



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA

**Estudio de las isoformas de *splicing* del gen
ADGRG1 en cáncer de mama**

TESIS

TÍTULO QUE SE OBTIENE

Licenciada en Biomedicina

PRESENTA

Tapia Carreón Karen Jazmín

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Rebeca Débora Martínez Contreras

COASESOR

D.C. Nancy Martínez Montiel

Puebla, 2025

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a la D.C. Rebeca Martínez Contreras por su experiencia, comprensión y paciencia contribuyeron a mi experiencia profesional y gratificante camino de la investigación. Agradeciendo también a su equipo de trabajo como D.C. Nancy Martinez Montiel y M.C. Mayra Gasparino por su apoyo profesional y consejos para enriquecer mi conocimiento.

Al D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán por su apoyo, asesoría durante los experimentos y poderme brindar el espacio para poder realizar este proyecto. A mis hermanos y mis papas por siempre estar apoyándome y dándome ánimos para cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mis papás, mis hermanos y mi abuelita por alentarme y darme su apoyo incondicional durante esta etapa.

A Selene Cruz alumna de doctorado por su apoyo profesional, ser paciente, sus consejos para mejorar y ser una guía en la parte experimental del proyecto. Mencionando también a María Julieta López Cuevas por su experiencia, paciencia y apoyo constante.

Me gustaría agradecer a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional.

ÍNDICE

Índice de figuras	
Abreviaciones	
Resumen	
Introducción	1
1. Antecedentes generales	
1.1. Cáncer de mama	2
1.2. Estadios del cáncer de mama	5
1.3. Características del cáncer mama triple negativo	6
1.4. Tratamientos del cáncer de mama	8
1.5. Biomarcadores en el cáncer de mama	9
1.6. <i>Splicing</i>	10
1.7. <i>Splicing</i> Alternativo	11
1.8. El spliceosoma	12
2. Antecedentes específicos	
2.1. Factores moduladores del spliceosoma	14
2.2. Alteraciones del <i>splicing</i> en el cáncer de mama	15
2.3. El receptor ADGRG1	16
2.4. siRNA	17
3. Planteamiento del problema	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
5.1. Objetivo General	21
5.2. Objetivos Particulares	21
6. Material y métodos	21
6.1. Condiciones de cultivo para tratamiento con Lipofectamina 2000	21
6.2. Condiciones para la extracción	22
6.3. Análisis bioinformático	22
6.3.1. Análisis de las isoformas reportadas	22
6.3.2. Identificación de sitios trans y cis de regulación del <i>splicing</i>	23
6.3.3. siRNA	23
6.3.4. Diseño de oligonucleótidos	23
6.4. Análisis In vivo	24
6.4.1. Línea celular	24
6.5. Ensayos de silenciamiento	25
6.5.1. Transfección de siRNAs con lipofectamina 2000	25
6.6. Evaluación del efecto de los ensayos de silenciamiento	26
6.6.1. Extracción de ARN	26
6.6.2. Cuantificación mediante espectrofotometría	26
6.6.3. Transcripción reversa	26
6.6.4. Amplificación por PCR	26
6.6.5. Electroforesis en gel de agarosa	27
6.6.6. Conteo celular	27
6.6.7. Densitometría	27
6.6.8. Análisis de datos	28
7. Resultados	29
7.1. Análisis bioinformático	29
7.1.1. Diseño de oligonucleótidos	29
7.1.2. Diseño de siRNA	30
7.2. Tratamiento con siRNA	34
7.2.1. Ensayo de proliferación celular	34
7.3. RT-PCR	37
7.3.1. Efectos del silenciamiento sobre la morfología celular	42
8. Discusión	44

9. Conclusión	47
10. Anexos	48
11. Bibliografía	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Características del cáncer	2
Fig. 2 Incidencia en el cáncer a nivel mundial	3
Fig. 3 Mortalidad en el cáncer a nivel mundial	4
Fig. 4 Estadios del cáncer mama	5
Fig.5 Eventos de <i>splicing alternativo</i>	11
Fig. 6 Spliceosoma	13
Fig. 7 Mecanismo de RISC y la modulación post transcripcional	18
Fig. 8 Complejo RISC y proteína AGO, ejecutores del silenciamiento	19
Fig. 9 Morfología de línea celular MDA-MB-231.	25
Fig. 10 Estructura del gen ADGRG1	30
Fig. 11 ADGRG1 y siRNA	31
Tabla 1. Proteínas SR y HNRNP que son moduladores de splicing y su reconocimiento en el gen ADGRG1	32
Tabla 2. Ensayo de proliferación mediado con lipofectamina 2000	35
Tabla 3. Ensayo de proliferación mediado por el silenciamiento de siRNA	36
Fig. 12. Efecto del silenciamiento del gen ADRG1 sobre el número de células MDA-MB-231	37
Fig. 13 Tratamiento con siRNA 2	38
Fig. 14 Tratamiento con lipofectamina en siRNA 1 y siRNA 2	40
Fig. 15 Tratamiento en una concentración de 0.015 µg/µL de lipofectamina probado en el siRNA 1	41
Fig. 16 Cambios morfológicos celulares después del tratamiento con lipofectamina 2000	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Fig. A Características del cáncer	48
Fig. B Controles de calidad para la expresión genética de ADGRG1	49

ABREVIATURAS

ADGRG1 : *Adhesion G Protein-Coupled Receptor G1*

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGO: proteína argonauta

ALDH1A1: aldehído deshidrogenasa 1

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN pequeño de interferencia

BrCa: cáncer de mama

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ER: receptor de estrógeno

ESE: potenciadores de *splicing* de exón

EVI1: sitio de integración viral ecotrópico 1

HER2: factor de crecimiento epidérmico humano

hnRNP: *Heterogeneous ribonucleoprotein particle*

ISE: Silenciador de *splicing*

Im: N-metilimidazol

PARP: polimerasa

PCR: reacción de cadena de la polimerasa.

PIP: pirrol-imidazol poliamida

PR: receptor de progesterona

Py: N-metilpirrol

RISC: complejo *RNA-induced silencing complex*

RT: transcriptasa inversa

RTK: tirosina quinasas receptoras

siRNA: ácido ribonucleico de interferencia pequeño

snRNP: *small nuclear ribonucleoproteins*

SRp: proteínas SR

TNBC: cáncer de mama triple negativo

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con diferentes subgrupos que presentan variaciones moleculares, antecedentes celulares, sensibilidad a tratamientos y diagnósticos. Generalmente, este tipo de cáncer se origina en las células de los lobulillos o conductos mamarios, aunque puede surgir en tejidos estromales. Existen diversos factores de riesgo como la edad, sexo, factores ambientales, hormonales y predisposición genética, que juegan un papel fundamental en su desarrollo. En este contexto, las mutaciones genéticas son clave, ya que pueden aumentar la agresividad del cáncer y pueden generar que la sobreexpresión de ciertos genes favorezcan a un cáncer de mama con un mal pronóstico, es por ello que se estudia al gen ADGRG1 como un posible adyuvante en el tratamiento de cáncer de mama por sus implicaciones en el cáncer ya que se encontrado evidencia que en favorecer la adhesión, progresión, migración, proliferación y metástasis en cáncer de hueso, melanoma y en gliomas. El gen ADGRG1 pertenece al grupo de receptores acoplados a proteínas G, los cuales son el grupo más extenso de receptores en la superficie celular y tienen un papel esencial en varios procesos biológicos. En el contexto de la tumorigénesis, los receptores de adhesión acoplados a proteína G (aGPCR) se destacan por su estructura híbrida, que incluye un largo dominio adhesivo extracelular y un dominio transmembrana de siete segmentos para la señalización. Un ejemplo representativo es el ADGRG1/GPR56, un aGPCR vinculado a tumores que se ha identificado como un posible biomarcador y factor pronóstico para ciertos tipos de cáncer, mostrando tanto funciones que pueden suprimir como promover el desarrollo tumoral. El gen ADGRG1 puede generar al menos 5 isoformas por *splicing* alternativo, las cuales pueden tener funciones distintas en las células. El *splicing* alternativo se regula por proteínas enhancer o silenciadoras las cuales juegan un papel importante para dar paso a los posibles eventos de *splicing*, algunas proteínas son las SR o hnRNPs. Para poder monitorear este proceso, se optó por usar un silenciamiento por siRNA, los cuales se ubican en regiones diferenciales para cada isoforma. Los siRNAs se transfectaron empleando lipofectamina 2000 y su efecto se evaluó mediante RT-PCR y por medio de una prueba fenotípica de proliferación celular. Con estos ensayos pudimos confirmar que las células MDA-MB-231 expresan el ARNm que

codifica para el receptor ADGRG1/GPR56 y que el silenciamiento de este mensajero disminuye la proliferación de esta línea celular. Será interesante explorar en el futuro la participación de las diferentes isoformas de este mensajero en los diferentes procesos celulares relevantes para el cáncer de mama.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública ya que es una neoplasia maligna del tejido mamario y es más común diagnosticada en mujeres a nivel mundial, siendo una de las principales causas mundiales de muerte por cáncer en mujeres, representando 1,38 millones de diagnósticos de cáncer y 458.000 víctimas cada año [63,14], además que cada año suben estas cifras.

En el cáncer de mama se encuentran diferentes estadios (0, I, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc, IV), los cuales indican como va progresando la enfermedad [40], en donde cada uno tiene ciertas características que lo llegan a ser en algunos casos más agresivo, el estudio se basa en un cáncer triple negativo (TNBC) que tiene como característica un perfil de expresión génica análogo a la capa mioepitelial basal de la mama normal, también el nombre que recibe es por la ausencia de expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2, la ausencia del receptor de estrógeno y la ausencia del receptor de progesterona [16]. Para el TNBC (Cáncer de mama triple negativo) su perfil molecular muestra una alta mortalidad y su tiempo de supervivencia más corto, es por ello por lo que la cirugía, como la quimioterapia sean la principal herramienta de tratamiento [50,70]. Al buscar una alternativa de tratamiento y diagnóstico se estudia el uso de siRNA en un gen de interés como el ADGRG1 que codifica a un receptor ADGRG1/GPR56, cuando el transcrito del gen sufre *splicing* se han detectado 5 isoformas de la proteína GPR56, las cuales difieren en la composición de la región extracelular y el primer bucle intracelular [49], se ha encontrado en algunos estudios que el gen puede apoyar en adhesión en gliomas, en la regularización de la mielinización del sistema nervioso central y la progresión del melanoma al interactuar con su ligando [57,60].

El uso de siRNA tienen una alta especificidad en el silenciamiento en genes de interés, son un mecanismo con el que cuenta la célula para su regulación post transcripcional, en este caso ayudara al silenciamiento de la expresión de la isoforma que se haya expresado y silenciando el gen ADGRG1 [8].

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Cáncer de mama

El cáncer es una enfermedad que tiene varias características funcionales que lo hacen pasar de un estado de normalidad a los estados de crecimiento neoplásico, es decir formar un tumor maligno, las características que se han estudiado son la capacidad adquirida para mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir/acceder a la vasculatura, activar la invasión y la metástasis, reprogramar el metabolismo celular y evitar la destrucción inmunológica (Fig. 1) [26]. Las características mencionadas apoyan que cada cáncer tiene un comportamiento distintivo el cual, día con día se va estudiando para poder identificar nuevas técnicas de tratamiento.

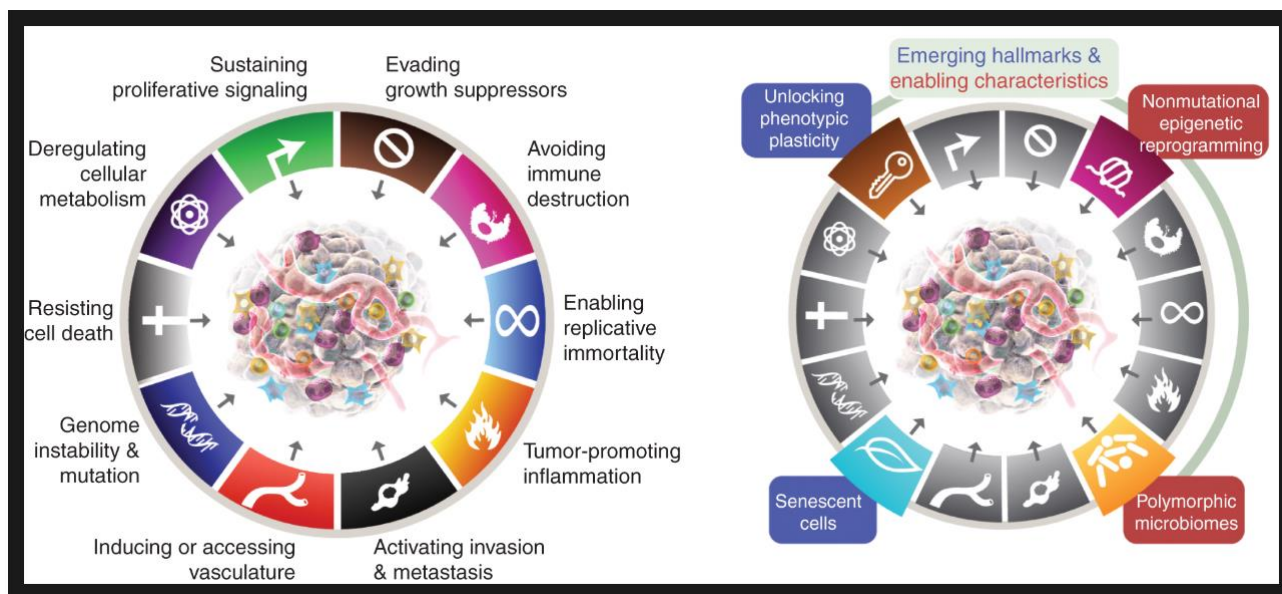


Fig. 1 Características del cáncer adaptado por Hanahan y Weinberg.

Las ocho capacidades distintivas funcionales requeridas para la progresión del tumor y crecimiento las podemos visualizar a la izquierda mientras de lado derecho se encuentran características distintivas emergentes adicionales que implican el desbloqueo de plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, los microbiomas polimórficos y a las células senescentes [26].

El cáncer de mama (BrCa) constituye una neoplasia maligna originada en el tejido mamario, representando la principal neoplasia diagnosticada en mujeres a nivel global y una de las mayores causas de mortalidad oncológica en este grupo poblacional. Según reportes epidemiológicos, esta patología registró aproximadamente 1,38 millones de casos nuevos y 458,000 muertes anuales en datos históricos [14, 63]. Sin embargo, para el año 2022, la incidencia aumentó a 2.3 millones de casos confirmados (Fig. 2), con una mortalidad estimada en 666,103 decesos (Fig. 3) [64].

La distribución geográfica de BrCa muestra una correlación significativa con el Índice de Desarrollo Humano (IDH). En regiones con IDH elevado, la probabilidad acumulada de diagnóstico alcanza 1 caso por cada 12 mujeres durante su vida, mientras que la tasa de mortalidad asociada se reduce a 1 de cada 71 mujeres afectadas. A escala global, esta neoplasia ocupa el cuarto lugar entre las causas de muerte en la población femenina [6, 25].

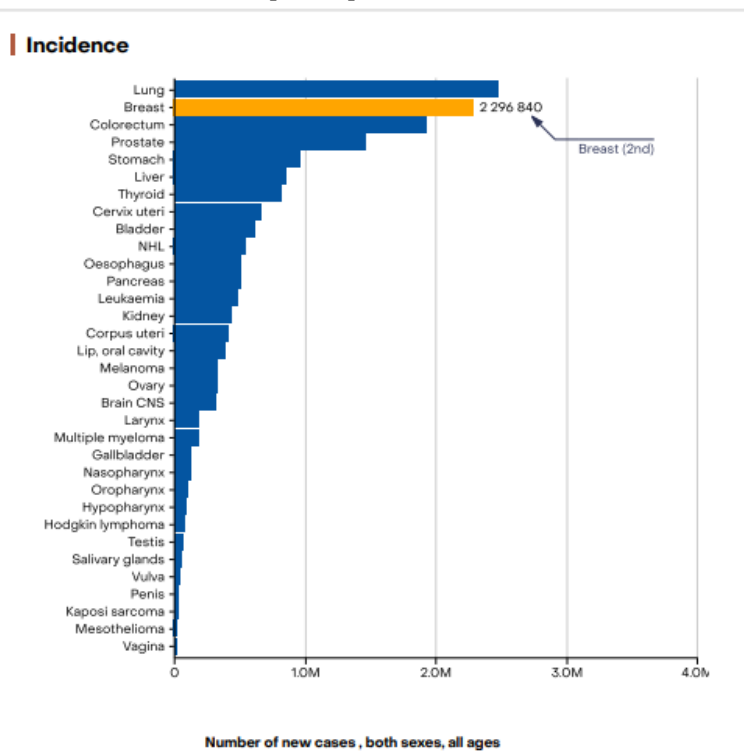


Fig. 2 Incidencia en el cáncer a nivel mundial: podemos observar que el cáncer de mama se encuentra en el ranking en segundo lugar como incidencia, siendo un problema de salud pública [64].

