).

Considerando lo anterior, se realizaron experimentos con AuNRs-PEG, AuNPs-PEG y GnRH para determinar el efecto de estos tratamientos en la viabilidad de células A2780.

9.3.3. Determinación de la viabilidad de células A2780 posterior al tratamiento con AuNRs-PEG, AuNPs-PEG y GnRH.

Los resultados muestran una posible disminución en la viabilidad celular luego del tratamiento con 10, 20, 30, 50 y 100 pM de AuNRs-PEG (figura anexo 4A). Por lo que se puede concluir que AuNRs-PEG tienen un posible efecto tóxico en células A2780

En el caso de AuNPs-PEG, la aparente disminución en la viabilidad celular solo se puede observar a partir de los 100 pM, contrario a lo observado al realizar el tratamiento con AuNPs-GnRH dónde se estaría presentando una disminución a partir de los 50 pM, indicando un posible efecto anti proliferativo de GnRH sobre las células A2780 (figura anexo 4B).

Considerando lo anterior, se evaluó el efecto del péptido GnRH sobre las células A2780. Los resultados, muestran una viabilidad aparente de aproximadamente un 100% luego del tratamiento con diferentes concentraciones de GnRH (figura anexo 4C).

Estos resultados estarían indicando que GnRH no estaría afectando la viabilidad de células A2780, sin embargo, estudios concuerdan en que el tipo de unión al receptor de LRHR puede provocar diferentes efectos a nivel celular por lo que

GnRH al estar unido a nanopartículas puede exponer sitios de unión al receptor de GnRH que desencadenen efectos anti proliferativos a nivel celular (120,121).

