



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

“Reprogramación del *splicing* alternativo de genes asociados
a cáncer de mama”

TESIS

Que para obtener el grado de:
Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Kate Ariadna Rossano Gutiérrez

Directora de Tesis:

D. C. Rebeca Débora Martínez Contreras

Co-Directora de Tesis:

D.C. Nancy Martínez Montiel

Agosto 2022

Índice

Resumen	5
Introducción.....	6
Justificación.....	7
1.1 Generalidades del <i>splicing</i>	
1.1.2 <i>Splicing</i> constitutivo	8
1.1.2.1 Elementos en <i>cis</i> que definen eventos de <i>splicing</i>	8
1.1.2.2 Conformación del espliceosoma	8
1.1.2.3 Proceso de formación del complejo espliceosomal.....	9
1.1.3 <i>Splicing</i> alternativo.....	11
1.1.3.1 Retención de intrones	12
1.1.3.2 Exitrones	13
1.1.3.3 Omisión de exones.....	13
1.1.3.4 Sitio donador alternativo 5'.....	14
1.1.3.5 Sitio aceptor alternativo 3'	14
1.1.3.6 Exones mutuamente excluyentes.....	15
1.1.3.7 Selección de sitios de poliadenilación alternativos.....	16
1.1.3.8 Selección de sitios promotores alternativos	17
1.1.4 Factores reguladores del <i>splicing</i> alternativo.....	18
1.1.4.1 Proteínas SR.....	18
1.1.4.2 Proteínas hnRNP's.....	18
1.1.5 Elementos reguladores del <i>splicing</i> alternativo.....	20
2.1 Cáncer de mama	21
2.1.1 Clasificaciones del cáncer de mama	21
2.1.1.1 Clasificación acorde a la invasividad	22
2.1.1.3 Clasificación según la localización anatómica.....	22
2.1.1.3 Tipos de estadios en cáncer de mama	23
2.1.1.4 Clasificación del cáncer de mama según la presencia de los receptores hormonales	24
3.1 Desregulación del <i>splicing</i> alternativo de genes asociados a cáncer de mama	25

3.1.1.1	Actividad de los estrógenos mediada por la unión a receptores (ER)..	26
3.1.1.2	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1 (BRCA1).....	28
3.1.1.3	Factor de transcripción tipo Myb 1 de unión a ciclina D (DMTF1).....	29
3.1.1.4	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)	30
3.1.1.5	Factor 6 tipo Krüppel (KLF6)	31
3.1.1.6	Survivina	33
4.1	Oligonucleótidos antisentido como tratamiento contra cáncer.....	37
4.1.1	Modificaciones químicas en oligonucleótidos anti sentido.....	38
4.1.1.1	Modificaciones de grupo fosfato en los oligonucleótidos anti sentido ..	39
4.1.1.2	Modificaciones de los anillos de azúcar en los oligonucleótidos anti sentido.....	40
4.1.1.3	Modificaciones de la base nitrogenada en los oligonucleótidos anti sentido.....	40
4.1.1.4	Ácidos nucleicos bloqueados (LNA)	40
4.1.1.5	Ácidos nucleicos peptídicos (PNA).....	41
4.1.2	Métodos de transfección celular para oligonucleótidos anti sentido	42
4.1.2.1	Transfección celular por lípidos	42
4.1.2.2	Transfección celular mediante péptidos penetrantes de células	43
4.1.3	Mecanismos de captación celular de los oligonucleótidos anti sentido	44
4.1.4	Mecanismo de acción de los oligonucleótidos anti sentido.....	44
4.1.5	Oligonucleótidos antisentido como modificadores de eventos de <i>splicing</i> alternativo	45
4.1.5.1	Oligonucleótidos interruptores de <i>splicing</i> (SSO).....	46
4.1.5.2	Moléculas TOSS, TOES y ESSENCE como modificadores de eventos de <i>splicing</i> alternativo.....	48
4.1.6	Oligonucleótidos antisentido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos	49
4.1.6.1	Fomirvirsén	50
4.1.6.2	Nusinersén	50
4.1.6.3	Eteplirsén	51
	Conclusiones	53

Perspectivas.....	54
Referencias	55
Anexos	69

Resumen

De acuerdo con el dogma central de la biología molecular, el ADN se transcribe en ARN, y este a su vez, se traduce a proteína. Durante la transcripción, el transcrito primario (pre-ARNm) es convertido en un ARNm maduro y funcional. Estas modificaciones son 1) la adición de la CAP extremo 5', 2) la poliadenilación en el extremo 3' y 3) el *splicing*. El *splicing* alternativo es el mecanismo co-transcripcional empleado por el 95% de los genes humanos, que involucra el corte o empalme diferencial de exones (secuencias codificantes) e intrones (secuencias no codificantes) para formar transcritos complejos y proteínas desiguales. Se ha observado que los poco más de 21 000 genes en el humano, generan más de 100 000 transcritos diferentes, con lo que se demuestra la diversidad proteica del genoma humano, expresada gracias al *splicing* alternativo. Por si fuera poco, el *splicing* alternativo es uno de los principales reguladores de la expresión génica, que en ocasiones puede dañarse, debido a las mutaciones génicas y cambios en los factores de *splicing*, por lo que producen isoformas aberrantes; un ejemplo claro es en cáncer de mama. El cáncer de mama es una problemática en salud pública que requiere atención, debido a sus altos niveles de incidencia, prevalencia y mortalidad. A nivel mundial, este tumor ocupa el primer lugar entre las neoplasias más frecuentes mientras que en México, hay un estimado anual de 40.5 casos nuevos por cada 100 000 mujeres. En cáncer de mama, la desregulación del *splicing* alternativo en los genes *ERα*, *BRCA1*, *DMTF1*, *HER2*, *KLF6* y *BIRC5*, se han correlacionado con la progresión tumoral, la angiogénesis, la invasión, la metástasis y la resistencia a fármacos antineoplásicos además de que altera el ciclo celular e inhibe la apoptosis, lo que muestra el papel fundamental del *splicing* alternativo en el contexto del cáncer de mama.

Ante la resistencia a los fármacos existentes, se han buscado nuevos tratamientos con mayor especificidad y menor daño celular. El uso de oligonucleótidos anti sentido es una propuesta novedosa que ha mostrado éxito en la reprogramación de genes para otras condiciones, por lo que consideramos que la reprogramación de las isoformas oncogénicas a través de éstos oligonucleótidos, podría reducir los efectos tumorales en las células e incrementar la supervivencia del paciente.

Introducción

El procesamiento del ARNm es un evento nuclear, previo a la formación de proteínas, conformado por tres procesos: 1) adición del CAP en el extremo 5', 2) poliadenilación del extremo 3' y 3) *splicing* (1). El corte y empalme (*splicing*) es un mecanismo co-transcripcional, que se da en organismos eucariotas como metazoos, hongos, plantas y mamíferos. Este proceso ocurre en un pre-ARNm (1–3), el cual está formado por secuencias no codificantes (intrones) y secuencias codificantes (exones), que son removidas y ligadas, respectivamente, para formar distintas proteínas a partir de un mismo gen. El *splicing* es clave fundamental en la diferenciación celular, homeostasis celular, regulación de funciones específicas del tipo celular, desarrollo de tejidos y diversidad proteica (1,4,5). Específicamente, el *splicing* alternativo es un proceso importante que controla la expresión de genes y contribuye a la complejidad y diversidad proteómica (2). Sin embargo, se ha observado que el 15% de las enfermedades genéticas y cáncer están asociadas con alguna desregulación de los eventos de *splicing* alternativo (6,7). En cáncer, la desregulación del *splicing* alternativo promueve la oncogénesis de cáncer de pulmón, ovario, glioblastoma, melanoma y mama (8,9). En cáncer de mama, las alteraciones del *splicing* alternativo están relacionadas con la sobreexpresión de oncogenes y baja expresión de genes supresores de tumores (10). Eventualmente, han surgido nuevas terapias mediante el uso de oligonucleótidos antisentido capaces de redirigir el *splicing* alternativo. Este tipo de terapias ya han sido probadas en pacientes con enfermedades neuromusculares. El objetivo de este trabajo es analizar los antecedentes relacionados a la expresión de isoformas de *splicing* implicadas en procesos celulares como la proliferación, invasión, angiogénesis, transición epitelio-mesénquima, inhibición de la apoptosis y actividades supresoras de tumores en cáncer de mama. Asimismo, proponemos el uso de oligonucleótidos antisentido como tratamiento terapéutico contra cáncer de mama.

Justificación

El cáncer de mama es un gran desafío en la salud pública, pues hasta la fecha se siguen reportando niveles elevados de incidencia, prevalencia y mortalidad debidas a esta enfermedad, ocupa el primer lugar entre las neoplasias más frecuentes en el mundo, siendo además la primera causa de muerte en mujeres mexicanas.

El *splicing* alternativo juega un papel importante en la regulación de la expresión génica y diversidad proteica. No obstante, se han observado mutaciones en el genoma, tanto en algunas proteínas espliceosomales y reguladoras, como en diversos genes relacionados a procesos cancerosos. En estos casos, se induce la formación de variantes aberrantes relacionadas al desarrollo de procesos como el cáncer de mama, en donde el *splicing* alternativo tiene implicaciones importantes en el control tumoral, pues se reportan isoformas relacionadas a la angiogénesis, invasión, progresión y metástasis celular e inhibición de la apoptosis.

En la actualidad, los tratamientos basados en quimioterapias, radioterapias, hormonales e intervenciones quirúrgicas reducen el número de células tumorales, sin embargo, presentan una gran desventaja al no ser específicos y no discernir entre células sanas y células tumorales. Estos tratamientos resultan ser desgastantes física y anímicamente para el paciente, por lo que se requiere del uso de terapias más precisas y menos agresiva. En las últimas décadas, han surgido terapias génicas como coadyuvantes de los tratamientos de elección y un ejemplo corresponde a los oligonucleótidos antisentido (ASOs, por sus siglas en inglés: AntiSense Oligonucleotides). Estos ASOs son diseñados para corregir un evento anómalo de *splicing* y ya han sido empleados con éxito para el tratamiento de la atrofia muscular espinal, al ser capaces de restablecer la expresión de la isoforma funcional de la proteína SMN2. Estos antecedentes indican que la reprogramación de eventos de *splicing* a través del diseño de oligonucleótidos antisentido constituye una herramienta prometedora que podría permitir la expresión de isoformas proteicas, que supriman el desarrollo tumoral y promuevan la muerte celular.

1.1 Generalidades del *splicing*

1.1.2 *Splicing* constitutivo

El *splicing* constitutivo es el mecanismo menos frecuente en organismos eucariotas, que controla la cantidad de ARNm maduro al precisar el corte de intrones y empalme de exones, por lo que no favorece la diversidad de isoformas. Este tipo de mecanismo no solo actúa durante la transcripción, pues se ha propuesto su participación en diferentes eventos como el mejoramiento de la expresión a través del proceso "*intron mediated enhancement*", así como el incremento de los niveles de ARN no codificantes, entre ellos los microARN intrónicos, además de que facilita el estudio de diversos tipos de *splicing* alternativo. Se ha comprobado que la eficiencia del *splicing* constitutivo está determinada por las concentraciones del complejo proteico de *splicing* (espliceosoma) y las características de las secuencias presentes en los límites exón/intrón (11).

1.1.2.1 Elementos en *cis* que definen eventos de *splicing*

Los elementos en *cis* son secuencias específicas y conservadas, que se encuentran a lo largo del pre-ARNm, en especial, en las uniones exón/intrón (1). El intrón presenta un sitio de *splicing* 5' (5'SS) al inicio, determinado por la secuencia dinucleótido GU, y un sitio de *splicing* 3' (3'SS) al final, rico en secuencias AG. Además, 15-50 nucleótidos río arriba de 3'SS, se ubica el punto de ramificación (BP, por sus siglas en inglés: Branch Point) (rico en adenina) y un tracto de polipirimidina (PPT, por sus siglas en inglés: PolyPyrimidine Tract), que más tarde serán reconocidas por el espliceosoma (Figura 1a) (2,12).

1.1.2.2 Conformación del espliceosoma

El *splicing* constitutivo es un proceso complejo y sistemático, que requiere de la unión ordenada de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, por sus siglas en inglés: Small Nuclear Ribonucleoproteins) U1, U2, U4, U5 y U6 para formar el centro catalítico del espliceosoma, y de esta manera, llevar a cabo el corte de intrones y empalme de exones(1,2). Estructuralmente, cada una de las

snRNP presenta un grupo característico de proteínas, además de un anillo formado por siete proteínas Sm (13). Además de las snRNP's, existen otras proteínas que participan en la formación del espliceosoma; tal es el caso del factor de *splicing* 1 (SF1, por sus siglas en inglés; Splicing Factor 1) que es indispensable, ya que interactúa con el subcomplejo SF3b1 de la proteína U2 y favorece los eventos de omisión de exones (14). También, se ha reportado la actividad de las ARN/helicadas Brr2, Prp2, Prp16 y Prp22 durante el ensamble del espliceosoma y los procesos de transesterificación (15).

1.1.2.3 Proceso de formación del complejo espliceosomal

El ensamble del espliceosoma pasa por siete etapas, que se diferencian por la unión de cada snRNP, denominados, 1) complejo pre-catalítico (B), 2) complejo activado (B^{activo}), 3) complejo catalíticamente activado (B^*), 4) espliceosoma paso catalítico I (C), 5) complejo activado paso catalítico II (C^*), 6) complejo post-catalítico (P) y 7) estructura de lazo del intrón (ILS, por sus siglas en inglés: Intron Lariat Spliceosome) (Figura 1b)(15).

La reacción inicia con el reconocimiento de la proteína U1 al 5'SS, luego se une SF1 a la secuencia BP y U2AF65 al 3'SS para formar el complejo E (2). Posteriormente, se promueve el intercambio de SF1 por U2, mediante la actividad de las ARN/helicadas sub2/UAP56 y Prp5, que promueven la formación del complejo A (15,16). Enseguida, el complejo de las tri-snRNP U4/U6.U5 se acopla al 5'SS. Mientras tanto, el paso del complejo B a B^{activo} es realizado por la helicasa Brr2, que disocia las snRNP's U1 y U4 y promueve su salida. Luego, la helicasa Prp2 permite la conversión del complejo B^{activo} a B^* (Figura 1b). El primer paso de transesterificación surge a partir del ataque nucleofílico del hidroxilo de la adenosina, que forma parte de la secuencia BP, al grupo fosfato del 5'SS, liberando así el extremo 5' del intrón dejando atrás la estructura en forma de lazo intrón. En la segunda reacción, el grupo hidroxilo del 5'SS ataca al grupo fosfato del 3'SS, lo cual produce la liberación del intrón y el empalme de los exones, además de la liberación de las snRNP's y el reinicio del ciclo (Figura 2) (2,13,15,16).

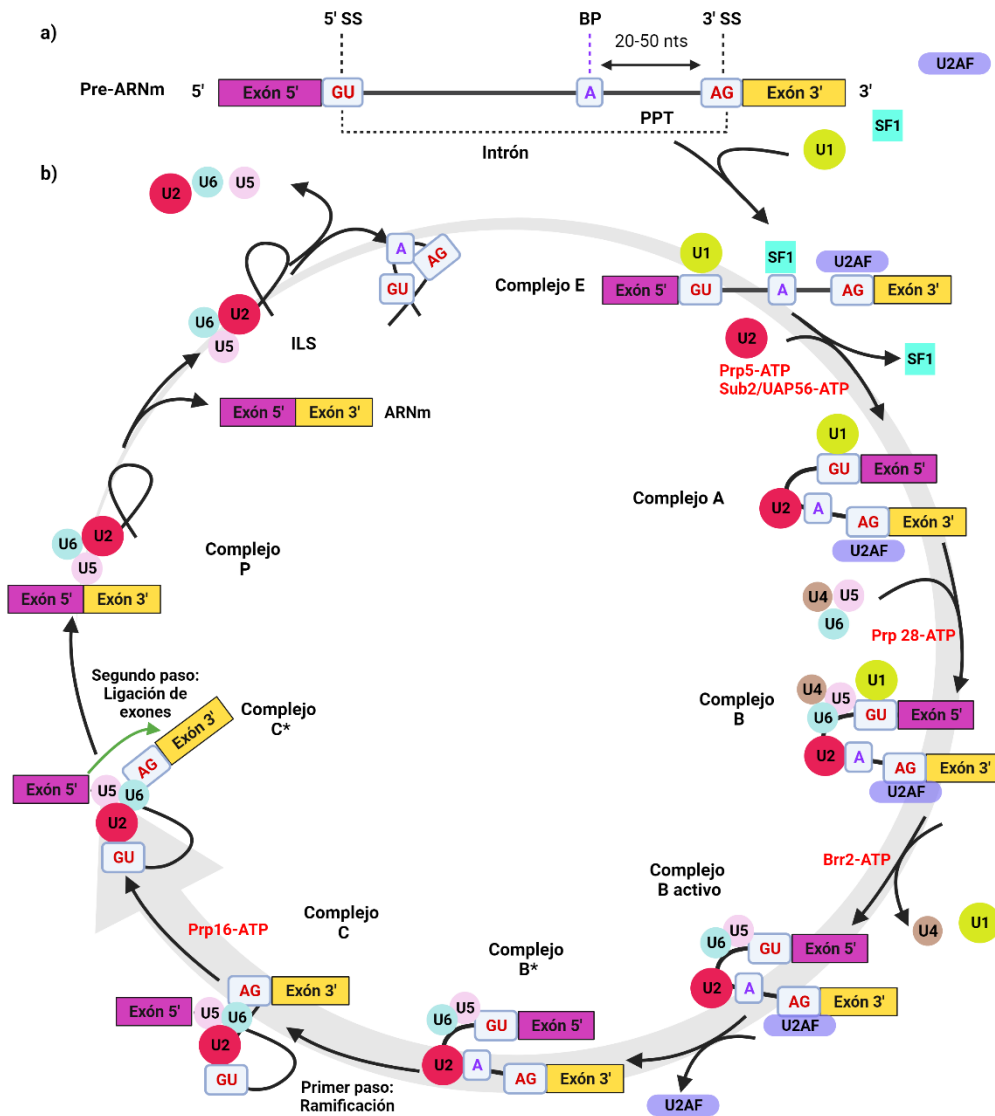


Figura 1. Ensamblaje del complejo espliceosomal y elementos reguladores de *splicing* alternativo.

a) El pre-ARNm está conformado por los exones 5' y 3', que flanquean el intrón. Este presenta un sitio de *splicing* 3' (3'SS), determinado por la secuencia GU, y un sitio de *splicing* 5' (5'SS), que expresa la secuencia AG. De lado izquierdo del sitio 3'SS, se localiza el tracto de polipirimidina (PPT). Además, entre 20-50 nucleótidos río arriba de 3'SS, se encuentra el sitio de ramificación (BP), que se caracteriza por la presencia de una adenina. Los rectángulos ejemplifican los exones, mientras tanto la línea negra simboliza el intrón.

b) El espliceosoma es un complejo multiproteico, que cataliza la remoción de intrones y el empalme de los exones para producir ARNm maduros. Este complejo está formado por las ribonucleoproteínas U1, U2, U4/U6.U5 y factores asociados. En esta sección, se esquematiza paso a paso la interacción de las snRNP's para el ensamblaje del espliceosoma en mamíferos. Este proceso requiere de las ATPasas/helicadas dependientes de ARN que actúan en distintas etapas del ciclo para catalizar el reordenamiento del ARN. Modificada de Shi, 2017 (15).

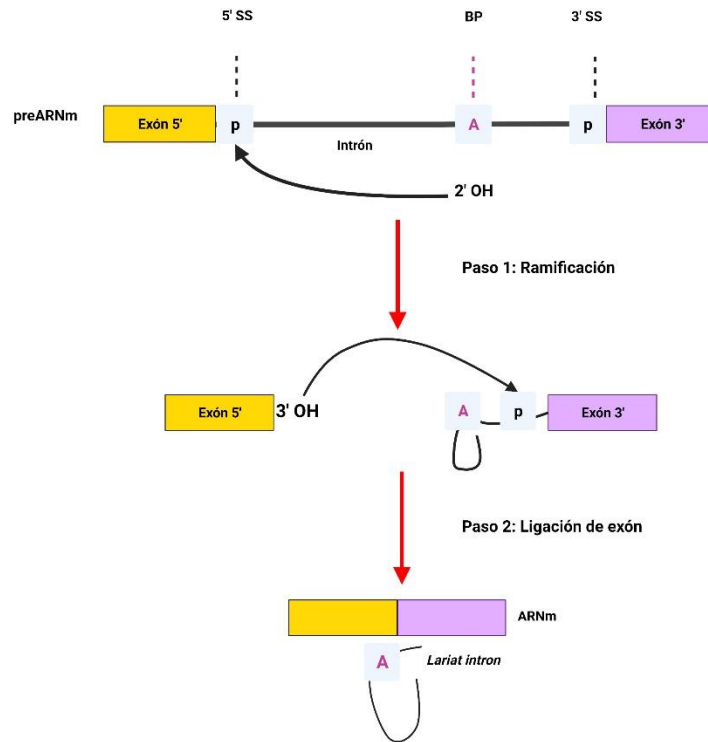


Figura 2. Reacciones de transesterificación en el *splicing* alternativo.

En el siguiente esquema se explican las reacciones de transesterificación involucradas en el *splicing* alternativo. El paso 1 es el ataque nucleofílico del 2'OH, proveniente de la adenosina del sitio de ramificación, al grupo fosfato del intrón 5', liberando así el exón 5' y generando el *lariat intron*. El paso 2 implica la ligación de los exones, mediante el ataque nucleofílico de 3'OH del exón 5', al fosfato del 3'SS. Modificada de Wilkinson y cols., 2020 (13).

1.1.3 *Splicing* alternativo

El *splicing* alternativo es el proceso dinámico empleado para la maduración y expresión en el 95% de los genes humanos (17,18). Este fenómeno participa en la regulación de diferentes procesos celulares como: la diferenciación celular, la homeostasis celular y el desarrollo de tejidos, además que regula la expresión génica y promueve la diversidad proteica (1,4). En organismos eucariotas, el *splicing* alternativo regula la activación de distintos mecanismos como: el tiempo de floración en *Arabidopsis*, la virulencia de hongos patógenos, la termogénesis de ratones y el desarrollo en gusanos, moscas, ratas y primates (3). Contrario al *splicing* constitutivo, el *splicing* alternativo consiste en la eliminación o inclusión de intrones o de exones de manera diferencial, lo que genera múltiples transcritos con actividad distinta (3,8). Se ha observado que el procesamiento de los poco más de 21 000 genes humanos, generan más de 100 000 transcritos, de manera

que, la diversidad proteica es el resultado de la combinación de eventos de empalme simples para formar transcritos complejos (18,19). Se han descrito los siguientes patrones de *splicing* alternativo: (1) retención de intrones, (2) omisión de exones, (3) sitio donador alternativo 5', (4) sitio aceptor alternativo 3' y (5) exones mutuamente excluyentes (Figura 3) (20).

1.1.3.1 Retención de intrones

La retención de intrones (RI) es el evento menos estudiado, que se caracteriza por la inclusión total o parcial de intrones, incluso se pueden observar uno o varios intrones en un mismo ARNm maduro (Figura 3) (21,22). Este evento ocurre principalmente en organismos eucariotas unicelulares como plantas, virus y con menor frecuencia en mamíferos. En ocasiones, la expresión de este evento involucra la alteración y/o pérdida de la función proteica. Un ejemplo claro, que define RI, es la proteína rica en glutamato y arginina 1 (ARGLU1) (19,22).

Las funciones de ARGLU1 aún no están claras, sin embargo, se ha reportado la interacción de ARGLU1 con diferentes componentes del espliceosoma, dentro de ellos, las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs, por sus siglas en inglés: Small Nuclear RiboNucleoProteins) y las proteínas ricas en serina-arginina (SR). En *Drosophila*, se ha identificado a CG31712, homólogo de ARGLU1, que interactúa con la snRNP U1-70K, por lo que podría estar implicado en el ensamblaje del espliceosoma. Además, que el ARNm de ARGLU1 experimenta la retención del intrón 2, localizado entre los exones 2 y 3. En consecuencia, la RI altera la regulación del *splicing* sobre el mismo gen y el transporte del ARNm, pues pierde la capacidad de exportarse hacia el citoplasma y permanece en el núcleo.

Durante la transcripción, se ha observado la asociación de ARGLU1 y la subunidad del complejo mediador 1 (MED1). MED1 actúa como un coactivador de la transcripción, que, a su vez, se une al complejo mediador transcripcional. Este complejo se encarga de difundir la señal de activación de la transcripción a la ARN polimerasa II y los factores asociados para así garantizar el proceso, por lo cual

ARGLU1 podría ser un acoplador tanto para el *splicing* como para la transcripción (22).

1.1.3.2 Exitrones

Comúnmente, *Arabidopsis thaliana* muestra eventos de RI, de los cuales el 11% corresponde a exitrones. Los exitrones (intrones exónicos) son secuencias intrónicas dentro de exones, que producen isoformas más cortas, desordenadas y sujetas a cambios postraduccionales. En *A. thaliana*, las proteínas expresadas por la RI no cuentan con dos sitios de fosforilación y un motivo de unión a ATP, que la isoforma larga de RI presenta. En mamíferos, estos exitrones modifican el marco de lectura río abajo, además de que inciden en varios procesos celulares, incluyendo la unión a ADN durante la transcripción, la activación de factores de replicación y la disminución de la localización de la matriz nuclear; esto último se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (19).