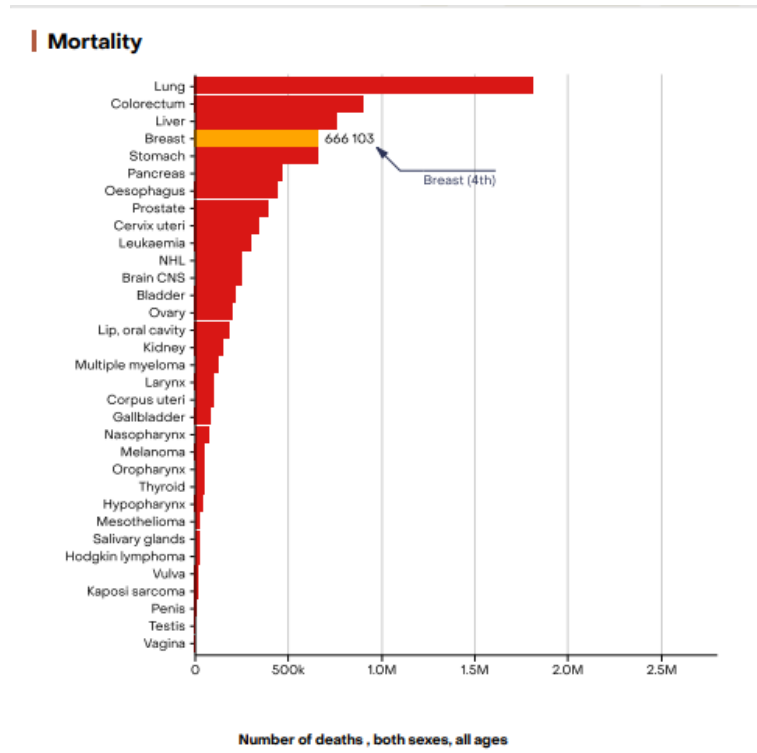


Fig. 3 Mortalidad por cáncer a nivel mundial: Se identifica al cáncer de mama con el cuarto lugar en mortalidad a nivel mundial con 666 103 casos de muertes en el año 2022 [64].

En México podemos observar 2022 el cáncer de mama registra 847 716 defunciones en el país siendo el 10.6% de la incidencia de tumores malignos. Según cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI, se tiene registro que los estados con mayor mortalidad son Ciudad de México, Sonora, Veracruz de Ignacio de la Llave, Colima, Morelos y Chihuahua [26].

El cáncer de mama es una enfermedad variable que abarca diversos subgrupos con variaciones moleculares, antecedentes celulares, sensibilidad a diferentes tratamientos y diagnósticos. Comúnmente el cáncer de mama se origina en las células de los lobulillos o en los conductos, otros casos particulares menos comunes se pueden originar en tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama [69]. Hay factores que pueden ayudar a que se desencadene el cáncer de mama los más comunes son la edad, sexo, proliferaciones benignas, ambientales, hormonales o predisposición genética,

donde cada uno juega un papel en el cáncer de mama como esta tesis se centrara en la predisposición genética, ya que es donde ocurren mutaciones las cuales pueden ocasionar una mayor agresión del cáncer o la predisposición hacia algún tipo de BrCa [14].

En el cáncer de mama se pueden encontrar diferentes estadios de acuerdo con la invasión que tengan las células cancerígenas y los receptores que se expresen, así también se puede llegar a conocer su progresión y poder obtener un tratamiento más específico para un mejor diagnóstico.

1.2. Estadios del cáncer de mama

Los estadios del cáncer de mama hacen referencia, a lo lejos que se han propagado las células cancerígenas más allá del tumor original. El cáncer de mama lo podemos encontrar en diferentes estadios (0, I, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc, IV), los cuales nos indican como va progresando la enfermedad [40].

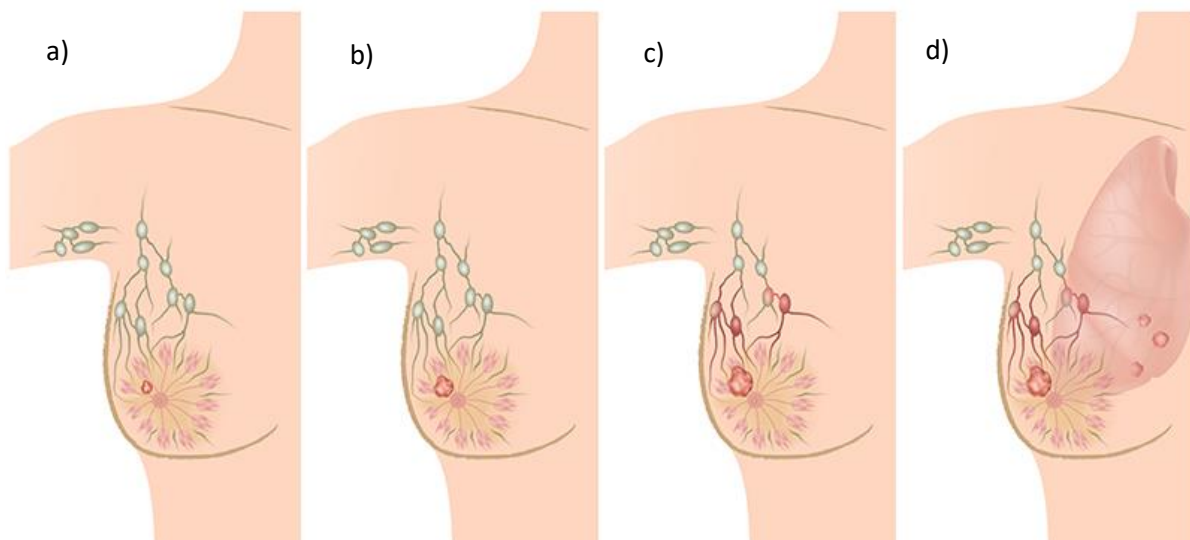


Fig. 4 Estadios del cáncer mama

Los estadios del cáncer de mama comienzan con un estadio 0 donde tiende a localizarse en el interior de los conductos mamarios (a), en el estadio I tiende a presentar un tamaño de 2 cm y se extiende en otros tejidos de la mama (b). Cuando el cáncer pasa a un estadio II tendrá el mismo tamaño o puede crecer a un máximo de 5 cm, pero se esparcirá en ganglios de la axila en un 50 % de probabilidad, en el estadio III siguiente ya se encuentra con un nódulo que no alcanza aun 5 cm, pero las células cancerígenas ya invadieron tejidos cercanos a la glándula mamaria (c), en el último estadio que es el IV las células cancerígenas ya llegaron a invadir otros tejidos y formando metástasis en algunos otros órganos(d) [23].

A continuación, se presenta en que consiste cada estadio:

I carcinoma *in situ* (carcinoma no invasivo, estadio 0), es aquel donde las células cancerosas no han invadido más allá de la membrana basal del conducto o del lóbulo, mientras el siguiente estadio sería el infiltrante, el cual es un cáncer invasivo y abarca del estadio I al IV, es donde las células van invadiendo los conductos mamarios con un nódulo que oscila los 2 cm, para en el siguiente estadio (II) podemos observar un tamaño que no pasa de 5 cm (Fig. 4b, 4c), cuando las células llegan a invadir otros tejidos y han llegado a causar metástasis en otros órganos se llega a un estadio IV; los sitios de metástasis más comunes son los huesos, hígado, pulmón y cerebro [23,63].

El BrCa se puede identificar no solo por su invasión en los tejidos sino también por el perfil molecular que presente, de los cuales hay cinco subtipos de BrCa, de acuerdo con la expresión del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [69]. Reciben el nombre de luminal A, luminal B, HER2, tipo basal o triple negativo, donde el luminal A, incluye tumores que son positivos para ER y positivos para el PR, pero negativos para el HER2, en el luminal B es ER positivos, PR negativos y HER2 positivos (ER / PR -, HER2 +), tipo HER2 tenemos el ER negativo, el PR negativo y el HER2 positivo (ER- / PR-, HER2 +), TNBC o triple negativo todos los receptores tienden a ser negativos (ER- / PR - / HER2-), en la mayoría de los tipos de BrCa que se han descrito tienden a beneficiarse en tratamientos de quimioterapia o radioterapia, el subtipo HER2 y el luminal B también tienden a beneficiarse de tratamientos hormonales, pero día con día van creciendo los tratamientos y diagnósticos de esta enfermedad, por eso se encuentran estudios que sugieren que hay marcadores moleculares que pueden ayudar en el tratamiento [39,41].

1.3. Características del cáncer mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) tiene como característica un perfil de expresión génica análogo a la capa mioepitelial basal de la mama normal, también el nombre que recibe es por la ausencia de expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2, la ausencia del receptor de estrógeno y la ausencia del

receptor de progesterona [16]. Siendo uno de los cánceres con mayor morbilidad y mortalidad, por el daño que causa en el huésped. En este tipo de cáncer se han reportado algunas variantes patogénicas de la línea germinal, estas variantes en un contexto molecular sugieren correlación entre la progresión y expresión génica de células cancerígenas [38]. Se ha encontrado que la expresión génica que se manifiesta llega tener mutaciones o cambios por las isoformas que puede llegar a existir y formar un fenotipo celular, por ello tener un tratamiento efectivo para el TNBC sea complicado [32,43].

Mutaciones o cambios en expresión de genes específicos como BRCA1, BRCA2, RAD51D, entre otros genes en el TNBC podrían servir como un posible marcador biomolecular para su identificación y tratamiento en el cáncer, hay estudios previos en BRCA1, BRCA2 y RAD51D porque se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama y otros tipos de cáncer debido a su papel en la reparación del ADN y el mantenimiento de la estabilidad genómica, algunos de estos genes ya son estudiados y son utilizados como perfil genómico en pacientes [38,42].

Se encuentra en la literatura que TNBC una similitud con el cáncer de mama tipo basal y llegan en algunos estudios colocarlo como si fuera un sinónimo, pero estudios basados en datos clínicos, de micro matrices e inmunohistoquímicos muestran que no lo son. La morfología de las células cancerosas TNBC y de tipo basal muestran un patrón de marcadores de superficie celular que es análogo al de las células madre del cáncer de mama, donde sus características fenotípicas muestran CD44+ en una alta concentración y a CD24- en una concentración baja o indetectable y a su vez cuentan con expresión de aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1A1) [16, 38]. La célula cancerosa diferenciada adquiere la propiedad de autorrenovación, en la transición de características epiteliales a mesenquimatosas es un proceso natural que ocurre durante la embriogénesis, la cicatrización e heridas y la regeneración de tejidos. Podría decirse que se puede considerar como un paso clave para conferir potencial metastásico a los carcinomas [37,69].

1.4. Tratamientos del cáncer de mama

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) se caracteriza por una alta mortalidad y un tiempo de supervivencia más corto en comparación con otros subtipos. Por este motivo, el tratamiento se basa principalmente en estrategias como la cirugía y la quimioterapia, que constituyen las herramientas terapéuticas fundamentales [50,70].

En general, la quimioterapia sirve como un neoadyuvante al reducir el tamaño del tumor, por ello se utiliza para evitar una cirugía menos extensa o como tratamiento de cánceres que son demasiado grandes para extirparlos. Otro tipo de tratamiento es la inmunoterapia, incluye inmunomoduladores y el uso de anticuerpos para inducir la muerte de las células cancerosas a través de diferentes vías. Mediante la terapia génica, se podría inducir la muerte de las células cancerosas para alentar o revertir el crecimiento del tumor, un ejemplo sería el uso de partículas virales con capacidad de replicarse en las células BrCa donde producen un anticuerpo de cadena única contra factor de crecimiento endotelial vascular, el cual al unirse a VEGF (especialmente VEGF-A), bloquean su interacción con el receptor VEGFR-2, inhibiendo así proliferación, migración de células endoteliales, angiogénesis [9, 33]. Por otro lado, hay otro tratamiento que usa portadores no virales, los cuales incluyen nanopartículas catiónicas, aniónicas o neutras unidas a ácidos nucleicos, por ejemplo, el uso de CRISPER para restaurar la función de BRCA1/2 en células tumorales para sensibilizarlas a inhibidores de PARP. Por último, los métodos basados en interferencia de ARN han silenciado con éxito genes como CCL2 y VEGF-C. Sería interesante modificar o combinar algunos de estos métodos para el silenciamiento de las isoformas de *splicing* para un resultado más específico [9, 36, 70].

En los últimos años este campo ha sido estudiado con 3 terapias dirigidas, donde algunas son dirigidas a BRCA (gBRCAm-BC) de su línea germinal donde se incluye a los inhibidores de PARP como son los fármacos olaparib y talazoparib, otro tipo de técnica dirigida recientemente estudiada es la inmunoterapia dirigida con un inhibidor al punto de control, uno de ellos es el fármaco atezolizumab en el ligando

1 de muerte programada (PD-L1+) TNBC, otra terapia dirigida es la conjugación de anticuerpos y fármacos, también la orientación molecular [36,59,72]. En el cáncer de mama triple negativo hay referencias que sustentan que terapias dirigidas en vías como MAPK y PI3K, el bloqueo de la respuesta al daño del ADN, incluida la inhibición del ciclo celular, ayudan como tratamiento en este tipo de cáncer [33].

1.5. Biomarcadores en el cáncer

De los tipos BrCa que se hablaron anteriormente, se conoce que hay modificaciones fenotípicas y moleculares en los genes por consecuencia del *splicing* alternativo, generado por la isoforma que se exprese, las cuales pueden tener un efecto diferente y a menudo opuestos, que pueden afectar a receptores transmembrana, moléculas adaptadoras (Bcl-x, survivina), caspasas y algunos ejecutores. Además, podría también encontrarse una desregulación en factores catalíticos del *splicing* que pueden estar asociados con el desarrollo del BrCa [41].

En uno de los genes que se considera como marcador de predisposición para el cáncer de mama es el gen BRCA1, el cual se considera responsable de la mayoría de cánceres hereditarios de mama y ovarios, se manejan sus mutaciones como alteraciones en los eventos de *splicing* [40]. Entre los casos esporádicos de cáncer de mama, la expresión de BRCA1 es reducida o indetectable en carcinomas ductales de alto grado, lo que sugiere la participación de este gen en la etiología del cáncer de mama. Variaciones de la secuencia de la línea germinal en ambos sitios de *splicing* y elementos reguladores del gen BRCA1, han sido implicados en susceptibilidad al cáncer. Por ejemplo, una mutación sin sentido heredada en el exón 18 del gen BRCA1 interrumpe un potenciador de *splicing* exónico. El potenciador se une a la proteína SR SF2 / ASF, y su mutación causa omisión inapropiada del exón constitutivo 18. También se ha demostrado que una mutación en los nucleótidos (de AA a AG) genera un sitio de *splicing* 3', lo que añade 11 nucleótidos al ARNm de BRCA1. Esta alteración da lugar a una proteína truncada asociada a un mayor riesgo de cáncer de mama en una familia específica [42,72].

Al igual que ocurre con BRCA1, nuestro objetivo es determinar si ADGRG1 y la expresión de alguna de sus isoformas podría estar implicado en un mayor riesgo de

cáncer de mama. Además, buscamos identificar si modificar sus niveles de expresión podría tener un efecto beneficioso.