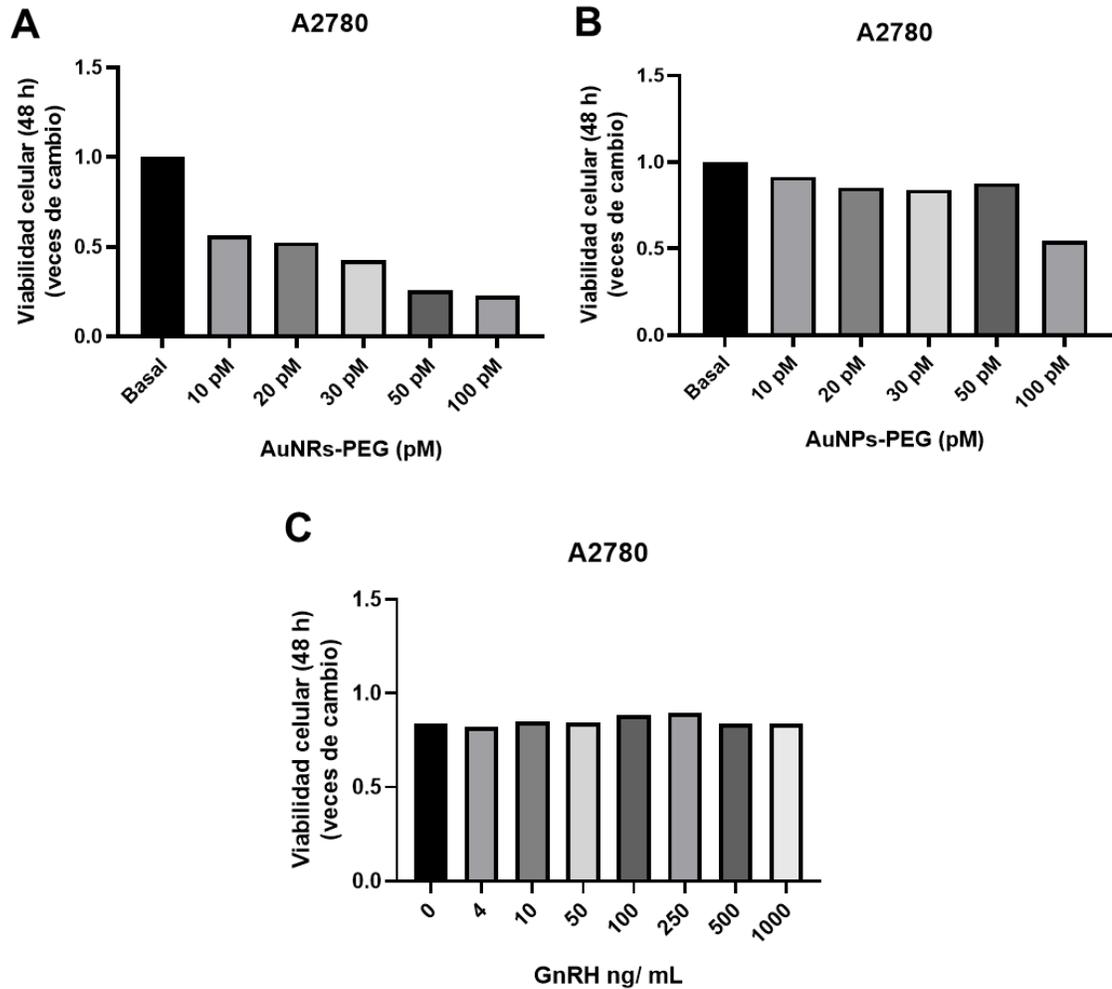


Figura anexo 4. Viabilidad de células A2780 luego del tratamiento con AuNRs-PEG, AuNPs-PEG y GnRH. Las condiciones se normalizaron con respecto a la condición basal (medio RPMI 5% SFB). Cada condición se realizó en triplicado. **A** N=1, **B** N=1 y **C** N=1.

Considerando los resultados anteriores, se puede observar que de las cuatro formulaciones propuestas, AuNPs-FSH podría tener menores efectos tóxicos en células A2780, coincidiendo con estudios realizados anteriormente por nuestro

grupo de investigación, dónde células de COE fueron tratadas con AuNPs-FSH unidas a miR-145 disminuyendo la viabilidad y la migración celular (112).

9.3.4. IC₅₀ de metotrexato en células A2780

Se determinó la concentración de metotrexato capaz de inhibir en un 50% la viabilidad de las células A2780 (IC₅₀), con el objetivo de estimar la concentración de metotrexato necesaria para preparar AuNPs-FSH-MTX.

Para ello, las células A2780 se trataron con concentraciones de 0, 10, 100, 500 y 1000 μM de MTX durante 1 hora. Posteriormente se retiró el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron en medio RPMI 5% SFB por 48 horas adicionales a 37°C, para posteriormente, evaluar la viabilidad celular utilizando el reactivo Cell Counting Kit-8 (CCK8, #HY-K0301).

Los resultados muestran que el IC₅₀ de MTX en células A2780 es de 97,4 μM (Figura Anexo 5).

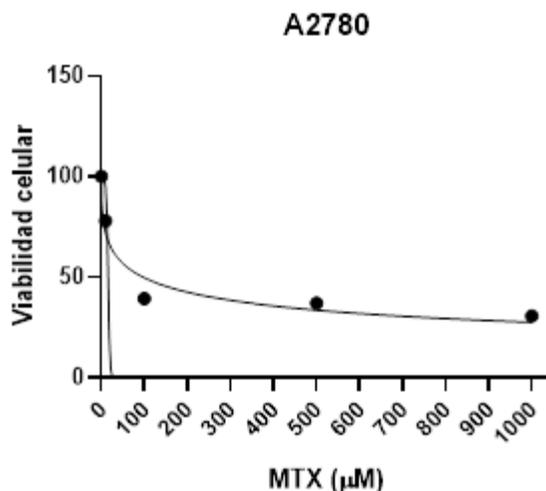


Figura Anexo 5. IC₅₀ de metotrexato (MTX) en células A2780. N=1

9.4. Proyecciones de la sección anexa

- Los resultados preliminares podrían indicar que AuNPs-FSH sería el sistema adecuado para usar junto a metotrexato y miRs en células de COE, ya que por sí solo no pareciera afectar la viabilidad de las células de COE, aunque es necesario realizar experimentos adicionales para corroborarlo. En una siguiente etapa de este trabajo, se debe caracterizar esta formulación para poder evaluar el efecto de la funcionalización de AuNPs-FSH-MTX, AuNPs-FSH-miR-145-miR-23b y AuNPs-FSH-miR-145-miR-23b-MTX en células A2780 de cáncer ovárico epitelial. Para posteriormente probar la formulación con MTX y miRs.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* [Internet]. julio de 2018 [citado 29 de junio de 2021];68(4):284–96. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21456>
2. Hirst J, Crow J, Godwin A, Hirst J, Crow J, Godwin A. Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors [Internet]. *Ovarian Cancer - From Pathogenesis to Treatment*. IntechOpen; 2018 [citado 20 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/state.item.id>
3. The World Ovarian Cancer Coalition Atlas 2020 [Internet]. 2020 [citado 20 de marzo de 2021]. Disponible en: https://worldovariancancercoalition.org/wp-content/uploads/2020/10/2020-World-Ovarian-Cancer-Atlas_FINAL.pdf
4. Plan Nacional del Cáncer 2018-2028 [Internet]. Ministerio de Salud de Chile; 2019 [citado 20 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf
5. Jessmon P, Boulanger T, Zhou W, Patwardhan P. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* [Internet]. 4 de mayo de 2017 [citado 15 de junio de 2022];17(5):427–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1299575>
6. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(12):2113.
7. Ledermann JA. First-line treatment of ovarian cancer: questions and controversies to address. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 15 de marzo de 2022];10:1758835918768232. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1758835918768232>
8. Beesley VL, Ross TL, King MT, Campbell R, Nagle CM, Obermair A, et al. Evaluating patient-reported symptoms and late adverse effects following completion of first-line chemotherapy for ovarian cancer using the MOST (Measure of Ovarian Symptoms and Treatment concerns). *Gynecologic Oncology* [Internet]. 1 de febrero de 2022 [citado 18 de marzo de 2022];164(2):437–45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825821016322>
9. Fathalla MF. Incessant ovulation—a factor in ovarian neoplasia. *Lancet*. 1971;2(7716):163.

10. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *The Lancet* [Internet]. 17 de octubre de 2009 [citado 15 de marzo de 2022];374(9698):1371–82. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609613386>
11. Choi PW, So WW, Yang J, Liu S, Tong KK, Kwan KM, et al. MicroRNA-200 family governs ovarian inclusion cyst formation and mode of ovarian cancer spread. *Oncogene* [Internet]. mayo de 2020 [citado 14 de marzo de 2022];39(20):4045–60. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41388-020-1264-x>
12. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983;71(4):717–21.
13. Fleming JS, Beaujié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology* [Internet]. 9 de marzo de 2006 [citado 14 de marzo de 2022];247(1):4–21. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720705003400>
14. Risch HA. Hormonal Etiology of Epithelial Ovarian Cancer, With a Hypothesis Concerning the Role of Androgens and Progesterone. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2 de diciembre de 1998 [citado 14 de marzo de 2022];90(23):1774–86. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jnci/90.23.1774>
15. Ho SM. Estrogen, Progesterone and Epithelial Ovarian Cancer. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 7 de octubre de 2003 [citado 14 de marzo de 2022];1(1):73. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-73>
16. Kurman RJ, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol* [Internet]. marzo de 2010 [citado 14 de marzo de 2022];34(3):433–43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2841791/>
17. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in Oncology Nursing* [Internet]. 1 de abril de 2019 [citado 15 de marzo de 2022];35(2):151–6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208119300129>
18. US Preventive Services Task Force. Screening for Ovarian Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA* [Internet]. 13 de febrero de 2018 [citado 24 de junio de 2022];319(6):588–94. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.21926>

19. Potenza E, Parpinel G, Laudani ME, Macchi C, Fuso L, Zola P. Prognostic and predictive value of combined HE-4 and CA-125 biomarkers during chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Int J Biol Markers* [Internet]. 1 de diciembre de 2020 [citado 2 de octubre de 2022];35(4):20–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1724600820955195>
20. Chandra A, Pius C, Nabeel M, Nair M, Vishwanatha JK, Ahmad S, et al. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Medicine* [Internet]. 2019 [citado 2 de octubre de 2022];8(16):7018–31. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cam4.2560>
21. Cancer of the Ovary - Cancer Stat Facts [Internet]. National Cancer Institute; [citado 4 de octubre de 2022]. (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program). Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>
22. Mathieu KB, Bedi DG, Thrower SL, Qayyum A, Bast RC. Screening for ovarian cancer: imaging challenges and opportunities for improvement. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. marzo de 2018 [citado 4 de octubre de 2022];51(3):293–303. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5788737/>
23. Sólétormos G, Duffy MJ, Hassan SOA, Verheijen RHM, Tholander B, Bast RC, et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *International Journal of Gynecologic Cancer* [Internet]. 1 de enero de 2016 [citado 6 de octubre de 2022];26(1). Disponible en: <https://ijgc.bmj.com/content/26/1/43>
24. Charkhchi P, Cybulski C, Gronwald J, Wong FO, Narod SA, Akbari MR. CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)* [Internet]. 11 de diciembre de 2020 [citado 17 de diciembre de 2022];12(12):3730. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7763876/>
25. Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Human Reproduction* [Internet]. 1 de enero de 1989 [citado 17 de diciembre de 2022];4(1):1–12. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136832>
26. van Haaften-Day C, Shen Y, Xu F, Yu Y, Berchuck A, Havrilesky LJ, et al. OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125-II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* [Internet]. 2001 [citado 17 de diciembre de 2022];92(11):2837–44. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0142%2820011201%2992%3A11%3C2837%3A%3AAID-CNCR10093%3E3.0.CO%3B2-5>

