



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Maestría en Ciencias Biomédicas



**Efecto de la sobreexpresión de miR-411-5p sobre
el nivel de GRB2, la proliferación y migración en
células AGS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta

QBP. Arvey Tacuba Saavedra

Directora de tesis

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Codirectora

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

Asesor Externo

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Chilpancingo de los Bravo, Guerrero., Julio del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 15 días del mes de junio del año dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de la sobreexpresión de miR-411-5p sobre el nivel de GRB2, la proliferación y migración en células AGS", presentada por el alumno Arvey Tacuba Saavedra, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Gloria Fernández Tilapa
Dirección de tesis

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo
Codirección de tesis

Dra. Hilda Jiménez Wences

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Dr. Oscar Peralta Zaragoza



UAGro
FCQB Coordinación de la
Maestría en Ciencias
Biomédicas
DIRECCIÓN 2018-2021

Vo. Bo

Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias
Biomédicas



Vo. Bo

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica (LIC) y el Laboratorio de Investigación en Biomoléculas (LIB) de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

La codirección de:

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carillo

La asesoría externa de:

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

La asesoría interna de:

Dra. Hilda Jiménez Wences

Dr. Julio Ortiz Ortiz

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por el CONACYT al proyecto 258433, en la convocatoria de Investigación Científica Básica 2015-01 y con recursos otorgados por el Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa (PFCE-SEP-2018, 2019 y 2020) de la Secretaría de Educación Pública al cuerpo Académico Agentes Infecciosos y Cáncer (UAGro-CA194). El apoyo del Dr. Carlos Alberto Castañón Sánchez del Laboratorio de Investigación Biomédica del Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca y del Dr. Eduardo Castañeda Saucedo del Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro.

Durante el periodo en que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, el Q.B.P Arvey Tacuba Saavedra obtuvo una beca académica, del 1 septiembre del 2018 al 31 de agosto del 2020, que otorga el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a estudiantes que pertenecen a un programa educativo del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

INDICE

I. Resumen	5
II. Abstract.....	6
III. Introducción	7
IV. Material y métodos.....	9
V. Resultado.....	13
VI. Discusión	19
VII. Conclusiones	22
VIII. Referencias.....	22

I. Resumen

Antecedentes: La desregulación de los microRNAs se asocia con múltiples enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Varios estudios han demostrado la alteración de miR-411-5p y su dualidad de función en cáncer humano. En cáncer gástrico, se ha reportado que miR-411-5p está disminuido, sin embargo se desconoce su papel en esta patología y cuáles de sus genes blanco están asociados. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-411-5p en la proliferación, migración y expresión de GRB2 en la línea celular AGS. **Métodos:** Se usaron microRNAs miméticos para inducir la sobreexpresión de miR-411-5p, la cuantificación de miR-411-5p se hizo por RT qPCR de dos pasos, los niveles de expresión de GRB2 se determinaron por RT qPCR de un paso, los niveles de proteína por Western Blot, la migración se determinó por ensayos de cierre de heridas y la proliferación celular a través del método de MTT. **Resultados:** Se demostró que en cáncer gástrico, no hay disminución significativa de miR-411-5p respecto a tejido no tumoral, sin embargo, observamos que los niveles más bajos coinciden con la presencia de *Helicobacter pylori*. GRB2 presenta un aumento no significativo en cáncer gástrico con respecto a tejido gástrico no tumoral. La sobreexpresión de miR-411-5p disminuye el mensajero de GRB2 y estabiliza de manera indirecta sus niveles proteínicos, disminuye la proliferación y aumenta la migración de las células AGS. **Conclusiones:** miR-411-5p tiene tendencia de disminución en tejido de cáncer gástrico con respecto a tejido no tumoral, *Helicobacter pylori* podría potenciar la disminución de miR-411-5p en cáncer gástrico. El nivel de expresión de GRB2 en cáncer gástrico, tiene tendencia de aumento con respecto a tejido no tumoral. La sobreexpresión de miR-411-5p induce la disminución del transcrito de GRB2 e indirectamente estabiliza sus niveles proteínicos, disminuye la proliferación y aumenta la migración de las células AGS.

Palabras clave: miR-411-5p, GRB2, migración, proliferación, AGS.