1.1.3.3 Omisión de exones

La omisión de exón o empalme de exón en cartucho (ES, por sus siglas en inglés: Exon Skipping) comprende del 50 al 60% total de eventos de empalme alternativo, por lo que es el evento más común en genes humanos (7). El empalme de exón en cartucho consiste en la eliminación y/o inclusión total de un exón intermedio, flanqueado por dos exones, que genera dos proteínas funcionalmente distintas (Figura 3) (7,20). En comparación con el *splicing* constitutivo, los exones en cartucho presentan un menor contenido de guaninas y citocinas (GC), mayor debilidad de los sitios de *splicing* y mayor número de codones de término (7).

Diversos estudios han demostrado que los eventos de empalme de exón en cartucho están relacionados al desarrollo de múltiples enfermedades como cáncer renal, pérdida auditiva, atrofia muscular espinal y cáncer de hueso (7,12,23). En la atrofia muscular espinal (SMA, por sus siglas en inglés: Spinal Muscular Atrophy), las eliminaciones homocigóticas alteran el gen SMN1, lo que origina pérdida de la proteína de supervivencia de las neuronas motoras (SMN) (24). Ante esta pérdida, se activa la producción de SMN2, que presenta una estructura similar a SMN1. Sin

embargo, el procesamiento de SMN2 favorece la omisión del exón 7, que compromete la funcionalidad de la proteína (12). Otro ejemplo, el oncogén homólogo E26 del virus de la eritroblastosis aviar V-ets (ERG, por sus siglas en inglés: the ETS Related Gene), juega un papel importante en la hematopoyesis, maduración de condrocitos, desarrollo óseo, apoptosis y migración celular. El exón 7 de ERG puede llegar a omitirse debido a un evento de *splicing* alternativo y en este caso el fenotipo corresponde a impedir la maduración de condrocitos y el remplazo del cartílago con hueso. Por otro lado, se ha reportado el uso de exones en cartucho como blanco terapéutico para generar proteínas funcionales en el síndrome de miastenia congénita (7).

1.1.3.4 Sitio donador alternativo 5'

El sitio donador alternativo 5' (A5'SS, por sus siglas en inglés: Alternative 5' Splice Site) es el evento en el cual se pueden elegir diferentes sitios 5' de afinidad variable por el espliceosoma, lo que deriva en la retención de un fragmento del exón (Figura 3) (20,21). Este tipo de eventos se observa en los genes XIST y ERG.

XIST (XIST, por sus siglas en inglés X-inactive specific transcript) es un ARN no codificante indispensable para la desactivación del cromosoma X, por lo tanto, su incorrecta expresión dificulta el desarrollo embrionario. XIST presenta dos isoformas; la isoforma corta (XIST-S) y la isoforma larga (XIST-T) producidas por el A5'SS. Mientras tanto ERG (ERG, por sus siglas en inglés, ETS Related Gene) es un gen regulador de la transcripción que experimenta un agregado del exón 7, denominado 7-b, que suscita la proliferación, invasión celular y apoptosis en osteosarcoma (23).

1.1.3.5 Sitio aceptor alternativo 3'

El sitio aceptor alternativo 3' (A3'SS, por sus siglas en inglés: Alternative 3' Splice Site) constituye aproximadamente el 18% del total de eventos de *splicing* alternativo (25). Este evento ocurre cuando la maquinaria del empalme reconoce y elige un sitio 3' variable, de manera que, se modifica la longitud del transcrito

generado (Figura 3) (21), como por ejemplo el empalme del factor de crecimiento endotelial vascular 165b (VEGF-A 165b, por sus siglas en inglés: Vascular Endothelial Growth Factor- A 165b, los números señalan la cantidad de aminoácidos en la proteína y la letra indica la funcionalidad anti-angiogénica) (20).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés: Vascular Endothelial Growth Factor) es una familia de receptores, encargados de regular la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) en células sanas y anormales (20). Esta familia está conformada por cuatro miembros (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D) donde VEGF-A es el mayor estudiado, pues es el estimulador principal de la angiogénesis, la permeabilidad, la migración y la supervivencia celular, además de ser una excelente diana terapéutica contra el cáncer (26). A su vez, VEGF-A se subdivide en dos grupos según la funcionalidad de sus isoformas, ya que las isoformas denominadas 1) VEGF-A_{xxx} a muestran un efecto pro-angiogénico y las isoformas 2) VEGF-A_{xxx} b presentan actividad anti-angiogénica (27). En especial, VEGF-A 165b es la variante anti-angiogénica conformada por ocho exones, que experimenta un A'3SS distal en el exón 8, localizado 66 pares de bases (pb) río abajo del A'3SS convencional, lo que da como resultado un recortamiento del exón 8 (exón 8b) y cambio en la funcionalidad (26).

1.1.3.6 Exones mutuamente excluyentes

El evento de exones mutuamente excluyentes (MXE, por sus siglas en inglés: Mutually eXclusive Exons) es la retención competitiva entre dos exones para formar múltiples isoformas, por lo que no se observan dos exones consecutivos. Este tipo de eventos ocurre en un 33% de los eventos de *splicing* alternativo (Figura 3) (20,21,28).

La piruvato cinasa del musculo (PKM, por sus siglas en inglés: Pyruvate Kinase Muscle) es una de las enzimas encargadas de regenerar la energía celular, a través de la transformación de fosfoenolpiruvato y ADP (ADP, por sus siglas en inglés: Adenosin DiPhosphate) a piruvato y ATP (ATP, por sus siglas en inglés: Adenosin TriPhosphate) en la vía glucolítica. Durante el procesamiento de los

ARNm, PKM sufre eventos de MXE en los exones 9 y 10, lo que promueve la formación de las variantes PKM1 y PKM2 (28). Las actividades de PKM1 y PKM2 son distintas, pues PKM1 prevalece en tejidos diferenciados, actúa en el proceso metabólico de la fosforilación oxidativa y suprime el desarrollo de tumores (oncogénesis). Caso contrario a PKM2, que predomina en tejido embrionario y células cancerosas, por lo que activa la transcripción de oncogenes y contribuye en la oncogénesis (29).

1.1.3.7 Selección de sitios de poliadenilación alternativos

La retención de más de un sitio de poliadenilación en el ARNm, se denomina poliadenilación alternativa (Figura 3). Esta se puede clasificar en 1) poliadenilación alternativa de región no traducida (UTR-APA, por sus siglas en inglés: UnTranslated Region- Alternative PolyAdenylation) y 2) poliadenilación alternativa de región codificante (CR-APA, por sus siglas en inglés: Coding Region- Alternative PolyAdenylation) (30). La UTR-APA exhibe varios sitios poliadenilados en la región 3' no traducible (3'UTR, por sus siglas en inglés: 3' UnTranslated Region), lo que produce una reducción de la región, pero sin modificar la región codificante (28).

Contrario a UTR-APA, CR-APA se distingue por la presencia de múltiples sitios de poliadenilación en exones e intrones. Además, el reconocimiento de los diferentes sitios de poliadenilación, da como resultado el empalme de diferentes exones en el extremo 3' del transcrito (17,20,30). Algunos oncogenes utilizan la poliadenilación alternativa para su activación; en particular CCND1(28,30).

La ciclina 1 (CCND1; por sus siglas en inglés: CyCliN D1) es una proteína, que participa en la transición de las etapas G1-S del ciclo celular y que con frecuencia se ve alterada en procesos cancerígenos. Durante el procesamiento del ARNm, CCDN1 expresa las isoformas CCND1a y CCND1b, que son productos derivados de UTR-APA y CR-APA, respectivamente. CCD1a es la isoforma común, que incluye los exones 1-5. En cambio, CCD1b es la variante oncogénica que se forma a partir de los sitios de poliadenilación, localizados en el intrón 4, lo que da como resultado la retención del intrón 4, la anticipación del codón de parada y la

exclusión del exón 5. Además, que la sobreexpresión de la isoforma acelera la proliferación tumoral (30).

1.1.3.8 Selección de sitios promotores alternativos

Los sitios promotores alternativos son elementos localizados en el extremo 5', que forman diferentes transcritos, a partir de la variabilidad de los primeros exones, por lo que cada transcrito difiere de la región no traducida 5' (UTR, por sus siglas en inglés: Unstranlated Region) o de las secuencias de codificación, en consecuencia, esto podría modificar la función y la localización de la proteína (17,20,31). Hasta el momento, se tiene poca información sobre este tipo de evento (31).

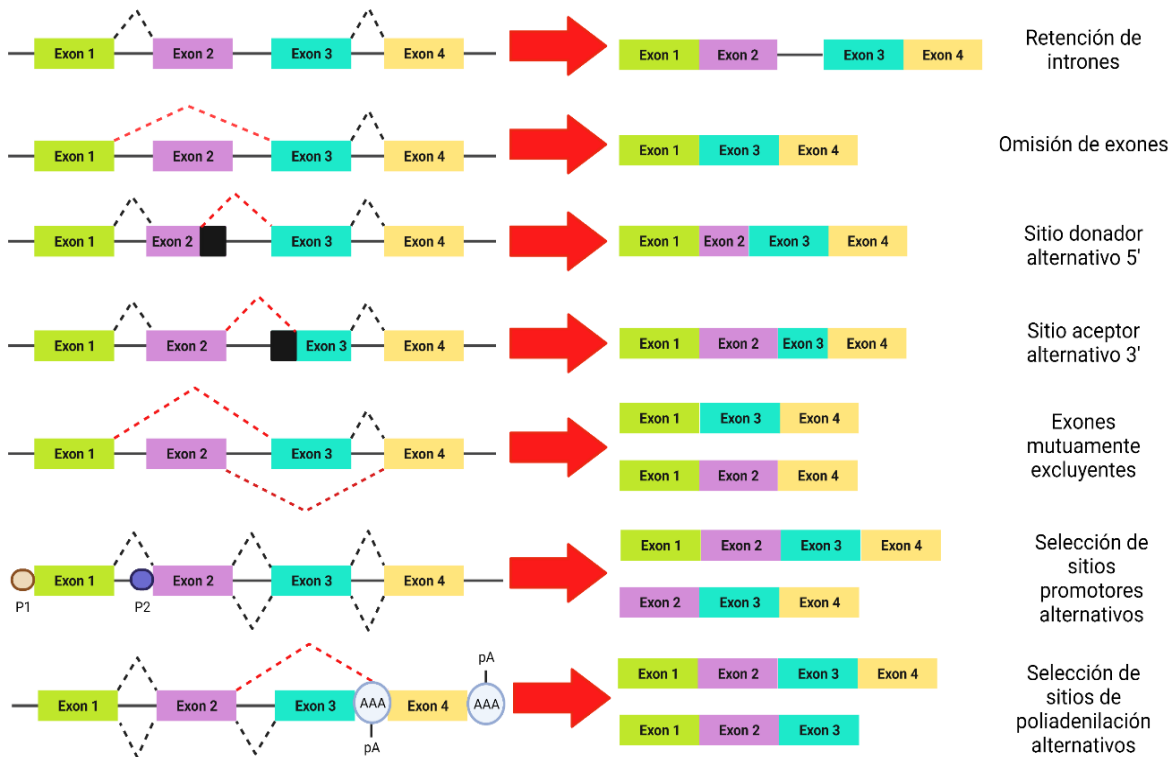


Figura 3. Tipos de *splicing* alternativo en ARNm.

El siguiente esquema muestra los diferentes eventos de *splicing* alternativo, que se representan en el núcleo celular como: retención de intrones, omisión de exones, sitio donador alternativo 5', sitio aceptor alternativo 3', exones mutuamente excluyentes, selección de sitios promotores alternativos y selección de sitios de poliadenilación alternativos. De lado izquierdo se muestra el pre-ARNm. De lado derecho se observa el ARNm resultante tras cada evento de *splicing* alternativo. Los cuadros simbolizan los exones y las líneas negras continúan representando los intrones. P1: Promotor 1. P2: Promotor 2. pA: sitios de poliadeninas. Modificada de: Wang y Lee, 2018 (20).

1.1.4 Factores reguladores del *splicing* alternativo

Para su correcto funcionamiento durante el procesamiento del ARNm, el espliceosoma requiere de proteínas adicionales para modular la expresión. El empalme alternativo está regulado por factores en *trans*. Estos factores se dividen principalmente en dos familias de proteínas: las proteínas SR y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP's) (1).

1.1.4.1 Proteínas SR

Las proteínas SR están constituidas por dos motivos de reconocimiento al ARN (RRM) ubicados en el extremo amino y un dominio SR localizado en el extremo carboxilo. En el humano se han reportado 12 proteínas SR (SRSF1-SRSF12) (12,32). Cada una de ellas se distingue por la longitud y conformación del dominio SR, siendo SRSF4 la proteína más larga, mientras que SRSF7 presenta un dominio adicional de zinc (33,34). La importancia de los dominios SR radica en que es el responsable del reconocimiento de elementos *cis* (ARNm) así como de la interacción con diversos componentes espliceosomales. En este sentido, SRSF1, SRSF2 y SRSF6 favorecen el reclutamiento de las snRNP's U1 y U2 a los sitios 5'SS y 3'SS (9). No obstante, SRSF2 puede inhibir el empalme al unirse a una secuencia específica, localizada 20 nucleótidos río arriba del 3'SS y promover la exclusión de exones (12). Por otro lado, las proteínas SR pueden unirse al intrón e impedir el reclutamiento de las snRNP's U1 y U2. Algunas veces, se logra observar la competencia entre dos proteínas SR al reclutar a la snRNP U2 mediante su unión a exones adyacentes. En cambio, se ha observado que SRSF2, SRSF9, SRSF10 y SRSF12 actúan como potenciales represores del *splicing* alternativo (33).

1.1.4.2 Proteínas hnRNP's

Las hnRNP's son proteínas que presentan uno o varios motivos de reconocimiento al ARN (RRM, por sus siglas en inglés: RNA Recognition Motif), uno o más dominios de homología K (KH, por sus siglas en inglés: K Homology) y/o una secuencia rica en arginina/glicina (35). En humanos, se han encontrado alrededor

de 20 proteínas pertenecientes a este grupo (A1-U), cuya localización celular puede ser el núcleo, la mitocondria, el citoplasma o membrana citoplasmática (36,37). En procesos moleculares, las hnRNP's juegan un papel importante en el control de la expresión génica al modular mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, dentro de los cuales se incluye la poliadenilación, el procesamiento del ARN, así como su limitación, modificación, exportación, localización, traducción y recambio. Dentro de todas sus actividades, la principal función de las hnRNP's en el *splicing* alternativo; es regular la expresión del ARNm por medio de la inhibición, dicho de otra manera, evita la unión del complejo espliceosomal al ARNm; tal es el caso de la hnRNP L y el transcrito de la caspasa 9 (35).

Las caspasas son un grupo de cisteína proteasas, que fragmentan residuos de aspartato y desintegran la célula para llevarla hacia la muerte celular (apoptosis) cuando las condiciones de la célula no son favorables, debido al desgaste celular, la disminución de los niveles de oxígeno (hipoxia), el daño irreparable al ADN y/o la expresión excesiva de oncogenes. El grupo de caspasas comprende de la caspasa 1 -11 y de acuerdo con su función estas se dividen en dos grupos: iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras 8, 9 y 10 son las principales encargadas en recibir las señales pro apoptóticas. En cambio, las caspasas efectoras 3, 6 y 7 dependen de las caspasas iniciadoras, es decir las caspasas 8, 9 y 10, para su activación mediante la escisión de la subunidad catalítica pequeña (por su nombre en inglés: Small catalytic subunit) (38,39).

Entre las caspasas mencionadas, el transcrito de la caspasa 9 sufre eventos de inclusión y exclusión de los exones en cartucho 3, 4, 5 y 6, lo que da lugar a la formación de las variantes 9a (proapoptótica) y 9b (antiapoptótica), respectivamente. En este escenario, las hnRNP U y hnRNP L se unen al exón 3 para lograr la formación de las variantes. La diferencia es que la hnRNP L inhibe la inclusión de los cuatro exones y forma la variante 9b, mientras que, hnRNP U favorece la inclusión de los exones, lo que da como resultado la variante 9a (40,41). Asimismo, Gu y cols., mencionan que hnRNP L actúa como un activador

en eventos de retención de intrones (36). Como ya sabemos las hnRNP's son proteínas que inhiben el *splicing* alternativo, así como tienen la capacidad de activarlo. Esto depende de la unión de las hnRNP's a los elementos reguladores (35,36), que se describen en el siguiente apartado.

1.1.5 Elementos reguladores del *splicing* alternativo

El *splicing* alternativo participa en la regulación de la expresión génica, la homeostasis celular y el desarrollo de tejidos (21,32,35). A su vez, este proceso es modulado gracias a la unión de proteínas SR y hnRNP's a diversos sitios reguladores, los cuales pueden potenciar y/o inhibir el reconocimiento del espliceosoma de un sitio en particular (1,2,25). Para estudiar la regulación del *splicing*, se han descrito cuatro tipos de elementos reguladores de *splicing* (SRE), que son los siguientes: 1) potenciadores exónicos de *splicing* (ESE, por sus siglas en inglés: Exonic Splicing Enhancer), 2) potenciadores intrónicos de *splicing* (ISE, por sus siglas en inglés: Intronic Splicing Enhancer), 3) silenciadores exónicos de *splicing* (ESS, por sus siglas en inglés: Exonic Splicing Silencer) y 4) silenciadores intrónicos de *splicing* (ISS, por sus siglas en inglés: Intronic Splicing Silencer) (2). Generalmente, las proteínas SR reconocen sitios ESE, que favorecen la inclusión de los exones (25,33). En contraste, las hnRNP's se unen a los sitios ESS e impiden la unión de las snRNP's al tracto de polipirimidina, de manera que inhiben el empalme de los exones (Figura 4) (21,25). Recientemente, se ha reportado actividad inversa en estas proteínas, en otras palabras, las proteínas SR son capaces de excluir exones, mientras que las hnRNP's favorecen la inclusión de ciertos exones. De esta forma, la actividad de las proteínas SR y hnRNP's depende de su concentración relativa, del contexto celular y de su unión a secuencias específicas (1,25). No obstante, un desbalance en la concentración o disponibilidad de estos factores de *splicing* puede inducir a la producción de isoformas aberrantes que puedan favorecer la progresión tumoral o interrumpir la

función de varios supresores tumorales, por ejemplo, en cáncer de mama (20).

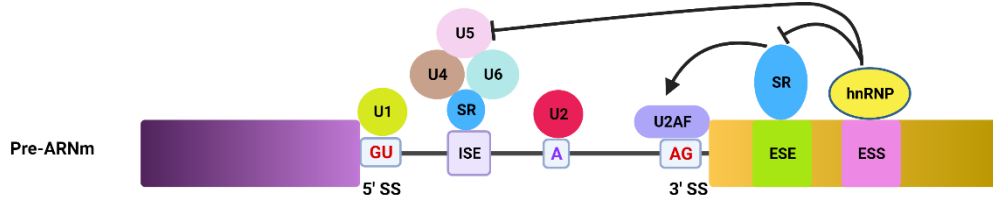


Figura 4. Elementos reguladores del *splicing* alternativo

Los elementos reguladores se localizan a lo largo del transcrito. Las proteínas SR reconocen los elementos potenciadores de *splicing* exónico (ESE), que tienen la capacidad de activar el *splicing* alternativo. De manera contraria, las proteínas hnRNP's se unen a los elementos silenciadores de *splicing* exónico (ESS) para impedir la llegada de las snRNP's e inhibir el *splicing* alternativo. Además, la interacción de los elementos potenciadores intrónicos (ISE), ubicados dentro del intrón, con las proteínas SR favorece la exclusión de los intrones. Modificada de Martínez-Montiel y cols., 2015 (142).

2.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad que se considera heterogénea debido a su diversidad biológica, morfológica, fenotípica y molecular, lo que facilita su propagación a los tejidos cercanos (42). Este tumor ocupa el primer lugar entre las neoplasias más frecuentes a nivel mundial. En México, cada año existen 40.5 casos nuevos por cada 100 mil mujeres. Además que es la primera causa de muerte por cáncer con 7931 decesos (43). El hallazgo de tumores mamarios sigue siendo más frecuente en mujeres, pero esto no impide su desarrollo en hombres (44). Hasta el momento se desconocen los orígenes de esta enfermedad, sin embargo, si se comprenden los factores de riesgo. Existen factores extrínsecos e intrínsecos como la edad, la etnia, la dieta, la actividad física, el consumo de alcohol, la diabetes y la exposición a tratamientos hormonales, que podrían intervenir en el desarrollo de células cancerígenas (45).

2.1.1 Clasificaciones del cáncer de mama

El seno es una estructura corporal compuesta principalmente por tejido conjuntivo (vasos sanguíneos y ganglios linfáticos), tejido adiposo (grasa) y tejido glandular (lobulillos). Los lobulillos son las glándulas productoras de la leche, que a través de los conductos y senos lactíferos drenan la leche hacia el pezón para ser extraída por el bebé (46). Este tipo de glándulas y conductos son relevantes en la carcinogénesis, pues la mayoría de los tumores se alojan en estas estructuras

(46). Tomando en cuenta lo antes mencionado podemos decir que el cáncer de mama es el crecimiento anómalo de células epiteliales mamarias en conductos y/o lobulillos mamarios, que pueden migrar hacia otros órganos (metástasis) a través de los vasos linfáticos mamarios y axilares (46–48).

Con el paso del tiempo, el cáncer de mama ha adquirido varias clasificaciones según la invasividad, localización anatómica, estadio y grado molecular (2,49,50).

2.1.1.1 Clasificación acorde a la invasividad

La siguiente clasificación describe la invasión de las células tumorales dentro o fuera de los lobulillos y conductos lactíferos (49).

Cáncer de mama no invasivo

El cáncer de mama no invasivo o carcinoma *in situ* es aquel tumor que no se ha propagado más allá de los lobulillos o conductos lactíferos, por lo que no invade otras partes del cuerpo (49). Esto genera un pronóstico favorable, luego de que ~98% de los pacientes no mostraron reincidencia del cáncer en los siguientes 5 años (47). A pesar de que este no se extiende, existe la posibilidad de que el tumor progrese, migre y se convierta en cáncer de mama invasivo (49).

Cáncer de mama invasivo

El cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico sucede cuando las células cancerígenas se extienden fuera de la membrana basal y migran a los diferentes órganos del cuerpo mediante el torrente sanguíneo y sistema linfático. Es más común, que este tipo de carcinoma se extienda a el cerebro, el hígado, los huesos y los pulmones (49). En este caso, la metástasis representa el peor pronóstico, pues solo el 23% de los pacientes sobreviven 5 años después del diagnóstico (47).

2.1.1.2 Clasificación según la localización anatómica

El cáncer de mama, también, se puede clasificar según su localización anatómica e invasividad, pues la mayoría de ellos se desarrollan en las estructuras internas del seno (49).

Carcinoma lobulillar infiltrante

El carcinoma lobulillar infiltrante o carcinoma lobulillar invasivo se desarrolla en el interior de los lobulillos y se propaga a otras partes del cuerpo humano (49).

Carcinoma ductal infiltrante

El carcinoma ductal infiltrante, también conocido como carcinoma ductal invasivo, son las células tumorales que invaden los conductos lactíferos y se expanden a la pared del conducto para posteriormente migrar a otras zonas del cuerpo (49). Es importante mencionar, que este subtipo de carcinoma es el más frecuente y simboliza del 70-80% total de los carcinomas invasivos mamarios (47).

Carcinoma tubular

Este tipo de neoplasia pertenece al grupo de carcinomas invasivos, sin embargo, las pacientes que contraen carcinoma tubular tienen mayor esperanza de vida, que aquellas con diferentes tipos de carcinomas invasivos (49).

2.1.1.3 Tipos de estadios en cáncer de mama

El Comité Conjunto Americano del cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés: American Joint Committee on Cancer) ha desarrollado un sistema de categorización, llamado TNM, para el cáncer de mama. El sistema TNM clasifica con base al tamaño del tumor (T), el daño a los ganglios linfáticos (N) y la metástasis (M), por lo que se ha dividido en cuatro estadios. Los estadios se describen en la tabla (50).

Estadio	Descripción
0	Las células tumorales se mantienen dentro de la mama sin invadir el tejido normal próximo.
I	El tumor mide 2 cm o menos. De 1 a 3 ganglios linfáticos axilares pueden estar invadidos por las células tumorales.
II	IIA: El tumor mide entre 2 y 5 cm. De 1 a 3 ganglios linfáticos axilares están invadidos.
	IIB: El tumor mide más de 5 cm. Las células cancerígenas no han invadido los ganglios linfáticos axilares.
III	El tumor se ha propagado a la pared torácica o la piel de la mama y ganglios linfáticos axilares.
IV	El cáncer ha realizado metástasis y se ha propagado a órganos distantes como: hueso, hígado, cerebro o pulmones.

Tabla 1. Sistema TNM para la estadificación del cáncer de mama

2.1.1.4 Clasificación del cáncer de mama según la presencia de receptores hormonales

Molecularmente, el cáncer de mama se puede clasificar a medida que expresa el receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2⁺). De tal manera que existen cinco subtipos, los cuales se han clasificado en 1) Luminal A (ER⁺, PR⁺, HER2⁻), 2) Luminal B (ER⁺, PR⁻, HER2⁻ o ER⁺, PR⁺/PR⁻, HER2⁺), 3) HER2 positivo (ER⁻, PR⁻, HER2⁺), 4) triple negativo (TNBC) (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) y 5) tumores de tipo normal (1,2,51–53). Cada subtipo se logra identificar diferencialmente, debido a los distintos pronósticos y respuestas a terapias, además que esto permite una mejor experimentación *in vivo* sin problema alguno (1,2). Estudios previos han reportado que el subtipo luminal A es el cáncer de menor grado y de excelente pronóstico, que comprende del 40-50% de los cánceres de mama invasivos. Por el contrario, el subtipo luminal

B es el de mayor grado y peor pronóstico, que requiere de terapias adicionales como la quimioterapia (54). Además, HER2⁺ es el subtipo de mayor sensibilidad al tratamiento que, si no se detecta a tiempo, permite el desarrollo de cánceres agresivos (42). La mediana de supervivencia es un factor que oscila entre 12, 20, 56 y 101 meses; esto para pacientes con cáncer triple negativo, tipo luminal, HER2 positivo e invasivo respectivamente (1,55).