27. Prorok PC, Andriole GL, Bresalier RS, Buys SS, Chia D, Crawford ED, et al. Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Control Clin Trials*. diciembre de 2000;21(6 Suppl):273S-309S.
28. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res* [Internet]. 27 de marzo de 2019 [citado 6 de octubre de 2022];12(1):28. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>
29. Barr CE, Funston G, Jeevan D, Sundar S, Mounce LTA, Crosbie EJ. The Performance of HE4 Alone and in Combination with CA125 for the Detection of Ovarian Cancer in an Enriched Primary Care Population. *Cancers* [Internet]. enero de 2022 [citado 6 de octubre de 2022];14(9):2124. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/9/2124>
30. Dayyani F, Uhlig S, Colson B, Simon K, Rolny V, Morgenstern D, et al. Diagnostic Performance of Risk of Ovarian Malignancy Algorithm Against CA125 and HE4 in Connection With Ovarian Cancer: A Meta-analysis. *International Journal of Gynecologic Cancer* [Internet]. 1 de noviembre de 2016 [citado 18 de enero de 2023];26(9). Disponible en: <https://ijgc.bmj.com/content/26/9/1586>
31. Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ* [Internet]. 9 de noviembre de 2020 [citado 16 de junio de 2022];371:m3773. Disponible en: <https://www.bmj.com/content/371/bmj.m3773>
32. Gadducci A, Guarneri V, Peccatori FA, Ronzino G, Scandurra G, Zamagni C, et al. Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status. *Journal of Ovarian Research* [Internet]. 28 de enero de 2019 [citado 15 de marzo de 2022];12(1):9. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0484-6>
33. Garrido MP, Fredes AN, Lobos-González L, Valenzuela-Valderrama M, Vera DB, Romero C. Current Treatments and New Possible Complementary Therapies for Epithelial Ovarian Cancer. *Biomedicines* [Internet]. enero de 2022 [citado 20 de marzo de 2022];10(1):77. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/1/77>
34. Jensen SE, Cella D. Quality of Life in Patients with Ovarian Cancer. En: Farghaly SA, editor. *Advances in Diagnosis and Management of Ovarian Cancer* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2014 [citado 17 de marzo de 2022]. p. 241–60. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8271-0_14

35. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2 de abril de 2015 [citado 15 de marzo de 2022];15(1):38. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>
36. Retamales-Ortega R, Oróstica L, Vera C, Cuevas P, Hernández A, Hurtado I, et al. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. marzo de 2017 [citado 29 de junio de 2021];18(3):507. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/507>
37. D'angelo B, Benedetti E, Cimini A, Giordano A. MicroRNAs: A Puzzling Tool in Cancer Diagnostics and Therapy. *Anticancer Research* [Internet]. 1 de noviembre de 2016 [citado 15 de marzo de 2022];36(11):5571–5. Disponible en: <https://ar.iijournals.org/content/36/11/5571>
38. Julio-Pieper M, Lozada P, Tapia V, Vega M, Miranda C, Vantman D, et al. Nerve Growth Factor Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Granulosa Cells via a trkA Receptor/Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellularly Regulated Kinase 2-Dependent Pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 1 de agosto de 2009 [citado 15 de marzo de 2022];94(8):3065–71. Disponible en: <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0542>
39. Garrido MP, Torres I, Avila A, Chnaiderman J, Valenzuela-Valderrama M, Aramburo J, et al. NGF/TRKA Decrease miR-145-5p Levels in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. enero de 2020 [citado 29 de junio de 2021];21(20):7657. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7657>
40. Tapia V, Gabler F, Muñoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A, et al. Tyrosine kinase A receptor (trkA): A potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* [Internet]. 1 de abril de 2011 [citado 1 de julio de 2021];121(1):13–23. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825810012485>
41. Urzua U, Tapia V, Geraldo MP, Selman A, Vega M, Romero C. Nerve Growth Factor Stimulates Cellular Proliferation of Human Epithelial Ovarian Cancer. *Horm Metab Res* [Internet]. septiembre de 2012 [citado 1 de julio de 2021];44(9):656–61. Disponible en: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0032-1304617>
42. Campos X, Muñoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C, et al. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* [Internet]. 1 de enero de 2007 [citado 1 de julio

- de 2021];104(1):168–75. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825806005609>
43. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* [Internet]. 1 de mayo de 2015 [citado 15 de marzo de 2022];1849(5):506–16. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187493991400073X>
44. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* [Internet]. 23 de enero de 2004 [citado 29 de junio de 2021];116(2):281–97. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404000455>
45. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. agosto de 2014 [citado 29 de junio de 2021];15(8):509–24. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm3838>
46. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. enero de 2020 [citado 29 de junio de 2021];21(1):132. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/132>
47. Vera C, Retamales-Ortega R, Garrido M, Vega M, Romero C. Signaling Pathways Related to Nerve Growth Factor and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *Ovarian Cancer: From Pathogenesis to Treatment*. 2018;39.
48. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1 de julio de 2016 [citado 29 de junio de 2021];76(13):3666–70. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>
49. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Current Biology* [Internet]. 18 de agosto de 2014 [citado 1 de julio de 2021];24(16):R762–76. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982214007593>
50. Katz B, Tropé CG, Reich R, Davidson B. MicroRNAs in Ovarian Cancer. *Human Pathology* [Internet]. 1 de septiembre de 2015 [citado 15 de marzo de 2022];46(9):1245–56. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004681771500218X>
51. Cui SY, Wang R, Chen LB. MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [Internet]. 2014 [citado 16 de marzo de 2022];18(10):1913–26. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jcmm.12358>