II. Abstract

Background: Dysregulation of microRNAs is associated with multiple human diseases, including cancer. Multiple studies have demonstrated the alteration of miR-411-5p and its duality of function in human cancer. Particularly in gastric cancer, it has been reported that miR-411-5p is decreased, however the role of this microRNA in this pathology is unknown, because it has not been associated with its target genes. **Objective:** This work aims to evaluate the effect of miR-411-5p overexpression on the proliferation, migration and expression of GRB2 in AGS cell line. **Methods:** Mimic microRNAs were used to induce miR-411-5p overexpression, miR-411-5p quantification was done by two-step RT qPCR, GRB2 expression levels were determined by one-step RT qPCR, protein levels by Western Blot, migration was determined by wound closure assays, and cell proliferation through the MTT method. **Results:** We show that in gastric cancer, there is no significant decrease in miR-411-5p with respect to non-tumor tissue, however, we observed that the lower levels coincide with the presence of *Helicobacter pylori*. GRB2 shows a non-significant increase in gastric cancer compared to non-tumor gastric tissue. The overexpression of miR-411-5p decreases the GRB2 messenger and indirectly stabilizes its protein levels, decreases proliferation, and increases AGS cell migration. **Conclusions:** miR-411-5p has a downward trend in gastric cancer tissue compared to non-tumor tissue, *Helicobacter pylori* could potentiate the decrease of miR-411-5p in gastric cancer. The level of expression of GRB2 in gastric cancer has a tendency to increase with respect to a non-tumor tissue. The overexpression of miR-411-5p induces a decrease in the GRB2 transcript and indirectly stabilizes its protein levels, decreases proliferation and increases the migration of AGS cells.

Keywords: miR-411-5p, GRB2, migration, proliferation, AGS.

III. Introducción

Los microRNAs son pequeños RNAs no codificantes, con proteínas de la familia Argonauta forman un complejo de silenciamiento inducido por microRNAs (RISC) que regula negativamente la traducción del RNA mensajero (mRNA) de aproximadamente el 60% de los genes humanos (Dexheimer and Cochella, 2020). En su forma madura, los microRNAs tienen una longitud de 21 a 25 nucleótidos, que incluye una secuencia semilla localizada entre los nucleótidos 2 al 8. La secuencia semilla del microRNA permite la interacción directa con los elementos de reconocimiento de microRNAs (MRE) presentes en el mRNA blanco, lo que induce la inhibición de la traducción o la degradación del transcrito (O'Brien *et al.*, 2018). El complejo RISC controla la traducción de varios transcritos blanco y contribuye en procesos celulares tan importantes como la autorrenovación, pluripotencia de células troncales, el metabolismo, diferenciación y proliferación celular (Mens and Ghanbari, 2018; Vienberg *et al.*, 2017). Sin embargo, los polimorfismos, la alteración de la tasa de transcripción y defectos en la biogénesis de los microRNAs, causan la desregulación de los niveles de expresión de los microRNAs (Mahmoudian-Sani *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la desregulación de los microRNAs se asocia con el desarrollo de enfermedades humanas como el cáncer (Paul *et al.*, 2018).

Jishnu *et al.* (2020) demostraron que la alteración en la expresión del grupo de microRNAs localizados en la región 14q32 se asocia con eventos de hiperproliferación, migración, invasión, metástasis y resistencia a la apoptosis en diferentes tipos de cáncer ya sea de manera individual o en grupo. MiR-411-5p, un microRNA miembro del clúster 14q32, se ha reportado desregulado y con dualidad de funciones en cáncer humano. Xia *et al.* (2015) reportaron que miR-411-5p estaba sobreexpresado en cáncer hepatocelular, y que tiene función oncogénica al regular negativamente a la ubiquitín ligasa ITCH causando la sobreexpresión de la ciclina D1 y c-Met, lo que favorece la hiperproliferación de las células tumorales. Sin embargo, en estudios posteriores se ha asociado a miR-411-5p con funciones supresoras de tumor. En 2016, Guo *et al.* reportaron que el nivel de miR-411-5p se encuentra disminuido en tejido y líneas celulares de cáncer de mama en comparación con tejido y células de mama no tumorales. Para demostrar el papel