1.6. Splicing

El procesamiento del ARNm es un proceso de maduración clave que incluye el *splicing*, la poliadenilación y la protección del ARNm. El *splicing* ocurre en las células eucariotas y permite que aumente la diversificación de los genes que codifican para proteínas en el ser humano, permite que un gen llegue a generar de 8 a 10 variantes de empalme, ya que, el proceso busca la eliminación de intrones y dejar solo los exones, este tipo de evento se le conoce como *splicing* consecutivo, sin embargo, se sabe que también se puede generar un empalme alternativo donde puede generarse exones mutuamente excluyentes, un salto de exón, sitio donante alternativo 5', sitio aceptor alternativo 3' o una retención de intrones (Fig. 5) [5]. Este proceso de maduración que se produce en el núcleo de una manera cotranscripcional y regula la expresión génica eucariota [41]. Entonces el *splicing* alternativo ocurre cuando algunos exones, intrones o porciones de estos son incluidos de manera diferencial para producir diversas moléculas de ARNm a partir de un mismo precursor inmaduro (pre-ARNm). Se estima que entre el 15% y el 50% de las enfermedades genéticas humanas tienen su origen en algún defecto a nivel de *splicing* [5, 72].

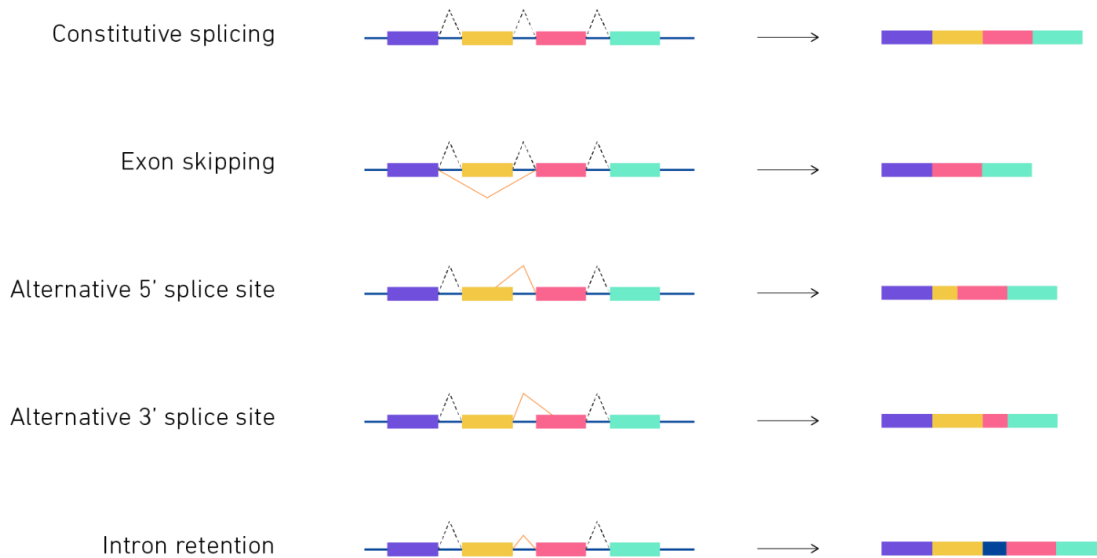


Fig. 5 Eventos de *splicing alternativo*

El procesamiento RNAm puede utilizar los siguientes eventos de *splicing alternativo*, por ejemplo, exones mutuamente excluyentes, un salto de exón, sitio donante alternativo 5', sitio aceptor alternativo 3' o una retención de intrones, el procesamiento ocurre como se visualiza en la imagen en el núcleo de la célula [10].

1.7. *Splicing Alternativo*

En células eucariotas es clave el *splicing* alternativo para la expresión génica ya que aumenta la capacidad de codificación del genoma humano, los defectos del *splicing* alternativo generan proteínas funcionalmente distintas donde algunas de ellas, llegan a contribuir en enfermedades como la atrofia muscular espinal (AME), la distrofia miotónica y el cáncer⁵. Mutaciones puntuales en el *splicing* provocan alteraciones. Hay registros que un 60% de las enfermedades humanas pueden ser ocasionadas en alteraciones de este tipo [3]. Los cambios que genera el *splicing* son una diferente interacción de proteínas, localización subcelular o cambiar su capacidad catalítica, es así como podemos ver que este proceso tiende a regular la función de los genes que van a codificar a una proteína [3, 52].

Los eventos que se pueden generar en el *splicing* alternativo son los saltos de exones donde se eliminan por completo los intrones y se llega a omitir exones, otro

evento es la retención de intrones donde se conservan los exones pero también es incluida una porción de algún intrón, mientras el sitio donante alternativo 5' o sitio aceptor empalme de 3' llegan a usar una unión de empalme alternativa para el sitio 5' (sitio donante), cambia el límite 3' del exón aguas arriba y sería lo mismo para 3' solo cambia el aceptor dejando como sitio final al 5' (Fig. 2) [47]. Pero el *splicing* alternativo no es el único mecanismo para incrementar la diversidad del ARNm, sino también puede haber sitios de poliadenilación y promotores alternativos [12].

1.8. El spliceosoma

El *splicing* alternativo se realiza en el nucleoplasma, es realizado por cinco pequeños ARN nucleares que forman el núcleo del spliceosoma, los cuales son un complejo de unidades U1, U2, U4, U5, U6²⁷. Pero para la modulación del *splicing* alternativo se encuentran los potenciadores de *splicing* de exón (ESE) o los silenciadores de *splicing* (ESS) [22].

En el complejo E, se reconocen todos los elementos de consenso y los potenciadores de *splicing* de exón (ESE) si están presentes, la unidad U1 forma una interacción de emparejamiento con el sitio de *splicing* 5' y el factor de *splicing* 1 (SF1) se une en el punto de ramificación, llegara a unirse el factor auxiliar U2 (U2AF) que se llega a unir al tracto de polipirimidina y al sitio de *splicing* 3', por otro lado las proteínas SR (SRp) se unen a los ESE y entran en contacto con el factor U2AF, U1 snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) y el punto de ramificación, todo en conjunto forma el complejo E que está asociado a la ARN polimerasa II, mientras el nucleosoma esta unido con secuencias exónicas y se asocian con U2 snRNP, se recluta a un complejo tri-snRNP que contiene U4, U5 y U6, los cuales se asocian con el spliceosoma que se forma y U4 se elimina ya que funciona como un acarreador(Fig. 6) [48]. Esto permite que U6 reemplace a U1 en el sitio 5' de *splicing* y conduce la unidad U6 a una interacción con U2 que lo trae al sitio 5' y da el punto

de ramificación al juntarse, lo que permite una transferencia de paso catiónico. Al formar interacciones no canónicas, U5 acerca a los dos exones y permite el segundo paso del *splicing*, cuando los dos exones están unidos [52].

Se pueden detectar repeticiones de secuencia corta en numerosos exones, donde sirven para incrementar el reconocimiento por un determinado factor de *splicing*. Por ello, si se presenta un cambio en la longitud de secuencias repetidas simples puede cambiar el patrón de corte y *splicing* de un gen [41]. En el *splicing* también

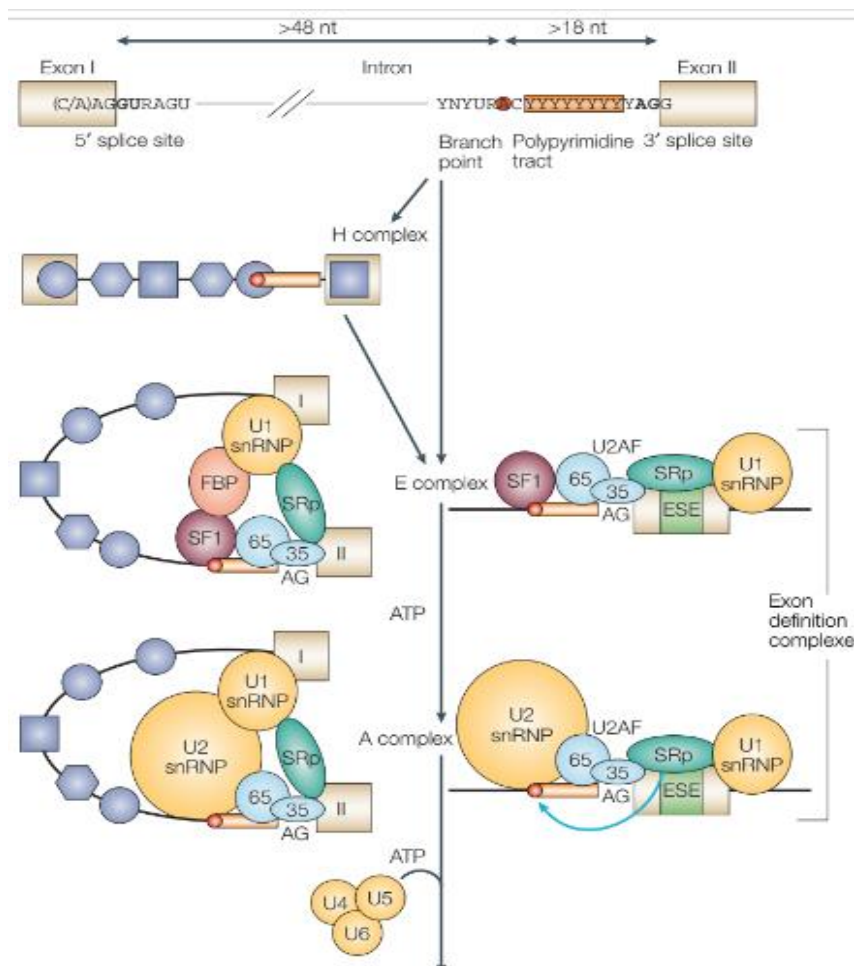


Fig. 6 Spliceosoma

El primer paso en el ensamblaje del espliceosoma es la formación del complejo de compromiso, también conocido como E complejo. En este complejo, el snRNP U1 se une al sitio de empalme 5' del pre-RNAM y se asocia a través de proteínas SR con la U2snRNP y SF1, que se encuentran unidos en el sitio 3', llegan otras snRNP (U4, U5 y U6) que ayudan a formar el complejo B [43].

interactúan otras proteínas como hnRNP y proteínas SR, las cuales pueden funcionar como potenciadores o silenciadores, llegando a ocasionar alteraciones en la selección del sitio de corte y *splicing* [31].

2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

2.1. Factores moduladores del spliceosoma

Hay dos grupos de factores importantes que influyen en la modulación del *splicing* los cuales son las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas hnRNP y las proteínas SR. Las proteínas hnRNP son proteínas que se unen al ARN en sitios blanco-específicos, mientras las proteínas SR se caracterizan por un dominio proteico rico en serina y arginina, tienen dominios de unión al ARN y participan en eventos moleculares en la expresión de un gen (estabilidad, procesamiento postranscripcional, procesos de transcripción y traducción del ARNm) [20, 52]. Las hnRNP en ciertas concentraciones son el complemento preciso de proteínas que podrían antagonizar o promover la interacción posterior de los componentes espliceosomales con sitios de corte y *splicing* alternativo. Hay secuencias moduladoras que actúan como potenciadores (sitios ESE o ISE, del inglés *Exonic Splicing Potenciador* o *Intronic Splicing Potenciador*) o inhibidoras (sitios ESS o ISS, del inglés *Exonic Splicing Silencer* o *Intronic Splicing Silencer*), donde estos sitios son reconocidos por las proteínas SR que tienen funciones en varios pasos del ensamblaje del espliceosoma, pero algunos otros son reconocidos por hnRNPs que tienen dominios de unión de tipo ARN, así como dominios auxiliares que a menudo están involucrados en interacción proteína-proteína y tienen múltiples funciones en el metabolismo de pre-ARNm y ARNm. Aunque se ven más comúnmente como represores, los hnRNP individuales también pueden estimular el uso de sitios de *splicing* alternativo, principalmente a través de ISE. Un ejemplo de lo antes menciona es la activación de un sitio 5' débil de *splicing* en el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se efectúa mediante la unión de hnRNPs a un ISE de repetición CA [2, 19, 18, 23].

La concentración y activación de los factores de *splicing* pueden desencadenar en procesos cancerosos, lo que con lleva a la producción de diferentes isoformas y así formar alteraciones en la función celular, causando enfermedades o también pueden ser un indicador de un defecto subyacente. Observando un panorama más general, la regulación del *splicing* podría utilizarse para generar una nueva herramienta terapéutica por lo ya mencionado antes. Los efectos de las mutaciones en el *splicing* son diferentes y difíciles de predecir, pero cuando ya se tiene alguna mutación podemos observar en ocasiones un efecto fenotípico que se presenta por la isoforma que se expresó [38, 40, 42]. Para la corrección de estos eventos anómalos de *splicing*, se ha demostrado que los oligonucleótidos anti sentidos (OAS) son capaces de restablecer la correcta expresión de un gen mutado, por ello al tener eventos de *splicing* en el cáncer de mama pueden ayudarse de OAS como una vía de tratamiento. En otros casos se podría utilizar siRNA para silenciar alguna isoforma en particular que se conozca su efecto para poder evitar se exprese [68].

2.2. Alteraciones del *splicing* en el cáncer

El *splicing* alternativo genera múltiples isoformas de un mismo gen, algunas de las cuales pueden presentar alteraciones con implicaciones funcionales en la traducción proteica. Estas modificaciones pueden afectar la función del receptor o su interacción con ligandos, dando lugar a procesos como un aumento en la apoptosis o la senescencia [51].

Estas alteraciones son frecuentes en el cáncer. De hecho, el proyecto del genoma del cáncer del *Wellcome Trust Sanger Institute* (Reino Unido) ha identificado 488 genes humanos con mutaciones asociadas a diversos tipos de cáncer, de los cuales 63 presentan mutaciones que afectan directamente su *splicing* alternativo [17].

Un ejemplo que se investigó son las mutaciones germinales en el gen BRCA1 que pueden considerarse como marcadores de predisposición para cáncer de mama y ovario, algunos de los cuales alteran sitios donadores o aceptores de *splicing*, así como las regiones que flanquean los límites intrón/ exón. Un estudio bioinformático identifico 23 elementos potenciadores altamente conservados a lo largo de los 22 exones del gen BRCA1 y de ellos un 61% están alterados en el cáncer de mama,

de acuerdo con la base de datos del Núcleo de Información del Cáncer de Mama [40, 68]. Otro ejemplo de la alteración del *splicing* en el cáncer son las presentes en el gen SEMA3F se expresa en una nueva isoforma que expresa semaforinas donde ayuda a la movilidad y adhesión, a su vez a procesos metastásicos [3].

Las alteraciones en el empalme alternativo que se generan son dadas por mutaciones en elementos reguladores o elementos de la maquinaria, algunos ejemplos de esto es lo que pasa con las snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) que son los componentes centrales del spliceosoma, en algunos pacientes con cáncer se pueden encontrar mutaciones en algunos factores como SF3B1 o U2AF1, donde las alteraciones muestran un efecto en la tumorigénesis [51]. Por otro lado, se encuentran los elementos reguladores como las proteínas SR o hrRNPs que se encuentran alteradas como las siguientes hnRNPK, hnRNPM, PTBP1 y RBM10 dan como resultado alteraciones en señalización, anclaje, invasión y proliferación celular [65].

2.3. El receptor ADGRG1

El gen ADGRG1 codifica a un receptor ADGRG1/GPR56 la cual es una proteína de 693 aminoácidos, el gen se encuentra en la posición 16q21. Cuando el transcrito del gen sufre *splicing* se han detectado 5 isoformas de la proteína GPR56, las cuales difieren en la composición de la región extracelular y el primer bucle intracelular. La proteína GPR56 tiene un dominio *pentraxin/laminin/neurexin sex-hormone-binding globulin-like* (PLL N-terminal) y un dominio GAIN C-terminal en su región extracelular, dos isoformas no contienen el dominio PLL N-terminal [49]. Se muestra que GPR56 puede apoyar en adhesión en gliomas, en la regularización de la mielinización del sistema nervioso central y la progresión del melanoma al interactuar con su ligando [57,60].