Las evidencias sugieren que un diagnóstico temprano podría ayudar en la efectividad del tratamiento, aumentar la supervivencia del paciente y reducir gastos en el sector salud, además de reducir el número de muertes a causa de esta enfermedad. No obstante, esto podría variar según el subtipo de cáncer diagnosticado, ya que se ha observado que en mujeres jóvenes prevalecen subtipos de cáncer de mama más agresivos e invasivos que afectan la eficacia del tratamiento hormonal (56,57).

3.1 Desregulación del *splicing* alternativo de genes asociados a cáncer de mama

En condiciones normales, las células pueden crear de 8 -10 isoformas a partir de un mismo gen mediante el *splicing* alternativo, por lo que favorece la diversidad del proteoma. En cambio, los defectos en este mecanismo contribuyen a la formación de isoformas anómalas, que participan en el desarrollo de múltiples enfermedades, entre ellas enfermedades genéticas y cáncer (58). Particularmente, las células tumorales muestran un incremento del 30% de los eventos de *splicing* alternativo, por lo tanto, se ha convertido en una marca distintiva del cáncer (1,9). La regulación del *splicing* alternativo juega un papel importante en el control de la expresión génica; sin embargo, en ocasiones se producen alteraciones genómicas que favorecen el incremento de la proliferación celular, la vascularización, la invasión, la metástasis y la inhibición de la apoptosis (1,10). En cáncer de mama, se producen mutaciones somáticas en algunas proteínas SR, hnRNP's y snRNP's, lo que promueve la producción de variantes oncogénicas y modifican la funcionalidad proteica (9). Las hnRNP's muestran una frecuencia de mutación del 0-14.9% y se ha registrado una sobreexpresión de la proteína hnRNPM mutada en

cáncer de mama (5). Esta sobreexpresión de hnRNPM mutada aumenta la invasión, la transición epitelio-mesénquima y favorece la expresión de las variantes de CD44 asociadas al aumento en la agresividad del cáncer de mama y permite clasificarlo como un tumor de alto grado (59). Por otro lado, se ha reportado que la sobreexpresión de SRSF4, SRSF6 y SRSF9 incrementa la migración, invasión y actividad metastásica en diferentes líneas celulares de mama (47). A continuación se resume la evidencia disponible para los eventos de *splicing* alternativo que más se han estudiado en el contexto de cáncer de mama.

3.1.1 Actividad de los estrógenos mediada por la unión a receptores (ER)

La actividad de los estrógenos está mediada por la unión a los receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) (61). El receptor de estrógenos ($ER\alpha$) es un elemento importante a la hora de diagnosticar cáncer de mama (62). El 75% de los cánceres que son diagnosticados como $ER\alpha$ positivos responden con éxito al tratamiento hormonal y a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6). En cambio, los casos $ER\alpha$ negativos tienden a ser potencialmente agresivos y metastásicos (63). El gen $ER\alpha$ presenta diferentes variantes generadas por los múltiples eventos de *splicing* alternativo (2). La isoforma clásica $ER\alpha66$ longitud completa (FL, por sus siglas en inglés: Full Length) presenta ocho exones y codifica para una proteína de 66kDa que presenta dos dominios de activación transcripcional, AF-1 y AF-2, responsables de la regulación transcripcional de los ER (61–63). Por otro lado, la isoforma denominada $ER\alpha36$ es la variante más corta, que codifica para una proteína de 29 aminoácidos y carece de los dominios AF-1 y AF-2 (64). Se ha descrito también la isoforma $ER\alpha46$, la cual se caracteriza por la ausencia de los primeros 173 aminoácidos que codifican para el dominio AF-1 (62). De manera interesante, las variantes $ER\alpha46$ y $ER\alpha66$ muestran secuencias idénticas de aminoácidos desde la posición 174 a 595 (Figura 5) (2).

En cáncer de mama, la sobreexpresión de $ER\alpha36$ se asocia con un mal pronóstico, baja supervivencia y actividad metastásica, además que se ha correlacionado con la resistencia al tratamiento hormonal con tamoxifeno (64–66).

Asimismo, la sobreexpresión de ER α 36 reduce los niveles de expresión de ER α 66, contribuyendo así al aumento en la proliferación y diferenciación de las células carcinogénicas (67). Por otra parte, se ha reportado la relación entre ER α 36 y PR al modular la expresión, señalización y actividad transcripcional (65).

La isoforma ER α 46 se expresa en células cancerígenas de colon, recto y mama con resistencia al tamoxifeno. La principal actividad de tamoxifeno en ER α , es antagonizar el dominio AF-2, presente en ER α 66 y ER α 46, además de que es un agonista de AF-1 en ER α 66. Por lo tanto, el tamoxifeno no actúa en ER α 46 debido a la ausencia de AF-1. En cáncer de mama, se reporta que el tamoxifeno 4-OH muestra una mayor eficacia que el fulvestrant en la inhibición de ER α 46 y ER α 66 en presencia de 17- β estradiol (E2). La expresión de ER α 46 se ha correlacionado con el estadio y tamaño del tumor donde predominan los tumores de bajo grado (grado I) y tumores pequeños, lo cual indica que podría ser un excelente biomarcador de evolución tumoral (62).

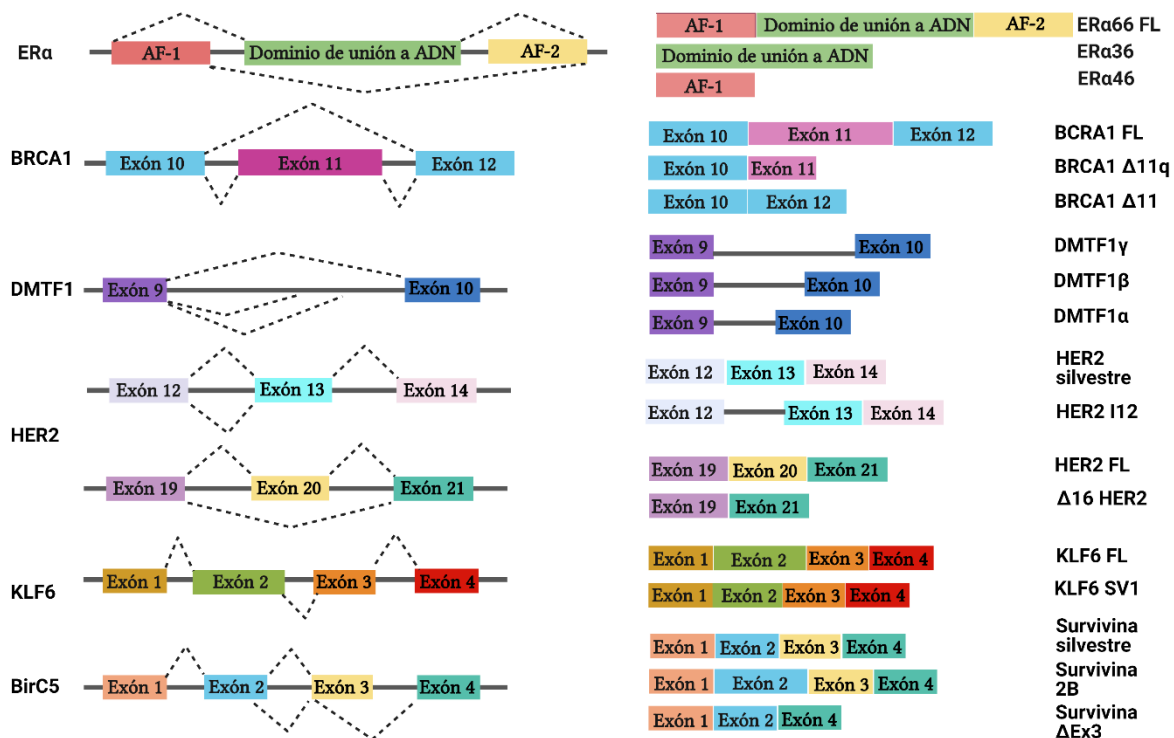


Figura 5. Eventos de *splicing* alternativo involucrados en el desarrollo de cáncer de mama.

El esquema representa múltiples eventos de *splicing* alternativo, que generan isoformas oncogénicas. De lado izquierdo, se representa el pre-ARNm que será procesado. De lado derecho, se muestran las isoformas resultantes. Las líneas oscuras simbolizan intrones y los rectángulos esquematizan exones. Las líneas punteadas indican la unión de los exones. FL: Isoforma de larga longitud. Modificada de Martínez-Montiel y cols., 2017 (52).

3.1.2 Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1 (BRCA1)

BRCA1 es un supresor de tumores que exhibe 23 exones y codifica para una proteína de 208kDa (68) que se caracteriza por la presencia del dominio de dedo de zinc RING (RING, por sus siglas en inglés: Really Interesting New Gene), dos señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés: Nuclear Localization Signals), dos dominios BRCT (BRCT, por sus siglas en inglés BRCA1 C-Terminal domain) y varios sitios de fosforilación (69). BRCA1 es relevante en la reparación del ADN, la proliferación celular y la regulación transcripcional (70); sin embargo, se pueden producir alteraciones que modifican su funcionamiento. Las mutaciones del gen BRCA1 se manifiestan solamente del 2-5% de los casos en cáncer de mama (71). Regularmente, los cánceres de mama relacionados a BRCA1 son de alto grado (grado III) y ER negativos. Curiosamente, las personas portadoras de mutaciones en el gen BRCA1 son más jóvenes (<50 años) y muestran una peor supervivencia que las no portadoras (72).

El exón 11 codifica al menos el 60% de la proteína, que alberga la señal NLS, por lo que es importante para el control del ciclo celular y la reparación del ADN (73). Por medio de *splicing* alternativo, se producen tres variantes que se diferencian por la presencia y/o ausencia del exón 11: 1) BRCA1 longitud completa (FL) (inclusión del exón 11), 2) BRCA1 Δ 11 (omisión total del exón 11) y 3) BRCA1 Δ 11q (omisión parcial del exón 11) (74). La formación de la variante Δ 11q se logra a partir del uso de un sitio donador alternativo ubicado 117pb río abajo del exón 11, de modo que excluye la mayor parte del exón y se han reportado niveles de expresión más elevados para esta isoforma que para la variante Δ 11 (73,74). Cabe resaltar que las dos isoformas carecen de la señal NLS, lo que imposibilita su acceso al núcleo (Figura 5) (52). En cáncer de mama, existe un desequilibrio de variantes, ya que se ha observado una reducción de la expresión de *BRCA1 FL* y una sobreexpresión de BRCA1 Δ 11 y BRCA1 Δ 11q. La sobreexpresión de las isoformas desregula varios procesos celulares; sobre todo la sobreexpresión de BRCA1 Δ 11 que altera la mitosis celular, la apoptosis, la respuesta al daño del ADN y promueve aneuploidía. Recientemente se han identificado variantes

génicas en el exón 10 que permiten la omisión parcial o total del exón 11 y se asocian a la expresión de las isoformas truncas, lo cual indica el riesgo a cáncer de mama (73). Además, se ha descrito una región específica de 41 nucleótidos en el interior del exón 11, la cual puede ser reconocida por ciertas proteínas SR y hnRNP, lo que produce el acortamiento y/o ausencia del propio exón (71).

Ante estas características, la detección de las isoformas de BRCA1, generadas por el *splicing* alternativo, pueden ser relevantes para el pronóstico de supervivencia del paciente con cáncer de mama.

3.1.3 Factor de transcripción tipo Myb 1 de unión a ciclina D (DMTF1)

DMTF1 o DMP1 es un gen localizado en el cromosoma 7q21, que genera un pre-ARNm de 18 exones (75,76). DMTF1 es un supresor tumoral que detiene el ciclo celular en la fase S (76). El *splicing* alternativo de DMTF1 surge a partir de la inclusión parcial o total del intrón 9. En este caso, se producen tres variantes denominadas 1) DMTF1 α (FL), 2) DMTF1 β y 3) DMTF1 γ de composición variable, en donde DMTF1 α contiene 760 aminoácidos, DMTF1 β presenta 272 aminoácidos y DMTF1 γ es de 285 aminoácidos (75). De manera interesante, las tres isoformas presentan secuencias idénticas en los primeros 273 aminoácidos, lo cual incluye el dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés: TransActivation Domain), un sitio de unión a ciclina D (CBS, por sus siglas en inglés: Cyclin D Binding Site) y una parte corta de la región homóloga de myb (o myb) (MHR, por sus siglas en inglés: Myb-Homology Region). Sin embargo, las variantes cortas no presentan afinidad de unión al ADN, lo cual altera su funcionalidad (Figura 5) (77).

En el contexto celular de cáncer de mama se ha observado una expresión disminuida de DMTF1 α y una sobreexpresión de DMTF1 β en el 30% de los casos (28). Investigaciones previas han reportado una eliminación aproximadamente del 42% de DMTF1 α y un incremento de DMTF1 β entre el 43-60% en tejido mamario carcinogénico (28,76). Además, las células mamarias carcinogénicas adquieren resistencia al tratamiento con cisplatino debido a la sobreexpresión de DMTF1 β . En modelos de ratones transgénicos se ha relacionado la expresión de DMTF1 β con la proliferación celular (77). Por otra parte, se ha asociado la actividad de

SRSF5 con la sobreexpresión de DMTF1 β . En este caso, SRSF5 se une a un elemento potenciador ubicado en el intrón 9, que promueve el *splicing* alternativo de DMTF1 β/γ , bloqueando así el reconocimiento por SF1 (75).

3.1.4 Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)

HER2 es un gen que forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés: Epidermal Growth Factor Receptor). Este receptor (185kDa) presenta un fragmento lipofílico transmembranal, un dominio tirosina cinasa intracelular y un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés: ExtraCellular Domain) que interactúa con los factores de crecimiento (78). HER2 es pieza clave en la detección tumoral, pues se sobreexpresa en el 15-20% de los casos reportados en cáncer de mama. Estos se relacionan con una mayor agresividad, metástasis ganglionar y baja supervivencia (52,79,80).

Las variantes producidas por *splicing* alternativo a partir del pre-ARNm para HER2 son: HER2 silvestre y Δ 16HER2. En cáncer de mama, la isoforma Δ 16HER2 se debe a la omisión del exón 16 (48 pb), que origina una eliminación en marco de 16 aminoácidos (Figura 5) (79). Esta eliminación genera un desequilibrio entre los residuos de cisteína, además que promueve la formación de homodímeros con puentes de disulfuro y la activación de Δ 16HER2 (81). La expresión de Δ 16HER2 incrementa los niveles de fosforilación de tirosina y la señalización de la vía Src (vía pro-oncogénica), así como mejora las propiedades oncogénicas al incrementar las actividades invasivas, proliferativas, metastásicas y la resistencia a trastuzumab (79,81–83). Cabe resaltar que el trastuzumab es un anticuerpo monoclonal activo, que se une a los receptores HER2. Este tipo de tratamiento es combinado con la quimioterapia para combatir el cáncer de mama HER2+. Los pacientes tratados con este anticuerpo muestran un mejoramiento de la tasa de supervivencia (47,81). En el contexto clínico patológico, la sobreexpresión de Δ 16HER2 se ha correlacionado fuertemente con la ausencia del ER, el alto grado del tumor y la actividad metastásica, de tal forma que se produce una baja supervivencia en el paciente (81).

En cuanto al mecanismo de *splicing* que regula la formación de $\Delta 16$ HER2 (igual), éste involucra la interacción de las proteínas SRSF3 y hnRNPH1. En este sentido, se ha reportado que una sobreexpresión de hnRNP H1 y la disminución de la concentración de SRSF3, reduce los niveles de la variante $\Delta 16$ HER2 (igual), con lo cual se restablecen las propiedades celulares de HER2 (84). Además, Castagnoli y cols., han analizado los sitios de unión de los factores de *splicing* en $\Delta 16$ HER2, mediante el programa RBPmap. En este programa bioinformático, se encontraron los sitios de unión para SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF7, TRA2B, hnRNPF, hnRNPA2/B1, FMR1, MBNL1 y CUG-BP. Es importante mencionar que la mayoría de estos participan en la formación de variantes involucradas en la tumorigénesis (78).

Desde otro ángulo, una reciente investigación realizada por Hart y cols., detectó la expresión de dos nuevas variantes involucradas en la carcinogénesis mamaria, denominadas HER2-PI9 y HER-I12 (igual). La variante HER2-PI9 (HER2-PI9, por sus siglas en inglés: HER2 Partial Intron 9) incluye un exón en cartucho (117 pb) en el interior del intrón 9, esto ocurre 704 pb río abajo del exón 8 y 2016 pb río arriba del exón 9. La segunda isoforma, nombrada HER-I12 (HER-I12, por sus siglas en inglés: HER2 Intron 12), retiene el intrón 12, que codifica 361 pb (Figura 4). En este caso, HER2-I12 tiene importancia en cáncer de mama, pues reporta niveles elevados de expresión, que se asocian con la activación de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés: Mitogen Activated Protein Kinases) y la vía fosfatidilinositol 3 cinasa/ proteína cinasa B (PI3K/Akt, por sus siglas en inglés: Phospholinositide 3-Kinase/ Protein Kinase B) y el mejoramiento de la proliferación, migración e invasión celular tumoral (79).

3.1.5 Factor 6 tipo Krüppel (KLF6)

Los factores de transcripción similar a Krüppel (KLF, por sus siglas en inglés: Krüppel Like Factors) son una familia de activadores de la transcripción, conformada por 18 proteínas (KLF1-KLF18). Este grupo de proteínas presentan tres motivos de unión al ADN, llamados dedos de zinc (C2H2), encargados de

regular la expresión génica (85). A nivel celular, estos factores participan en la regulación del desarrollo, la proliferación, la diferenciación, y la muerte celular (86). Particularmente, el gen KLF6 es un supresor de tumores, ubicado en el cromosoma 10p15, que codifica para una proteína de 283 aminoácidos (87). La inactivación funcional del gen KLF6 puede surgir por mutaciones, pérdidas alélicas, alteraciones genéticas, metilación de promotores y modificación en los eventos de *splicing* alternativo (85,88). En consecuencia, permite el desarrollo de cáncer de pulmón, colorrectal, gástrico, glioma, hepatocelular, ovario, cabeza y cuello (85). Las isoformas involucradas en la oncogénesis son: KLF6 FL, KLF6 SV1, KLF6 SV2 y KLF6 SV3 (89). Cada una de ellas, se distingue por la longitud y conformación de los exones según los sitios donantes y/o aceptores del *splicing* alternativo (90).

KLF6 FL es la isoforma nuclear conformada por cuatro exones, que conservan la actividad supresora de tumores (87). En cambio, KLF6 SV1 es una proteína de 195 aminoácidos, que surge de los eventos A5'SS e incluye un nuevo extremo carboxilo de 21 aminoácidos. Esta isoforma se caracteriza por la pérdida de los dominios de dedos de zinc y la conservación del dominio de activación KLF, lo que impide su actividad reguladora y supresora de tumores (Figura 5) (91). La variante KLF6 SV1 se expresa con mayor frecuencia en procesos cancerígenos, especialmente, en personas jóvenes (<30 años) (89). En *splicing* alternativo, la proteína SRSF1 es un factor importante que contribuye a la formación de KLF6 FL, pero este no da lugar a la formación de KLF6 SV1, puesto que la baja concentración de SRSF1 favorece la sobreexpresión de *KLF6 SV1* (88). La sobreexpresión de KLF6 SV1 se asocia directamente con la edad, el estado de supervivencia, los niveles de receptores de hormonas esteroideas, el tamaño, el grado del tumor y una baja supervivencia libre de metástasis (85,92). Los tumores de mayor tamaño y ER positivos muestran correlación con la presencia de KLF6 SV1 (93). Además, existe una correlación inversa entre la sobreexpresión de KLF6 SV1 y la disminución de E-cadherina, por lo que se suscita la progresión tumoral y la metástasis (89). En este caso, Hatami y cols., explican que ocurre un intercambio de E-cadherina por N-cadherina en la célula; cuando los niveles de E-

cadherina disminuyen, lo que da como resultado la pérdida de la adherencia celular y la facilidad de la transición epitelio mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés: Epithelial Mesenchymal Transition) (92).

Debouki y cols., señalan que tanto KLF6 SV1 como KLF6 SV2 se sobreexpresan en muestras tumorales. De manera contraria, KLF6 FL y KLF6 SV3 reportan niveles bajos de expresión y no muestran diferencias significativas entre ellas (89). La expresión KLF6 SV2 no tiene relación significativa entre la edad, el sexo, la localización del tumor, la clasificación del tumor, la actividad metastásica y el estado ganglionar. Sin embargo, se menciona que tiene un efecto supresor tumoral en cáncer colorrectal, por lo tanto, el papel y la concentración de KLF6 SV2 depende del tipo de cáncer (87). KLF6 SV1 y KLF6 SV2 son variantes situadas en el citoplasma debido al recortamiento parcial de los exones, lo que da como resultado la ausencia del dominio NLS. Por el contrario, KLF6 FL y KLF6 SV3 son las isoformas que se ubican en el núcleo gracias a la retención del exón 2, que codifica para el dominio NLS (2,86,87).

3.1.6 Survivina

BIRC5 (por su nombre en inglés: Baculoviral IAP repeat- containing protein 5) es un gen, ubicado en el cromosoma 17q25, que codifica para la proteína BIRC5, también llamada survivina (94). En 1997, la survivina se identificó por primera vez, como parte de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP, por sus siglas en inglés: Inhibitor of Apoptosis Proteins) (95,96). La survivina es una proteína multifuncional y pequeña de 142 aminoácidos (16 kDa), que presenta un dominio BIR (BIR, por sus siglas en inglés: Baculovirus IAP Repeat) (20-90 aminoácidos), una región central enlazadora (90-102 aminoácidos) y una α -hélice (98-142 aminoácidos) (Figura 6a) (97). Dentro de sus funciones esta regular la mitosis, la apoptosis y la respuesta al estrés celular (95). Generalmente, la survivina se expresa en tejidos embrionarios y no es normal su expresión en tejidos sanos y desarrollados. En condiciones extraordinarias, la survivina se expresa en tumores malignos, específicamente en cáncer de pulmón, vejiga, estómago, esófago, páncreas, hígado, ovario, útero, hematológico y mama (98).

En cáncer de mama, se ha visto que la survivina inhibe la apoptosis al bloquear las caspasas 3, 7 y 9 (99). Además, se ha visto que los pacientes con niveles elevados del gen BIRC5 presentan una mayor probabilidad de desarrollar cáncer metastásico y resistencia a la quimioterapia y radioterapia, comparado a las personas con baja expresión. También, la sobreexpresión de la survivina citoplasmática incentiva la proliferación de células tumorales ER negativas y la reincidencia a cáncer de mama (95,98,100,101).

Comúnmente, el ARNm de BIRC5 presenta cuatro exones dominantes (1, 2, 3 y 4) (Figura 6b) (102). Cada una de ellas se distingue por la localización, capacidad de inducir la apoptosis y el procesamiento del ARNm que sufren por los diferentes eventos de *splicing* alternativo, dentro de ellos; la omisión de exones y la inclusión parcial o total de exones. Existen seis isoformas involucradas en la promoción y/o inhibición de la apoptosis, denominadas 1) survivina silvestre 2) survivina 2 α , 3) survivina 2-B, 4) survivina 3 α , 5) survivina 3-B y 6) survivina Δ Ex3 (Figura 6b) (103).

Survivina 2 α

La survivina 2 α es la isoforma corta (74 aminoácidos), ubicada en citoplasma y núcleo, que carece de los exones 3 y 4, lo que promueve la interrupción del dominio BIR y mejora la apoptosis (Figura 6b). Sin embargo, otros estudios reportan que la expresión de survivina 2 α se relaciona con etapas menores de cáncer de mama (102). Asimismo, Span y cols., cuantificaron los niveles de expresión de 2 α mediante RT-PCR. En este estudio encontraron que la concentración de la isoforma 2 α se correlaciona directamente con las características clínico-patológicas, es decir, la edad del paciente y el estado de los ganglios linfáticos. En este caso, la concentración baja de 2 α fue más evidente en mujeres posmenopáusicas mayores, además que la sobreexpresión de 2 α se observó en mujeres con 1-3 ganglios afectados (104).

Survivina 2-B

2-B es la isoforma larga (165 aminoácidos), que muestra una inclusión parcial del intrón 2 (22 pb) (Figura 6b). La mayor parte de la proteína 2-B (52%) se encuentra en el citoplasma, mientras que el 22% está en el núcleo (105). La función de la survivina 2-B no está completamente definida, ya que algunos estudios reportan que favorece la apoptosis. Sin embargo, 2-B es capaz de inhibir la apoptosis al presentar un dominio BIR truncado (102,105). Además, se ha notado que la sobreexpresión de 2-B favorece la resistencia en los tratamientos dirigidos contra cáncer de mama (97,102). Por otra parte, Khan y cols., cuantificaron los niveles séricos de 2-B, donde observaron niveles elevados en tumores de grado I y niveles bajos o nulos en estadio avanzado (II/III y IV), por lo tanto, 2-B es un indicador excelente de tumores primarios en cáncer de mama (106).