de miR-411-5p, indujeron su sobreexpresión exógena y observaron una disminución de la tasa de proliferación, migración e invasión de las células de cáncer de mama en comparación con las células sin sobreexpresión de miR-411-5p. Adicionalmente, demostraron que miR-411-5p regula negativamente al transcrito de AP-1, un factor de transcripción que se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama y que se asocia con un mal pronóstico para los pacientes. Zhang *et al.*, (2017) reportaron que miR-411-5p presenta un nivel de expresión bajo en tejido y líneas celulares de cáncer renal con respecto a tejido y células de riñón no tumorales. Demostraron que al sobreexpresar a miR-411-5p, la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales disminuyó y aumentó la tasa de apoptosis, comprobando así el papel supresor de miR-411-5p en cáncer de riñón. Además, dos estudios publicados en 2018 informaron que en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y en cáncer colorrectal, miR-411-5p tiene funciones supresoras de tumor a través de la regulación negativa de PUM1 en NSCLC (Xia *et al.*, 2018) y de PIK3R3 en cáncer colorrectal (Zhao *et al.*, 2018). En ambos estudios observaron la disminución de la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de las células tumorales y el aumento de la tasa de apoptosis en respuesta a la sobreexpresión de miR-411-5p. En cáncer gástrico, Azarbarzin *et al.*, (2016) reportaron que miR-411-5p se encuentra disminuido en tejido de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Sin embargo, no se analizaron posibles genes blanco de miR-411-5p o su papel en cáncer gástrico. Un estudio realizado por Zhang *et al.*, (2016) en cáncer de mama demostró que GRB2 es un blanco de miR-411-5p, debido a que al sobreexpresar a miR-411-5p los niveles de expresión de GRB2 disminuyeron, también observaron una disminución en la proliferación, migración e invasión de las células tumorales.

GRB2 es una oncoproteína que se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer, y es un intermediario clave en las vías de señalización oncogénicas. En melanoma, la vía SRC-GRB2-FAK promueve la proliferación, migración e invasión de las células tumorales inducida por la sobreexpresión de la ubiquitín ligasa linfoma de linaje B de casitas (c-CBL), el estudio reportó que al inhibir la expresión de c-CBL, se disminuía la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de las células tumorales y también los niveles de SRC, FAK y GRB2 (Nihal and Wood., 2016). En

cáncer de mama, GRB2 es una molécula clave para la proliferación celular inducida por la vía LMTK3-GRB2-RAS-ERK-MAPK, en la migración e invasión a través de la vía EGFR-GRB2-ARF1/ARF6, también participa en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) a través de la vía TGF- β -GRB2-p38MAPK y en la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Ijaz *et al.*, 2018). En cáncer gástrico, Yu *et al.*, (2009) reportaron que GRB2 está sobreexpresado en comparación con tejido gástrico no tumoral, los investigadores demostraron que la sobreexpresión de GRB2 se asocia con una menor tasa de supervivencia de los pacientes. En líneas celulares de cáncer gástrico, se describió que GRB2 contribuye con una mayor capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales al favorecer la activación río abajo de Rab35 en la vía de señalización activada por el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR) (Ye *et al.*, 2018). Con base en lo anterior y debido a que no existen reportes que esclarezcan si miR-411-5p regula la traducción de GRB2 en cáncer gástrico, el objetivo de este estudio fue analizar la relación entre los niveles de expresión de miR-411-5p con los de GRB2, con la proliferación y migración de las células AGS de cáncer gástrico. Este trabajo contribuye con la comprensión de los mecanismos asociados a la progresión del cáncer gástrico.

IV. Material y métodos

Cultivo celular

La línea celular AGS se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivó en medio DMEM/F12 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a temperatura constante de 37 °C.

Transfección con microRNAs miméticos

Las células AGS se transfectaron con 50 nM del mimético de miR-411-5p (ID: 4464066) o su control negativo (CN) miR-#1 (ID: 4464058) de TM mirVanaTM miRNA Mimics (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 24 h. Todas las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y medio bajo en suero Opti-MEM GibcoTM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Extracción de proteínas totales

A partir de las células AGS transfectadas con los miméticos de miR-411-5p o su CN, se realizó la extracción de proteínas totales con buffer RIPA (Radio-Immunoprecipitation-Assay). Las proteínas totales se centrifugaron a 12, 000 rpm a 4 °C por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron por el método BCA con el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por espectrofotometría con el equipo Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Western Blot

Las proteínas totales se separaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poros de 0.2 µm (BIO-RAD, Hercules, California, USA). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 al 0.05%, se incubaron con los anticuerpos primarios anti-GRB2 (Y237) (ab32037; Abcam, Cambridge, UK) y anti-GAPDH (14C10; Cell signaling, Danvers, Massachusetts, USA) durante toda la noche. Finalizado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron con TBS-Tween-20 al 0.05% y se incubaron con anticuerpo secundario anti-Rabbit y anti-Mouse respectivamente. Para el revelado, se agregó luminol y peróxido y la reacción de quimioluminiscencia se detectó en el sistema de imagen digital ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, California, EUA).