El gen GPR56/ADGRG1 se ha estudiado en cáncer colorrectal, cervicouterino, cáncer óseo, entre otros, encontrando estudios donde sugieren que apoya en la progresión, se ve su presencia por el ligando de colágeno tipo III en GPR56/ADGRG1 en células tumorales metastásicas de cáncer de mama. También se puede analizar que GPR56/ADGRG1 al reducirlo previene la formación de

tumores óseos [28, 58]. No solo se encuentra evidencia en esos tipos de cáncer sino también hay estudios en leucemia mieloide aguda donde el factor de transcripción del sitio de integración viral ecotrópico 1 (EVI1) expresa a GPR56 contribuyendo a la inhibición de la apoptosis siendo un marcador, diseñaron un compuesto silenciador de genes llamado pirrol-imidazol poliamida (PIP), donde este compuesto por anillos aromáticos de aminoácidos N-metilimidazol (Im) y N-metilpirrol (Py), se van a dirigir a la unión de EVI1 dentro del promotor GPR56, provocando la inhibición de la expresión de GPR56 y suprime el crecimiento celular [55].

2.4. siRNA

Es un ARN de interferencia (ARNi) tienen una alta especificidad en el silenciamiento en genes de interés, son un mecanismo con el que cuenta la célula para su regulación post transcripcional, pero pueden sintetizarse para poder combatir específicamente un efecto ventajoso o perjudicial para la célula [8,20]. Hay varios tipos de silenciamiento, pero se encuentra la diferencia al ver secuencias blanco y la estructura proteica de los componentes potenciadores. Son caracterizados por una doble cadena con una longitud de 19-25 pares de bases, las cuales se encuentran en el citosol y tiene un inicio por medio de la RNAdc larga, donde se procesan estas pequeñas secuencias por la enzima RNAsa III Dicer, que serán guiadas para incorporarse al mRNA por complementariedad para su degradación, empleando el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Figura 6) [30]. La enzima DICER va a reconocer y cortar secuencias de miRNA monocatenarios de 50-70 nucleótidos (nt), y va a formar los miRNA o siRNA de una manera natural, para generar un silenciamiento, por ello se menciona que el silenciamiento es parte de una regulación post transcripcional [67].

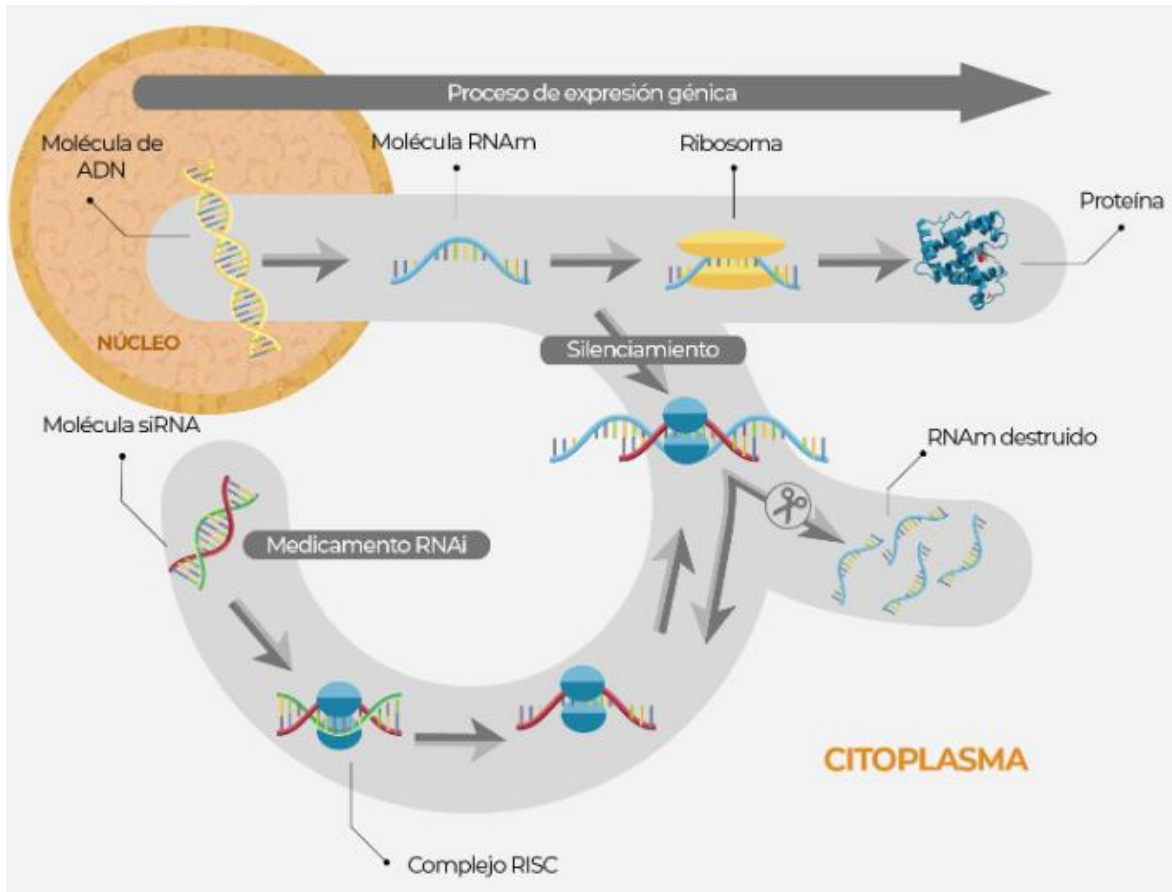


Fig 7 Mecanismo de RISC y la modulación post transcripcional.

Se puede visualizar el proceso de expresión génica y como es regulado por siRNA promoviendo el silenciamiento en una porción del gen de interés [67].

Pero en el caso de inducir el silenciamiento con siRNA artificialmente va comenzar uniéndose el sitio 5' de la proteína argonauta (AGO) formando un complejo *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Figura 7), el cual determina la dirección de carga y cuál de las dos hebras se ocupara como guía para RISC, la hebra que se escoge dependiendo de su extremo 5' ya que debe reconocer conexiones débiles, con Adenina y Uracilo o que tengan un desajuste [27], después de esto la proteína AGO va reconocer un dominio N terminal que permite abrir la doble cadena del siRNA para que el dominio PAZ haga una rotación pivotante con su unión 3' formando así la separación de la cadena guía, después el complejo RISC se va unir a la cadena guía y al ARNm de interés para su escisión y poder generar el silenciamiento ya sea

cortando o reclutando proteínas que median la represión o que desestabilizan la traducción (Figura 8) [24,27].

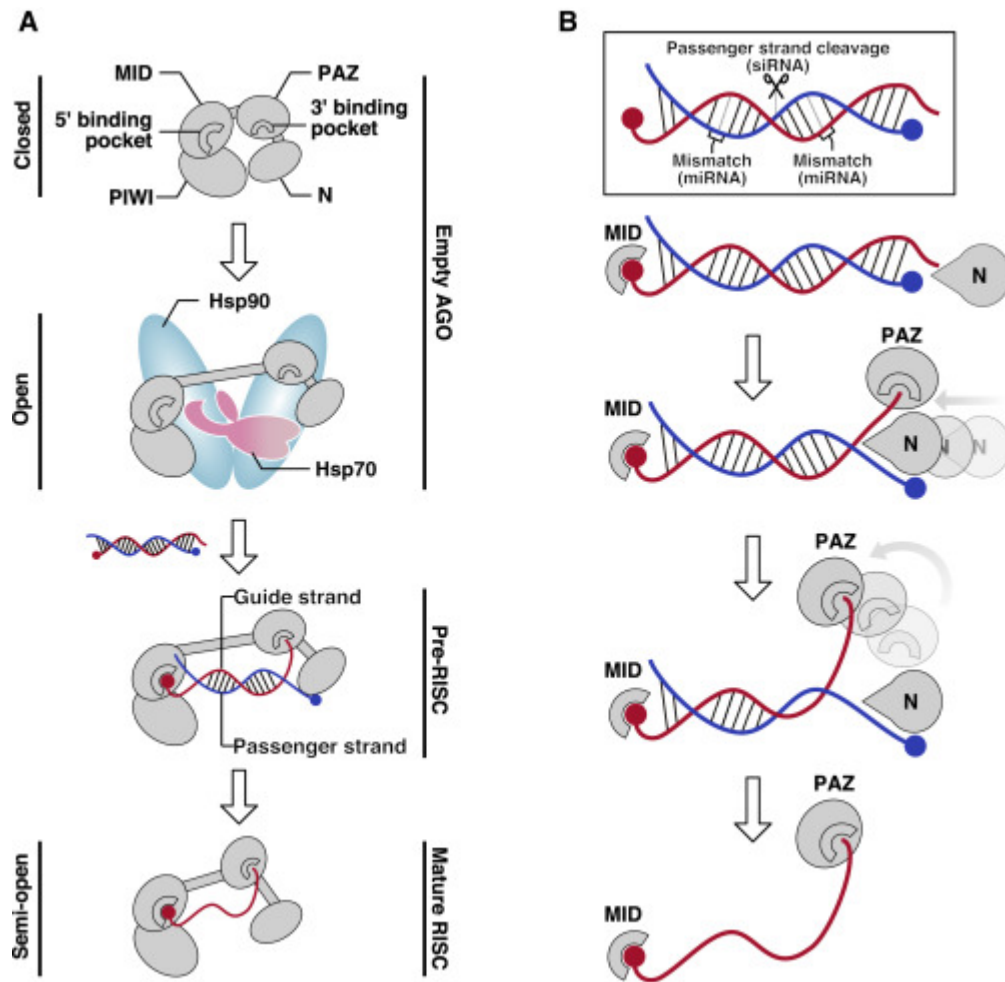


Fig 8 Complejo RISC y proteína AGO, ejecutores del silenciamiento.

Se observa como el dominio de la proteína AGO puede ayudar a la separación de la cadena guía del siRNA para poder efectuar el silenciamiento [27].

El complejo de silenciamiento RISC cuenta con 4 dominios los cuales son la región semilla, central, suplementaria y de cola, donde cada dominio reconoce diferentes partes de la cadena guía del siRNA; el sitio que reconoce la región semilla son del 2° al 8° nucleótido desde el extremo 5', mientras la región central reconoce el 9° al 12° nucleótido, la región suplementaria reconocerá del 13° al 17° nucleótido, en esta parte se estabiliza la unión con el sitio diana y en el dominio de la cola podemos

encontrar el nucleótido 18° y la cola del siRNA [55], este último dominio ayuda a reclutar factores adicionales. En las proteínas AGO se tiene un dominio PIWI-PAZ el cual recluta a otras proteínas AGO para la regresión traduccional, dependiendo de las características de la unión del ARN pequeño y el RNAm, si tenemos una unión del 100% de siRNA y un ARNm blanco, genera que el centro activo de la endonucleasa del RISC forme una horquilla entre el ARNm blanco y el siRNA, formando una represión traduccional [6,66].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con los antecedentes mostrados anteriormente se identifica que el cáncer de mama es el segundo lugar en incidencia en la variedad de cánceres reportados en la ONU, mostrando una mortalidad del 39% de los casos reportados. Una subpoblación presenta un perfil de cáncer triple negativo, cuyos pacientes cuentan con pocos tratamientos que suelen ser efectivos y tomando en cuenta que es el 4° lugar en muertes de mujeres a nivel mundial, se considera relevante la incidencia de esta enfermedad. Un candidato prometedor es el gen *ADGRG1*, dado que evidencia previa en otros tipos de neoplasias (e.g., cáncer de hueso, piel y cerebro) sugiere que la sobreexpresión de su isoforma corta está asociada con un aumento en la proliferación y migración celular, procesos clave en la progresión tumoral. En este trabajo se tiene como objetivo el silenciamiento de una isoforma corta del gen *ADGRG1* que este afectando la progresión, migración y la metástasis del cáncer triple negativo. El diseño experimental plantea evaluar si la silenciación del gen *ADGRG1* mediante siRNA dirigido al exón 2 afecta selectivamente las isoformas implicadas en la proliferación y migración celular en cáncer de mama. Esta hipótesis se sustenta en hallazgos previos que vinculan a *ADGRG1* (también conocido como *GPR56*) con la motilidad celular en neoplasias malignas. En particular, Sasaki et al. [58] demostraron que la expresión de este gen está correlacionada con un fenotipo migratorio en cáncer de hueso, lo que sugiere un posible papel conservado en otros tumores, incluido el BrCa.

Para generar el silenciamiento se utilizarán mecanismos de interferencia de ARN, utilizando para este fin a siRNA los cuales ya han sido reportados como un posible tratamiento de cáncer de mama, ya que en combinación con otras terapias muestran un efecto favorable [20,30].

4. HIPÓTESIS

El gen ADGRG1 codifica cinco isoformas proteicas reportadas, de las cuales la isoforma corta (ADGRG1-S) ejerce un papel crítico en la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo (TNBC). El silenciamiento selectivo de esta isoforma mediante siRNA dirigido al exón 2 provocará una reducción significativa en la viabilidad celular.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar la isoforma corta (ADGRG1-S) y el efecto del silenciamiento en un contexto de cáncer de mama

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar los eventos de *splicing* anotados para el gen ADGRG1.
- Establecer el perfil de expresión basal para el gen ADGRG1 en líneas celulares de tejido mamario.
- Determinar el efecto del silenciamiento del gen ADGRG1 sobre la viabilidad celular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Diseño del estudio.**

Estudio prospectivo, expresión y silenciamiento genéticos.

6.1. Condiciones de cultivo para tratamiento con Lipofectamina 2000

Para el siguiente estudio se utilizaron Células MDA-231 en un medio DMEM completo, que contiene 500 mL de medio, 56 mL de suero fetal bovino, 6 mL de L-

glutamina y 6 mL antibiótico-antimicótico, en placas de 6 pozos con una concentración del subcultivo de 500 μ L, con una temperatura de 36.5 °C y con CO₂ al 5%, por otra parte, una confluencia del 40%-50% al realizar el tratamiento (36 hrs después del subcultivo), teniendo en cuenta que se encontraran en un pasaje del 3 al 35, permitiendo así tener condiciones óptimas para el estudio. Para poder realizar la transfección de los siRNA se utilizó un tratamiento con lipofectamina 2000, ya que con la formación de liposomas de las subunidades lipídicas se insertarán los siRNA a las células. Para tener una eficiente transfección se debe tener en cuenta los cambios morfológicos, no presentar contaminación de microorganismo, tener en cuenta que no deben ser tratadas con antibiótico-antimicótico 24 hrs antes del contacto de la lipofectamina que se encontrará en una concentración de 1 mg/mL, tomando 0.015 μ g/ μ L y 0.0225 μ g/ μ L, también tener en cuenta el suero con el que se adiciona, cuidando que no se genere una inhibición en la transfección mediada por lípidos catiónicos [35].

6.2. Condiciones para la extracción

Se cuidó que las placas tengan un mínimo de confluencia del 70% en cada pozo de la placa antes de la extracción, posteriormente con ayuda de espectrofotometría se analizó el nivel A260/A280 que se encuentre en los rangos de 1.7 – 2.00, así también como una concentración de la muestra arriba de 200 μ g/mL. Para posteriormente utilizar el mini kit de purificación total de ARN de tejidos para su extracción del material genético.

6.3. Análisis bioinformático:

6.3.1. Análisis de las isoformas reportadas

Del gen de GPR56/ADGRG1 se analizaron las isoformas reportadas en NCBI, buscando si es que presenta una isoforma corta y otra larga que podamos analizar con el tratamiento de siRNAs. Se busca en las isoformas reportadas que haya un cambio en los pares de bases para identificar si es que se tiene un perfil, se llegan a tomar los que se encuentren con mayor frecuencia o si hay un evento de *splicing*. Se identificó cuales exones cambiaban de longitud o cuales desaparecen en las isoformas reportadas, se comparará las secuencias de NCBI y la pagina de UCSC

Genome Browser, en ambas paginas se realizaron BLAST para la identificación de un cambio en las secuencias.

6.3.2. Identificación de sitios trans y cis de regulación del *splicing*

Se analizó si dentro de las secuencias tomadas hay sitios en cis o trans que puedan afectar junto con el siRNA el porcentaje de cuantificación de una isoforma corta y una larga. Se buscaron los sitios ESS y ESS para identificar si estos pueden interferir con el silenciamiento y a su vez con la isoforma que se genere, el análisis se realizó por medio de NCBI y con la búsqueda de secuencias de unión de la tabla 1.