Survivina 3 α

La principal característica de la variante 3 α es que solo incluye 32 nucleótidos del exón 3, lo cual mantiene completo el dominio BIR y la actividad antiapoptótica (Figura 6b) (106). Previamente, la survivina 3 α fue descubierta en la línea celular NB4 de leucemia promielocítica aguda. Más tarde, se reportó su expresión en tumores malignos y tumores benignos mamarios, sin embargo, no se encontró expresión en tejidos adyacentes normales (107).

Survivina 3-B

La survivina 3-B antiapoptótica se caracteriza por conservar el dominio BIR e incluir una parte del exón 3. Esta proteína tiene una secuencia de 120 aminoácidos (Figura 6b) (105). En cáncer, se ha observado que p53 juega un papel importante en la expresión de 3-B, puesto que las mutaciones originadas en p53 determinan la sobreexpresión de la isoforma (108). Además, su sobreexpresión se relaciona directamente con una supervivencia global más baja y una resistencia al tratamiento (95). También, las evidencias sugieren que survivina 3-B tiene propiedades citoprotectoras después de un tratamiento con fluorouracilo, clorhidrato de epirubicina y ciclofosfamida (108).

Survivina Δ Ex3

La omisión del exón 3 promueve la formación de la variante Δ Ex3 (137 aminoácidos, 15.6kDa) y desplaza el marco de lectura, lo cual modifica el extremo C-terminal de la proteína (Figura 6b) (105). A diferencia de otras variantes, Δ Ex3 tiene tres dominios; un dominio de localización mitocondrial, un dominio NLS y un dominio homólogo a Bcl-2 (BH2, por sus siglas en inglés: Bcl-2 Homology domain) (10,105). Los dominios BH (BH1- BH4) son regiones estructurales, que forman parte de la familia de las proteínas 2 del linfoma de células B (Bcl-2, por sus siglas en inglés: B-Cell Lymphoma 2). Estas proteínas regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y están involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis, por lo tanto, tienen actividad proapoptótica y antiapoptótica (38,109). En este caso, BH2 proporciona una mejor estabilidad a Δ Ex3 al unirse a la caspasa 3, por lo que exhibe un efecto antiapoptótico (10,105). Además, se ha observado que aproximadamente el 56% de las isoformas de Δ Ex3 se localizan en el núcleo durante las fases de división celular G1 y G2 (105). La expresión de Δ Ex3 se ha asociado con el grado del tumor, pues la mayoría de las muestras de tejidos mamarios oncogénicos expresan Δ Ex3 en estadios II, III y IV (106). Investigaciones previas, han demostrado que la proteína SAM68 (SAM 68, por sus siglas en inglés: Src Associated during Mitosis 68 kDa) reconoce una región exónica de 22 nucleótidos, situada río arriba en el exón 3. Esta unión determina la inclusión y/o exclusión del exón 3, ya que cuando SAM68 está presente, bloquea la unión de la maquinaria en el extremo 5' y promueve la omisión del exón 3. Todo lo contrario, si SAM68 no está presente, la maquinaria reconoce el sitio 5' y favorece la transcripción de la isoforma completa. Además, estos resultados señalan que otros factores podrían competir por el reconocimiento del exón 3 (10). Con base en estos resultados, la isoforma survivina Δ Ex3 podría ser un blanco terapéutico.

Como ya se ha visto, la expresión de las isoformas es inconstante, pues la mayoría de ellas depende de la localización, tipo y estadio del tumor, por lo que la detección de las isoformas ayudaría en el pronóstico de cáncer de mama y podría convertirse en un blanco terapéutico. Desde la perspectiva como dianas terapéuticas, es necesario el implemento de terapias que focalicen el restablecimiento de la unión de los factores de *splicing*, lo que daría como resultado un reordenamiento de isoformas, niveles de expresión y funcionalidad, además de reestablecer el mecanismo celular y reducir el número de células tumorales.

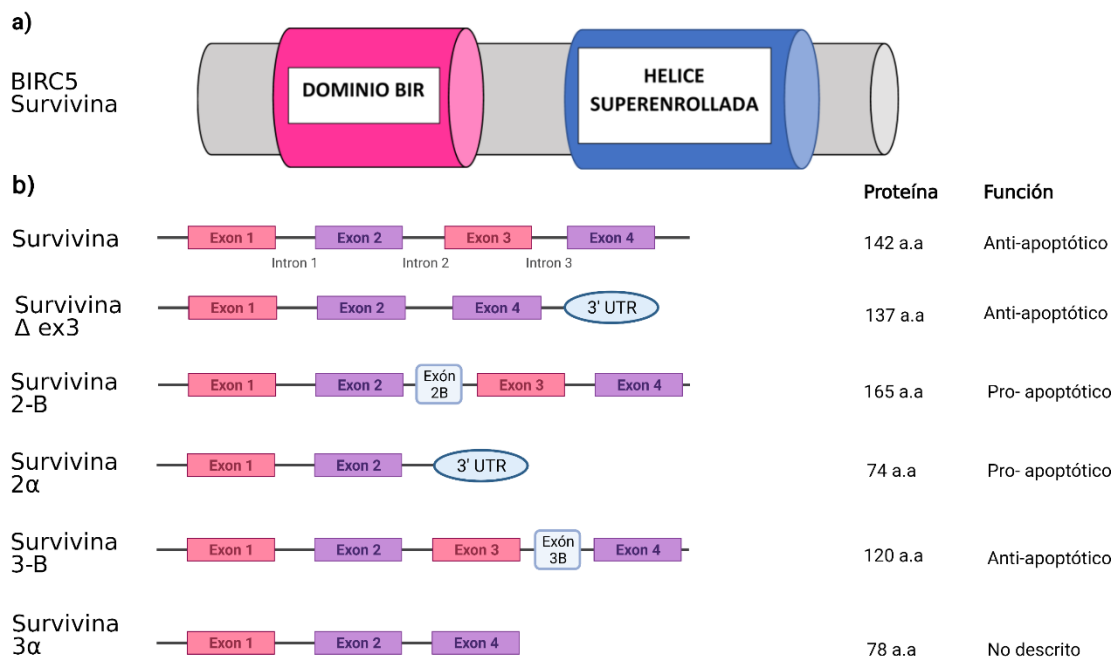


Figura 6. Isoformas de la proteína survivina

La siguiente representación gráfica muestra la composición de isoformas y dominios de la proteína survivina. **a)** *BIRC5* codifica para la proteína survivina, que se caracteriza por la presencia de un dominio BIR y una hélice superenrollada. **b)** El *splicing* alternativo que sufren los pre-ARNm de la survivina, generan seis isoformas. De lado izquierdo, se esquematiza la región pre-ARNm que será procesada. De lado derecho, se observa el tamaño y la función de la proteína resultante. Modificada de Santerelli y cols., 2018 (143).

4.1 Oligonucleótidos anti sentido como tratamiento contra cáncer

Normalmente, los tratamientos contra cáncer son invasivos, no selectivos y dañinos para las células, pues no diferencian entre una célula sana y una célula tumoral. Además, la mayoría de los pacientes sometidos a radioterapias,

quimioterapias y tratamientos hormonales experimentan efectos secundarios desgastantes, que comprometen la salud física y mental del paciente. De manera que, la industria farmacéutica ha buscado nuevos tratamientos basados en la tecnología antisentido. La tecnología antisentido consiste en el diseño de moléculas sintéticas que tienen como objetivo unirse a secuencias específicas, en particular el ARNm, para activar o inactivar la expresión génica. Algunos de ellos son los aptámeros, los ARN's pequeños de interferencia (siRNA's, por sus siglas en inglés: Small Interfering RNA), los microARN's (miRNA' s, por sus siglas en inglés: microRNA's) y los oligonucleótidos antisentido (ASO's, por sus siglas en inglés: AntiSense Oligonucleotides). Hasta el momento, los más sobresalientes por su efectividad, especificidad, mayor estudio, e innovación son los ASOs. Los ASOs son moléculas pequeñas (13-25 pb) que presentan un esqueleto de ácido ribonucleico (ARN) para reconocer y unirse a los ARNm por complementaridad de bases (110). También, el número de nucleótidos determina el sitio de unión y la especificidad del ASO, es decir, aquellos ASOs que tienen entre 16-20 nucleótidos son más probables de unirse a una sola secuencia diana (111). Los ASOs son moléculas hidrófobas, que interactúan fácilmente con las proteínas de superficie, lo que podría permitir fácilmente su ingreso a la célula, independientemente del uso de moléculas adicionales para atravesar la membrana celular (112). Cabe resaltar que este tipo de tecnología se ha implementado en enfermedades genéticas, infecciones virales y cáncer (58,113). En cáncer, los ASOs son un tratamiento antitumoral, que inhibe mecanismos moleculares como la transcripción y la traducción (114). Además, la asociación entre los ASOs y la regulación de la expresión génica podría beneficiar al aumentar la expresión de los supresores de tumores y disminuir la expresión de oncogenes (24).

4.1.1 Modificaciones químicas en oligonucleótidos anti sentido

El diseño de ASOs es un elemento importante que involucra la elección del mecanismo de acción, distribución intracelular y estabilidad (115). La estabilidad y la funcionalidad de los ASOs son determinadas por las modificaciones químicas aplicadas en la base nitrogenada, el grupo fosfato y el azúcar del nucleótido, que

le confieren mayor afinidad por el ARN diana, vida media del fármaco y protección contra la degradación por enzimas (116). Los ASOs de ARN, que no son modificados químicamente, tienden a ser degradados por nucleasas intra y extracelulares, además de presentar menor afinidad por las proteínas, absorción tisular nula, mayor filtración glomerular y excreción por vía urinaria, alterando así sus propiedades terapéuticas (24,111,113). Como se mencionó anteriormente, las modificaciones ocurren en la cadena principal, el esqueleto fosfato y los anillos de azúcar en la posición 2', incluidas las siguientes: 1) Fosforotioato (PS, por sus siglas en inglés: PhoSphorothioate), 2) Fosforodiamidato morfolino (PMO, por sus siglas en inglés: Phosphorodiamidate MOrpholino), 3) 2-O-metil (OMe, por sus siglas en inglés: 2-O-Methyl), 4) 2-O-metoxietil (MOE, por sus siglas en inglés: 2-O-MethOxyEthyl), 5) Ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés: Locked Nucleic Acids), 6) Ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés: Peptide Nucleic Acid) y 7) Modificación de 5'-metilcitosina (Figura 7) (24,113,117).

4.1.1.1 Modificaciones de grupo fosfato en los oligonucleótidos anti sentido

El desarrollo de la primera generación de ASO's involucró una cadena central de PS (24). Este tipo de ASO intercambia el oxígeno del grupo fosfato por un átomo de azufre para convertirlo en PS, lo cual mejora la resistencia a las nucleasas, presenta mayor afinidad a proteínas séricas como la albumina y proporciona vidas medias más prolongadas (113,118) (Figura 7).

También, el PMO es un grupo de amidas, que modifica el grupo fosfato, pues reemplaza los enlaces fosfodiéster (PO, por sus siglas en inglés: PhosphOdiester) por enlaces PMO (Figura 7). Los PMO han sido diseñados para bloquear la traducción de proteínas y no promover la degradación del transcrito por actividad de la ARNasa H1 (Consultar la sección 4.1.3). A diferencia de PS, PMO posee mayor afinidad por el ARNm diana, eficacia, estabilidad y resistencia a las nucleasas (24). Además, que no es tóxico para el cuerpo humano (119).

4.1.1.2 Modificaciones de los anillos de azúcar en los oligonucleótidos anti sentido

Los ASO con modificaciones del azúcar pertenecen al grupo de segunda generación, los cuales se caracterizan por modificar la posición 2' de la ribosa con grupos alquilo; OMe y MOE (Figura 7) (112,118). Este grupo de modificaciones químicas utilizan como mecanismo de acción el impedimento estérico. Sin embargo, MOE muestra mayor afinidad por el ARNm diana, mayor especificidad y menor toxicidad que OMe (113). Experimentalmente, las modificaciones MOE aplicadas incrementan la temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés: Melting Temperature), al menos 2°C en el ARN, además que mejoran la resistencia a las nucleasas (117). También, se ha comprobado que la semivida del ASO 2-O-metoxietilo/ Fosforotioato (MOE/PS, por sus siglas en inglés: 2-O-MethOxyEthyl/ PhoSphorothioate) en el líquido cefalorraquídeo es mayor a los 6 meses, por lo que el cambio de los enlaces PO a PS junto con la modificación MOE mejoran la entrada del oligonucleótido a los órganos como el cerebro (113).

4.1.1.3 Modificaciones de la base nitrogenada en los oligonucleótidos anti sentido

Se ha propuesto que los cambios de núcleo base mejoran la actividad de los ASO. Con base en lo antes mencionado, la adición del grupo metilo en la posición 5' de la citosina (5'-metilcitosina) eleva la especificidad y mejora la hidrofobicidad del ASO (Figura 7) (113). Este tipo de modificación ya ha sido aplicada en esclerosis lateral amiotrófica para corregir el ARNm de superóxido dismutasa (SOD1, por sus siglas en inglés: SuperOxide Dismutase 1) (120). En cambio, la 5'-metilcitosina-timidina favorece la citotoxicidad, mientras que los motivos CpG pueden estimular la respuesta inmune a través de la activación de receptores tipo Toll (113,121).

4.1.1.4 Ácidos nucleicos bloqueados (LNA)

Los LNA son nucleótidos modificados covalentemente, que se producen a partir de la interacción del oxígeno 2' (grupo fosfato) con el carbono 4' (ribosa), por lo tanto, limita la flexibilidad y actúa como un análogo limitado de la modificación OMe

(Figura 7) (24). Generalmente, los LNA no reclutan la ARNasa H, pero la presencia de un siRNA si activa la enzima. Asimismo, el uso de estas modificaciones proporciona una carga negativa, mayor especificidad por la diana y menor reconocimiento por las nucleasas. Desafortunadamente, los LNA presentan mayor toxicidad hepática, sin embargo, estos pueden intercalarse con bases no modificadas para disminuir la toxicidad e incrementar la eficacia del ASO. Se ha visto que el híbrido ácido nucleico bloqueado/ 2-O-metoxietil (LNA/MOE, por sus siglas en inglés: Locked Nucleic Acids/ 2-O-MethOxyEthyl) disminuye la toxicidad e incrementa la eficacia del ASO (24,113). También, el híbrido ácido nucleico bloqueado/ 2' O- metil (LNA/2'Ome, por sus siglas en inglés: Locked Nucleic Acids/ 2-O-Methyl) aumenta la potencia del ASO, y restablece la actividad del *splicing* alternativo, además que no daña el riñón e hígado (122).

4.1.1.5 Ácidos nucleicos peptídicos (PNA)

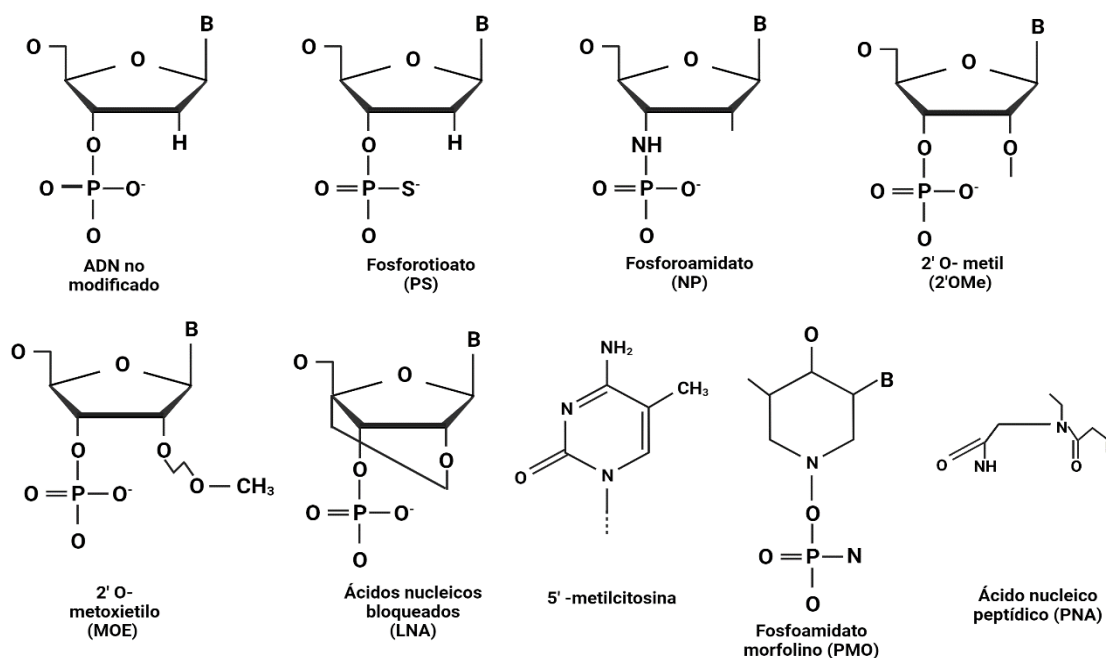


Figura 7. Modificaciones químicas en los oligonucleótidos anti sentido

En la siguiente figura se esquematizan las modificaciones químicas más comunes realizadas en oligonucleótidos antisentido. Consulte el texto para mayor descripción de las estructuras. Modificada de: Scoles y cols., 2019 (113).

Los PNA son un grupo de modificaciones estructurales nucleotídicas donde se reemplaza la ribosa por un péptido (Figura 7). Estos cambios proporcionan baja solubilidad y dificultad a la hora de transfectar en la célula. No obstante, el

agregado de lisina podría incrementar la solubilidad de PNA. La ventaja de utilizar PNA es que presenta una gran resistencia a nucleasas y proteasas. También, se ha demostrado que PNA tiene una mayor afinidad por el ADN y ARN, que 2-O-metilo/ fosforotioato (OMe/ PS, por sus siglas en inglés: 2-O-Methyl/ PhoSphorothioate) (24,113). En Distrofia Muscular de Duchenne, se reporta que los ASO modificados con PNA poseen una alta afinidad por el ARN, pero no inducen la omisión del exón 23 del gen DMD en mioblastos de ratón (123).

4.1.2 Métodos de transfección celular para oligonucleótidos anti sentido

La efectividad de cada ASO depende de su capacidad de atravesar la membrana citoplasmática y llegar hasta el sitio de acción. Uno de los mayores conflictos de los ASO's es la manera de introducir estas moléculas a la célula, pues su carga negativa impide la interacción con los componentes de la membrana plasmática, por lo que se requieren de vehículos compatibles para atravesarla (119,124). Existen métodos de transfección que permiten introducir material genético, tanto ADN como ARN, dentro de la célula para modificar la expresión génica y proteica (125).

4.1.2.1 Transfección celular por lípidos

Las nanopartículas basadas en lípidos (LNP, por sus siglas en inglés: Lipid based NanoParticles) son los métodos de transfección química más empleados en la entrega de ASO's a la célula, debido a su estabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad (119,126,127). Los LNP son lípidos de carga positiva (catión) que interactúan con los ASO's de carga negativa (anión), para formar complejos LNP/ASO's catiónicos, además de los lípidos catiónicos, los LNP están conformados por colesterol y lípidos exteriores, llamados polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés: PolyEthylene Glycol), que estabilizan la forma del liposoma, evitan que sean reconocidos por el sistema inmunológico, proporcionan estabilidad sérica y aumentan el tiempo de circulación en la sangre (126). Ming y cols., utilizaron un lípido catiónico comercial, llamado lipofectamina 2000, unido a un ASO modificador de eventos de *splicing* para comprender la captación celular de los mismos. En este estudio, se revela que los LNP/ASO's ingresan a la célula

por fusión de membranas y no requieren de la vía endocítica para su internalización, por lo que su efecto es más rápido y efectivo al evitar la transición por los diferentes endosomas y la degradación lisosomal (128).

4.1.2.2 Transfección celular mediante péptidos penetrantes de células

Los péptidos penetrantes de células (CPP's, por sus siglas en inglés: Cell Penetrating Peptides) son péptidos cortos con carga positiva (<30 aminoácidos), que potencian la captación celular. Estas moléculas con propiedades anfipáticas, es decir, que presentan una región hidrofílica (soluble en agua) y una región hidrofóbica (insoluble en agua), les permite ingresar a la célula sin alterar la membrana plasmática para transportar diferentes moléculas como: ácidos nucleicos, proteínas y virus (129). Principalmente, los CPP han sido utilizados para el transporte de fármacos, especialmente, para la liberación nuclear y citoplasmática de los ASO's (130). La captación de los CPP se puede realizar mediante translocación directa o endocitosis. Esta vía es un tipo de internalización que no requiere de energía y sucede tras la interacción electrostática de los fosfolípidos de la membrana celular y los CPP. Posteriormente, los CPP pueden ingresar mediante la desestabilización o la formación de poros en la membrana celular. La formación de poros involucra la incrustación de los CPP en la bicapa lipídica, pues el extremo hidrofóbico interactúa con las colas de los fosfolípidos y el extremo hidrofílico interactúa con las cabezas de los fosfolípidos para así formar el poro con forma de "barril" y liberar el producto (129). La conjugación del CPP-ASO solo es posible cuando se realizan las modificaciones PNA y PMO, debido a la carga positiva de CPP y la carga neutra del ASO. También, los CPP pueden utilizar la vía endocítica para el transporte de los ASO's, lo que representa una gran desventaja, pues se debe garantizar la liberación endosomal para evadir la degradación por lisosomas y evitar así la pérdida del ASO. Hasta el momento, los CPP-ASO únicamente son de carácter preclínico, pues requieren de mejoras en la estructura para reducir la toxicidad (24,129).

4.1.3 Mecanismos de captación celular de los oligonucleótidos anti sentido

La internalización de ASO's es un proceso de múltiples pasos, que involucra el transporte de los ASO's desde la membrana hacia el citoplasma. La mayoría de los ASO's utilizan la vía endocítica para ingresar a la célula. De esta manera, la internalización celular es un proceso que involucra la captación y el transporte de los ASO's en vesículas y/o endosomas. La endocitosis es la vía más común y representada, que sucede enseguida de la interacción con los receptores de la superficie celular. Los receptores varían según la célula en la que ingresen los ASO's (112).

Una vez que los ASO's atraviesan la membrana, estos son capturados por los endosomas tempranos (EE, por sus siglas en inglés: Early Endosomes) en el citoplasma para transportarlos, posteriormente, a los endosomas tardíos (LE, por sus siglas en inglés: Late Endosomes). En algunas ocasiones, los endosomas tardíos pueden trasladar los ASO's al sitio de acción, o bien, pueden entregarlos al lisosoma para ser degradados, por esta razón, los ASO's deben estar diseñados para realizar el escape endosomal y garantizar su efecto, algo que todavía sigue siendo un problema en el diseño de los ASO's, pues depende de la partícula de transporte y el método de transfección que se utilice (112,124).

4.1.4 Mecanismo de acción de los oligonucleótidos anti sentido

Los ASO's son capaces de regular la expresión génica dependiendo de la especificidad y el mecanismo de acción (24,131). Una vez que los ASO's ingresan al cuerpo humano, estos deberán trasladarse a través del flujo sanguíneo, llegarán a la célula, atravesarán la membrana celular y serán internalizados para así comenzar su mecanismo de acción (119).

Estos actúan a través de dos mecanismos distintos: 1) impedimento estérico y 2) degradación del ARN por la ARNasa H (117). Una vez que los ASO's reconocen y se unen a la secuencia ARN diana, se forman los híbridos ARN-ASO, que reclutan a la ARNasa H1 y degradan el ARN diana. La ARNasa H1 es una endonucleasa, que se localiza en el núcleo y el citoplasma donde se dirige a el pre-ARNm y el

ARNm (111,113,115). Específicamente, esta enzima rompe los enlaces fosfodiéster del ARN para posteriormente ser degradados por exonucleasas (119).

Generalmente, las modificaciones químicas intervienen en la elección del mecanismo de acción, pues las modificaciones de azúcar (OMe y MOE) impiden que los híbridos ARN/ASO sean degradados por la ARNA asa H1, por lo que recurren al impedimento estérico (117,119). Es importante mencionar que la mayoría de los ASO's no optan por la eliminación del ARN diana, si no, utilizan el impedimento estérico para evitar la degradación del transcrito (112). El segundo mecanismo de acción consiste en el bloqueo del ARN, que evita ser reconocido por ribosomas y/o espliceosomas para modular la expresión del ARN. Los ASO's no solo bloquean, también, permiten la regulación del *splicing* alternativo, el bloqueo de la traducción y el secuestro de miRNA's endógenos para modular el ARN (116,117). En el caso del miRNA, el ASO se une a él para inhibir el ARNm, en consecuencia, altera los niveles de expresión del transcrito (24). En la traducción, el ASO se une a la región 5'UTR del ARNm, de manera que, bloquea la unión del ribosoma con el codón de inicio de la traducción e impide el procesamiento de la proteína. Durante el *splicing* alternativo, la llegada del ASO interrumpe la unión de los elementos y los factores de regulación, que promueven la expresión de las isoformas, sin embargo, esto depende del sitio regulador al que se una, pues puede favorecer o inhibir el empalme de los exones y restablecer la isoforma (119).

4.1.5 Oligonucleótidos antisentido como modificadores de eventos de *splicing* alternativo

Los ASO son moléculas que modifican eventos de *splicing* alternativo aberrantes. Particularmente, los ASO dirigidos a ARNm son modificados químicamente para utilizar el mecanismo de impedimento estérico y evitar así la degradación del ARNm por la ARNasa H. Además, las mutaciones génicas, que alteran el *splicing* alternativo y reducen la expresión génica, pueden incrementar la actividad del espliceosoma mediante la unión de ASO a los sitios reguladores de *splicing*. En este sentido, el bloqueo de los sitios reguladores puede reordenar el

posicionamiento de los exones en el ARNm, por consiguiente, reestablecer el *splicing* alternativo (132).