Extracción de RNA

A partir de las células AGS transfectadas con los miméticos de miR-411-5p o su CN. Se realizó la extracción de RNA total con el método de Chomczynski-Sacchi con reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop One (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y se almacenó a -75 °C hasta su uso.

RT-qPCR

La expresión de miR-411-5p se determinó por RT-qPCR de dos pasos. La retrotranscripción se realizó a partir de 5 ng de RNA total, utilizando el Kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Para la qPCR, la mezcla de reacción incluyó agua libre de nucleasas, TaqMan Universal PCR Master Mix II [2x] (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) y la sonda TaqMan Small RNA Assay [20x], miR-411-5p: MIMAT0003329: UAGUAGACCGUAUAGCGUACG; assay ID: MC11409 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) y 1 μ L del producto de la retrotranscripción (cDNA).

La expresión del RNA mensajero se determinó por RT-qPCR de un paso con TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) y la sonda Taqman™ Gene Expression Assay: GRB2, NM_002086.4; assay ID: Hs00157817_m1 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). La expresión relativa de miR-411-5p y GRB2 se determinó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La expresión de RNU6b, NR_002752: CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT; assay ID: 001093; (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) y GAPDH NM_001289746; assay ID: Hs99999905_m1; (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) fueron utilizadas como control de referencia para la expresión de miR-411-5p y GRB2, respectivamente.

Ensayo de proliferación

La proliferación de las células AGS se determinó utilizando el Cell Proliferation Kit (MTT) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, USA). En una placa de 6 pozos, se sembraron 4×10^5 células por pozo y se dejaron crecer por 24 h. Las células se transfectaron con 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN por 24 h. Las células transfectadas se transfirieron a una placa de 96 pozos donde se sembraron 1×10^4 células por pozo y se dejaron crecer en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA) suplementado con 10% de SFB por 24 h, 48 h y 72 h. Se adicionaron 50 uL de MTT por pozo y se incubaron a 37 °C durante 3 h con 30 min. Se agregan 100 uL de isopropanol por 1 h y se determinó la absorbancia a 570 nm con el lector de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Ensayo de migración

La migración de las células AGS se evaluó por ensayo de cierre de herida. Se sembraron 550,000 células/pozo en placas de cultivo de 6 pozos y se dejaron crecer por 24 h. Las células se transfectaron con 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN por 24 h. Las células se pusieron en supresión de SFB por 6 h, 4 h después del inicio de la supresión, se adicionó 1 µL de AraC por cada mL de medio DMEM/F12 basal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Al finalizar las 6 h de supresión de SFB se realizó la herida con una punta de pipeta estéril (200 µL) y se hicieron dos lavados con PBS para remover las células suspendidas, se agregó DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con 0.5% de SFB. El progreso de la migración celular se monitoreo a 0h, 24 h, 48 h y 72 h con el microscopio Olympus BX43 acoplado a una cámara fotográfica. La migración celular se determinó al calcular el porcentaje de cierre de la herida con el software ImageJ.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6.0. De las variables cuantitativas se determinó la media \pm DE. Se utilizó la prueba estadística t de Student para determinar si hay diferencia entre grupos y la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

V. Resultado

Expresión de miR-411-5p y GRB2 en tejido gástrico tumoral y no tumoral

Para conocer el nivel de expresión de miR-411-5p en tejido gástrico, se descargaron y graficaron los datos de expresión de miR-411-5p en tejido gástrico tumoral y no tumoral a partir de la *OncomiR Cancer Database* (oncomir.umn.edu/omcd/) (Figura 1A). Se determinó la expresión de miR-411-5p y el mensajero de GRB2 por RT-qPCR a partir de muestras de cáncer gástrico y tejido con gastritis crónica con y sin *Helicobacter pylori* (Figura 1B-1C). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, los niveles de miR-411-5p tienden a disminuir en tejido de cáncer gástrico en comparación con el tejido gástrico no tumoral. En el grupo de pacientes con gastritis crónica, el nivel de miR-411-5p fue más bajo en aquellos con *H. pylori* (Figura 1B). La expresión de GRB2, tiende a incrementar en las muestras de cáncer gástrico con respecto a las muestras de gastritis crónica con y sin *H. pylori* tanto a nivel de mRNA (Figura 1C) como de proteína (Figura 1D).