6.3.3. siRNA

Al tener la identificación de la isoforma corta y la isoforma larga se localizaron donde serian esos sitios que permitiría ver la expresión de la isoforma corta o larga del gen *ADGRG1* que podrían promover el silenciamiento en el gen de interés, posicionando uno antes y uno después del comienzo de la isoforma corta del exón, para poder evaluar el silenciamiento, se tomaron secuencias cuidando las características principales de los siRNA, por ejemplo, que sea una secuencia conservada, entre otras. Los siRNAs se sintetizaron por la compañía IDT.

La transfección se realizó con medio de lipofectamina 2000, más adelante se habla a detalle cómo se realizó.

6.3.4. Diseño de oligonucleótidos

Para poder medir el silenciamiento y la expresión del gen se tomaron como referencia un juego de oligonucleótidos, cuidando las características como el porcentaje de Guaninas y Citosinas entre el 50%- 60%, el tamaño del oligonucleótido debe ser de 18 a 24 pares de bases, una temperatura entre el 55 y 80 °C, que no generen estructuras secundarias, entre otras características. Se analizaron en el programa de NCBI y en biotools, para verificar que se encontraran en los parámetros que se caracteriza un oligo [30].

6.4. Análisis *In vivo*

6.4.1. Línea celular

La línea celular con la que se trabaja es la línea MDA-MB-231 con morfología de tipo epitelial, las características con las que cuenta son las siguientes: una forma de células fusiformes muestra un fenotipo invasivo, alta eficiencia en formar colonias, entre otras (Fig. 9). Es una línea celular usada para hacer estudios *in vitro* de cáncer de mama triple negativo, ya que no cuenta con sobreexpresión de HER2 y no cuenta con receptores ER ni PR, que es una característica de este tipo de cáncer. Para obtener esta línea celular fue aislada en Cancer Center en 1973, a partir de un sitio metastásico de derrame pleural en una mujer de 51 años de etnia caucásica que falleció de esta enfermedad en el Hospital Anderson en Houston [1, 44].

La línea celular MDA-MB-231 cuenta con resistencia a terapias hormonales, siendo un reflejo de lo que se vive al recibir ciertos tratamientos en el cáncer, cuentan con un fenotipo de tipo mesenquimal y cuentan con una capacidad de generar tumores en ratones inmunodeprimidos. También hay estudios en estas líneas celulares ya que cuentan con mutaciones en oncogenes y genes claves en la supresión tumoral como son TP53, KRAS Y BRAF [7, 44].

ATCC Number: **HTB-26™**
Designation: **MDA-MB-231**

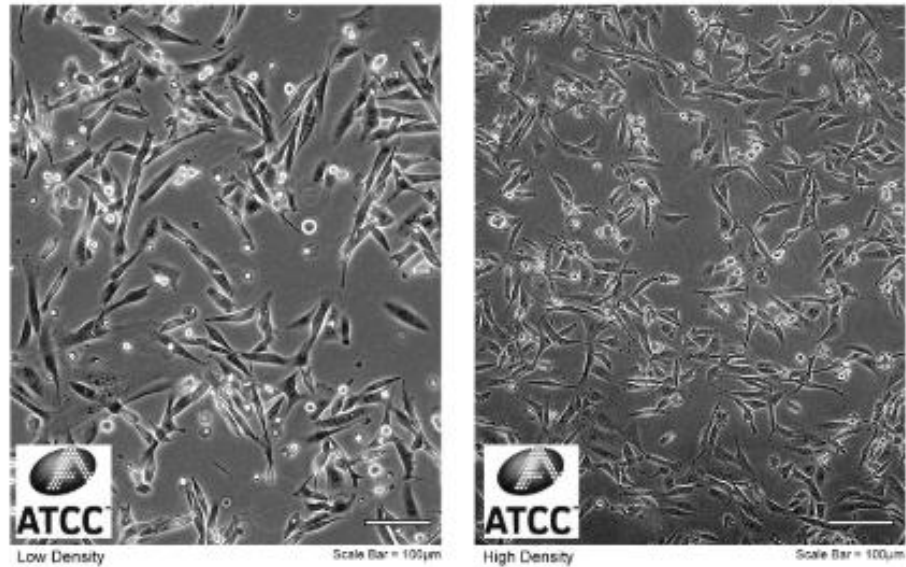


Fig 9 Morfología de línea celular MDA-MB-231.

Se observa la morfología típica de células MDA-MB-231, donde se observa su forma alargada con sus husos largos, siendo una línea celular usada para estudiar cáncer triple negativo por sus características [1,7, 44].

6.5. Ensayos de silenciamiento

6.5.1. Transfección de siRNAs con lipofectamina 2000

La transfección se realizó cuidando las condiciones marcadas en el protocolo del fabricante [44], después de subcultivar las células del matraz madre, se dejan en crecimiento por 48 hrs, después se retira el medio y se le adiciona un medio libre de antibiótico-antimicótico 24 hrs antes de su tratamiento y se pasa con medio Opti-MEM cuidando la relación de concentración final del siRNA de 33nM y utilizando el reactivo lipofectamina 2000 agregando 0.015 µg/µL o 0.0225 µg/µL respectivamente, cuidando los tiempos marcados en el protocolo [44], para tener un volumen final en el pozo de 400µL dejándolo actuar 5 horas y posteriormente se hace un cambio de medio con medio DMEM completo por un lapso de 36 horas.

Las condiciones que se tomaron fueron un control negativo, un control positivo para lipofectamina pero negativo para siRNA y la siguiente condición fue siRNA positivo y lipofectamina positivo, esta última condición se repitió con el otro par de siRNA.

6.6. Evaluación del efecto de los ensayos de silenciamiento

6.6.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de las células MDA-MB-231 que son cultivadas como se indica anteriormente y se realiza una tripsinización antes para poder despegarlas de la caja Petri de cultivo, para posteriormente neutralizarlo y se realice el proceso de extracción con el mini kit de purificación total de ARN de tejidos, con un lavado PBS al 1X previo, respetando las condiciones establecidas por el fabricante [53].

6.6.2. Cuantificación mediante espectrofotometría

Nos brinda al pasar un haz de luz sobre la muestra y detectarse en el fotodocumentador la cantidad de luz no absorbida, pasando así a señales eléctricas que permiten calcular la concentración de la muestra y su nivel de pureza, permitiendo que las muestras se encuentren en un rango arriba de 200 µg/mL y una A260/A280 entre 1.7 – 2.00 para tener un nivel fiable de pureza y tener una concentración optima [13]. La dilución utilizada es de de 4 µL de muestra + 196 µL de agua libre de RNasa.

6.6.3. Transcripción reversa

Se preparó la muestra de RNA que se extrajo en pasos anteriores para posteriormente ponerlo a realizar ciclos con oligo (dT), dNTPs y la transcriptasa reversa que se utiliza es la *RevertAid Reverse Transcriptase* para poder generar el cDNA, el protocolo que se utilizó fue el marcado por el fabricante respetando una concentración de 3500 µg/mL en cada reacción [11].

6.6.4. Amplificación por PCR

Se utilizó la PCR para hacer muchas copias de una secuencia genética cDNA anteriormente generado, con el fin de analizar el silenciamiento y las condiciones

control. Luego, con la enzima llamada ADN-polimerasa amplificamos ese trozo de ADN. Las copias de ADN amplificadas ayudan a identificar si hay una isoforma que produce la molécula específica de ARNm. El kit que se utilizó es el de la enzima *Dream Taq Green PCR Master MIX* con el protocolo marcado por el fabricante [13].

6.6.5. Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó la técnica de electroforesis para poder analizar las isoformas que se presentan por los ARN que tenemos para identificación de las isoformas, esta separación como lo dice su fundamento es por medio de cargas eléctricas para separar las moléculas en función a sus tamaño y carga eléctrica. El gel que se utilizó es a 1.2% por las pb que se amplificaron, con un corrimiento de 1 hora 20 minutos para poder ver un bandeo más definido, se utiliza un marcador de peso molecular de 1000 pb [61].

6.6.6. Conteo celular

Se realizó un conteo celular con una concentración de 10 μL de muestra por 40 μL de azul de tripano, teniendo un volumen final de 50 μL de muestra. Se realiza el conteo en cámaras de Neubauer con ello se evalúa la proliferación celular, tomando 10 μL del volumen final y se observa al microscopio para comenzar el conteo, teniendo en cuenta que las células en un tono azul ya se encuentran muertas.

6.6.7. Densitometría

Se llevó a cabo por medio del procesamiento de imágenes tomadas de la electroforesis con el programa ImageJ, el cual permite poder cuantificar que cantidad de ARN se cuenta en el bandeo generado en la electroforesis, también comparándolo con el control de β Actina, ya que el programa ImageJ, arroja graficas que permiten posteriormente la cuantificación del bandeo y después se tiende a comparar la imagen del bandeo con β Actina y las muestras con tratamiento.

6.6.8. Análisis de datos

Los datos recolectados del diseño experimental se analizaron en hojas de cálculo y gráficos estadísticos y figuras en medios digitales como es Excel, ImageJ, SnapGene y Canva.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis bioinformático

7.1.1. Diseño de oligonucleótidos

Se analizan las secuencias reportadas en la base de datos de NCBI con el objetivo de identificar las diferentes isoformas reportadas para el gen ADRG1 y comparar las regiones variables para cada una. Así, se identificó el cambio de Exones en cada isoforma, se evalúa que evento de *splicing* es el que podría haber generado el acortamiento de la isoforma en el caso de la isoforma corta, según los datos reportados en artículos sugieren que el evento es una exclusión del primer exón recorriendo el marco de lectura hasta el segundo exón, en la posición 57,650,302nt (Fig. 10).

Oligo 1

Fodward 5'GTG GTG ACT TCC AAG AGT GAC 3' GC: 52% Tamaño: 21
nt

Revers 5'TGT GGA AGG AGA AGG TGA AGC T 3' GC: 50% Tamaño:22
nt

PRODUCTO ESTIMADO RT PCR: 522 pb T_M : 68°C

Localización en el cromosoma:

Fodward 57 650 253 – 57 650 273 nt

Revers 57 651 602- 57 651 602 nt

Producto con intrones y exones: 1359 nt

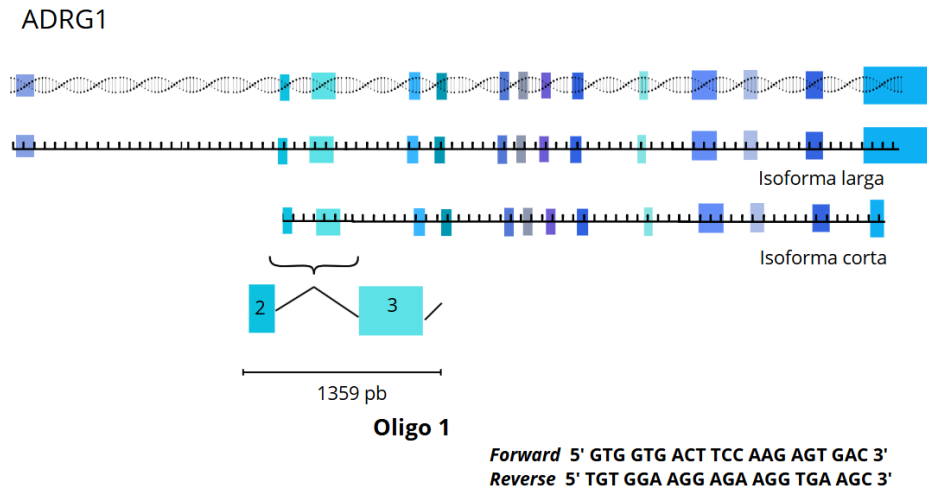


Fig. 10 Estructura del gen ADGRG1. Se observa la localización de la isoforma corta y la isoforma larga del gen ADGRG1 y la ubicación del oligo para detectar su expresión.

Se observa en la Fig. 10 como el corrimiento del marco de lectura genera una isoforma con menor número de exones, eliminado el exón 1 en el gen ADRG1 y un tamaño acortado comparado con la primera isoforma por la pérdida del exón 1. Al obtener el producto del oligo 1, tendremos un producto de 1359 pb que incluye dos exones y un intrón, cuando en el marco de lectura se toman solo los exones se obtiene un producto de 522 nt.

7.1.2. Diseño de siRNA

El diseño del siRNA tiene como objetivo la identificación de isoformas, ya que su localización es tomando parte del primer intrón, el exón 2 y 3, mientras en el siRNA2 toma en cuenta el exón 4, esas posiciones se identificaron por medio de BLAST, donde se encontró la pérdida de exones y reducen su marco de lectura, se tomaron en cuenta secuencias potenciadoras y silenciadoras (Fig. 11), también sitios de unión para factores reguladores del *splicing* que pueden promover el silenciamiento o tener un efecto contrario (Tabla 1); se identificaron los sitios de unión y cuantas veces es posible encontrarlos.

Localización en el cromosoma:

siRNA1

5' TTG UGG CUC CGU AAC ACU 3'

5' CAC GGC CGC UCA CAA UGC 3'

9.4 nm MW 17,112.4

siRNA 2

5' TTU AGG CCA GGA GGA GCU 3'

5' UGG UGU CCU UCG AGG AG 3'

9.9 nm MW 17,356.5

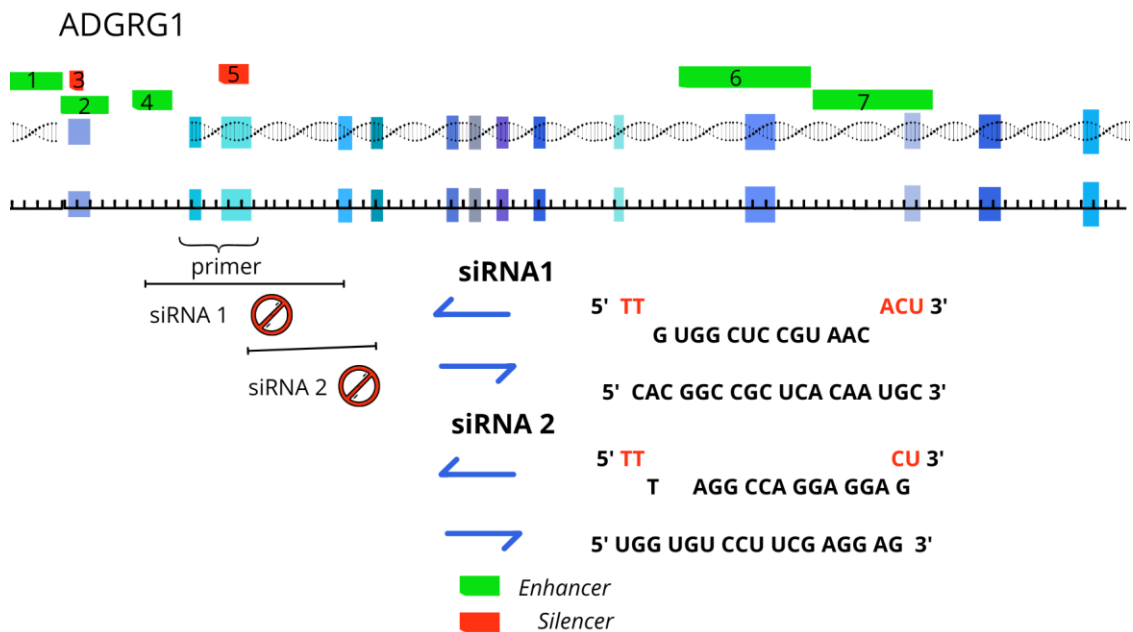


Fig. 11 ADGRG1 y siRNA. Podemos observar la localización de los siRNA en el gen de interés, se encuentran unas flechas azules que hacen referencia al sentido de la secuencia de unión del siRNA, las letras rojas marcadas en los siRNA muestran los sitios que no se acoplan al ARNm, en verde se muestran sitios potenciadores y en rojo los sitios silenciadores (1. hESC H3K27ac-H3K4me1, 2. deHESC H3K27ac-H3K4me1, 3. Región silenciadora 7535, 4.hESC H3K4me1, 5. Región silenciadora_7535, 6. hESC H3K4me1, 7. hESC H3K4me1)

Los sitios de unión *potenciador* y *silenciador* son los siguientes:

1. Potenciador hESC H3K27ac-H3K4me1 chr16:57661723-57662378
2. Potenciador dehESC H3K27ac-H3K4me1 chr16:57662379-57663034
3. Región silenciadora 7535 chr16:57628672-57628741
4. Potenciador hESC H3K4me1 chr16:57665003-57665658
5. Región silenciadora_7535 chr16:57685116-57685516
6. Potenciador hESC H3K4me1 chr16:57692922-57693920
7. Potenciador hESC H3K4me1 chr16:57693921-57694919

Se sugiere que existen sitios de pegado para factores reguladores de splicing a lo largo del gen los cuales podrían ser potenciadores o silenciadores para la regulación de la expresión de los exones que se codifican y den paso a las isoformas reportadas. A continuación, se muestra un resumen de los sitios identificados.