4.1.5.1 Oligonucleótidos interruptores de *splicing* (SSO)

Los ASO modificadores de eventos de *splicing*, también, llamados interruptores de *splicing* (SSO, por sus siglas en inglés: Splice Switching Oligonucleotide) reconocen sitios 5'SS, 3'SS, ESE, ISE, ESS e ISS, de manera que impiden el reclutamiento de las proteínas SR, y hnRNP's. La unión de SSO a estos elementos favorece la inclusión/exclusión de exones y el restablecimiento de las isoformas (Figura 8) (24,58,114).

Inicialmente, los SSO fueron utilizados para modular diferentes eventos de *splicing* en enfermedades neurodegenerativas como la atrofia muscular espinal (SMA, por sus siglas en inglés: Spinal Muscular Atrophy), la distrofia miotónica tipo 1 (DM1, por sus siglas en inglés: Myotonic Dystrophy type 1) y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés: Amyotrophic Lateral Sclerosis), por mencionar algunas (58,113).

DM1 es una enfermedad hereditaria que promueve la relajación muscular retardada tras una contracción inesperada y la debilidad progresiva, lo que produce la rigidez muscular. Molecularmente, se produce una secuencia larga de repetidos CTG en la región 3'UTR del gen que codifica para la proteína cinasa de la distrofia miotónica (DMPK, por sus siglas en inglés: Dystrophia Myotonica Protein Kinase), lo que produce un ARNm aberrante (24,122). Asimismo, el ARNm producido secuestra el regulador de empalme MBNL1 (MBNL1, por sus siglas en inglés: MuscleBlind Like 1), que continúa contribuyendo al procesamiento incorrecto de su propio ARNm, en consecuencia, ocasiona pérdida de la función proteica. En condiciones normales, MBNL1 carece de la señal de localización nuclear, pues facilita la omisión del exón 7. Todo lo contrario, en DM1, que promueve la inclusión del exón 7 y produce el almacenamiento excesivo anormal de MBLN1 en el núcleo. Christou y cols., demostraron que los SSO conjugados LNA/2' OMe de 14, 16 y 18 nucleótidos de longitud reducían significativamente la inclusión del exón 7 de MBLN1 y restablecían la isoforma (122).

Actualmente, los SSO están siendo estudiados para reestablecer variantes relacionadas al desarrollo de osteosarcoma, glioblastoma y cáncer de mama. El gen ERG es un factor de la transcripción, que participa en la hematopoyesis, maduración de condrocitos, desarrollo óseo, apoptosis y migración celular. El procesamiento de ERG produce alrededor de 30 variantes, dentro de las cuales se producen los exones en cartucho; 7 y 7b. Cada una se distingue por el número de aminoácidos, pues el exón 7b codifica para 24 aminoácidos, mientras que el exón 7 codifica para 27 aminoácidos. Particularmente, se muestra un interés por 7b, ya que contribuye al desarrollo de osteosarcoma. El SSO con modificaciones de PMO apunta al bloqueo estérico de los sitios aceptores de 7b (E7b3), que promueven la inclusión del exón 7b, de tal forma que omite el exón 7b, incrementa la apoptosis, disminuye la proliferación y la invasión celular (23).

En glioblastoma, la serina/treonina cinasa 2 (MNK2, por sus siglas en inglés: MAPK interacting serine/threonine kinase 2) es una proteína que facilita la proliferación celular. El procesamiento de ARNm promueve las variantes MNK2a y MNK2b, donde cada una de ellas son productos derivados de la inclusión del exón 14a y 14b, respectivamente. Ambas tienen distinta funcionalidad, ya que la sobreexpresión de MNK2a mejora la actividad supresora de tumores, mientras que la sobreexpresión de MNK2b favorece la oncogénesis. Mogilevski y cols., diseñaron SSO/2-OMe para corregir este tipo de eventos de *splicing* alternativo. SSO/2-OMe se une al exón 14b, que impide el reclutamiento de las proteínas de *splicing* y mejora la inclusión del exón 14a en MNK, en consecuencia, los niveles de expresión de MNK2a se elevan y se activa el efecto supresor de tumores (133).

Por otra parte, Bcl-2 es una familia de proteínas, que regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y participan en la vía de la apoptosis. Un miembro de la familia es Bcl-X, que durante el *splicing* alternativo expresa las variantes: Bcl-xL y Bcl-xS. Estas se diferencian por la inclusión/exclusión de los sitios 5'SS en el exón 2. Bcl-xL contribuye en la actividad antiapoptótica, mientras que Bcl-xS ejerce la actividad proapoptótica. Investigaciones realizadas en Bcl-X, reportan que la aplicación de SSO MOE/PS, favorece la omisión parcial del exón 2, mejora la

apoptosis, incrementa la expresión de Bcl-xS, reduce la expresión de Bcl-xL e inhibe la proliferación celular en líneas celulares de glioma (134).

En cáncer de mama, el SSO/PMO induce la omisión del exón 11 en BRCA1, lo que altera la expresión de las variantes BRCA1-FL y BRCA1 Δ 11q. Sin embargo, se ha observado que las células cancerígenas ausentes de BRCA1 Δ 11q son más susceptibles al tratamiento con inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés Poly ADP- Ribose Polymerase) (71).

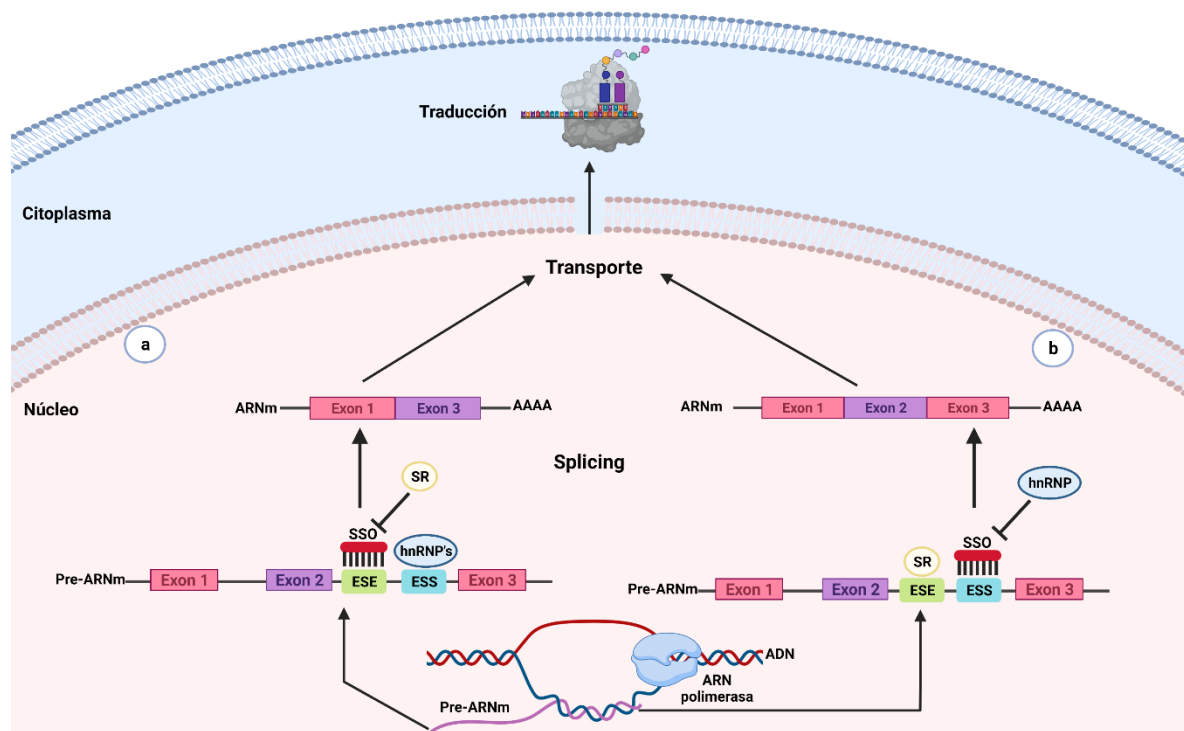


Figura 8. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos interruptores de *splicing* alternativo

a) El oligonucleótido interruptor de *splicing* (SSO, por sus siglas en inglés: Splice Switching Oligonucleotide) se une al potenciador de *splicing* exónico (ESE, por sus siglas en inglés: Exonic *Splicing* Enhancer), para impedir la unión de las proteínas SR. Al mismo tiempo, la proteína hnRNP se une al silenciador de *splicing* exónico (ESS, por sus siglas en inglés: Exonic *Splicing* Silencer) para promover así la omisión del exón 2.
 b) En este caso, el SSO se une a ESS y bloquea la unión de hnRNP, por lo que no permite la inhibición del *splicing*. De manera simultánea, la proteína SR se adhiere a ESE, de tal manera que favorece la inclusión del exón 2. Por último, el ARNm es transportado hacia el citoplasma para ser traducido a proteína en el ribosoma. Modificada de Bennett, 2019 (111).

4.1.5.2 Moléculas TOSS, TOES y ESSENCE como modificadores de eventos de *splicing* alternativo.

La tecnología SSO dirigida a sitios específicos del pre-ARNm son los oligonucleótidos silenciadores de *splicing* (TOSS, por sus siglas en inglés:

Targeted Oligonucleotide Silencers of Splicing) y potenciadores del *splicing* de exones específicos por efectores químicos (ESSENCE, Exon Specific Splicing Enhancement by Small Chimeric Effectors). Los TOSS son oligonucleótidos con una extensión no híbrida 5' o 3', que se une a hnRNPA1/A2 e impide la unión de snRNPU1 (1,58). El TOSS 2'OMe con reconocimiento a hnRNPA1 mejoró los niveles de las isoformas Bcl-xS y redujo los niveles de Bcl-xL, debido a la inhibición de los TOSS en 5'SS de Bcl-xL. También, los TOSS de unión a hnRNPA1 han sido estudiados al inhibir la exclusión del exón 8 y permitir la inclusión del exón 7 de SMN2 en SMA. Por otra parte, los oligonucleótidos dirigidos a potenciadores de *splicing* (TOES, por sus siglas en inglés: Targeted Oligonucleotide Enhancer of Splicing) son moléculas que presentan una cola de unión a proteínas SR, por lo tanto, promueven la inclusión de exones. Los TOES con extensión de PS reconocen exitosamente a SRSF1 y estimula la inclusión de exones, sin embargo, este tipo de moléculas son tóxicas para las líneas celulares de cáncer de ovario y mama. Mientras tanto, los TOES con modificación 2'OMe muestran un efecto contrario, ya que reclutan a hnRNPA1 e inhibe el *splicing* alternativo. Además, los TOES dirigidos a la hnRNP TDP-43, proteína de respuesta transactiva conjugada a ADN de 43kDa (TDP-43, por sus siglas en inglés: TAR DNA binding Protein 43), impulsan la inclusión del exón 7 de SMN2 en SMA, de manera que este tipo de TOES son una excelente opción para optimizar la inclusión de exones (58). De la misma manera, ESSENCE son moléculas, que emplean oligonucleótidos enlazados al dominio SR en el extremo 3', por ello favorece la inclusión de exones. Este enfoque ha sido una estrategia para reestablecer el exón 18 de BRCA1 y Bcl-x (1).

4.1.6 Oligonucleótidos antisentido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos

La tecnología antisentido es un hecho real, que ya ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration), pues varias investigaciones demuestran que los ASO son altamente eficaces, específicos y no generan toxicidad en el cuerpo humano.

Clínicamente, los ASO han demostrado ser seguros para el tratamiento contra retinitis por citomegalovirus, atrofia muscular espinal y distrofia muscular de Duchenne.

4.1.6.1 Fomivirsén

En 1998, la FDA aprobó por primera vez el fármaco Formivirsén basado en tecnología antisentido. Formivirsén es un ASO de 21 *mer* con modificación PS, encargado de inhibir la replicación del citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés: CytoMegalovirus) en pacientes con retinitis (118). Fomivirsén va dirigido al ARNm que codifica la proteína temprana inmediata 2 (IE-2, por sus siglas en inglés: Immediate Early 2) del CMV donde los pacientes mostraron una mejora de signos y síntomas durante la retinitis (135). En un ensayo clínico, se evaluó la gran eficacia del tratamiento cuya disminución de la progresión infecciosa fue evidente en pacientes con SIDA a los 71 días, por lo que Fomivirsén es el tratamiento ideal para la retinitis por CMV en pacientes con SIDA (121). Finalmente, la llegada de la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART, por sus siglas en inglés Highly Active AntiRetroviral Treatment) redujo el número de casos de retinitis por CMV, lo que promovió la salida de Fomivirsén.

4.1.6.2 Nusinersén

SMA es una enfermedad neurodegenerativa, que daña la función de las motoneuronas en medula espinal. Los niños afectados manifiestan debilidad y atrofia de músculos esqueléticos, bulbares, respiratorios, extremidades y torso, lo que da como resultado una parálisis progresiva (24,136,137). Los genes SMN1 y SMN2 son los principales responsables del desarrollo de SMA, pues las deleciones en el gen SMN1 fomentan la pérdida de función de la proteína SMN. Mientras que su homólogo, el gen SMN2, manifiesta la ausencia del exón 7, lo que genera un transcrito inestable y de rápida degradación. El 85% de los transcritos producidos por SMN2 carecen del exón 7 y únicamente el 15% llega al término de la proteína funcional, de modo que, la cantidad de proteína es insuficiente para sustentar las actividades de SMN1 (24,113,121). A pesar de los grandes avances de las investigaciones en SMA, aún no existen tratamientos farmacológicos, que

corrijan el genoma y funcionalidad de SMN1 Sin embargo, si se han innovado estrategias para sobreexpresar a SMN, a través del restablecimiento del *splicing* alternativo de SMN2 (24). En 2016, la FDA aprobó Nusinersen (Spinraza) como fármaco antisentido, que reconoce el elemento ISS dentro del intrón 7 de SMN2, evitando así la unión del espliceosoma y mejorando la inclusión del exón 7 (58,113,135). Estudios clínicos, demuestran que Nusinersen es eficaz como tratamiento contra SMA, pues existe un mejoramiento de la función motora en los niños (137). Otros ensayos, mencionan que abeparvovec (AVXS-101, por sus siglas en inglés: Onasemnogene Abeparvovec) exhibe mayor eficacia en funciones motoras y supervivencia, que el uso de Nusinersen (138). También, Lee y cols., señalan que la combinación de AVXS-101 y Nusinersen, basados en los puntajes de la prueba de trastornos neuromusculares (CHOP- INTEND, por sus siglas en inglés: Initial Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders), mejoran significativamente las condiciones motoras de bebés con SMA, aunque falta por evaluar los riesgos y niveles de toxicidad (139).

4.1.6.3 Eteplirsén

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, por sus siglas en inglés: Duchenne Muscular Dystrophy) es una enfermedad neuromuscular genética, común en niños, ocasionada por la ausencia de la distrofina, ya que las mutaciones del gen DMD provocan truncamientos prematuros en la proteína (113,121). Las duplicaciones y deleciones en el gen DMD son frecuentes en el 80% de los casos, mientras tanto, el otro 20% solo presentan mutaciones pequeñas(24). Clínicamente, las personas con DMD presentan debilidad muscular, pérdida de la capacidad al caminar, insuficiencia respiratoria y cardiaca (140). En este caso, la tecnología antisentido se ha utilizado para omitir exones. Especialmente, eteplirsén es un oligonucleótido con modificaciones PMO de carga neutra, diseñado para excluir el exón 51 y restaurar así el marco de lectura desde el exón 48 al exón 52 (113,140). Las dosis administradas 30 y 50mg/kg de Eteplirsén, incrementaron la expresión de distrofina a la semana 48, en comparación, con los pacientes que recibieron únicamente placebo. Además, se realizó una prueba de

caminata de 6 minutos (6MWT, por sus siglas en inglés: 6 Minute Walk Test) donde se observó una mejoría en distancia y tiempo, que al inicio del estudio. Los resultados arrojaron una distancia media recorrida de 68.4m, 153.4m y 174.4m para la cohorte placebo, 30mg/kg y 50mg/kg, respectivamente (140). Estudios más recientes, reportan que los pacientes ambulatorios recorrieron una distancia media de la 6MWT de 376.4m al inicio del estudio. Posteriormente, en las semanas 24 y 36 reportaron una media de 381.8m y 359.5m, respectivamente. De la misma manera, se aplicaron las pruebas en pacientes gemelos, paciente A y B, los cuales experimentaban una enfermedad más grave y avanzada en comparación con los pacientes ambulatorios. Inicialmente, los pacientes A y B recorrieron una distancia media de 330m y 126, respectivamente. Durante la semana 32, los pacientes A y B arrojaron una media de 12m y 3m para cada uno de ellos. También, se evaluó la función pulmonar mediante el porcentaje de capacidad vital forzada prevista (FVC, por sus siglas en inglés: Forced Vital Capacity), que fue del 92% para pacientes ambulatorios, 80% para el paciente A y 72% para el paciente B. Con referente a lo ya expuesto, la eficacia de Eteplirsén depende del estadio o gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, la aplicación de Eteplirsén es una opción como tratamiento, que ralentiza la progresión de la enfermedad y mejora el estilo/calidad de vida de los niños con DMD (141).

Conclusiones

- 1) Existe una importante desregulación del *splicing* alternativo en el contexto de cáncer de mama, lo que conduce a la expresión de isoformas anómalas para los genes Era , BRCA1, DMTF1, HER2, KLF6 y BirC5. La mayoría de las isoformas están involucradas en el desarrollo de la tumorigénesis, pues la sobreexpresión de estas inhibe las actividades apoptóticas y supresoras de tumores, además de favorecer la invasión celular, progresión tumoral y resistencia a fármacos antineoplásicos.
- 2) Una alternativa para el tratamiento del cáncer de mama es el empleo de moléculas como los ASOs, los cuales mejoran la especificidad, efectividad y supervivencia del paciente. Los ASOs son secuencias cortas de nucleótidos, que se unen a los elementos reguladores del *splicing*, como ISE, ESE, ISS y ESS para reposicionar la maquinaria de *splicing*, lo que da como resultado la corrección de las isoformas y mejora la funcionalidad proteica.
- 3) Las modificaciones químicas en los anillos de azúcar constituyen una excelente protección para el ASO debido a que evita la degradación por endonucleasas y tiene menor toxicidad que otras modificaciones reportadas. Por otro lado, el mejor transporte de los ASOs hacia la célula es la nanopartícula basada en lípidos, pues atraviesa con mayor facilidad la membrana plasmática, llega más rápido a su sitio de acción, no es reconocida por el sistema inmunológico y no es degradada.
- 4) Los ASOs constituyen una excelente opción como terapia antitumoral al ser altamente específico, eficaz y menos tóxico que otras moléculas antineoplásicas, lo cual refuerza la idea de que estos podrían ser un tratamiento ideal contra cáncer de mama al restablecer el *splicing* alternativo de las isoformas aberrantes.

Perspectivas

Las perspectivas para futuras investigaciones, a partir de los estudios presentados en este trabajo de tesis, podrían orientarse en las siguientes direcciones

- Identificar mediante bioinformática los sitios de *splicing* alternativo que promueven la formación de las isoformas aberrantes de los genes $E\alpha$, BRCA1, DMTF1, HER2, KLF6 y BirC5.
- Diseñar ASOs dirigidos contra los elementos reguladores del splicing para las isoformas aberrantes de los genes $E\alpha$, BRCA1, DMTF1, HER2, KLF6 y BirC5.
- Identificar y cuantificar la expresión de isoformas generadas por los genes $E\alpha$, BRCA1, DMTF1, HER2, KLF6 y BirC5
- Evaluar los efectos del tratamiento debido a la aplicación de los ASOs en líneas celulares de cáncer de mama.

Referencias

1. Martinez-Montiel N, Rosas-Murrieta NH, Ruiz MA, Monjaraz-Guzman E, Martinez-Contreras R. Alternative Splicing as a Target for Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2018 Feb 11 [cited 2021 Sep 28];19(2). Available from: [/pmc/articles/PMC5855767/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
2. Yang Q, Zhao J, Zhang W, Chen D, Wang Y. Aberrant alternative splicing in breast cancer. *Journal of Molecular Cell Biology* [Internet]. 2019 May 8 [cited 2021 Mar 6];11(10):920–9. Available from: <https://academic.oup.com/jmcb/article/11/10/920/5486617>
3. Bush SJ, Chen L, Tovar-Corona JM, Urrutia AO. Alternative splicing and the evolution of phenotypic novelty [Internet]. Vol. 372, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society of London; 2017 [cited 2020 Dec 8]. Available from: [/pmc/articles/PMC5182408/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
4. Climente-González H, Porta-Pardo E, Godzik A, Eyraes E. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell Reports* [Internet]. 2017 Aug 29 [cited 2021 Oct 21];20(9):2215–26. Available from: <http://www.cell.com/article/S221112471731104X/fulltext>
5. Li H, Liu J, Shen S, Dai D, Cheng S, Dong X, et al. Pan-cancer analysis of alternative splicing regulator heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) family and their prognostic potential. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Oct 24];24(19):11111. Available from: [/pmc/articles/PMC7576281/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
6. Dvinge H, Guenthoer J, Porter PL, Bradley RK. RNA components of the spliceosome regulate tissue- and cancer-specific alternative splicing. *Genome Research* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 28];29(10):1591. Available from: [/pmc/articles/PMC6771400/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
7. Cui Y, Cai M, Stanley HE. Comparative Analysis and Classification of Cassette Exons and Constitutive Exons. *BioMed Research International* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 24];2017. Available from: [/pmc/articles/PMC5734011/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
8. Ma FC, He RQ, Lin P, Zhong JC, Ma J, Yang H, et al. Profiling of prognostic alternative splicing in melanoma. *Oncology Letters* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Oct 23];18(2):1081. Available from: [/pmc/articles/PMC6607279/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
9. Kahles A, Lehmann KV, Toussaint NC, Hüser M, Stark SG, Sachsenberg T, et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 Aug 13 [cited 2021 Oct 28];34(2):211-224.e6. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610818303064/fulltext>
10. Gaytan-Cervantes J, Gonzalez-Torres C, Maldonado V, Zampedri C, Ceballos-Cancino G, Melendez-Zajgla J. Protein Sam68 regulates the alternative splicing of survivin DEx3. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2017 Aug 18 [cited 2021 Mar 14];292(33):13745–57. Available from: [/pmc/articles/PMC5566528/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)

11. Ding F, Elowitz MB. Constitutive splicing and economies of scale in gene expression. *Nature Structural and Molecular Biology* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Dec 7];26(6):424–32. Available from: /pmc/articles/PMC6663491/?report=abstract
12. Moon H, Cho S, Loh TJ, Jang HN, Liu Y, Choi N, et al. SRSF2 directly inhibits intron splicing to suppresses cassette exon inclusion. [cited 2021 Oct 26]; Available from: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.8.103>
13. Wilkinson ME, Charenton C, Nagai K. RNA Splicing by the Spliceosome. <https://doi-org.proxydgb.buap.mx/101146/annurev-biochem-091719-064225> [Internet]. 2020 Jun 22 [cited 2021 Oct 29];89:359–88. Available from: <https://www-annualreviews-org.proxydgb.buap.mx/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>
14. Loerch S, Leach JR, Horner SW, Maji D, Jenkins JL, Pulvino MJ, et al. The pre-mRNA splicing and transcription factor Tat-SF1 is a functional partner of the spliceosome SF3b1 subunit via a U2AF homology motif interface. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2019 Feb 22 [cited 2021 Oct 29];294(8):2892. Available from: /pmc/articles/PMC6393619/
15. Shi Y. The Spliceosome: A Protein-Directed Metalloribozyme. *Journal of Molecular Biology*. 2017 Aug 18;429(17):2640–53.
16. Aquino-Santos V. Clonación y caracterización parcial de las helicasas Prp5 y UAP56/Sub2 de *Entamoeba histolytica* [Internet]. [Ciudad de México]; 2019 [cited 2021 Oct 30]. Available from: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1200>
17. Kim HK, Pham MHC, Ko KS, Rhee BD, Han J. Alternative splicing isoforms in health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2018 470:7 [Internet]. 2018 Mar 13 [cited 2021 Oct 3];470(7):995–1016. Available from: <https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/article/10.1007/s00424-018-2136-x>
18. Harvey SE, Xu Y, Lin X, Gao XD, Qiu Y, Ahn J, et al. Coregulation of alternative splicing by hnRNPM and ESRP1 during EMT. *RNA* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Oct 26];24(10):1326. Available from: /pmc/articles/PMC6140460/
19. Jacob AG, Smith CWJ. Intron retention as a component of regulated gene expression programs. *Human Genetics* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Oct 25];136(9):1043. Available from: /pmc/articles/PMC5602073/
20. Wang BD, Lee NH. Aberrant RNA splicing in cancer and drug resistance [Internet]. Vol. 10, *Cancers*. MDPI AG; 2018 [cited 2020 Dec 8]. Available from: /pmc/articles/PMC6266310/?report=abstract
21. Zhu LY, Zhu YR, Dai DJ, Wang X, Jin HC. Epigenetic regulation of alternative splicing. *American Journal of Cancer Research* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 24];8(12):2346. Available from: /pmc/articles/PMC6325479/
22. Pirnie SP, Osman A, Zhu Y, Carmichael GG. An Ultraconserved Element (UCE) controls homeostatic splicing of *ARGLU1* mRNA. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2017 Apr 7 [cited 2021 Oct 24];45(6):3473. Available from: /pmc/articles/PMC5389617/