El nivel de miR-411-5p y del mRNA de GRB2 en las líneas celulares GES-1 y AGS se determinó por RT-qPCR. No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de miR-411-5p entre las líneas celulares GES-1 y AGS (Figura 1E). A pesar de que no se observaron diferencias significativas, el nivel de GRB2 es mayor en las células AGS con respecto a la línea no tumoral GES-1 (Figura 1F).

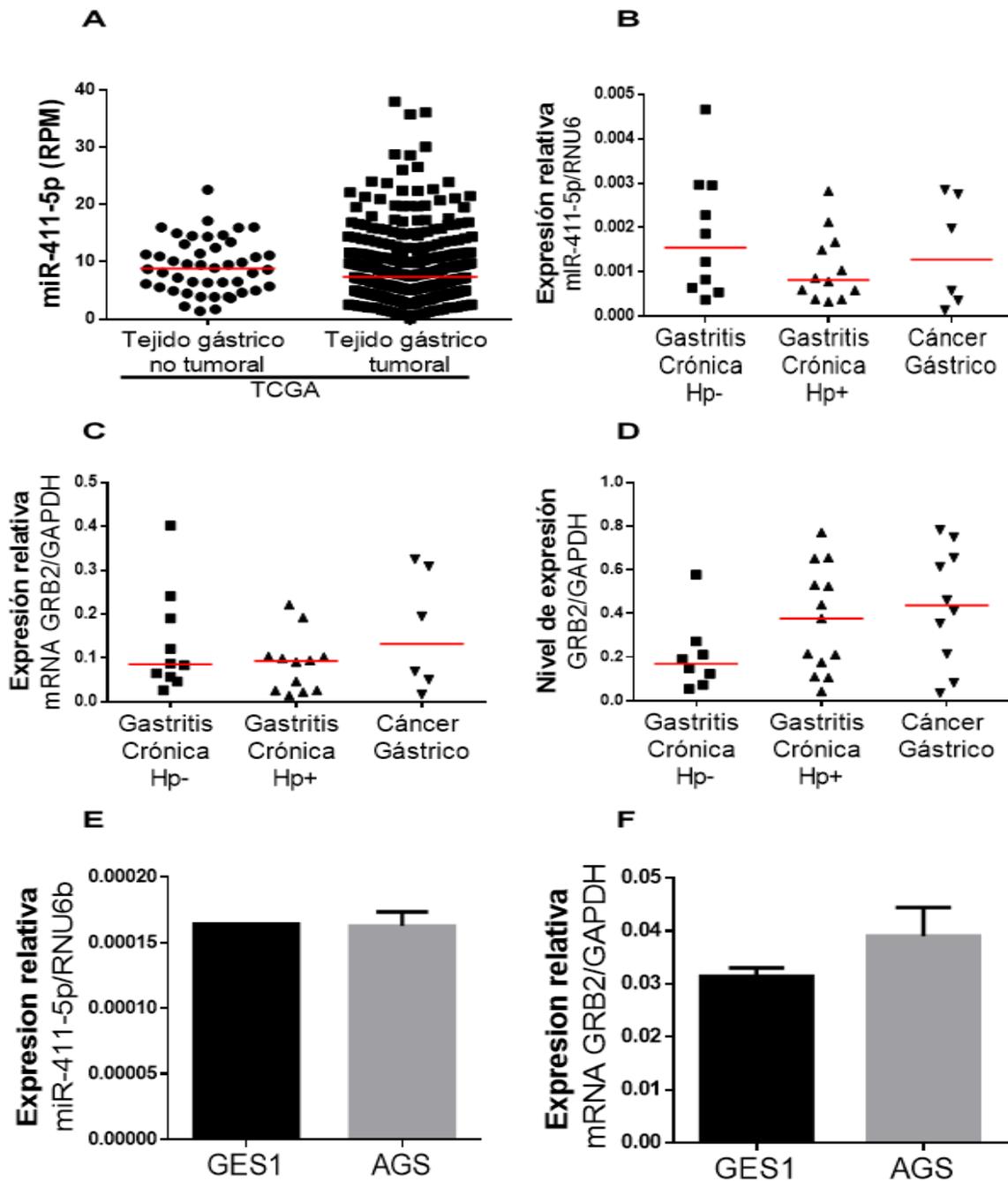


Figura 1: Nivel de expresión de miR-411-5p y GRB2 en tejido y líneas celulares gástricas tumorales y no tumorales. (A) datos de expresión de miR-411-5p en muestras de tejido gástrico tumoral y no tumoral (obtenido de OncoMir Cancer Database). **(B)** Expresión relativa de miR-411-5p en muestra de tejido de gastritis crónica con y sin *Helicobacter pylori* y en tejido de cáncer gástrico. **(C)** Expresión relativa de mRNA de GRB2 en tejido con gastritis crónica con y sin *Helicobacter pylori* y en cáncer gástrico. **(D)** Nivel de la proteína GRB2 en tejido con gastritis crónica con y sin *Helicobacter pylori* y en cáncer gástrico. **(E)** Expresión relativa de miR-411-5p en células GES-1 y AGS. **(F)** Expresión relativa del mRNA de GRB2 en la línea celular GES1 y AGS. Los experimentos de la línea celular GES-1 y AGS se realizaron por triplicado.

Efecto de la sobreexpresión de miR-411-5p sobre la expresión de GRB2