Tabla 1. Sitios de unión para proteínas SR y hnRNP identificadas en el gen ADGRG1

Factor regulador del splicing	Sitio de reconocimiento	Número de sitios identificados en el gen
ASF/SF2	RGAAGAAC	431
SC35	GRIYCSYR	40
	UGUUCSAGWU	1
	AGGAGAU	7
	UGCNGYY	62
SRp40	UGCGUC	1
	YYWCWSG	139

	ACDGS	333
SRp55	USCGKM	28
	URCRUC	18
9G8	UCAACA	8
SRp30c	GACGAC	1
	CUGGAUU	5
hnRNP A	UAGGGU	12
	UAGGGA	17
hnRNP B	ATTTA	28
	GTTTG	39
	TTGA	141
hnRNP C	TTTTT	38
hnRNP D	ATTTA	28
	TTGA	141
hnRNP E	TTGA	141
hnRNP F	GGGGCUG	7
	GGGA	424
hnRNP H	TTGGGT	11
	GGGGC	30
	TGTGG	104

	GGGA	424
	GGGGCUG	7
	UGCAUG	16
hnRNP I(PTB)	TTCTCT	26
	CTCTCT	28
	TCTTC	70
hnRNP A0	ATTTA	28
Fox1/2	UGCAUG	16
SRp55	URCRUC	7
	USCGKM (S:G o C; K:U o G; M:A o C)	32
SRp40	UGCGUC	1
	ACDGS20 (D:A,G o T; S:G o C)	336
TRA2 alpha/beta	GAA	593
NOVA	UCAY	209

7.2. Tratamiento con siRNA

7.2.1. Ensayo de proliferación celular

Se identificó por medio de conteo celular y azul de tripano la cantidad de células con cámaras de Neubauer, el objetivo es ver si se encontraban en óptimas condiciones ya que el azul de tripano tiene como fundamento colorear de azul aquellas células que su membrana celular este comprometida, mientras células que se encuentran viables no absorben el colorante. La lipofectamina se utiliza en este estudio con el

objetivo de que al formar liposomas catiónicos ayuda a la transfección del siRNA, este experimento se realizó por duplicado. Se probaron diferentes cantidades de lipofectamina 2000 para evaluar si es que no se tenía un efecto perjudicial en las células, se identificó un cambio en la tasa de proliferación que es alterada por la lipofectamina 2000, donde la tasa de proliferación control es tomada por 138 unidades, por su parte con una concentración de 0.0225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se obtuvo una baja del 33% en la proliferación, mientras con 0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de lipofectamina se obtuvo una baja del 12 % y en 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se cuenta con una baja del 8 % en la proliferación, podemos inferir que entre mayor sea la cantidad de lipofectamina la estabilidad de la membrana celular se ve alterada y por ello se tiene una disminución en la proliferación, ya que mueren las células (tabla 2).

Tabla 2. Ensayo de proliferación mediado con lipofectamina 2000

Tratamiento	Cantidad de lipofectamina 2000	Conteo	Variación con relación al control	Tasa de proliferación
Control	0 μL	138	-	100 %
Lipofectamina 2000+ /siRNA -	0.0225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	92	-46	-33 %
Lipofectamina 2000+ /siRNA -	0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	121	-17	-12 %
Lipofectamina 2000+ /siRNA -	0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	128	-10	-8%

De este experimento se obtuvo que la cantidad en la proliferación son alterados de acuerdo con la cantidad de lipofectamina y podemos observar también el número

de células que se obtienen del ensayo de viabilidad van cambiando de acuerdo con la concentración ya que se pierde su viabilidad, también tener en cuenta que existe una variabilidad en la morfología tomando una forma ovalada, en consecuencia por una concentración mayor de lipofectamina 2000, también su membrana se encuentra comprometida generando muerte celular, tiñéndose de azul.

Se observó un cambio en la morfología celular al realizar el conteo en las células que estaban tratadas con siRNA y las que tenían tratamiento con lipofectamina, se observa una morfología más ovalada, mientras en las células control conservan una morfología más redondeada y en el conteo se identifica una disminución de proliferación (Fig. 18).

Con el objetivo de analizar si el siRNA 1 tenía un efecto en el gen ADGRG1 se evalúa un tratamiento con una concentración de 0.015 µg/µL de lipofectamina en un ensayo de proliferación (Tabla 3), observando que se genera una disminución de 5% con solo la lipofectamina, mientras que al insertar el siRNA1 se tiene una baja en la proliferación del 21%, podemos observar que la desviación estándar es de 1.5 y 1 es decir que cuenta con una leve dispersión en los datos (Fig. 12). Se evaluó con 0.015 µg/µL de lipofectamina ya que en el experimento anterior muestra que la concentración de la lipofectamina puede causar muerte y deformación de la célula.

Tabla 3. Ensayo de proliferación mediado por el silenciamiento de siRNA 1

Tratamiento	Concentración de siRNA	Cantidad de lipofectamina a 2000	Conteo	Efectividad de siRNA	Tasa de proliferación
Control	0 pmol	0 µL	146	No	100 %
Lipofectamina 2000+ /siRNA -	0 pmol	0.0225 µg/µL	138	No	-5%
siRNA 1	50 pmol	0.015 µg/µL	115	Si	- 21%

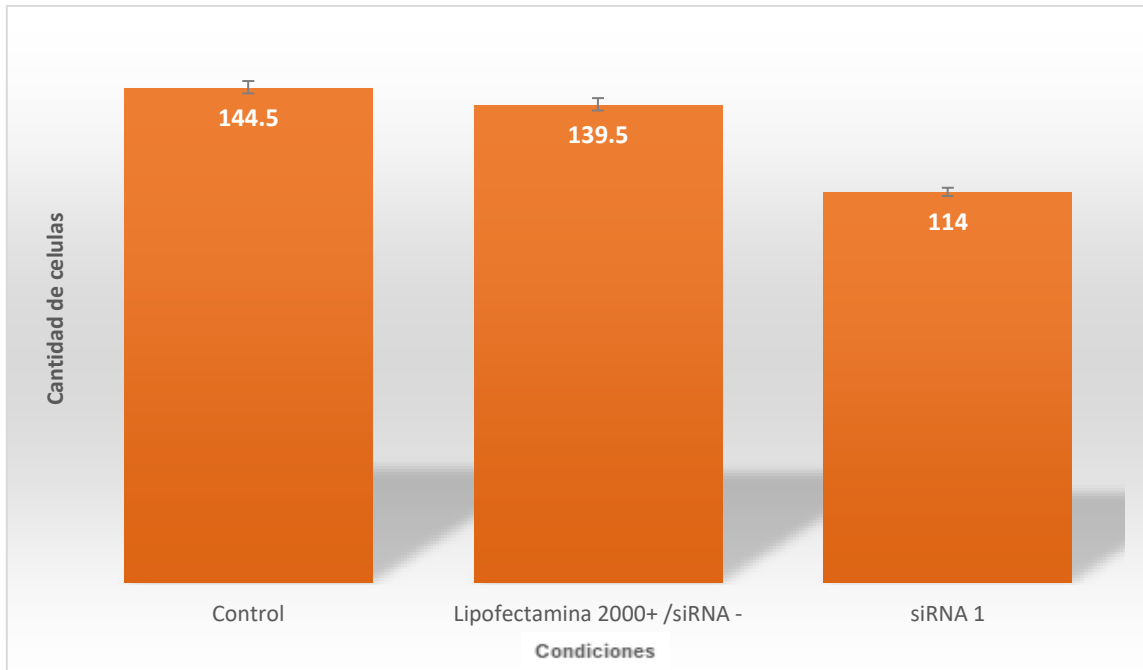


Fig. 12 Efecto del silenciamiento del gen ADRG1 sobre el número de células MDA-MB-231

Se observa la desviación estándar de 1.5 para las dos primeras condiciones y para la condición de siRNA es de 1 y el grafico de barras muestra el conteo de las células de como varía de acuerdo con la condición de que se tenga en el grupo de células.

7.3. RT-PCR

Con el objetivo de analizar el efecto del siRNA2 con una concentración 0.0225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de lipofectamina 2000, se obtiene como resultado una tasa de proliferación disminuida (tabla 4) con un valor del -38% con el tratamiento de lipofectamina, mientras al agregarle el siRNA 2 tuvo un valor del -29% en la proliferación basándonos en nuestra muestra control. Al evaluar la efectividad del siRNA 2 se observa que no genera un silenciamiento (Fig. 13), asimismo que la disminución de la proliferación celular está relacionada con la concentración de la lipofectamina y no por el siRNA utilizado.

Tabla 4. Ensayo de proliferación mediado por el silenciamiento de siRNA 2

Tratamiento	Concentración de siRNA	Cantidad de lipofectamina a 2000	Conteo	Efectividad de siRNA	Tasa de proliferación
Control	0 pmol	0 μ L	146	No	100 %
Lipofectamina 2000+ /siRNA -	0 pmol	0.0225 μ g/ μ L	91	No	-38 %
siRNA 2	50 pmol	0.0225 μ g/ μ L	105	No	- 29%

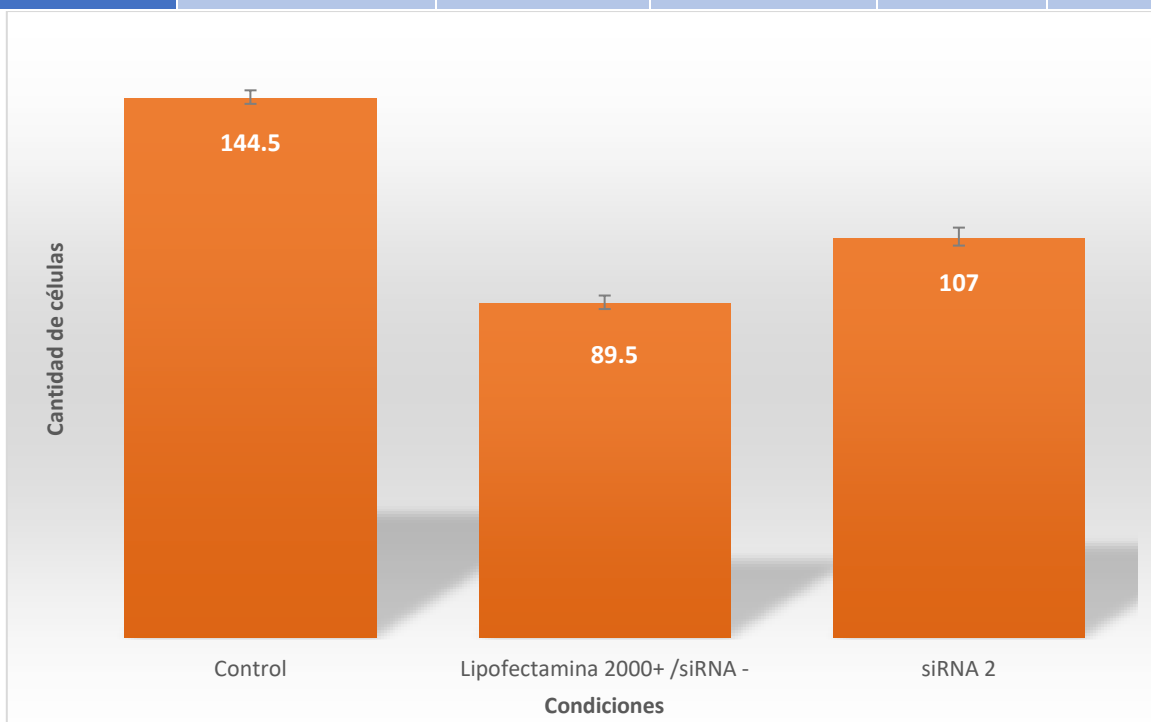


Fig 13 Tratamiento con siRNA 2. El gráfico de barras muestra el conteo de las células de acuerdo con el tratamiento correspondiente. Se observa la desviación estándar de 2.2 para las dos primeras condiciones y para la condición de siRNA 2 es de 2.8.

Para evaluar la expresión de la isoforma larga expresada para el gen ADGRG1, se realizó un ensayo de RT-PCR empleando los oligonucleótidos diseñados y usando como control a beta-actina. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al

1.2% y las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría. Para el gen ADGGRG1 se esperaba un producto 522 pb y para el control de beta actina un producto de 100 pb. Se realizó los cálculos necesarios para estandarizar la concentración de RNA en cada reacción y poder generar en primera estancia el cDNA y poder verificar el silenciamiento con el primer 1 por medio de una PCR y con un control de β -actina. Con el objetivo de estandarizar las muestras se tomaron los valores de $\mu\text{g/mL}$ en el espectrofotómetro y con ellos se logró estandarizar la cantidad en cada reacción de RT-PCR.

Con el objetivo de poder visualizar si es que el silenciamiento se realizaba a una concentración de $0.0225 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ se probaron los siRNA 1 y 2 respectivamente para poder observar el bandeo de las muestras, se obtuvo bandeos a 500 pb aproximadamente y se identificó que con las cantidades de lipofectamina pueden variar la expresión del silenciamiento (Fig 14), ya que no se tuvo una disminución significativa en el bandeo, por su parte al corroborar por medio de una cuantificación de la densitometría podemos observar un cambio mínimo en la muestra con solo lipofectamina y en el tratamiento con siRNA 1 de un incremento de .2 en cada muestra.

	A	B	C	D
Control	-	-	-	-
Lipofectamina 2000	-	+	+	+
siRNA 1	-	-	+	-
siRNA 2	-	-	-	+

	Cn	Lipofectamina	siRNA 1	siRNA 2
F1	24601.752	26700.631	29675.167	21090.995
F2	25125.53	27027.459	29973.752	21463.116
Inv	23396.681	28677.167	32168.581	22525.409
Promedio	24374.65433	27468.419	30605.8333	21693.1733
Normalizado	1	1.126925479	1.25564174	0.88998896
Normalizado con β -actina	0.651981214	0.819527329	0.849601253	0.602190669

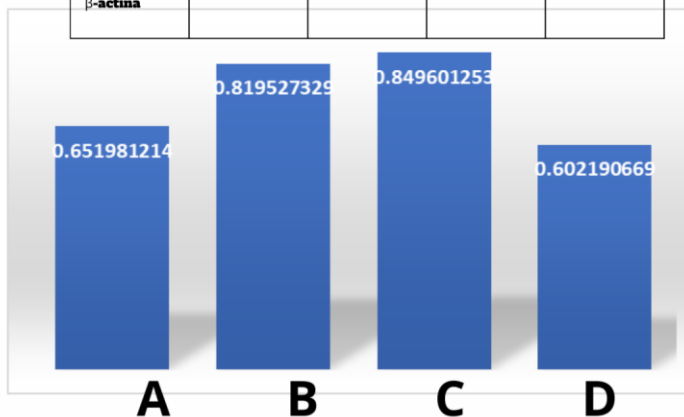
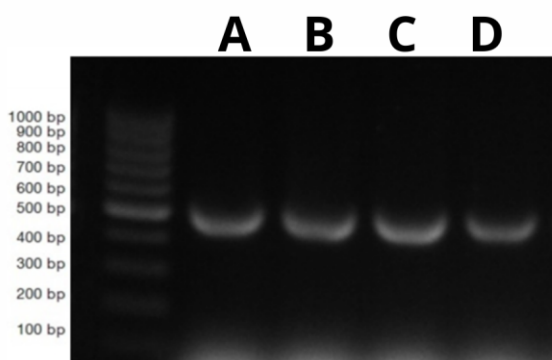


Fig. 14 Tratamiento con lipofectamina en siRNA 1 y siRNA 2

Se realiza el tratamiento con 0.0225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de lipofectamina, se colocó un marcador de peso molecular de 1000 pb, muestra un amplificado de 500 pb aproximado. Se observa la expresión del gen del interés sin tener un efecto en el silenciamiento, así también un efecto con mayor intensidad en el siRNA 1 en comparación con el control y el siRNA2, lo podemos observar por medio de la gráfica de la derecha donde se efectuó una densitometría y los resultados fueron normalizados con β -actina⁵⁹.