23. Jumbe SL, Porazinski SR, Oltean S, Mansell JP, Vahabi B, Wilson ID, et al. The Evolutionarily Conserved Cassette Exon 7b Drives ERG's Oncogenic Properties. *Translational Oncology* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Oct 26];12(1):134. Available from: [/pmc/articles/PMC6174920/](#)
24. Sardone V, Zhou H, Muntoni F, Ferlini A, Falzarano MS. Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Oct 10];22(4). Available from: [/pmc/articles/PMC6154734/](#)
25. Bowler E, Oltean S. Alternative Splicing in Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Oct 31];20(9). Available from: [/pmc/articles/PMC6540211/](#)
26. Stevens M, Oltean S. Modulation of VEGF-A Alternative Splicing as a Novel Treatment in Chronic Kidney Disease. *Genes (Basel)* [Internet]. 2018 Feb 15 [cited 2022 May 13];9(2). Available from: [/pmc/articles/PMC5852594/](#)
27. Star E, Stevens M, Gooding C, Smith CWJ, Li L, Ayine ML, et al. A drug-repositioning screen using splicing-sensitive fluorescent reporters identifies novel modulators of VEGF-A splicing with anti-angiogenic properties. *Oncogenesis* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 May 13];10(5). Available from: [/pmc/articles/PMC8093282/](#)
28. Tian N, Li J, Shi J, Sui G. From general aberrant alternative splicing in cancers and its therapeutic application to the discovery of an oncogenic DMTF1 isoform. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Mar 15];18(3):191. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
29. Jiang J, Chen X, Liu H, Shao J, Xie R, Gu P, et al. Polypyrimidine Tract-Binding Protein 1 promotes proliferation, migration and invasion in clear-cell renal cell carcinoma by regulating alternative splicing of PKM. *American Journal of Cancer Research* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 14];7(2):245. Available from: [/pmc/articles/PMC5336499/](#)
30. Wang Q, He G, Hou M, Chen L, Chen S, Xu A, et al. Cell Cycle Regulation by Alternative Polyadenylation of CCND1. *Scientific Reports* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 May 15];8(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5931507/](#)
31. Feng G, Tong M, Xia B, Luo GZ, Wang M, Xie D, et al. Ubiquitously expressed genes participate in cell-specific functions via alternative promoter usage. *EMBO Rep* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Jun 1];17(9):1304–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.15252/embr.201541476>
32. Gu J, Ma S, Zhang Y, Wang D, Cao S, Wang ZY. Genome-Wide Identification of Cassava Serine/Arginine-Rich Proteins: Insights into Alternative Splicing of Pre-mRNAs and Response to Abiotic Stress. *Plant and Cell Physiology* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Oct 30];61(1):178–91. Available from: <https://academic.oup.com/pcp/article/61/1/178/5584264>

33. Wagner RE, Frye M. Noncanonical functions of the serine-arginine-rich splicing factor (SR) family of proteins in development and disease. *BioEssays* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Oct 31];43(4):2000242. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.202000242>
34. Aubol BE, Hailey KL, Fattet L, Jennings PA, Adams JA. Redirecting SR Protein Nuclear Trafficking Through An Allosteric Platform. *J Mol Biol* [Internet]. 2017 Jul 7 [cited 2021 Oct 31];429(14):2178. Available from: [/pmc/articles/PMC5536852/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/)
35. Wu B, Su S, Patil DP, Liu H, Gan J, Jaffrey SR, et al. Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nature Communications* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Nov 1];9(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5789076/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30311111/)
36. Gu J, Chen Z, Chen X, Wang Z. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPL) in cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2020 Aug 1;507:286–94.
37. Xu Y, Wu W, Han Q, Wang Y, Li C, Zhang P, et al. Post-translational modification control of RNA-binding protein hnRNPK function. *Open Biology* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Nov 1];9(3). Available from: [/pmc/articles/PMC6451366/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)
38. Ramírez- García MÁ, Marqués-González H, Barranco-Lampón G, López-Aguilar J. REVISIÓN-ENSAYO. *Medigraphic* [Internet]. 2014 Jul 2 [cited 2022 May 25];9(3):84–94. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2014/rr143b.pdf>
39. van Opendenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation and disease. *Immunity* [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2022 May 25];50(6):1352. Available from: [/pmc/articles/PMC6611727/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
40. Xing S, Li Z, Ma W, He X, Shen S, Wei H, et al. DIS3L2 Promotes Progression of Hepatocellular Carcinoma via hnRNP U-Mediated Alternative Splicing. *Cancer Research* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Nov 2];79(19):4923–36. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/19/4923>
41. Vu NT, Park MA, Shultz JC, Goehre RW, Hoefler LA, Shultz MD, et al. hnRNP U Enhances Caspase-9 Splicing and Is Modulated by AKT-dependent Phosphorylation of hnRNP L. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2013 Mar 3 [cited 2022 May 25];288(12):8575. Available from: [/pmc/articles/PMC3605676/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23111111/)
42. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*. 2020 Jan 1;27(1):27–35.
43. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*. 2016 Sep 1;4(9):e609–16.
44. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Nov;68(6):394–424.

45. Ahmad A. Breast Cancer Statistics: Recent Trends. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2019 [cited 2021 Nov 9];1152:1–7. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-20301-6_1
46. Saladín K. Mamas y glándulas mamarias. In: *Anatomía y Fisiología: La unidad entre Forma y Función* [Internet]. 9a. edición. Ciudad de México: McGraw- Hill; 2021 [cited 2022 May 19]. Available from: <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3137§ionid=264404497>
47. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 30];1152:51–64. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-20301-6_4
48. IMSS. Cáncer de Mama [Internet]. [cited 2020 Dec 7]. Available from: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>
49. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 19];50(1):33. Available from: [/pmc/articles/PMC5625777/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35625777/)
50. Mota-González C, Aldana-Calva E, Bohórquez-Zambrano L, Martínez-Medina S, Peralta-López JR. Vista de Ansiedad y calidad de vida en mujeres con cáncer de mama: una revisión teórica | *Psicología y Salud*. *Psicología y Salud* [Internet]. 2018 Dec [cited 2022 May 20];28(2):155–65. Available from: <https://psicologiaysalud.uv.mx/index.php/psicysalud/article/view/2551/4446>
51. Sheng J, Zhao Q, Zhao J, Zhang W, Sun Y, Qin P, et al. SRSF1 modulates PTPMT1 alternative splicing to regulate lung cancer cell radioresistance. *EBioMedicine* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Mar 11];38:113–26. Available from: [/pmc/articles/PMC6306353/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306353/)
52. Martínez-Montiel N, Anaya-Ruiz M, Pérez-Santos M, Martínez-Contreras RD. Alternative splicing in breast cancer and the potential development of therapeutic tools [Internet]. Vol. 8, *Genes*. MDPI AG; 2017 [cited 2021 Mar 14]. p. 217. Available from: www.mdpi.com/journal/genes
53. Al-thoubaity FK. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020 Jan 1;49:44–8.
54. Dembinski R, Prasath V, Bohnak C, Siotos C, Sebai ME, Psoter K, et al. Estrogen Receptor Positive and Progesterone Receptor Negative Breast Cancer: the Role of Hormone Therapy. *Hormones and Cancer* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Nov 9];11(3–4):148–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12672-020-00387-1>
55. Hill DA, Friend S, Lomo L, Wiggins C, Barry M, Prossnitz E, et al. Breast Cancer Survival, Survival Disparities, and Guideline-Based Treatment. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Oct 2];170(2):405. Available from: [/pmc/articles/PMC6002943/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3002943/)

56. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis H v., Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates in Surgery* 2017 69:3 [Internet]. 2017 Mar 4 [cited 2021 Oct 2];69(3):313–7. Available from: <https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/article/10.1007/s13304-017-0424-1>
57. Erić I, Erić AP, Kristek J, Koprivčić I, Babić M. BREAST CANCER IN YOUNG WOMEN: PATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES. *Acta Clinica Croatica* [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 9];57(3):497. Available from: </pmc/articles/PMC6536281/>
58. Brosseau JP, Lucier JF, Lamarche AA, Shkreta L, Gendron D, Lapointe E, et al. Redirecting splicing with bifunctional oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 11];42(6):e40. Available from: </pmc/articles/PMC3973305/>
59. Sun H, Liu T, Zhu D, Dong X, Liu F, Liang X, et al. HnRNPM and CD44s expression affects tumor aggressiveness and predicts poor prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. *Genes, Chromosomes and Cancer* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 Nov 10];56(8):598–607. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxydgb.buap.mx/doi/full/10.1002/gcc.22463>
60. Park S, Brugiolo M, Akerman M, Das S, Urbanski L, Geier A, et al. Differential Functions of Splicing Factors in Mammary Transformation and Breast Cancer Metastasis. *Cell Rep* [Internet]. 2019 Nov 26 [cited 2021 Oct 1];29(9):2672. Available from: </pmc/articles/PMC6936330/>
61. Vinel A, Coudert AE, Buscato M, Valera MC, Ostertag A, Katzenellenbogen JA, et al. Respective role of membrane and nuclear estrogen receptor (ER) α in the mandible of growing mice: Implications for ER α modulation. *Journal of Bone and Mineral Research* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2021 Nov 10];33(8):1520. Available from: </pmc/articles/PMC6563159/>
62. Chantalat E, Boudou F, Laurell H, Palierne G, Houtman R, Melchers D, et al. The AF-1-deficient estrogen receptor ER α 46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Research : BCR* [Internet]. 2016 Dec 7 [cited 2021 Nov 10];18(1). Available from: </pmc/articles/PMC5142410/>
63. Hua H, Zhang H, Kong Q, Jiang Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Experimental Hematology & Oncology* [Internet]. 2018 Sep 19 [cited 2021 Nov 10];7(1):24. Available from: </pmc/articles/PMC6148803/>
64. Thiebaut C, Chamard-Jovenin C, Chesnel A, Morel C, Djermoune EH, Boukhobza T, et al. Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ER α 36 overexpression. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Nov 10];12(3). Available from: </pmc/articles/PMC5354400/>
65. Konan HP, Kassem L, Omarjee S, Surmieliova-Garnès A, Jacquemetton J, Cascales E, et al. ER α -36 regulates progesterone receptor activity in breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2020 May 19 [cited 2021 Nov 10];22(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32429997/>

66. Wang Q, Jiang J, Ying G, Xie XQ, Zhang X, Xu W, et al. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER α 36+ breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Research* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Nov 10];28(3):336. Available from: /pmc/articles/PMC5835774/
67. Xiping Z, Qingshan W, Shuai Z, Hongjian Y, Xiaowen D. A summary of relationships between alternative splicing and breast cancer [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2017 [cited 2021 Mar 14]. p. 51986–93. Available from: /pmc/articles/PMC5584306/
68. Zhou X, Wang R, Li X, Yu L, Hua D, Sun C, et al. Splicing factor SRSF1 promotes gliomagenesis via oncogenic splice-switching of MYO1B. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Mar 11];129(2):676–93. Available from: /pmc/articles/PMC6355305/
69. Jarhelle E, Riise Stensland HMF, Mæhle L, van Ghelue M. Characterization of BRCA1 and BRCA2 variants found in a Norwegian breast or ovarian cancer cohort. *Familial Cancer* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Nov 11];16(1):1–16. Available from: <https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/article/10.1007/s10689-016-9916-2>
70. Li D, Harlan-Williams LM, Kumaraswamy E, Jensen RA. BRCA1-No Matter How You Splice It. *Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2021 Nov 11];79(9):2091. Available from: /pmc/articles/PMC6497576/
71. Smith LD, Leme de Calais F, Raponi M, Mellone M, Buratti E, Blaydes JP, et al. Novel splice-switching oligonucleotide promotes BRCA1 aberrant splicing and susceptibility to PARP inhibitor action. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Nov 11];140(7):1564–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.30574>
72. Schmidt MK, van den Broek AJ, Tollenaar RAEM, Smit VTHBM, Westenend PJ, Brinkhuis M, et al. Breast Cancer Survival of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers in a Hospital-Based Cohort of Young Women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 Nov 11];109(8). Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/109/8/djw329/3064570>
73. Ruiz de Garibay G, Fernandez-Garcia I, Mazoyer S, Leme de Calais F, Ameri P, Vijayakumar S, et al. Altered regulation of BRCA1 exon 11 splicing is associated with breast cancer risk in carriers of BRCA1 pathogenic variants. *Human Mutation* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2021 Nov 11];42(11):1488–502. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxydgb.buap.mx/doi/full/10.1002/humu.24276>
74. Wang Y, Bernhardt AJ, Cruz C, Kraiss JJ, Nacson J, Nicolas E, et al. The BRCA1- Δ 11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin. *Cancer Res* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Nov 11];76(9):2778. Available from: /pmc/articles/PMC4874568/

75. Li J, Li G, Qi Y, Lu Y, Wang H, Shi K, et al. SRSF5 regulates alternative splicing of DMTF1 pre-mRNA through modulating SF1 binding. *RNA Biol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 12]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34291726/>
76. Inoue K, Fry EA. Aberrant splicing of the DMP1-ARF-MDM2-p53 pathway in cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Nov 12];139(1):33. Available from: </pmc/articles/PMC5047959/>
77. Li J, Shi K, Xu T, Hu J, Li T, Li G, et al. Mechanisms regulating DMTF1 β/γ expression and their functional interplay with DMTF1 α . *International Journal of Oncology* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Oct 8];58(1):20. Available from: </pmc/articles/PMC7721083/>
78. Castagnoli L, Lodomery M, Tagliabue E, Pupa SM. The d16HER2 Splice Variant: A Friend or Foe of HER2-Positive Cancers? *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Nov 15];11(7). Available from: </pmc/articles/PMC6678616/>
79. Hart V, Silipo M, Satam S, Gautrey H, Kirby J, Tyson-Capper A. HER2-PI9 and HER2-I12: two novel and functionally active splice variants of the oncogene HER2 in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2021 Oct 8];147(10):2893. Available from: </pmc/articles/PMC8397700/>
80. Wan J, Sazani P, Kole R. Modification of HER2 pre-mRNA alternative splicing and its effects on breast cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* [Internet]. 2009 Feb 15 [cited 2021 Nov 15];124(4):772. Available from: </pmc/articles/PMC2671679/>
81. Alajati A, Sausgruber N, Aceto N, Duss S, Sarret S, Voshol H, et al. Mammary Tumor Formation and Metastasis Evoked by a HER2 Splice Variant. *Cancer Research* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2021 Nov 16];73(17):5320–7. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/73/17/5320>
82. Silipo M, Gautrey H, Tyson-Capper A. Deregulation of splicing factors and breast cancer development [Internet]. Vol. 7, *Journal of Molecular Cell Biology*. Oxford University Press; 2015 [cited 2020 Dec 8]. p. 388–401. Available from: <https://academic.oup.com/jmcb/article/7/5/388/965847>
83. Peckys DB, Hirsch D, Gaiser T, de Jonge N. Visualisation of HER2 homodimers in single cells from HER2 overexpressing primary formalin fixed paraffin embedded tumour tissue. *Molecular Medicine* [Internet]. 2019 Aug 28 [cited 2021 Nov 16];25(1). Available from: </pmc/articles/PMC6712713/>
84. Gautrey H, Jackson C, Dittrich AL, Browell D, Lennard T, Tyson-Capper A. SRSF3 and hnRNP H1 regulate a splicing hotspot of HER2 in breast cancer cells. *RNA Biology* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 16];12(10):1139. Available from: </pmc/articles/PMC4829299/>
85. Ozdemir F, Koksall M, Ozmen V, Aydin I, Buyru N. Mutations and Krüppel-like factor 6 (KLF6) expression levels in breast cancer. *Tumor Biology* [Internet]. 2014 Feb 12 [cited 2021 Mar 14];35(6):5219–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer->

86. Zhang N, Li Z, Xiao W, Yang F, Gao W, Sun ZG. KLF6-SV1 is a new prognostic biomarker in postoperative patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Management and Research* [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 16];10:3937. Available from: [/pmc/articles/PMC6165774/](#)
87. Zhang B, Guo DD, Zheng JY, Wu YA. Expression of KLF6-SV2 in colorectal cancer and its impact on proliferation and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Nov 16];27(1):20. Available from: [/pmc/articles/PMC5732641/](#)
88. Muñoz Ú, Puche JE, Hannivoort R, Lang UE, Cohen-Naftaly M, Friedman SL. Hepatocyte Growth Factor Enhances Alternative Splicing of the Krüppel-like Factor 6 (KLF6) Tumor Suppressor to Promote Growth through SRSF1. *Molecular Cancer Research* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2021 Nov 16];10(9):1216–27. Available from: <https://mcr.aacrjournals.org/content/10/9/1216>
89. Debouki-Joudi S, Mhirsi S, Mokni-Baizig N, Ammous-Boukhris N, Mhamdi H, Gritli S, et al. Overexpression of the Oncogenic Variant (KLF6-SV1) in Young NPC Patients and Correlation with Lack of E-Cadherin. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)* [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 16];2018. Available from: [/pmc/articles/PMC5964540/](#)
90. Syafruddin SE, Mohtar MA, Nazarie WFWM, Low TY. Two Sides of the Same Coin: The Roles of KLF6 in Physiology and Pathophysiology. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Oct 7];10(10):1–22. Available from: [/pmc/articles/PMC7601070/](#)
91. Hu K, Zheng QK, Ma RJ, Ma C, Sun ZG, Zhang N. Krüppel-Like Factor 6 Splice Variant 1: An Oncogenic Transcription Factor Involved in the Progression of Multiple Malignant Tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2021 Nov 16];9:661731. Available from: [/pmc/articles/PMC8017371/](#)
92. Hatami R, Sieuwerts AM, Izadmehr S, Yao Z, Qiao RF, Papa L, et al. KLF6-SV1 Drives Breast Cancer Metastasis and Is Associated with Poor Survival. *Sci Transl Med* [Internet]. 2013 Jan 23 [cited 2021 Nov 16];5(169):169ra12. Available from: [/pmc/articles/PMC4661785/](#)
93. Olson OC, Joyce JA. A splicing twist on metastasis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2013 Jan 23 [cited 2021 Nov 17];5(169). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23345607/>
94. Nguyen HM, Dao MQ, La HT. Performance of survivin mRNA as a biomarker for breast cancer among Vietnamese women. *Heliyon* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Nov 14];5(3):1371. Available from: [/pmc/articles/PMC6431741/](#)
95. Sušac I, Ozretić P, Gregorić M, Levačić Cvok M, Sabol M, Levanat S, et al. Polymorphisms in Survivin (BIRC5 Gene) Are Associated with Age of Onset in Breast Cancer Patients. *Journal of Oncology*. 2019;2019.
96. Yu P, Li AX, Chen XS, Tian M, Wang HY, Wang XL, et al. PKM2–c-Myc–Survivin Cascade Regulates the Cell Proliferation, Migration, and Tamoxifen Resistance in

- Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2020 Sep 8 [cited 2021 Nov 14];11. Available from: [/pmc/articles/PMC7506054/](#)
97. Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *Journal of Cell Science* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Nov 14];132(7). Available from: [/pmc/articles/PMC6467487/](#)
 98. Collin LJ, Cronin-Fenton DP, Ahern TP, Christensen KB, Damkier P, Hamilton-Dutoit S, et al. Expression of Survivin Does Not Appear to Influence Breast Cancer Recurrence Risk. *Acta Oncol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Nov 14];58(2):154. Available from: [/pmc/articles/PMC6386593/](#)
 99. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *The Indian Journal of Medical Research* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 15];141(4):389. Available from: [/pmc/articles/PMC4510718/](#)
 100. Putra A, Riwanto I, Putra ST, Wijaya I. Typhonium flagelliforme extract induce apoptosis in breast cancer stem cells by suppressing survivin. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Nov 14];16(6):1302–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33342788/>
 101. Lin TY, Chan HH, Chen SH, Sarvagalla S, Chen PS, Coumar MS, et al. BIRC5/Survivin is a novel ATG12–ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. *Autophagy* [Internet]. 2020 Jul 2 [cited 2021 Nov 14];16(7):1296. Available from: [/pmc/articles/PMC7469615/](#)
 102. Trnski D, Gregorić M, Levanat S, Ozretić P, Rinčić N, Vidaković TM, et al. Regulation of Survivin Isoform Expression by GLI Proteins in Ovarian Cancer. *Cells* [Internet]. 2019 Feb 6 [cited 2021 Oct 8];8(2):128. Available from: [/pmc/articles/PMC6406444/](#)
 103. Laka K, Makgoo L, Mbita Z. Survivin Splice Variants in Arsenic Trioxide (As₂O₃)-Induced Deactivation of PI3K and MAPK Cell Signalling Pathways in MCF-7 Cells. *Genes (Basel)* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Nov 14];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6356383/](#)
 104. Span PN, Tjan-Heijnen VCG, Heuvel JJTM, de Kok JB, Foekens JA, Sweep FCGJ. Do the Survivin (BIRC5) Splice Variants Modulate or Add to the Prognostic Value of Total Survivin in Breast Cancer? *Clinical Chemistry* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2021 Nov 15];52(9):1693–700. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/52/9/1693/5626932>
 105. Sah NK, Seniya C. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumor Biology* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2021 Nov 14];36(9):6623–31. Available from: <https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/article/10.1007/s13277-015-3865-5>
 106. Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, et al. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2014 Mar 12 [cited 2021 Mar 14];14(1):1–10. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2407-14-176>

107. Moniri Javadhesari S, Gharechahi J, Hosseinpour Feizi MA, Montazeri V, Halimi M. Transcriptional Expression Analysis of Survivin Splice Variants Reveals Differential Expression of Survivin-3 α in Breast Cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2021 Mar 14];17(4):314–20. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2012.0411>
108. Végran F, Boidot R, Bonnetain F, Cadouot M, Chevrier S, Lizard-Nacol S. Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2021 Nov 15];18(6):783–92. Available from: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/18/6/783.xml>
109. Jang DM, Oh EK, Hahn H, Kim HS, Han BW. Structural insights into apoptotic regulation of human Bfk as a novel Bcl-2 family member. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Jun 1];20:745. Available from: </pmc/articles/PMC8814693/>
110. Takakura K, Kawamura A, Torisu Y, Koido S, Yahagi N, Saruta M. The Clinical Potential of Oligonucleotide Therapeutics against Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Oct 10];20(13). Available from: </pmc/articles/PMC6651255/>
111. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu Rev Med* 2019 [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 9];70:307–21. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217->
112. Ochaba J, Powers AF, Tremble KA, Greenlee S, Post NM, Matson JE, et al. A novel and translational role for autophagy in antisense oligonucleotide trafficking and activity. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2019 Dec 2 [cited 2021 Nov 20];47(21):11284. Available from: </pmc/articles/PMC6868497/>
113. Scoles DR, Minikel E v., Pulst SM. Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurology: Genetics* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Oct 10];5(2):323. Available from: </pmc/articles/PMC6501637/>
114. Yang S, Wang D, Sun Y, Zheng B. Delivery of antisense oligonucleotide using polyethylenimine-based lipid nanoparticle modified with cell penetrating peptide. *Drug Delivery* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Nov 18];26(1):965. Available from: </pmc/articles/PMC6764372/>
115. Liang XH, Sun H, Nichols JG, Crooke ST. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus. *Molecular Therapy* [Internet]. 2017 Sep 6 [cited 2021 Nov 20];25(9):2075. Available from: </pmc/articles/PMC5589097/>
116. Miller CM, Harris EN. Antisense Oligonucleotides: Treatment Strategies and Cellular Internalization. *RNA Dis* [Internet]. 2016 Nov 7 [cited 2022 May 26];3(4). Available from: </pmc/articles/PMC5376066/>
117. Bennett CF, Baker BF, Pham N, Swayze E, Geary RS. Pharmacology of Antisense Drugs. <http://dx.doi.org.proxydgb.buap.mx/101146/annurev-pharmtox-010716-104846> [Internet]. 2017 Jan 6 [cited 2021 Nov 19];57:81–105. Available from:

<https://www-annualreviews-org.proxydgb.buap.mx/doi/abs/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846>

118. Kim J, el Zahar NM, Bartlett MG. In vitro metabolism of 2'-ribose unmodified and modified phosphorothioate oligonucleotide therapeutics using liquid chromatography mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Nov 22];34(7):e4839. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxydgb.buap.mx/doi/full/10.1002/bmc.4839>
119. Gagliardi M, Ashizawa AT. The Challenges and Strategies of Antisense Oligonucleotide Drug Delivery. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Jun 2];9(4). Available from: [/pmc/articles/PMC8072990/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34872990/)
120. McCampbell A, Cole T, Wegener AJ, Tomassy GS, Setnicka A, Farley BJ, et al. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2021 Nov 23];128(8):3558. Available from: [/pmc/articles/PMC6063493/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3063493/)
121. Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, Pham H, Gupta A, Vikram A, et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol 9, Page 2004 [Internet]. 2020 Jun 26 [cited 2021 Nov 23];9(6):2004. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/6/2004/html>
122. Christou M, Wengel J, Sokratous K, Kyriacou K, Nikolaou G, Phylactou LA, et al. Systemic Evaluation of Chimeric LNA/2'-O-Methyl Steric Blockers for Myotonic Dystrophy Type 1 Therapy. *Nucleic Acid Therapeutics* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Nov 23];30(2):80. Available from: [/pmc/articles/PMC7133450/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/328450/)
123. Le BT, Murayama K, Shabanpoor F, Asanuma H, Veedu RN. Antisense oligonucleotide modified with serinol nucleic acid (SNA) induces exon skipping in mdx myotubes. *RSC Advances* [Internet]. 2017 Jul 6 [cited 2021 Nov 23];7(54):34049–52. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra06091b>
124. Silva AC, Lobo DD, Martins IM, Lopes SM, Henriques C, Duarte SP, et al. Antisense oligonucleotide therapeutics in neurodegenerative diseases: the case of polyglutamine disorders. *Brain* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Nov 28];143(2):407–29. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/143/2/407/5628274>
125. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Internet]. 2010 Aug [cited 2022 Jun 6];397(8):3173. Available from: [/pmc/articles/PMC2911531/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2011531/)
126. Robinson E, MacDonald KD, Slaughter K, McKinney M, Patel S, Sun C, et al. Lipid Nanoparticle-Delivered Chemically Modified mRNA Restores Chloride Secretion in Cystic Fibrosis. *Molecular Therapy* [Internet]. 2018 Aug 8 [cited 2022 Jun 6];26(8):2034. Available from: [/pmc/articles/PMC6094356/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3094356/)

127. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2016 Aug 8 [cited 2022 Jun 6];44(14):6518. Available from: [/pmc/articles/PMC5001581/](#)
128. Ming X, Sato K, Juliano RL. Unconventional Internalization Mechanisms Underlying Functional Delivery of Antisense Oligonucleotides via Cationic Lipoplexes and Polyplexes. *J Control Release* [Internet]. 2011 Jul 7 [cited 2022 Jun 7];153(1):83. Available from: [/pmc/articles/PMC3133857/](#)
129. Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S, Teng L, Lee RJ, et al. Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 May 20;11:697.
130. Dastpeyman M, Karas JA, Amin A, Turner BJ, Shabanpoor F. Modular Synthesis of Trifunctional Peptide-oligonucleotide Conjugates via Native Chemical Ligation. *Frontiers in Chemistry*. 2021 Mar 2;9:9.
131. Jafar-Nejad P, Powers B, Soriano A, Zhao H, Norris DA, Matson J, et al. The atlas of RNase H antisense oligonucleotide distribution and activity in the CNS of rodents and non-human primates following central administration. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2021 Jan 25 [cited 2021 Nov 20];49(2):657. Available from: [/pmc/articles/PMC7826274/](#)
132. Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2016 Aug 19 [cited 2021 Nov 24];44(14):6549. Available from: [/pmc/articles/PMC5001604/](#)
133. Mogilevsky M, Shimshon O, Kumar S, Mogilevsky A, Keshet E, Yavin E, et al. Modulation of MKNK2 alternative splicing by splice-switching oligonucleotides as a novel approach for glioblastoma treatment. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2018 Nov 30 [cited 2021 Oct 11];46(21):11396. Available from: [/pmc/articles/PMC6265459/](#)
134. Li Z, Li Q, Han L, Tian N, Liang Q, Li Y, et al. Pro-apoptotic effects of splice-switching oligonucleotides targeting Bcl-x pre-mRNA in human glioma cell lines. *Oncology Reports* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Nov 25];35(2):1013–9. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2015.4465/abstract>
135. Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Molecular Therapy* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2021 Nov 22];25(5):1069. Available from: [/pmc/articles/PMC5417833/](#)
136. Scharner J, Ma WK, Zhang Q, Lin KT, Rigo F, Frank Bennett C, et al. Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2020 Jan 24 [cited 2021 Nov 25];48(2):802. Available from: [/pmc/articles/PMC6954394/](#)
137. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, et al. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 Feb 15 [cited 2021 Nov

27];378(7):625–35. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1710504>

138. Dabbous O, Maru B, Jansen JP, Lorenzi M, Cloutier M, Guérin A, et al. Survival, Motor Function, and Motor Milestones: Comparison of AVXS-101 Relative to Nusinersen for the Treatment of Infants with Spinal Muscular Atrophy Type 1. *Advances in Therapy* [Internet]. 2019 [cited 2021 Nov 28];36(5):1164. Available from: [/pmc/articles/PMC6824368/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36824368/)
139. Lee BH, Collins E, Lewis L, Guntrum D, Eichinger K, Voter K, et al. Combination therapy with nusinersen and AVXS-101 in SMA type 1. *Neurology* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Nov 28];93(14):640–1. Available from: <https://n.neurology.org/content/93/14/640>
140. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2021 Nov 28];74(5):637–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.23982>
141. Alfano LN, Charleston JS, Connolly AM, Cripe L, Donoghue C, Dracker R, et al. Long-term treatment with eteplirsen in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medicine* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Nov 28];98(26):e15858. Available from: [/pmc/articles/PMC6617421/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36617421/)
142. Martínez-Montiel N, Rosas-Murrieta N, Martínez-Contreras R. Peptidic tools applied to redirect alternative splicing events. *Peptides (NY)*. 2015 May 1;67:1–11.
143. Santarelli A, Mascitti M, lo Russo L, Sartini D, Troiano G, Emanuelli M, et al. Survivin-Based Treatment Strategies for Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol 19, Page 971 [Internet]. 2018 Mar 24 [cited 2022 May 30];19(4):971. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/971/htm>

REPROGRAMACIÓN DEL SPLICING ALTERNATIVO DE GENES ASOCIADOS A CÁNCER DE MAMA

*Reprogramming of alternative splicing of genes
associated with breast cancer*

EPISTEMUS
ISSN: 2007-8196 (electrónico)

Kate Ariadna Rossano Gutiérrez ¹
Nancy Martínez Montiel ²
Maricruz Anaya Ruiz ³
Mayra Patricia Gaspariano Cholula ⁴
Rebeca D. Martínez Contreras ⁵

Recibido: 15 / 10 / 2021
Aceptado: 14 / 12 / 2021
Publicado: 17 / 12 / 2021
DOI: <https://doi.org/10.36790/epistemus.v15i30.186>

Autor de Correspondencia:
Dra. Rebeca D. Martínez Contreras
Correo: rebeca.martinez@correo.buap.mx

Resumen

El splicing alternativo es un proceso que modula la expresión génica y contribuye en la diversidad proteica. Sin embargo, se han observado que alteraciones en el splicing alternativo de algunos genes promueve el desarrollo de isoformas oncogénicas en cáncer de mama. Debido a que el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres y la primera causa de muerte por cáncer. El presente trabajo analiza la expresión de isoformas involucradas en la progresión tumoral y considera ideal el uso de oligonucleótidos antisentido como tratamiento contra cáncer de mama. La información revela que la desregulación de los genes BirC5 y KLF6 se asocia a la inhibición de la muerte celular y metástasis. Además, la existencia de terapias que utilizan oligonucleótidos antisentido es una realidad, tal es el caso del tratamiento utilizado en la atrofia muscular espinal, que ha brindado excelentes resultados a los pacientes que sufren de esta enfermedad.

Palabras clave: Splicing, cáncer mamario, oligonucleótidos antisentido.

Abstract

Alternative splicing is a process that modulates gene expression and contributes to protein diversity. However, alterations have been observed that harm alternative splicing and promote the development of oncogenic isoforms in breast cancer. Breast cancer is the most common neoplasm in women and the leading cause of death from cancer. This paper analyzes the expression of isoforms involved in tumor progression and the use of antisense oligonucleotides as a treatment for breast cancer. The information reveals that the deregulation of the BirC5 and KLF6 genes is involved in tumor progression and invasion, inhibition of cell death, and metastasis. In addition, antisense oligonucleotide therapies are reported, which re-establish alternative splicing of genes involved in spinal muscle atrophy, pancreatic cancer, colon cancer, and glioblastoma.

Keywords: Splicing, breast cancer, antisense oligonucleotides.

¹ Licenciada en Biomedicina, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, Puebla, México, kate.rossanog@alumno.buap.mx, <https://orcid.org/0000-0002-7510-8636>
² Doctora en Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, Puebla, México, nancy.martinez.montiel@usherbrooke.ca
³ Doctora en Ciencias, Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Metepec, Puebla, manaya19@yahoo.com.mx
⁴ Maestra en Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, Puebla, México, mayra.gaspariano.90@gmail.com
⁵ Doctora en Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, Puebla, México, rebeca.martinez@correo.buap.mx



INTRODUCCIÓN

La maduración del ARNm primario (pre-ARNm) consta de diferentes etapas: la adición de la CAP extremo 5', la poliadenilación y el *splicing*[1]. Particularmente, el *splicing* constitutivo es un proceso co-transcripcional de corte de intrones y empalme de exones. A diferencia del *splicing* alternativo, que tiene la capacidad de incluir exones, intrones o parte de ellos [2]. Además, se ha observado que el 95% de los genes humanos llevan a cabo este proceso, contribuyendo así a la diversidad proteica[3]. Sin embargo, las alteraciones durante el *splicing* alternativo se manifiestan en el desarrollo de enfermedades genéticas y cáncer[4]. El cáncer es una problemática de salud pública, debido a los niveles elevados de incidencia y mortalidad en el mundo. En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres[5], [6]. El cáncer de mama es un tumor maligno originado por el crecimiento desmedido de células mamarias, capaz de migrar e invadir tejidos lejanos[7]. Molecularmente, el *splicing* alternativo en cáncer de mama, se ha correlacionado con la progresión tumoral, debido a que favorece la angiogénesis, invasión y metástasis, además, altera el ciclo celular e inhibe la apoptosis[8]. Recientemente, se han reportado terapias que restablecen el *splicing* alternativo mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido para el tratamiento de múltiples enfermedades. En este trabajo, analizamos la expresión de isoformas involucradas en la proliferación, invasión, transición epitelio-mesénquima e inhibición de la apoptosis y de actividades supresoras en cáncer de mama. Además, presentamos el uso de oligonucleótidos antisentido como futuro tratamiento contra cáncer de mama.

SPLICING ALTERNATIVO Y SU MECANISMO

El *splicing alternativo* (SA) es un proceso nuclear que participa en el desarrollo, diferenciación de la célula, regulando la expresión génica[4]. La diversidad proteómica está determinada por los diferentes eventos de SA que surgen como: la retención de intrones, salto de exón, uso de sitio de *splicing* alternativo 5', sitio de *splicing* alternativo 3' y exones mutuamente excluyentes (Fig.1) [9].

Este proceso es catalizado por un complejo multiproteico, llamado *spliceosoma*. El *spliceosoma* está conformado por las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) U1, U2, U4, U5 y U6. Las snRNP son las encargadas de catalizar la eliminación de intrones y el empalme de exones, reconocen los sitios de *splicing* 5' y 3'. El SA es un mecanismo altamente regulado, que involucra a otras proteínas o factores en trans[2]. Estos factores comprenden a las proteínas SR (proteínas ricas repetidos de residuos arginina/ serina) y hnRNP's (proteínas ribonucleares heterogéneas) ambas son las responsables de activar y/o inhibir el SA, respectivamente[10]. Sin embargo, esto varía según su unión a elementos potenciadores de *splicing* intrónico (ISE), elementos potenciadores de *splicing* exónico (ESE), elementos silenciadores de *splicing* intrónico (ISS) y elementos silenciadores de *splicing* exónico (ESS), ya que la unión de las proteínas SR a la región ISS y ESS inhiben el SA [2], [3]. No obstante, las afectaciones en estas proteínas reguladoras también pueden alterar la actividad proteica y comprometer la integridad celular, lo que conlleva al desarrollo de diversas enfermedades, especialmente el cáncer de mama.



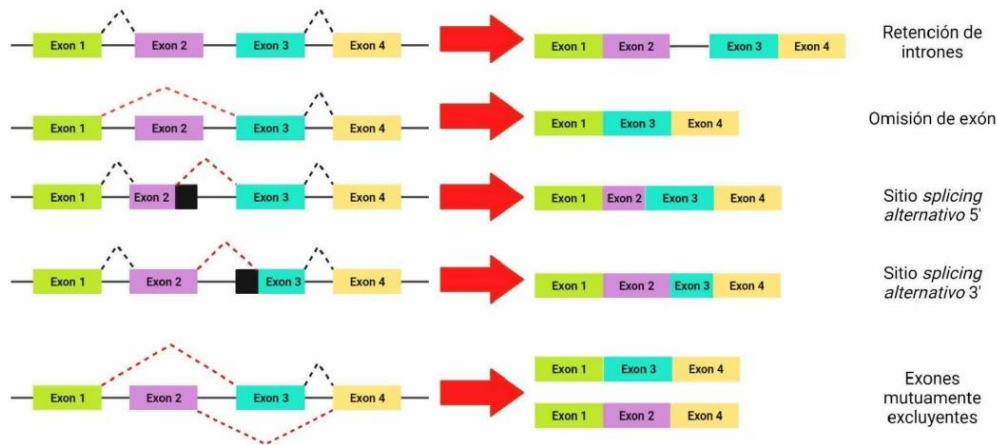


Figura 1. Tipos de splicing alternativo en ARNm. El siguiente esquema muestra eventos de splicing alternativo que se presenta en el núcleo celular como: retención de intrones, salto de exón, sitio splicing alternativo 5', sitio splicing alternativo 3' y exones mutuamente excluyentes.



CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres, sin embargo, no es exclusiva de este género ya que también se presenta en hombres. Este ha sido un problema de salud mundial ya que presenta una prevalencia del 15.4%[5].

El cáncer de mama es el crecimiento anormal de células epiteliales mamarias que ocurre dentro de los conductos, lóbulos y/o lobulillos mamarios[7], [11]. Curiosamente, la localización anatómica del tumor juega un papel importante, pues se le ha asociado con el grado de invasividad y la supervivencia del paciente; se ha observado que el desarrollo del tumor dentro de los conductos o lóbulos mamarios limita el crecimiento celular, aumenta la supervivencia del paciente y reduce la

reincidencia del cáncer; en cambio, las células tumorales que invaden la región ducto-lobulillar hacia el estroma, promueven la invasividad[11]. Existen cinco subtipos de cáncer de mama, los cuales se clasifican conforme a la expresión positiva o negativa del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2)[1], [2], clasificándose en: 1) luminal A (ER+, PR+, HER2-), 2) luminal B (ER+, PR-, HER2- o ER+, PR+ / PR-, HER2+), 3) HER2 positivo (ER-, PR-, HER+), 4) TNBC o triple negativo (ER-, PR-, HER2-) y 5) tumores de tipo normal[1], [2], [11]. Y cada uno tiene distintos pronósticos y respuestas a terapias[1], [2].

DESREGULACIÓN DEL SPLICING ALTERNATIVO EN GENES ASOCIADOS A CÁNCER DE MAMA

A pesar de la amplia regulación del SA, este puede verse gravemente afectado por mutaciones génicas, desarrollando isoformas oncogénicas e inhibitoras de la supresión de tumores. No obstante, el descubrimiento de estas isoformas ayuda en la detección de nuevos marcadores contra cáncer de mama y el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

ER (Receptor de estrógenos)

En cáncer de mama, ER α es un gen que expresa tres isoformas; ER α 66 (longitud larga), ER α 36 y ER α 46 (Fig.2) [12]. Cada una de ellas se distingue por la presencia de los dominios AF1 y AF2, encargados de regular la transcripción de ER[2], [13], [14]. Curiosamente, ER α 46 y ER α 66 presentan secuencias de aminoácidos similares que van desde la posición 174 a la 595[2]. Además, la expresión



esta inversamente correlacionada, es decir, cuando ER α 66 se expresa poco, ER α 46 se sobreexpresa[12]. Sin embargo, existen particularidades que las diferencian, ya que ER α 46 posee dos veces mayor afinidad al ligando, participando en la oncogénesis y resistencia a los fármacos[2], [13].

BRCA1 (Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1)

BRCA1 es un gen supresor de tumores, localizado en el núcleo y encargado de reparar el ADN por medio de recombinación homóloga[2], [15]. BRCA1 expresa las isoformas BRCA1 FL (longitud larga), BRCA Δ 11 y BRCA Δ 11q, que se caracterizan por la inclusión/exclusión del exón 11, lo cual determina la localización de BRCA1(Fig.2)[15]. En diferentes tumores de cáncer de mama, se ha observado una sobreexpresión de BRCA Δ 11q y una reducción de BRCA1 FL[16].

DMTF1 (Factor de transcripción tipo Myb 1 de unión a ciclina D)

DMTF1 es un supresor tumoral activado por la vía RAS/ERBB2[17]. La presencia de la región homóloga myb (MHR) distingue las variantes DMTF1 α , DMTF1 β y DMTF1 γ . DMTF1 α es la isoforma larga que posee actividad supresora de tumores[18]. DMTF1 β y DMTF1 γ son las variantes más cortas, ya que presentan una reducción de MHR, que afecta la unión al ADN[15]. En cáncer de mama, el SA de DMTF1 se produce en el 30% de los casos, donde se observa a DMTF1 α disminuida y DMTF1 β aumentada. Por medio de secuenciación de ARNm se ha reportado que DMTF1 β aumenta su expresión entre 43%-55%[15], [17]. Además, la sobreexpresión de DMTF1 β y DMTF1 γ se ha asociado con la reducción de la tasa de supervivencia a largo y corto plazo[18].

HER2 (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)

HER2 es un oncogén que pertenece a la familia de receptores tirosina cinasa[15], [19]. La sobreexpresión

del receptor lo clasifica como subtipo HER2+, que representa del 15-20% de los casos diagnosticados en cáncer de mama[2], [19]. Además, la sobreexpresión de HER2 es del ~30% en cáncer de mama primario[13], [15]. Generalmente, HER2 expresa la variante Δ 16HER2, que carece del exón 20, predominante en cáncer de mama metastásico y asociada a la resistencia a fármacos (Fig.2) [2], [15]. Se ha observado que la co-expresión de HER2 larga (FL) y Δ 16HER2 incrementa la heterogeneidad del cáncer, por lo que altera su biología, curso clínico y respuesta al tratamiento[2]. Estudios recientes, reportan la sobreexpresión de la isoforma HER2-112 que contribuye en la tumorigénesis al mejorar la proliferación, migración e invasión celular, además que activa las vías de señalización RAS/MAPK y PI3K/Akt.

KLF6 (Factor 6 tipo Krüppel)

KLF6 es una proteína supresora de tumores, que posee dominios de unión al ADN, llamados "dedos de zinc"[20], [21]. En tejidos normales, KLF6 presenta cuatro exones que constituyen la isoforma larga (KLF6 FL). En cáncer, se expresan las isoformas: KLF6-SV1, KLF6-SV2 y KLF6-SV3 que participan en la oncogénesis, progresión del tumor y evasión de la apoptosis[2], [15], [21]. La importancia de estas isoformas radica en la presencia y/o ausencia del dominio de localización nuclear (NLS), pues se ha observado que KLF6-SV1 permanece en el citoplasma debido a la pérdida del exón 2 durante el SA[2]. Cabe resaltar que KLF6-SV1 es la isoforma mayor predominante en cáncer de mama, que antagoniza la función de KLF6-FL, promueve la progresión tumoral, contribuye en la transición epitelio-mesénquima y se asocia con un mal pronóstico (Fig.2)[15], [16], [20].

Survivina

BIRC5 codifica para la proteína multifuncional survivina, implicada en el control de la mitosis, respuesta al estrés celular y regulación de la apoptosis[15], [22]. Generalmente, la survivina se expresa durante el desarrollo fetal y no en tejidos diferenciados y sanos. En cáncer de mama, la sobreexpresión de la proteína está involucrada al inhibir la apoptosis, promover la angiogénesis y proliferación celular[15], [23]. BIRC5 tiene seis isoformas: survivina WT (*Wild Type*), 2 α , 2B, 3 α , 3B y Δ ex3 (Fig.3) [15]. Particularmente, la survivina Δ ex3 muestra una sobreexpresión en tumores metastásicos y/o estadio IV, por lo que se relaciona con una enfermedad agresiva y pronóstico desfavorable en cáncer de mama[24], [25]. Además, se ha encontrado que la proteína Sam68 participa en la exclusión del exón 3, al actuar como hnRNP, unirse al pre-ARNm e impedir la unión de los factores de *splicing*, de esta manera contribuye en la formación de Δ ex3 y podría utilizarse como una excelente diana terapéutica [8]. Por otra parte, la survivina 2B es la isoforma mayor expresada en tumores primarios de mama, que responden con éxito al tratamiento, por lo que lo posiciona como un excelente biomarcador(Fig. 2 y 3) [8], [24], [25].

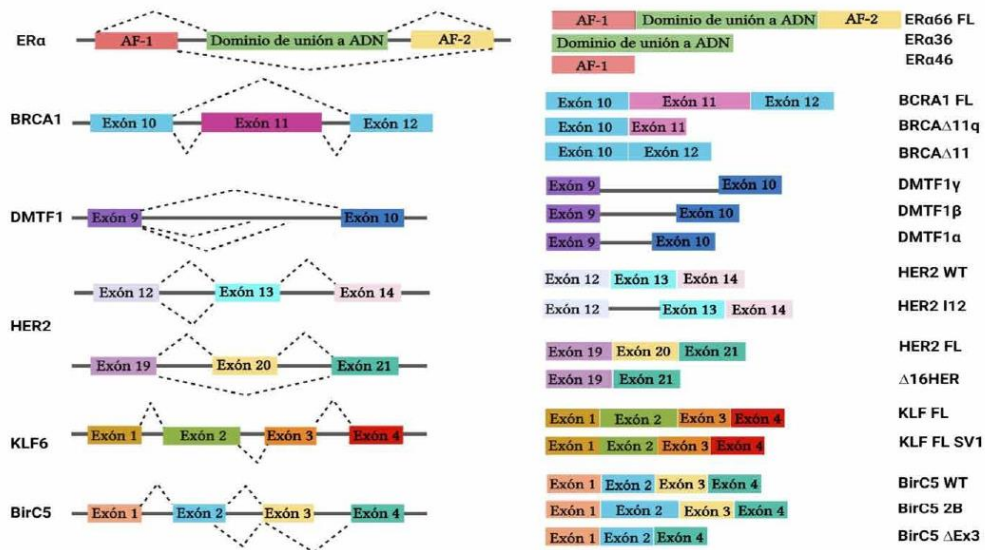


Figura 2. Eventos de splicing alternativo involucrados en el desarrollo de cáncer de mama. El esquema representa múltiples eventos de splicing alternativo que generan isoformas oncogénicas. De lado izquierdo, se presenta el pre-ARNm que será procesado. De lado derecho, se muestra las isoformas resultantes. Las líneas oscuras simbolizan intrones y los rectángulos esquematizan exones. Las líneas punteadas indican la unión de las exones. FL: Isoformas de larga longitud. WT: wild.

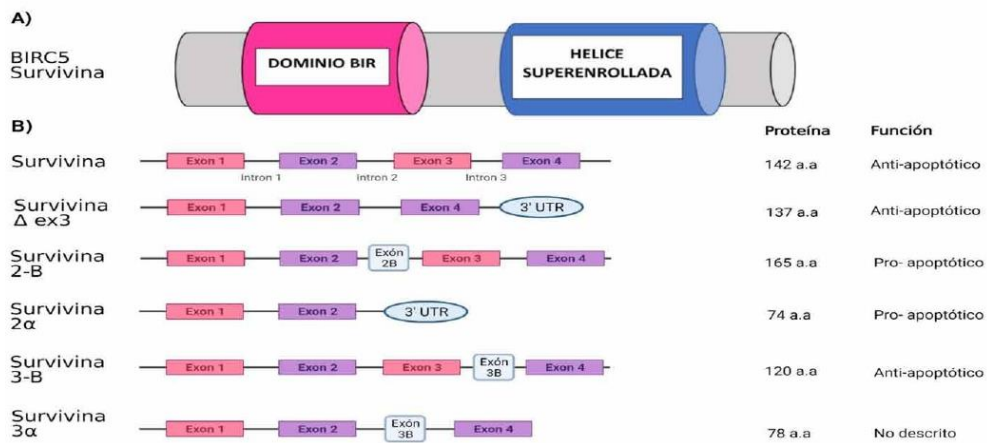


Figura 3. Isoformas de la proteína survivina. La siguiente representación gráfica muestra la composición de la proteína survivina. A) BirC5 codifica para la proteína survivina, que se caracteriza por la presencia de un dominio BIR y una hélice superenrollada. B) El splicing alternativo que sufren los pre-ARNm de la survivina, generan seis isoformas. De lado izquierdo, se esquematiza la región pre-ARNm que será procesada. De lado derecho, se observa el tamaño y función de la proteína resultante.

OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO (ASO'S) COMO TRATAMIENTO CONTRA CÁNCER DE MAMA

Durante mucho tiempo, el tratamiento de elección contra cáncer ha sido la radioterapia, quimioterapia y los tratamientos hormonales, sin embargo, su uso compromete la integridad del paciente. Ante estos acontecimientos, los investigadores han buscado terapias alternas que mejoren la efectividad del tratamiento y disminuyan el sufrimiento del paciente.