Para investigar si el nivel de expresión de GRB2 es modificado por miR-411-5p, se realizaron ensayos de dosis respuesta a concentraciones de 25 nM, 50 nM y 100 nM del mimético de miR-411-5p. La expresión de miR-411-5p es significativamente mayor ($P < 0.0001$) con 50 nM del mimético en comparación con las concentraciones de 25 nM y 100 nM (Figura 2A). Se hicieron ensayos de curso temporal a 24 h, 48 h y 72 h con una concentración de 50 nM del mimético de miR-411-5p. A las 48 h postransfección, el nivel de miR-411-5p es significativamente más alto ($P < 0.05$) en comparación a lo observado a 24 h y 72 h (Figura 2B).

Se determinó el nivel de expresión del mRNA y proteína de GRB2 a través de RT-qPCR y Western blot respectivamente, a partir de células AGS transfectadas con 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN. Las mediciones se hicieron a las 24 h, 48 h y 72 h postransfección. La expresión del mRNA de GRB2 fue significativamente más baja a las 72 en células AGS transfectadas con el mimético de miR-411-5p en comparación al CN ($P < 0.001$) (Figura 2C). Respecto a la proteína, se encontró que a 24 h y 48 h postransfección, el nivel de GRB2 aumenta significativamente en las células que sobreexpresan a miR-411-5p en comparación al CN ($P < 0.05$) en la línea celular AGS (Figura 2D-2E). A las 72 h, el nivel de GRB2 es similar en células AGS transfectadas con miR-411-5p o con el control negativo.