52. Li C, Yan G, Yin L, Liu T, Li C, Wang L. Prognostic roles of microRNA 143 and microRNA 145 in colorectal cancer: A meta-analysis. *Int J Biol Markers* [Internet]. 1 de marzo de 2019 [citado 15 de marzo de 2022];34(1):6–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1724600818807492>
53. Xu W, Hua Y, Deng F, Wang D, Wu Y, Zhang W, et al. MiR-145 in cancer therapy resistance and sensitivity: A comprehensive review. *Cancer Science*. 2020;111(9):3122.
54. Zhu X, Li Y, Xie C, Yin X, Liu Y, Cao Y, et al. miR-145 sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting Sp1 and Cdk6. *International journal of cancer*. 2014;135(6):1286–96.
55. Sheng Q, Zhang Y, Wang Z, Ding J, Song Y, Zhao W. Cisplatin-mediated down-regulation of miR-145 contributes to up-regulation of PD-L1 via the c-Myc transcription factor in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2020;200(1):45–52.
56. Grossi I, Salvi A, Baiocchi G, Portolani N, De Petro G. Functional Role of microRNA-23b-3p in Cancer Biology. *MicroRNA*. 1 de diciembre de 2018;7(3):156–66.
57. Campos-Viguri GE, Jiménez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Torres-Altamirano G, Soto-Flores DG, Hernández-Sotelo D, et al. miR-23b as a potential tumor suppressor and its regulation by DNA methylation in cervical cancer. *Infect Agents Cancer* [Internet]. 30 de noviembre de 2015 [citado 15 de marzo de 2022];10(1):42. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0037-6>
58. Yan J, Jiang J yi, Meng XN, Xiu YL, Zong ZH. MiR-23b targets cyclin G1 and suppresses ovarian cancer tumorigenesis and progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016;35(1):1–10.
59. Li W, Liu Z, Chen L, Zhou L, Yao Y. MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2. *FEBS Letters* [Internet]. 2 de mayo de 2014 [citado 6 de julio de 2021];588(9):1608–15. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579314001847>
60. Majid S, Dar AA, Saini S, Deng G, Chang I, Greene K, et al. MicroRNA-23b Functions as a Tumor Suppressor by Regulating Zeb1 in Bladder Cancer. *PLOS ONE* [Internet]. 2 de julio de 2013 [citado 15 de marzo de 2022];8(7):e67686. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067686>

61. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation. *Mol Cancer Res.* 1 de diciembre de 2011;9(12):1608–20.
62. Fan H, Atiya HI, Wang Y, Pisanic TR, Wang TH, Shih IM, et al. Epigenomic Reprogramming toward Mesenchymal-Epithelial Transition in Ovarian-Cancer-Associated Mesenchymal Stem Cells Drives Metastasis. *Cell Reports* [Internet]. 8 de diciembre de 2020 [citado 15 de marzo de 2022];33(10):108473. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124720314625>
63. Cui Y, Qin L, Tian D, Wang T, Fan L, Zhang P, et al. ZEB1 Promotes Chemoresistance to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells by Suppressing SLC3A2. *CHE* [Internet]. 2018 [citado 15 de marzo de 2022];63(5):262–71. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/FullText/493864>
64. ZEB1 - Zinc finger E-box-binding homeobox 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [citado 27 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37275/entry#sequences>
65. ABCB1 - ATP-dependent translocase ABCB1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08183/entry#sequences>
66. Kou CH, Zhou T, Han XL, Zhuang HJ, Qian HX. Downregulation of mir-23b in plasma is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncology Letters* [Internet]. 1 de diciembre de 2016 [citado 4 de julio de 2021];12(6):4838–44. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.5265>
67. Klicka K, Grzywa TM, Klinke A, Mielniczuk A, Wejman J, Ostrowska J, et al. Decreased expression of miR-23b is associated with poor survival of endometrial cancer patients. *Sci Rep* [Internet]. 5 de noviembre de 2022 [citado 26 de noviembre de 2022];12(1):18824. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-22306-w>
68. Tang W, Zhang X, Tan W, Gao J, Pan L, Ye X, et al. miR-145-5p Suppresses Breast Cancer Progression by Inhibiting SOX2. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 1 de abril de 2019 [citado 26 de noviembre de 2022];236:278–87. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480418308217>
69. Wang W, Ji G, Xiao X, Chen X, Qin WW, Yang F, et al. Epigenetically regulated miR-145 suppresses colon cancer invasion and metastasis by targeting LASP1. *Oncotarget* [Internet]. 9 de septiembre de 2016 [citado 26 de