Las bandas del gel de acrilamida se cuantificaron mediante densitometría con ImageJ para evaluar la expresión de RNA. El análisis reveló que el tratamiento 1 no mostró diferencias significativas entre control y condiciones experimentales (Fig. 14, tabla derecha); también que el siRNA2 presentó solo un cambio mínimo en el bandeo, mientras que siRNA1 y lipofectamina mostraron patrones similares (Fig. 14, gráfica).

En el tratamiento 2, la transfección con siRNA1 (0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de lipofectamina) mostró que los valores del control son más altos que los del siRNA1. Tras la normalización con beta actina, se observa una reducción del 50% en el bandeo del siRNA en comparación con las células control (Fig. 15).

La RT-PCR de este tratamiento confirmó una disminución en la expresión génica por efecto del siRNA1, sin cambios en las demás bandas (Fig. 15). La expresión relativa se redujo a 0.5 frente a los controles, y el producto de RT-PCR mostró un bandeo consistente en 500 bp en las tres bandas analizadas. Los valores obtenidos nos sugieren que fue posible obtener un silenciamiento con el siRNA 1, pero no con el siRNA 2.

	A	B	C	D
Control	-	-	-	-
Lipofectamina 2000	-	+	+	+
siRNA 1	-	-	+	-
siRNA 2	-	-	-	+

	Cn	Lipofectamina	SiRNA 1
F1	17754.794	17954.794	9176.702
F2	16929.823	16687.897	7637.024
Inv	17695.723	17495.356	8421.832
Promedio	17460.113	17379.349	8411.85267
Normalizado	1	0.99537431	0.48177539
Normalizado con β -actina	1.000000018	1.110246951	0.499987245

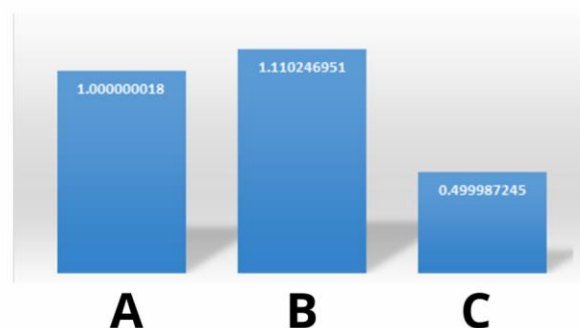
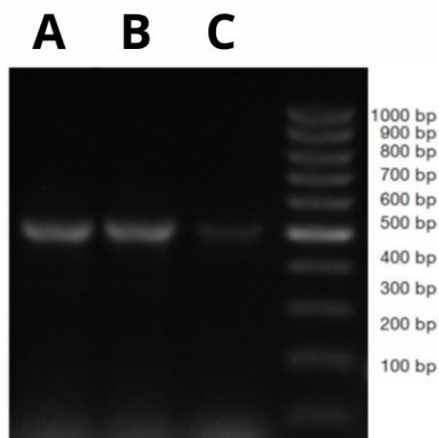


Fig 15. Tratamiento en una concentración de 0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de lipofectamina probado en el siRNA 1

La RT-PCR se realizó con 0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de lipofectamina. A la izquierda se observan las muestras con el primer de interés, mostrando una menor intensidad de bandeo en comparación con el control. Los análisis gráficos revelaron una disminución de 0.5 en la expresión del siRNA normalizada con β -actina, confirmando una reducción en la expresión génica.

Efecto del silenciamiento sobre la morfología celular

Con el objetivo de identificar un cambio en la morfología de las células MDA-231 se monitorizo el tratamiento en diferentes horarios. Inicialmente (48 hrs) se observaba una morfología similar a la reportada para esta línea celular, con husos largos y estrechos, cuando se termina este tiempo se intercambia su medio a un medio sin antibiótico, podemos observar células redondeadas que apenas se encuentran adhiriendo a la placa y células con husos más estrechos con una confluencia del 50%-40%, al transcurrir 24 hr después de este último cambio siguen con esa morfología aunque se observan mayor confluencia por la formación de aglomerados y formas redondeadas, al colocarle el tratamiento y dejarlo con el medio Opti-MEM, después del cambio de medio a las 6 hrs no se ve algún cambio morfológico al ser tratadas con lipofectamina y el siRNA.

Posterior a las 36 hrs después del tratamiento antes de su extracción se observan las células control con husos estrechos y células redondeadas con una confluencia del 100%-90%, mientras las células transfectadas con el siRNA se muestran con una morfología más alargada y con husos más largos, en una confluencia del 80%-90% (Fig. 18).

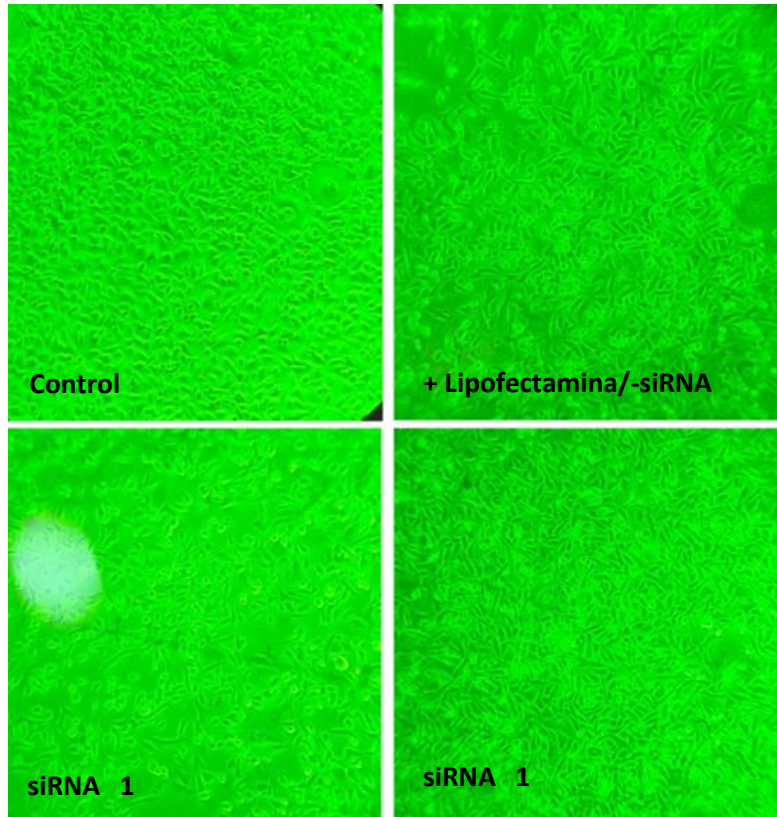


Fig. 16 Cambios morfológicos celulares después del tratamiento con lipofectamina 2000

Al finalizar el tratamiento, las células control alcanzaron un 100% de confluencia, formando conglomerados y agotando el espacio disponible para adhesión, por otro lado, el medio adquirió un tono naranjado. En contraste, las células tratadas con lipofectamina mostraron un 80-90% de confluencia, manteniendo áreas disponibles para adhesión. En las imágenes de los campos tratados con siRNA, se observó una confluencia similar (80-90%), pero con una morfología celular notablemente más alargada y con husos más extensos en comparación con las células control, que presentaban husos contraídos.

8. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una de las principales muertes en mujeres a nivel mundial, tomando en cuenta que el cáncer de mama triple negativo tiene un mal pronóstico y cuenta con terapias poco eficientes para su tratamiento por su acción ineficiente o la toxicidad de células sanas, también las dosis más elevadas y los efectos secundarios que pueden llegar a tener algunos tratamientos, se apoya que una terapia con siRNA pueda contribuir a su efectividad, en algunos estudios sugieren que la combinación de RNAi pueden optimizar el tratamiento para cáncer de mama[56].

Estudios previos reportan que el splicing alternativo en cáncer de mama genera isoformas oncogénicas o afecta la supresión tumoral, como observado en los genes BRCA1, DMTF1, HER2, KLF6 y BIRC5 [41, 54]. Nuestros resultados identificaron sitios cis y trans con unión de proteínas HNRNPK y SR. Las HNRNPK, previamente asociadas con la regulación de oncogenes y supresores tumorales, pueden alterar su expresión cuando se sobreexpresan. Por otro lado, las proteínas SR modulan procesos apoptóticos, participando en la transcripción, estabilidad del ARNm, traducción y degradación proteica [29].

Este estudio propone al gen *ADGRG1* como posible diana terapéutica en cáncer de mama, dado el papel clave de las proteínas G en la tumorigénesis mediante la activación de receptores de tirosina quinasa (RTK). En el cáncer de mama triple negativo, la desregulación de estas RTK promueve el crecimiento y progresión tumoral [41, 72].

Nuestro análisis bioinformático reveló que el gen *ADGRG1* presenta una posible exclusión mutua del exón 1, causando un cambio en el marco de lectura que genera una isoforma truncada. Aguas arriba del exón 2 identificamos múltiples secuencias de reconocimiento para el factor HnRNP A1 (principalmente UAGGGA y UAGGGU), junto con sitios de unión para otros reguladores como ASF/SF2 y hnRNP H. El exón 1 contiene repeticiones de "AG", un patrón similar al observado en la proteína SCRIB, donde hnRNP A1 promueve la omisión del exón 16 generando una isoforma corta metastásica [72].

Estos hallazgos sugieren que hnRNP A1 podría mediar la exclusión del exón 1 en ADGRG1, produciendo una isoforma corta con posible impacto funcional. En SCRIB, la sobreexpresión de la isoforma corta en células MDA-MB-231 activa la vía ERK promoviendo metástasis [15,72]. Por analogía, proponemos que la isoforma larga de ADGRG1 podría regular negativamente esta vía u otras relacionadas con progresión tumoral [72].

Para este estudio se seleccionó la línea celular MDA-MB-231 debido a su perfil de cáncer de mama triple negativo (ausencia de receptores ER, PR y HER2) y su consolidación como modelo en investigación del cáncer [67,69,72]. Los experimentos revelaron que el tratamiento con lipofectamina redujo significativamente la proliferación celular. Sin embargo, a concentraciones elevadas se observó: toxicidad celular con disminución poblacional y alteraciones morfológicas notorias.

La elección de Lipofectamina 2000 como vehículo de transfección se fundamentó en su reconocida eficiencia para introducir ácidos nucleicos en células difíciles de transfectar, manteniendo una viabilidad celular aceptable [35,36]. Sin embargo, como se observó en nuestros experimentos, existe una relación dosis-dependencia crítica entre la concentración del reactivo (0.01-0.0225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y su impacto en la fisiología celular. Las formulaciones liposomales catiónicas de este compuesto neutralizan las cargas negativas tanto del material genético como de la membrana plasmática, facilitando la internalización mediante endocitosis [35]. No obstante, a concentraciones elevadas ($>0.02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), se observó una disminución en la proliferación del 21%, probablemente debido a:

1. Alteraciones en la integridad de la membrana plasmática
2. Estrés osmótico por acumulación de complejos liposoma-ARN
3. Activación de rutas de apoptosis por estrés celular

El análisis comparativo de los dos siRNA evaluados reveló diferencias significativas en su capacidad de silenciamiento génico. Para el siRNA 2 (5'-TTUAGGCCAGGAGGAGCU-3'), no muestra un silenciamiento con una concentración de 0.0225 µg/µL, si llega a mostrar una baja en el bandeo al realizar la densitometría, esto nos quiere decir que si se forman complejos lipídicos para poder hacer el transporte del siRNA pero no es suficiente para poder generar el silenciamiento de la isoforma, algunas limitaciones sería que al ingresar los complejos liposoma-siRNA se formaron adecuadamente, podrían presentar: una baja eficiencia de liberación endosomal, una degradación prematura en el citoplasma y un atrapamiento nuclear post-mitótico [4, 34]. Por su parte la estructura del siRNA 2 puede mostrar factores que intervengan como una baja estabilidad del dúplex (presencia de bases U en extremos 5'), una posible formación de estructuras secundarias que interfieren con el RISC y baja afinidad por la diana de ARNm [6, 66].

Por su contra parte el siRNA 1 (5'-TTGUGGCUCGUUAACACUU-3') demostró una eficiencia de silenciamiento significativa (~50-60% de reducción) en las mismas condiciones experimentales. La detección por RT-PCR de un producto de 500 pb confirma específicamente la disminución de la isoforma larga de ADGRG1, ya que la isoforma corta generaría un producto de menor tamaño molecular y la especificidad fue validada por controles de amplificación [34]. Para la interpretación de los resultados en esta parte se demostró que la eficiencia de transfección fue dada por la diferencia en silenciamiento ya que el siRNA 1 presenta mejor incorporación al complejo RISC, mayor estabilidad del dúplex de ARN y un mejor acceso al sitio diana en el ARNm. Algunas implicaciones biológicas que se tienen en la selectividad por la isoforma larga indican una posible diferencia en la regulación postranscripcional y también dominios funcionales exclusivos en esta variante [4, 34].

Evidencia reciente indica que ADGRG1 desempeña un papel crucial en procesos metastásicos (adhesión, invasión y migración celular) mediante la modulación de receptores de tirosina quinasas (RTK), tetraspaninas (CD9/CD81) que actúan como

proteínas de andamiaje para GPR56 y las vías de señalización pro-tumorales [12,49].

Estos hallazgos se correlacionan con nuestros resultados, donde el silenciamiento de ADGRG1 mediante siRNA 1, ya que redujo la proliferación celular en un 21% comparado al control, sugiriendo su participación en redes de señalización dependientes de RTK y tetraspaninas [46,58]. La interacción física y funcional de ADGRG1 con estos complejos de membrana podría explicar su impacto en la progresión tumoral, posicionándolo como un regulador clave de la motilidad e invasión celular.

En conjunto, los datos demuestran que el siRNA 1 ejerció un efecto biológico significativo en las células MDA-MB-231, evidenciado por la reducción del 21% en comparación a la proliferación del control y la disminución consistente en la intensidad del bandeo (500 pb) mediante RT-PCR.

Estos hallazgos correlacionados confirman la eficacia del silenciamiento génico y sugieren que la isoforma larga de ADGRG1 podría regular procesos proliferativos en este modelo de cáncer de mama triple negativo.

CONCLUSIONES

- Las células MDA-MB-231 expresan el ARNm que codifica para el receptor ADGRG1/GPR56.
- El siRNA 5' TTG UGG CUC CGU AAC ACU 3' tiende a disminuir los niveles de expresión del ARNm que codifica para el receptor ADGRG1/GPR56.
- El silenciamiento del gen ADGRG1 genera una disminución en la proliferación de las células MDA-MB-231.