Los oligonucleótidos antisentido (ASO's) son secuencias cortas específicas de 15 a 30 nucleótidos que se unen al ARNm para formar híbridos bicatenarios[1]. La hibridación de los oligonucleótidos inhibe la expresión génica, mediante bloqueo estérico o por degradación del híbrido a causa de la RNasa H[26], [27]. Estos han sido modificados químicamente en la cadena principal y los anillos de azúcar, que incluyen modificaciones fosforotiato (PS), fosforodiamidato morfolino(PMO) 2'-O-metoxietilo (MOE) y 2'-O-metilo (OMe), dando mejor resultado 2'-O-metilo y 2"-O-metoxietilo al proporcionar una mayor especificidad, afinidad al ARNm diana y resistencia a la degradación por endonucleasas [26], [28], [29]. Por lo tanto, estas modificaciones son una excelente opción para el recubrimiento de ASO's utilizados contra cáncer. Además, se ha observado la participación de los ASO's en la modificación de eventos de SA, que podrían reestablecer el procesamiento de isoformas antitumorales. En este caso, los oligonucleótidos interruptores de *splicing* (SSO) son secuencias cortas, que compiten contra los factores de *splicing* por la unión a elementos reguladores, por lo que contribuye en la activación o inhibición del SA (Fig4.)[1],

[29]. Los oligonucleótidos dirigidos a potenciadores de *splicing* (TOES) son elementos que dirigidos a proteínas SR y promueven la inclusión de exones. En diferentes estudios, los TOES han sido utilizados para promover la inclusión del exón 7 de SMN2 en pacientes con Atrofia Muscular Espinal (AME)[29]. Los potenciadores de *splicing* exón-específico por efectores quiméricos pequeños (ESSENCE) son moléculas que se unen al dominio serina/arginina, de las proteínas SR, en el extremo 3' para favorecer la inclusión de exones[1]. Además, se ha demostrado la eficacia de estas moléculas al redirigir el SA de SMN2 en AME, el exón 18 y Bcl-x en BRCA1[1], [29]. En cambio, los oligonucleótidos dirigidos a silenciadores de *splicing* (TOSS) son elementos que reconocen proteínas hnRNP A1/A2, que afectan la unión de U1 al pre-ARNm e inhibe el *splicing* alternativo. Cabe resaltar que los TOSS ya ha sido probados y dirigidos a hnRNP A1, reprimiendo la exclusión del exón 8 y favoreciendo la inclusión del exón 7 de SMN2 en AME[30].

Los SSO también han sido probados en diversos genes asociados a cáncer. En glioblastoma, los SSO favorece la inclusión del exón 14a en Mnk, lo que conlleva al aumento de la expresión Mnk2a (supresor de tumores) y disminución de la isoforma Mnk2b (pro-oncogénica)[31]. Por otra parte, el diseño de TOSS, dirigido a hnRNP A1, muestra una reducción de la isoforma Bcl-xL (Longitud completa) y aumento de Bcl-xS (longitud corta) en líneas celulares de cáncer de próstata, colon y mama, de manera que favorece la apoptosis[30]. Además, OT-101 es un ASO, diseñado para inhibir el ARNm de TGF- β 2, que mostró una mejoría en la supervivencia general de los pacientes con cáncer de páncreas[32]. En este sentido, la unión de ASO's a elementos reguladores restablecería el SA y disminuiría la expresión de oncogenes en cáncer de mama.



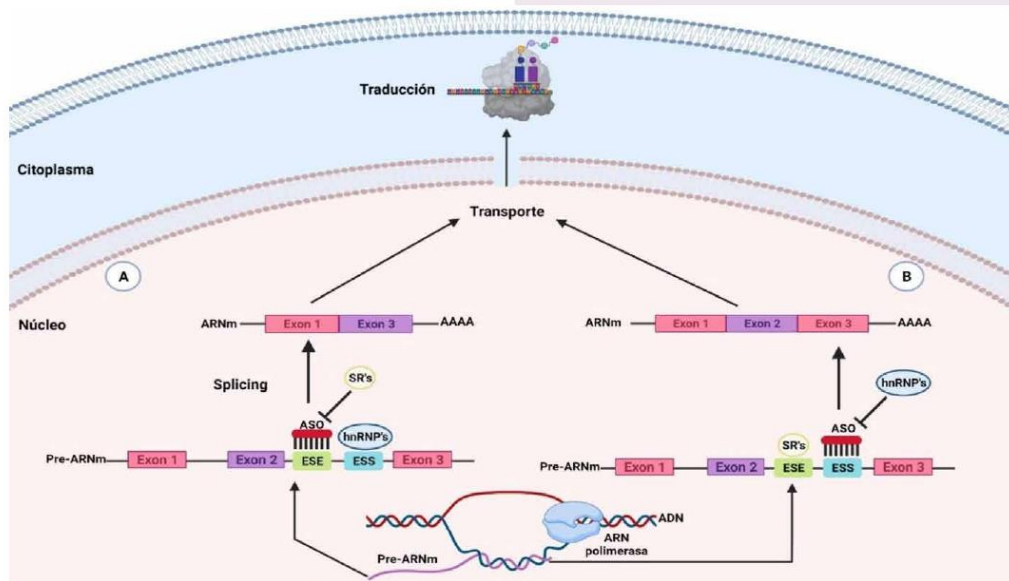


Figura 4. Mecanismos de acción de los oligonucleótidos antisentido en splicing alternativo. A) El oligonucleótido antisentido se une a elementos silenciadores de splicing que impiden la inclusión del exón 2. B) El oligonucleótido antisentido se une a elementos potenciadores del splicing, que favorecen la inclusión del exón 2. Posteriormente, el ARNm es transportado hacia el citoplasma para ser traducido a proteína en el ribosoma.

CONCLUSIÓN

La disregulación del splicing alternativo en cáncer ha sido evidenciado en diferentes estudios. Ejemplo de esto, son las diferentes isoformas de los genes ERα, BRCA1, DMTF1, HER2, KLF6 y BirC5, pues cada una de ellas se asocia con la progresión tumoral, invasión celular, desarrollo transición epitelio-mesénquima y resistencia a fármacos, además de inhibir actividades apoptóticas y supresoras de tumores, lo que da paso al desarrollo de tumores malignos mamarios. Afortunadamente, el desarrollo de ASO's brinda una nueva y mejor opción como terapia antitumoral. Los estudios de protección de los ASO's sugiere que la modificación 2'-O-ME es una excelente opción, ya que evitan la degradación por nucleasas y favorece la vida media del fármaco. Por último, las evidencias apuntan que los ASO's serían el tratamiento ideal contra cáncer de mama, ya que tienen la capacidad de restablecer el splicing alternativo y han demostrado ser específicos, efectivos, no deterioran la salud y mejoran la supervivencia del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Martínez-Montiel, N. H. Rosas-Murrieta, M. A. Ruiz, E. Monjaraz-Guzmán, y R. Martínez-Contreras, "Alternative Splicing as a Target for Cancer Treatment", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, núm. 2, feb. 2018, doi: 10.3390/IJMS19020545.
- [2] Q. Yang, J. Zhao, W. Zhang, D. Chen, y Y. Wang, "Aberrant alternative splicing in breast cancer", *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, núm. 10, pp. 920-929, may 2019, doi: 10.1093/jmcb/mjz033.
- [3] H. K. Kim, M. H. C. Pham, K. S. Ko, B. D. Rhee, y J. Han, "Alternative splicing isoforms in health and disease", *PLoS Arch. - Eur. J. Physiol.* 2018 4707, vol. 470, núm. 7, pp. 995-1016, mar. 2018, doi: 10.1007/S00424-018-2136-X.
- [4] H. Dvinge, J. Guenthoer, P. L. Porter, y R. K. Bradley, "RNA components of the spliceosome regulate tissue- and cancer-specific alternative splicing", *Genome Res.*, vol. 29, núm. 10, p. 1591, 2019, doi: 10.1101/GR.246678.118.
- [5] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, y A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, núm. 6, pp. 394-424, nov. 2018, doi: 10.3322/CAAC.21492.
- [6] Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, "Información Estadística Cáncer de Mama | Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva | Gobierno | gob.mx", dic. 02, 2016. <https://www.gob.mx/salud/cnegsr/acciones-y-programas/informacion-estadistica-cancer-de-mama> (consultado oct. 01, 2021).
- [7] IMSS, "Cáncer de Mama". <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama> (consultado dic. 08, 2020).
- [8] J. Gaytan-Cervantes, C. Gonzalez-Torres, V. Maldonado, C. Zampedri, G. Ceballos-Cancino, y J. Melendez-Zajgla, "Protein Sam68 regulates the alternative splicing of survivin DEx3", *J. Biol. Chem.*, vol. 292, núm. 33, pp. 13745-13757, ago. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.800318.



- [9] M. Bhadra, P. Howell, S. Dutta, C. Heintz, y W. B. Mair, "Alternative splicing in aging and longevity", *Hum. Genet.* 2019 1393, vol. 139, núm. 3, pp. 357–369, dic. 2019, doi: 10.1007/S00439-019-02094-6.
- [10] S. Park et al., "Differential Functions of Splicing Factors in Mammary Transformation and Breast Cancer Metastasis", *Cell Rep.*, vol. 29, núm. 9, p. 2672, nov. 2019, doi: 10.1016/J.CELREP.2019.10.110.
- [11] M. Fahad Ullah, "Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status", *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1152, pp. 51–64, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_4.
- [12] Z. Xiping, W. Qingshan, Z. Shuai, Y. Hongjian, y D. Xiaowen, "A summary of relationships between alternative splicing and breast cancer", *Oncotarget*, vol. 8, núm. 31, Impact Journals LLC, pp. 51986–51993, feb. 07, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.17727.
- [13] K. Inoue y E. A. Fry, "Aberrant Splicing of Estrogen Receptor, HER2, and CD44 Genes in Breast Cancer", *Genet. Epigenet.*, vol. 7, núm. 7, pp. 19–32, ene. 2015, doi: 10.4137/GEG.S35500.
- [14] N. Fuentes y P. Silveyra, "Estrogen receptor signaling mechanisms", *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 116, p. 135, ene. 2019, doi: 10.1016/BS.APCSB.2019.01.001.
- [15] N. Martínez-Montiel, M. Anaya-Ruiz, M. Pérez-Santos, y R. D. Martínez-Contreras, "Alternative splicing in breast cancer and the potential development of therapeutic tools", *Genes*, vol. 8, núm. 10, MDPI AG, p. 217, oct. 06, 2017, doi: 10.3390/genes8100217.
- [16] D. Wiener et al., "BRCA1 and BARD1 colocalize mainly in the cytoplasm of breast cancer tumors, and their isoforms show differential expression", *Breast Cancer Res. Treat.* 2015 1533, vol. 153, núm. 3, pp. 669–678, sep. 2015, doi: 10.1007/S10549-015-3575-0.
- [17] N. Tian, J. Li, J. Shi, y G. Sui, "From general aberrant alternative splicing in cancers and its therapeutic application to the discovery of an oncogenic DMTF1 isoform", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, núm. 3, p. 191, mar. 2017, doi: 10.3390/ijms18030191.
- [18] J. Li et al., "Mechanisms regulating DMTF1 β/γ expression and their functional interplay with DMTF1 α ", *Int. J. Oncol.*, vol. 58, núm. 1, p. 20, ene. 2021, doi: 10.3892/IJO.2020.5146.
- [19] V. Hart, M. Silipo, S. Satam, H. Gautrey, J. Kirby, y A. Tyson-Capper, "HER2-PI9 and HER2-I12: two novel and functionally active splice variants of the oncogene HER2 in breast cancer", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 147, núm. 10, p. 2893, oct. 2021, doi: 10.1007/S00432-021-03689-1.
- [20] Z. Xiping, W. Qingshan, Z. Shuai, Y. Hongjian, y D. Xiaowen, "A summary of relationships between alternative splicing and breast cancer", *Oncotarget*, vol. 8, núm. 31, p. 51986, feb. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.17727.
- [21] S. E. Syafruddin, M. A. Mohtar, W. F. W. M. Nazarie, y T. Y. Low, "Two Sides of the Same Coin: The Roles of KLF6 in Physiology and Pathophysiology", *Biomolecules*, vol. 10, núm. 10, pp. 1–22, oct. 2020, doi: 10.3390/BIOM10101378.

- [22] I. Sušac et al., "Polymorphisms in Survivin (BIRC5 Gene) Are Associated with Age of Onset in Breast Cancer Patients", *J. Oncol.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/3483192.
- [23] J. Dai et al., "Identification of prognostic significance of BIRC5 in breast cancer using integrative bioinformatics analysis", *Biosci. Rep.*, vol. 40, núm. 2, 2020, doi: 10.1042/BSR20193678.
- [24] S. Khan et al., "Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer", *BMC Cancer*, vol. 14, núm. 1, pp. 1–10, mar. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-176.
- [25] D. Trnski et al., "Regulation of Survivin Isoform Expression by GLI Proteins in Ovarian Cancer", *Cells*, vol. 8, núm. 2, p. 128, feb. 2019, doi: 10.3390/CELLS8020128.
- [26] K. Xue y R. E. Maclaren, "Antisense oligonucleotide therapeutics in clinical trials for the treatment of inherited retinal diseases", <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1804853>, vol. 29, núm. 10, pp. 1163–1170, oct. 2020, doi: 10.1080/13543784.2020.1804853.
- [27] K. Takakura, A. Kawamura, Y. Torisu, S. Koido, N. Yahagi, y M. Saruta, "The Clinical Potential of Oligonucleotide Therapeutics against Pancreatic Cancer", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, núm. 13, jul. 2019, doi: 10.3390/IJMS20133331.
- [28] D. R. Scoles, E. V. Minikel, y S. M. Pulst, "Antisense oligonucleotides: A primer", *Neurol. Genet.*, vol. 5, núm. 2, p. 323, abr. 2019, doi: 10.1212/NXG.0000000000000323.
- [29] V. Sardone, H. Zhou, F. Muntioni, A. Ferlini, y M. S. Falzarano, "Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease", *Mol. A J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.*, vol. 22, núm. 4, abr. 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22040563.
- [30] J.-P. Brosseau et al., "Redirecting splicing with bifunctional oligonucleotides", *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, núm. 6, p. e40, 2014, doi: 10.1093/NAR/GKT1287.
- [31] M. Mogilevsky et al., "Modulation of MKNK2 alternative splicing by splice-switching oligonucleotides as a novel approach for glioblastoma treatment", *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, núm. 21, p. 11396, nov. 2018, doi: 10.1093/NAR/GKY921.
- [32] O. J. D'Cruz, S. Qazi, L. Hwang, K. Ng, y V. Trieu, "Impact of targeting transforming growth factor β -2 with antisense OT-101 on the cytokine and chemokine profile in patients with advanced pancreatic cancer", *Onco. Targets. Ther.*, vol. 11, p. 2779, may 2018, doi: 10.2147/OTT.S161905.

Cómo citar este artículo:

Rossano Gutiérrez, K. A., Martínez Montiel, N., Anaya Ruiz, M., Gaspariano Cholula, M. P., & Martínez Contreras, R. D. (2021). Reprogramación del splicing alternativo de genes asociados a cáncer de mama. *EPISTEMUS*, 15(30). <https://doi.org/10.36790/epistemus.v15i30.186>





Reprogramación del *splicing* alternativo de genes asociados a cáncer de mama

Kate Ariadna Rossano Gutierrez, Nancy Martínez Montiel, Maricruz Anaya Ruiz, Rebeca D. Martínez Contreras
¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ²Facultad de Medicina, ³Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas,
⁴Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana. Edif. 103 J. Ciudad Universitaria. CP 72540, Puebla, Pue. México. Tel +52 (222)
2295500 Ext 2529. correo: rebecca.martinez@correo.buap.mx



Introducción

El *splicing* alternativo (SA) es el mecanismo co-transcripcional empleado por el 95% de los genes humanos, que involucra el corte o empalme diferencial de exones (secuencias codificantes) e intrones (secuencias no codificantes) para formar transcritos complejos y diferentes proteínas (Figura 1) (1,2). Este fenómeno es uno de los principales reguladores de la expresión génica, que en ocasiones puede dañarse y producir isoformas aberrantes; un ejemplo claro es en cáncer de mama. El cáncer de mama es una de las problemáticas en salud pública, que requiere atención, debido a sus altos niveles de incidencia, prevalencia y mortalidad. A nivel mundial, este tumor ocupa el primer lugar entre las neoplasias más frecuentes. En México, se estima que cada año existen 40.5 casos nuevos por cada 100 000 mujeres (3). Molecularmente, la desregulación del *splicing* alternativo en diversos genes, se ha correlacionado con la progresión tumoral, debido a que favorece la angiogénesis, invasión y metástasis, además de que altera el ciclo celular e inhibe la apoptosis. Recientemente, se han reportado terapias que restablecen el *splicing* alternativo mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido para el tratamiento de múltiples enfermedades (4).

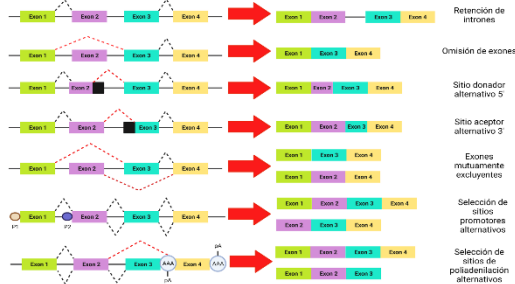


Figura 1. Tipos de *splicing* alternativo en ARNm. El siguiente esquema muestra los diferentes eventos de *splicing* alternativo, que se representan en el núcleo celular como: retención de intrones, omisión de exones, sitio donador alternativo 5', sitio aceptor alternativo 3', exones mutuamente excluyentes, selección de sitios promotores alternativos y selección de sitios de poliadenilación alternativos. De lado izquierdo se muestra el pre-ARNm. De lado derecho se observa el ARNm resultante tras cada evento de *splicing* alternativo. Los cuadros simbolizan los exones y las líneas negras continuas representan los intrones. P1: Promotor 1, P2: Promotor 2, pA: sitios de poliadenilación. Modificada de Wang y Lee, 2018 (2).

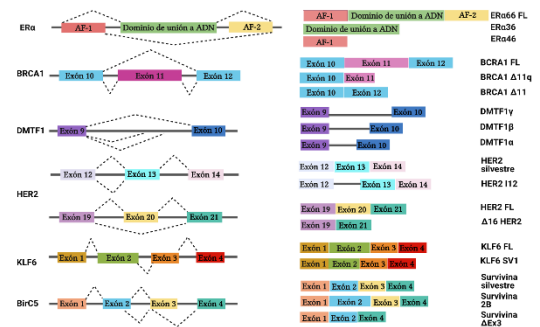


Figura 3. Eventos de *splicing* alternativo involucrados en el desarrollo de cáncer de mama. El esquema representa múltiples eventos de *splicing* alternativo que generan isoformas oncogénicas. De lado izquierdo, se representa el pre-ARNm que será procesado. De lado derecho, se muestran las isoformas resultantes. Las líneas oscuras simbolizan intrones y los rectángulos esquematizan exones. Las líneas punteadas indican la unión de los exones. FL: Isoforma de larga longitud. WT: Wild Type. Modificada de Martínez Montiel et al., 2017 (4).

Elementos que determinan los eventos de *splicing* alternativo

El SA es un proceso complejo que involucra la unión ordenada de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP's) (U1, U2, U4, U5 y U6), las proteínas ricas en serina y arginina (SR) y las proteínas ribonucleares pequeñas (hnRNP's) al ARNm. La unión entre sí de las snRNP's forman el spliceosoma, encargado del procesamiento de intrones y exones. Mientras que las proteínas SR y hnRNP's reconocen sitios reguladores (Figura 2) (5).

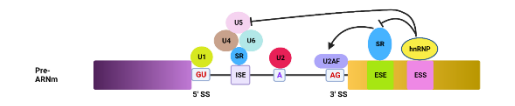


Figura 2. Ensamblaje del complejo spliceosómico y elementos reguladores de *splicing* alternativo. Los elementos reguladores se localizan a lo largo del transcrito. Las proteínas SR reconocen los elementos potenciadores de *splicing* exónico (ESE), que tienen la capacidad de activar el *splicing* alternativo. De manera contrasta, las proteínas hnRNP se unen a los elementos silenciadores de *splicing* exónico (ESE) para impedir la llegada de las snRNP e inhibir el *splicing* alternativo. Además, la interacción de los elementos potenciadores intrínsecos (ISE), ubicados dentro del intrón, con las proteínas SR favorece la exclusión de los intrones. Modificada de Martínez-Montiel y cols., 2013 (5).

Desregulación del *splicing* alternativo en genes asociados a cáncer de mama

En ocasiones, el SA puede verse afectado por mutaciones génicas y cambios en las proteínas spliceosómicas, lo que genera la formación de isoformas oncogénicas e inhibe la producción de isoformas supresoras de tumores, especialmente en cáncer de mama. Un ejemplo claro de esto, son las múltiples isoformas de los genes ER α , BRCA1, DMTF1 β , HER2, KLF6 y BIRC5 (5).

Cada una de las isoformas reportan diferentes eventos de SA, lo que propicia reordenamientos diferentes de intrones y exones, así como cambios en las funciones proteicas (Figura 3). Las isoformas de longitud completa de BRCA1, KLF6 y DMTF1 α tienen actividad supresora de tumores, es decir, impiden la formación de tumores. En cambio, la sobreexpresión de las isoformas BRCA1 Δ 11q, DMTF1 β y KLF6 SV1 (Figura 3) se ha relacionado con la progresión tumoral, actividades metastásicas y resistencia a fármacos antineoplásicos, por lo que se producen bajas tasas de supervivencia en personas con cáncer de mama. Asimismo, ER y HER2 son receptores hormonales que exhiben las variantes ER α 46, Δ 16HER2 y HER2-112 (Figura 3). La sobreexpresión de estas en cáncer de mama, se asocian con el mejoramiento de la proliferación, migración e invasión tumoral, así como actividades metastásicas y resistencia a fármacos (6).

En condiciones normales, BIRC5 codifica para la proteína survivina, encargada de regular la mitosis celular y la apoptosis. Esta proteína se expresa únicamente durante el desarrollo fetal. Sin embargo, se ha encontrado la expresión de las isoformas survivina-2B y survivina Δ -Ex3 (Figura 3), que están involucradas en el desarrollo de cáncer de mama primario y metastásico, respectivamente. Además que promueven la proliferación celular y la angiogénesis; sobre todo inhiben la apoptosis (6).

Hasta el momento, la quimioterapia, la radioterapia y los tratamientos hormonales son el tratamiento de elección contra cáncer de mama, lo que los vuelve inespecíficos y poco selectivos, pues la mayoría de ellos dañan por igual a las células sanas y tumorales. Además que deterioran la salud física y anímica de la persona; es por esto que se han buscado nuevas terapias que mejoren la especificidad y reduzcan el daño, tal como los oligonucleótidos antisentido (6).

Los oligonucleótidos antisentido (ASO's) son secuencias cortas y específicas (15-30 nucleótidos), que forman híbridos bicatenarios a través de su unión al ARNm. En SA, los ASO's compiten contra los factores de SA por los sitios reguladores, lo que facilita la inclusión o exclusión de exones e intrones y restablece la isoforma (Figura 4) (7). Clínicamente, este tipo de terapia ya ha sido aplicada en pacientes con Arofia Muscular Espinal (AME). Nusinersen es el ASO aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), que incluye el exón 7 en SMN2 al unirse al ISS, por lo que restablece la isoforma, mejora la función motora y la supervivencia de vida del paciente. En este sentido, los ASO's pueden ser dirigidos a las isoformas oncogénicas para restablecer las isoformas canónicas, pues han demostrado ser específicos y no generan toxicidad al cuerpo humano (6).

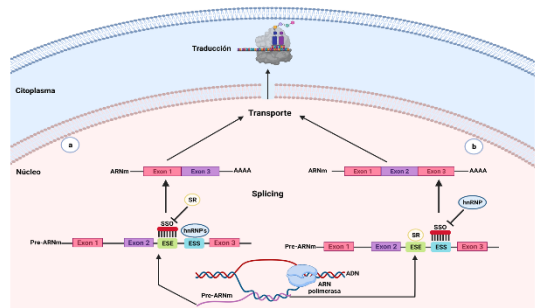


Figura 4. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos interruptores de *splicing* alternativo. a) El oligonucleótido interruptor de *splicing* (SSO, por sus siglas en inglés: Splice Switching Oligonucleotide) se une al potenciador de *splicing* exónico (ESE, por sus siglas en inglés: Exonic Splicing Enhancer), para impedir la unión de las proteínas SR. Al mismo tiempo, la proteína hnRNP se une al silenciador de *splicing* exónico (ESE, por sus siglas en inglés: Exonic Splicing Silencer) para promover así la omisión del exón 2. b) En este caso, el SSO se une a ESE y bloquea la unión de hnRNP por lo que no permite la inhibición del *splicing*. De manera simultánea, la proteína SR se adhiere a ESE, de tal manera que favorece la inclusión del exón 2. Por último, el ARNm es transportado hacia el citoplasma para ser traducido a proteína en el ribosoma. Modificada de Bennett, 2019 (7).

Referencias

- Kim HK, Pham MH, Ko KS, Rhee BD, Han J. Alternative splicing actoms in health and disease. *Phloggers Archiv - European Journal of Physiology* 2018 470(1) [Internet]. 13 Jun 2018 [citado 3 Oct 2021];470(1):106-116. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00421-018-2184-x>
- Wang BU, Luo H. Aberrant RNA splicing in cancer and drug resistance [Internet]. Vol. 10. *Cancers*. MDPI AG; 2018 [Bdado 8 Dic 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers10101999>
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019;169(9):920-948.
- Martínez-Montiel N, Anaya-Ruiz M, Irujo-Santana M, Martínez-Contreras RD. Alternative splicing in breast cancer and the potential of therapeutic tools [Internet]. Vol. 8. *Cancers*. MDPI AG; 2017 [Bdado 11 Mar 2021]. p. 217. Disponible en: [www.mdpi.com/cancers8030217](https://doi.org/10.3390/cancers8030217)
- Gutierrez KAR, Rossano KA, Martínez-Contreras RD. Replicon tools applied to correct alternative splicing events. *Popidos (NY)*. 2015; May 18(7):1-11.
- Gutierrez KAR, Montiel NM, Ruiz MA, Chelito MPH, Contreras RD. Reprogramación del *splicing* alternativo de genes asociados a cáncer de mama. *EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA*. 11 Dic 2021 [citado 29 May 2022]; 15(18):17-42. Disponible en: <https://repositorio.unoim.mx/doi/pdf/10.26434/chemrxiv-2021-187>
- Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides. *Adv. Coning of Age*. *Annu Rev Med* 2019; 2019 [citado 9 Oct 2021]; 70:207-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217>