- noviembre de 2022];7(42):68674–87. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5356582/>
70. Wu X, Han Y, Liu F, Ruan L. Downregulations of miR-449a and miR-145-5p Act as Prognostic Biomarkers for Endometrial Cancer. *Journal of Computational Biology* [Internet]. mayo de 2020 [citado 26 de noviembre de 2022];27(5):834–44. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/cmb.2019.0215>
 71. The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Cell line profile: Ovarian Cancer cell line A2780 [Internet]. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/113526/a2780-cell-lineprofile.pdf>
 72. American Type Culture Collection (ATCC). SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] HTB-77™ [Internet]. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-77.aspx#documentation>
 73. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* [Internet]. 9 de julio de 2013 [citado 15 de noviembre de 2022];4(1):2126. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ncomms3126>
 74. Huang TC, Renuse S, Pinto S, Kumar P, Yang Y, Chaerkady R, et al. Identification of miR-145 targets through an integrated omics analysis. *Molecular BioSystems* [Internet]. 2015 [citado 26 de noviembre de 2022];11(1):197–207. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/mb/c4mb00585f>
 75. Li B, Ding CM, Li YX, Peng JC, Geng N, Qin WW. MicroRNA-145 inhibits migration and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through regulation of the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway. *Oncology Reports* [Internet]. 1 de noviembre de 2018 [citado 6 de diciembre de 2022];40(5):2944–54. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6666>
 76. Garrido MP, Salvatierra R, Valenzuela-Valderrama M, Vallejos C, Bruneau N, Hernández A, et al. Metformin Reduces NGF-Induced Tumour Promoter Effects in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Pharmaceuticals* [Internet]. octubre de 2020 [citado 8 de julio de 2021];13(10):315. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/10/315>
 77. Li S, Wu X, Xu Y, Wu S, Li Z, Chen R, et al. miR-145 suppresses colorectal cancer cell migration and invasion by targeting an ETS-related gene. *Oncology Reports* [Internet]. 1 de octubre de 2016 [citado 18 de enero de

- 2023];36(4):1917–26. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2016.5042>
78. Li Q, Yu X, Yang L. MiR-145 inhibits cervical cancer progression and metastasis by targeting WNT2B by Wnt/ β -catenin pathway. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 1 de octubre de 2019 [citado 27 de noviembre de 2022];12(10):3740–51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6949761/>
79. Campos-Viguri GE, Peralta-Zaragoza O, Jiménez-Wences H, Longinos-González AE, Castañón-Sánchez CA, Ramírez-Carrillo M, et al. MiR-23b-3p reduces the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell lines via the reduction of c-Met expression. *Sci Rep* [Internet]. 24 de febrero de 2020 [citado 18 de enero de 2023];10(1):3256. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-60143-x>
80. Park NR, Cha JH, Sung PS, Jang JW, Choi JY, Yoon SK, et al. MiR-23b-3p suppresses epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting c-MET. *Heliyon* [Internet]. 1 de octubre de 2022 [citado 27 de noviembre de 2022];8(10):e11135. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022024239>
81. Fuse M, Nohata N, Kojima S, Sakamoto S, Chiyomaru T, Kawakami K, et al. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol*. abril de 2011;38(4):1093–101.
82. Shi L, Wang Z, Sun G, Wan Y, Guo J, Fu X. miR-145 Inhibits Migration and Invasion of Glioma Stem Cells by Targeting ABCG2. *Neuromol Med* [Internet]. 1 de junio de 2014 [citado 13 de enero de 2023];16(2):517–28. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8305-y>
83. Zeinali T, Mansoori B, Mohammadi A, Baradaran B. Regulatory mechanisms of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 1 de enero de 2019 [citado 13 de enero de 2023];109:195–207. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218341635>
84. Tang X, Liang X, Wen K, Chen Y, Han H, Li Q. Dual ATP/reduction-responsive polyplex to achieve the co-delivery of doxorubicin and miR-23b for the cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [Internet]. 1 de octubre de 2021 [citado 13 de enero de 2023];206:111955. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776521003994>
85. Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* [Internet]. 21 de enero