ANEXOS

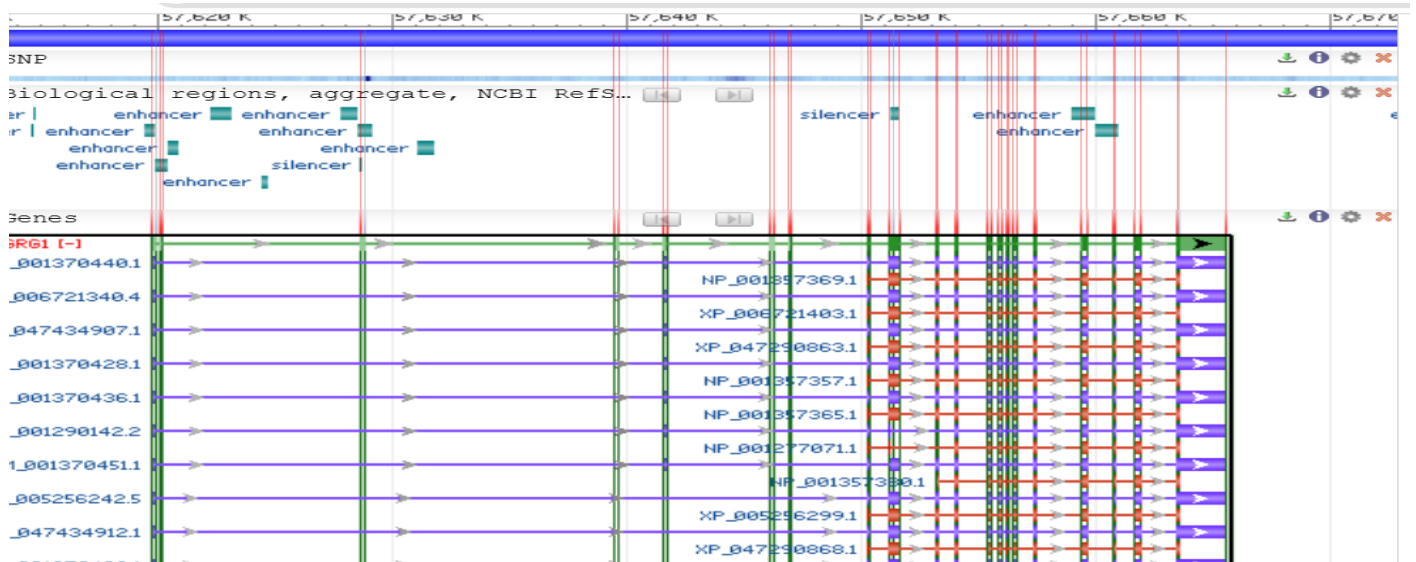


Fig. A Secuencias reportadas en la base de datos de NCBI del gen ADGRG1

Se logra apreciar los sitios potenciadores y silenciadores en la parte de arriba de las isoformas reportadas (color azul aqua), también en la parte de abajo se identifican las tres isoformas que se han encontrado y cambios que se han encontrado de ellas donde sufren pérdida de exones o acortamiento de exones, modificando su marco de lectura.

	A	B	C	D
Control	-	-	-	-
Lipofectamina 2000	-	+	+	+
siRNA 1	-	-	+	-
siRNA 2	-	-	-	+

	Cn	Lipofectamina	SIRNA 1
F1	40615.53	37114.652	39712.631
F2	35379.338	31240.702	33850.974
Inv	36161.681	32196.823	34507.681
Promedio	37385.51633	33517.39233	36023.762
Normalizado	1.000000001	0.896534157	0.963575351

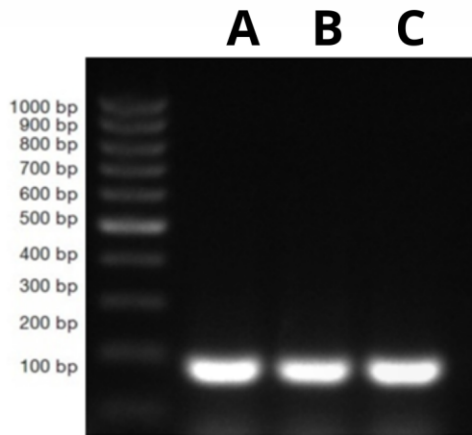


Fig. B Controles de calidad para la expresión genética de ADGRG1

Se puede apreciar la densitometría de la β -actina sin un cambio en el bandeo, obteniendo un producto de 100 bp.

BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022 [citado el 26 Nov 2024];12(1):31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
2. Anczuków O, Akerman M, Cléry A, Hua Y, Allain FH, Stamm S, et al. SRSF1-regulated alternative splicing in breast cancer. *Mol Cell.* 2015 [citado el 4 Sep 2023];60(1):105-17. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.005.
3. Aversa R, Sorrentino A, Esposito R, Ambrosio M, Amato A, Zambelli A, et al. Alternative splicing in adhesion- and motility-related genes in breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2016 [citado el 4 Abr 2023];17(1):121. DOI: 10.3390/ijms17010121.
4. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 2004 [citado el 2 Dic 2024];33(2):95-103. DOI: 10.1016/S1046-2023(03)00033-9.
5. Brosseau JP, Lucier JF, Lamarche A, Shkreta L, Gendron D, Lapointe E, et al. Redirecting splicing with bifunctional oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2014 [citado el 4 Abr 2023];42(6):e40. DOI: 10.1093/nar/gkt1312.
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer de mama [Internet]. Ginebra: OMS; 2024 [citado el 13 Nov 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
7. Cytion. Células MDA-MB-231 [Internet]. 2024 [citado el 27 Nov 2024]. Disponible en: <https://www.cytion.com/es/Celulas-MDA-MB-231/30027>.
8. Correa de Adjounian MF, Adjounian H, Adjounian SH. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Arch Venez Farmacol Ter.* 2008 [citado el 10 Nov 2024];27(1):22-5. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642008000100004.
9. Dastjerd N, Valibeik A, Monfared S, Goodarzi G, Sarabi M, Hajabdollahi F, et al. Gene therapy: A promising approach for breast cancer treatment. *Cell Biochem Funct.* 2021 [citado el 24 Abr 2023];40(1):28-48. DOI: 10.1002/cbf.3676.
10. Dornell J. Empalme alternativo: importancia y definición. *News Courier Genomics.* 2021 [citado el 5 Oct 2023]. Disponible en: <https://www.news-courier.com/genomics/articles/alternative-splicing-importance-and-definition-351813>.
11. Thermo Fisher Scientific. DreamTaq PCR Master Mix (2X) [Internet]. 2024 [citado el 10 Nov 2024]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1081>.
12. Dutertre M, Vagner S, Auboeuf D. Alternative splicing and breast cancer. *RNA Biol.* 2010 [citado el 24 Abr 2023];7(4):403-11. DOI: 10.4161/rna.7.4.12152.
13. Viresa. Espectrofotometría, un avance en la ciencia [Internet]. 2024 [citado el 10 Nov 2024]. Disponible en: https://viresa.com.mx/blog_espectrofotometria_avance_en_la_ciencia.
14. (Duplicada, eliminar o reemplazar por otra fuente).
15. Espinosa RM. Cáncer de mama. *Rev Méd Sinergia.* 2017 [citado el 24 Abr 2023];2(1):8-12. Disponible en: <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/58>.
16. Fallatah A, Anastasakis DG, Manzourolajdad A, Sharma P, Wang X, Jacob A, et al. Keratin 19 binds and regulates cytoplasmic HNRNPK mRNA targets in triple-negative breast cancer. *BMC Mol Cell Biol.* 2023;24(1):15. DOI: 10.1186/s12860-023-00488-z.
17. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 [citado el 24 Abr 2023];363(20):1938-48. DOI: 10.1056/NEJMra1001389.
18. Gabaldó X. Caracterización molecular y prevalencia de las variantes genéticas en BRCA1/2 en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario en la Región [Tesis doctoral]. España:

- Universidad de Valencia; 2014. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=97949>.
19. González F. Alteraciones en el procesamiento del pre-ARNm de los genes *pkd1* y *pkd2* debidas a mutaciones exónicas relacionadas con la enfermedad poliquística renal autosómica dominante [Tesis doctoral]. España: Universidad de La Rioja; 2013. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=237780>.
 20. González R, Tejera B, Hidalgo P. Proteínas de unión con ARN, moléculas integradoras de la expresión genética. *Rev Esp Investig Biosanit*. 2015 [citado el 16 Oct 2023];1(1):1-15. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8086097.pdf>.
 21. Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Salcedo-Vargas M. Grandes alcances de los RNAs pequeños: RNA de interferencia y microRNA. *Rev Genet Mol*. 2024 [citado el 11 Nov 2024];10(2):45-60. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4383248>.
 22. Hollander D, Naftelberg S, Lev-Maor G, Kornbliht AR, Ast G. How are short exons flanked by long introns defined and committed to splicing? *Trends Genet*. 2016 [citado el 24 Abr 2023];32(10):596-606. DOI: 10.1016/j.tig.2016.07.003.
 23. Hospital IGESP. Entenda o câncer de mama [Internet]. São Paulo: IGESP; 2021 [citado el 6 Sep 2023]. Disponible en: <https://hospitaligesp.com.br/entenda-o-cancer-de-mama/>.
 24. Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett*. 2005;579(26):5850-7. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.071.
 25. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Epidemiología del cáncer de mama [Internet]. México: gob.mx; 2024 [cited 2024 Nov 13]. Recuperado de: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
 26. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer de mama [Internet]. México: INEGI; 2024 [cited 2024 Nov 26]. Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/app/salaDeprensa/noticia.html?id=8823>
 27. Iwakawa HO, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell*. 2022;82(1):30–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.025>
 28. Jacob J, Francisco LE, Chatterjee T, Liang Z, Subramanian S, Liu QJ, et al. An antibody-drug conjugate targeting GPR56 demonstrates efficacy in preclinical models of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2023;128(8):1592–602. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02192-3>
 29. Kędzińska H, Piekiełko-Witkowska A. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer. *Cancer Lett*. 2017;396:53–65. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.013>
 30. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(9):4365–80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv328>
 31. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:291–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
 32. Lev S. Targeted therapy and drug resistance in triple-negative breast cancer: the EGFR axis. *Biochem Soc Trans*. 2020;48(2):657–65. <https://doi.org/10.1042/BST20191055>
 33. Li Y, Zhang H, Merkher Y, Chen L, Liu N, Leonov S, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):121. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01341-0>
 34. Li Z, Zhang C, Wang Z, Shen J, Xiang P, Chen X, et al. Lipofectamine 2000/siRNA complexes trigger endoplasmic reticulum unfolded protein response in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(11):21166–81. <https://doi.org/10.1002/jcp.28719>
 35. Thermo Fisher Scientific. Lipofectamine 2000 transfection reagent [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 10]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11668027>

36. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. *N Engl J Med*. 2018;379(8):753–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802905>
37. Liu Q, Wang X, Kong X, Yang X, Cheng R, Zhang W, et al. Prognostic alternative mRNA splicing signature and a novel biomarker in triple-negative breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2020;39(6):1051–63. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.5460>
38. Ma D, Chen S, Ren J, Pei Y, Jiang C, Zhao S, et al. Molecular features and functional implications of germline variants in triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2020;113(7):884–92. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa175>
39. Martín M, Herrero A, Echavarría I. El cáncer de mama. *Arbor*. 2015;191(773):a234. <https://doi.org/10.3989/arbor.2015.773n3004>
40. Martínez N, Anaya M, Pérez M, Martínez R. Alternative splicing in breast cancer and the potential development of therapeutic tools. *Genes (Basel)*. 2017;8(10):217. <https://doi.org/10.3390/genes8100217>
41. Martínez N, Rosas N, Anaya M, Monjaraz E, Martínez R. Alternative splicing as a target for cancer treatment. *Genes (Basel)*. 2018;8(10):E133. <https://doi.org/10.3390/genes8100133>
42. Martínez N, Rosas N, Martínez R. Regulación del splicing alternativo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. *Med Clin (Barc)*. 2015;144(7):317–23. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.02.021>
43. Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):386–98. <https://doi.org/10.1038/nrm1645>
44. ATCC. MDA-MB-231 (HTB-26) [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 27]. Available from: <https://www.atcc.org/products/htb-26>
45. Mehta P, Piao X. GPR56/ADGRG1. In: Choi S, editor. *Encyclopedia of signaling molecules*. 2nd ed. Cham: Springer; 2018. p. 2217–24.
46. Mei Y, Liu Y, Liu W, Chen M, Liu X, Wang S, et al. Identifying ADGRG1 as a specific marker for tumor-reactive T cells in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2024;13(1):4. <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00560-0>
47. Montes M, Sanford BL, Comiskey DF, Chandler DS. RNA splicing and disease: animal models to therapies. *Trends Genet*. 2019;35(1):68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.10.002>
48. Morais P, Adachi H, Yu YT. Spliceosomal snRNA epitranscriptomics. *Front Genet*. 2021;12:652129. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.652129>
49. Ng K, Chen T, Stacey M, Lin HH. Role of ADGRG1/GPR56 in tumor progression. *Cells*. 2021;10(12):3352. <https://doi.org/10.3390/cells10123352>
50. Novoa A, Nebril B, Díaz I, Ramírez S, Varela C, Cereijo C, et al. Axillary radiotherapy in conservative surgery for early-stage breast cancer (stage I and II). *Cir Esp*. 2016;94(6):331–8. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2016.04.003>
51. Park S, Brugiolo M, Akerman M, Muthuswamy S, Krainer AR, Anczuków O. Differential functions of splicing factors in mammary transformation and breast cancer metastasis. *Cell Rep*. 2019;29(9):2672–86. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.110>
52. Patel SB, Bellini M. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(20):6482–93. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn658>
53. Thermo Fisher Scientific. RevertAid reverse transcriptase (200 U/μL) [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 10]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EP0441>
54. Rossano-Gutiérrez KA, Martínez-Montiel N, Anaya-Ruiz M, Gaspariano-Cholula MP, Martínez-Contreras RD. Reprogramación del splicing alternativo de genes asociados a cáncer de mama. *Epistemus*. 2021;15(30):75–82. <https://doi.org/10.36298/epistemus.2021.15.30.75>
55. Saha HR, Kaneda-Nakashima K, Shimosaki S, Suekane A, Sarkar B, Saito Y, et al. Suppression of GPR56 expression by pyrrole-imidazole polyamide represents a novel therapeutic drug for

- AML with high EVI1 expression. *Sci Rep.* 2018;8(1):13742. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32205-8>
56. Sai BM, Dinakar YH, Kumar H, Jain R, Kesharwani S, Kesharwani SS, et al. Therapeutic delivery of siRNA for the management of breast cancer and triple-negative breast cancer. *Ther Deliv.* 2024;15(11):871–91. <https://doi.org/10.1080/20415990.2024.2400044>
 57. Salzman GS, Zhang S, Fernandez CG, Araç D, Koide S. Specific and direct modulation of the interaction between adhesion GPCR GPR56/ADGRG1 and tissue transglutaminase 2 using synthetic ligands. *Sci Rep.* 2020;10(1):14252. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74044-6>
 58. Sasaki S, Zhang D, Iwabuchi S, Tanabe Y, Hashimoto S, Yamauchi A, et al. Crucial contribution of GPR56/ADGRG1, expressed by breast cancer cells, to bone metastasis formation. *Cancer Sci.* 2021;112(12):4883–93. <https://doi.org/10.1111/cas.15150>
 59. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>
 60. Shashidhar S, Lorente G, Nagavarapu U, Nelson A, Kuo J, Cummins J, et al. GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. *Oncogene.* 2005;24(10):1673–82. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208395>
 61. Sylentis. Silenciamiento RNA [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 10]. Available from: <https://sylentis.com/es/silenciamiento-rna/>
 62. Silipo M, Gautrey H, Tyson-Capper A. Deregulation of splicing factors and breast cancer development. *J Mol Cell Biol.* 2015;7(5):388–401. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv027>
 63. Troyan SL, Susan L. Breast cancer in women. *DynaMed* [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 4]. Available from: <https://www.dynamed.com/condition/breast-cancer-in-women>
 64. International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 26]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
 65. Urbanski LM, Leclair N, Anczuków O. Alternative-splicing defects in cancer: splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(4):e1476. <https://doi.org/10.1002/wrna.1476>
 66. Vandenberg A, Mols J, Han J. RISC-target interaction: cleavage and translational suppression. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1779(11):668–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.07.005>
 67. Vergani-Junior CA, Tonon-da-Silva G, Inan MD, Mori MA. DICER: structure, function, and regulation. *Biophys Rev.* 2021;13(6):1081–90. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00902-w>
 68. Villemaire J, Dion I, Elela SA, Chabot B. Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50031–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307836200>
 69. American Cancer Society. What is breast cancer? [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 5]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
 70. Yang Q, Zhao J, Zhang W, Chen D, Wang Y. Aberrant alternative splicing in breast cancer. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(10):920–9. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz048>
 71. Zhang B, Xie SH, Hu JY, Lei SJ, Shen LH, Liu HT, et al. Truncated SCRIB isoform promotes breast cancer metastasis through HNRNP A1 mediated exon 16 skipping. *Acta Pharmacol Sin.* 2023;44(11):2307–21. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01116-4>
 72. Zhang Y, Qian J, Gu C, Yang Y. Alternative splicing and cancer: a systematic review. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):78. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00486-7>