- de 2015 [citado 18 de enero de 2023];14(4):481–7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4614883/>
86. Sakata J, Utsumi F, Suzuki S, Niimi K, Yamamoto E, Shibata K, et al. Inhibition of ZEB1 leads to inversion of metastatic characteristics and restoration of paclitaxel sensitivity of chronic chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Oncotarget* [Internet]. 10 de agosto de 2017 [citado 27 de noviembre de 2022];8(59):99482–94. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725108/>
87. Ren D, Wang M, Guo W, Huang S, Wang Z, Zhao X, et al. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. *Cell Tissue Res* [Internet]. 1 de diciembre de 2014 [citado 27 de noviembre de 2022];358(3):763–78. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2001-y>
88. Gao Y, Zhang Z, Li K, Gong L, Yang Q, Huang X, et al. Linc-DYNC2H1-4 promotes EMT and CSC phenotypes by acting as a sponge of miR-145 in pancreatic cancer cells. *Cell Death Dis* [Internet]. julio de 2017 [citado 27 de noviembre de 2022];8(7):e2924–e2924. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/cddis2017311>
89. Passacantilli I, Panzeri V, Bielli P, Farini D, Pillozzi E, Fave GD, et al. Alternative polyadenylation of ZEB1 promotes its translation during genotoxic stress in pancreatic cancer cells. *Cell Death Dis* [Internet]. noviembre de 2017 [citado 27 de noviembre de 2022];8(11):e3168–e3168. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/cddis2017562>
90. Tian B, Manley JL. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. enero de 2017 [citado 26 de enero de 2023];18(1):18–30. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm.2016.116>
91. Paradiso F, Fitzgerald J, Yao S, Barry F, Taraballi F, Gonzalez D, et al. Marine Collagen Substrates for 2D and 3D Ovarian Cancer Cell Systems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:343.
92. Bruhn O, Drerup K, Kaehler M, Haenisch S, Röder C, Cascorbi I. Length variants of the ABCB1 3'-UTR and loss of miRNA binding sites: possible consequences in regulation and pharmacotherapy resistance. *Pharmacogenomics*. marzo de 2016;17(4):327–40.
93. Norouzi-Barough L, Sarookhani M, Salehi R, Sharifi M, Moghbelinejad S. CRISPR/Cas9, a new approach to successful knockdown of ABCB1/P-glycoprotein and reversal of chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cell line. *Iran J Basic Med Sci* [Internet]. febrero de 2018 [citado 28 de

- noviembre de 2022];21(2):181–7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5811757/>
94. Lei ZN, Teng QX, Wu ZX, Ping FF, Song P, Wurpel JND, et al. Overcoming multidrug resistance by knockout of ABCB1 gene using CRISPR/Cas9 system in SW620/Ad300 colorectal cancer cells. *MedComm* (2020). diciembre de 2021;2(4):765–77.
 95. Engle K, Kumar G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 5 de septiembre de 2022 [citado 28 de noviembre de 2022];239:114542. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523422004445>
 96. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellon EA, Contreras HR. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian J Androl* [Internet]. 2018 [citado 18 de enero de 2023];20(3):294–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952486/>
 97. Garg NK, Singh B, Kushwah V, Tyagi RK, Sharma R, Jain S, et al. The ligand (s) anchored lipobrid nanoconstruct mediated delivery of methotrexate: an effective approach in breast cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [Internet]. 1 de octubre de 2016 [citado 19 de marzo de 2022];12(7):2043–60. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963416300557>
 98. Hannoodee M, Mittal M. Methotrexate. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 19 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556114/>
 99. Mikhaylov D, Hashim PW, Nektalova T, Goldenberg G. Systemic Psoriasis Therapies and Comorbid Disease in Patients with Psoriasis: A Review of Potential Risks and Benefits. *J Clin Aesthet Dermatol* [Internet]. junio de 2019 [citado 20 de marzo de 2022];12(6):46–54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6624011/>
 100. Neradil J, Pavlasova G, Veselska R. New mechanisms for an old drug; DHFR- and non-DHFR-mediated effects of methotrexate in cancer cells. *Klin Onkol*. 2012;25 Suppl 2:2S87-92.
 101. PubChem. Tetrahydrofolic acid [Internet]. [citado 20 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135444742>
 102. Gaïes E, Nadia J, Trabelsi S, Salouage I, Charfi R, Lakhel M, et al. Methotrexate Side Effects: Review Article. *journal of Drug Metabolism & Toxicology* 2157-7609 impact factor : 127. 21 de abril de 2012;3:123–5.

103. Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Molecular Pharmaceutics* [Internet]. 19 de noviembre de 2018 [citado 29 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810>
104. Vetterlein C, Vásquez R, Bolaños K, Acosta GA, Guzman F, Albericio F, et al. Exploring the influence of Diels–Alder linker length on photothermal molecule release from gold nanorods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [Internet]. 1 de junio de 2018 [citado 21 de marzo de 2022];166:323–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776518301656>
105. Bolaños K, Sánchez-Navarro M, Giralt E, Acosta G, Albericio F, Kogan MJ, et al. NIR and glutathione trigger the surface release of methotrexate linked by Diels-Alder adducts to anisotropic gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* [Internet]. 1 de diciembre de 2021 [citado 21 de marzo de 2022];131:112512. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493121006524>
106. Bolaños K, Sánchez-Navarro M, Tapia-Arellano A, Giralt E, Kogan MJ, Araya E. Oligoarginine Peptide Conjugated to BSA Improves Cell Penetration of Gold Nanorods and Nanoprisms for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* [Internet]. agosto de 2021 [citado 21 de marzo de 2022];13(8):1204. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/8/1204>
107. Costa Lima SA, Reis S. Temperature-responsive polymeric nanospheres containing methotrexate and gold nanoparticles: A multi-drug system for theranostic in rheumatoid arthritis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [Internet]. 1 de septiembre de 2015 [citado 29 de marzo de 2022];133:378–87. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776515002672>
108. Li X, Taratula O, Taratula O, Schumann C, Minko T. LHRH-Targeted Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 1 de febrero de 2017;17(3):258–67.
109. Emons G, Weiss S, Ortmann O, Grundker C, Schulz KD. LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer. *European Journal of Endocrinology* [Internet]. 1 de junio de 2000 [citado 29 de marzo de 2022];142(6):665–70. Disponible en: <https://ej.e.bioscientifica.com/view/journals/eje/142/6/665.xml>
110. Wang Z, Meng F, Zhong Z. Emerging targeted drug delivery strategies toward ovarian cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. 1 de

- noviembre de 2021 [citado 29 de marzo de 2022];178:113969. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X21003628>
111. Hu J, Obayemi JD, Malatesta K, Košmrlj A, Soboyejo WO. Enhanced cellular uptake of LHRH-conjugated PEG-coated magnetite nanoparticles for specific targeting of triple negative breast cancer cells. *Materials Science and Engineering: C* [Internet]. 1 de julio de 2018 [citado 29 de marzo de 2022];88:32–45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117325213>
112. Salas-Huenuleo E, Hernández A, Lobos-González L, Polakovičová I, Morales-Zavala F, Araya E, et al. Peptide Targeted Gold Nanoplatfrom Carrying miR-145 Induces Antitumoral Effects in Ovarian Cancer Cells. *Pharmaceutics* [Internet]. mayo de 2022 [citado 18 de diciembre de 2022];14(5):958. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/5/958>
113. Hong H, Yan Y, Shi S, Graves SA, Krasteva LK, Nickles RJ, et al. PET of Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Broad Applicability to Cancer Imaging. *Mol Pharmaceutics* [Internet]. 2 de febrero de 2015 [citado 18 de diciembre de 2022];12(2):403–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/mp500766x>
114. Rizwanullah M, Ahmad MZ, Ghoneim M, Alshehri S, Imam S, Md S, et al. Receptor-Mediated Targeted Delivery of Surface-Modified Nanomedicine in Breast Cancer: Recent Update and Challenges. *Pharmaceutics*. 29 de noviembre de 2021;13:2039.
115. Han Z, Shi L. Long non-coding RNA LUCAT1 modulates methotrexate resistance in osteosarcoma via miR-200c/ABCB1 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 21 de marzo de 2022];495(1):947–53. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17323008>
116. Jiang B, Yan L jun, Wu Q. ABCB1 (C1236T) Polymorphism Affects P-Glycoprotein-Mediated Transport of Methotrexate, Doxorubicin, Actinomycin D, and Etoposide. *DNA and Cell Biology* [Internet]. mayo de 2019 [citado 21 de marzo de 2022];38(5):485–90. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dna.2018.4583>
117. Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate Resistance Mediated by the Multidrug Resistance Proteins MRP1 and MRP21. *Cancer Research*. 1 de junio de 1999;59(11):2532–5.
118. Chaudhari R, Nasra S, Meghani N, Kumar A. MiR-206 conjugated gold nanoparticle based targeted therapy in breast cancer cells. *Sci Rep* [Internet]. 18 de marzo de 2022 [citado 29 de marzo de 2022];12(1):4713. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-08185-1>

119. Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, et al. High Affinity Binding and Direct Antiproliferative Effects of LHRH Analogues in Human Ovarian Cancer Cell Lines^{1 2}. *Cancer Research*. 1 de noviembre de 1993;53(22):5439–46.
120. Sperduti S, Limoncella S, Lazzaretti C, Paradiso E, Riccetti L, Turchi S, et al. GnRH Antagonists Produce Differential Modulation of the Signaling Pathways Mediated by GnRH Receptors. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. enero de 2019 [citado 19 de diciembre de 2022];20(22):5548. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5548>
121. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*. abril de 2004;25(2):235–75.