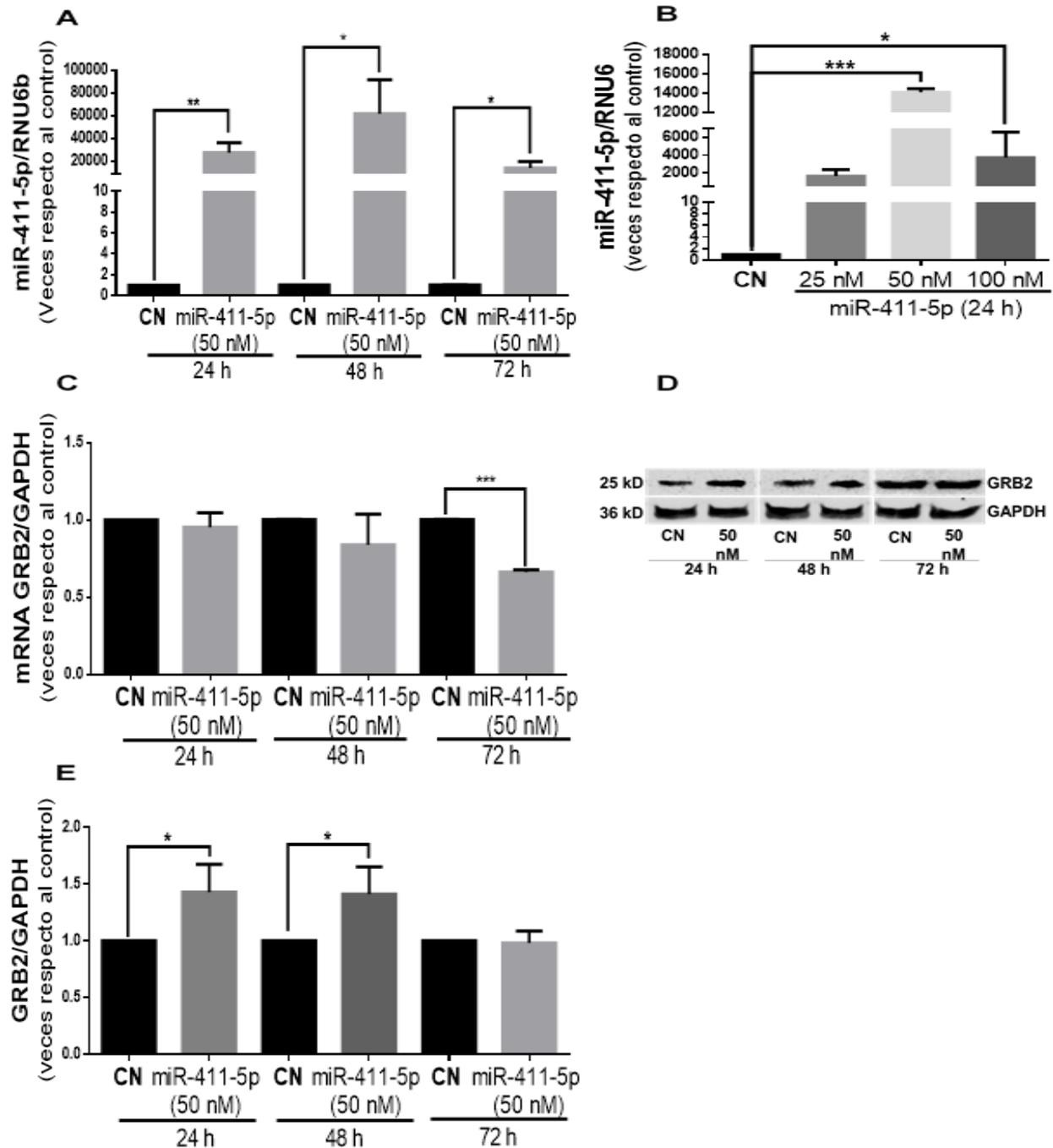


Figura 2: Efecto de la sobreexpresión de miR-411-5p sobre la expresión de GRB2 en la línea celular AGS. (A) nivel de miR-411-5p en respuesta a la transfección con 25 nM, 50nM y 100 nM del mimético de miR-411-5p o su CN por 24 h. **(B)** nivel de miR-411-5p en respuesta a la transfección de 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN a 24 h, 48 h y 72 h. **(C)** nivel de expresión del RNA mensajero de GRB2 en respuesta a la transfección de 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN a 24 h, 48 h y 72 h. **(D-E)** nivel proteínico de GRB2 en respuesta a la transfección de 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN a 24 h, 48 h y 72 h. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.001$), *** ($P < 0.0001$)

La sobreexpresión de miR-411-5p disminuye la proliferación y aumenta la migración de las células AGS.

Para evaluar si miR-411-5p modifica la proliferación de las células de cáncer gástrico, las células AGS se transfectaron con 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN durante 24 h. Se realizaron ensayos de MTT a 24 h, 48 h y 72 h para determinar la proliferación celular. La sobreexpresión de miR-411-5p disminuye significativamente la proliferación de las células AGS a las 24 h, 48 h y 72 h después del inicio de la transfección en comparación con el CN a los mismos tiempos (Figura 3A).

Para identificar si la sobreexpresión de miR-411-5p induce cambios en la migración celular, se realizaron ensayos de cierre de heridas a 24 h, 48 h y 72 h después de la transfección con 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN. Los datos muestran que a 24 h postransfección, hay mayor migración en la condición donde se transfectó a miR-411-5p, ya que el porcentaje de cierre de la herida es significativamente mayor que en el CN ($P < 0.05$). Sin embargo, el efecto se pierde a las 48 h y 72 h (Figura 3B-3C).

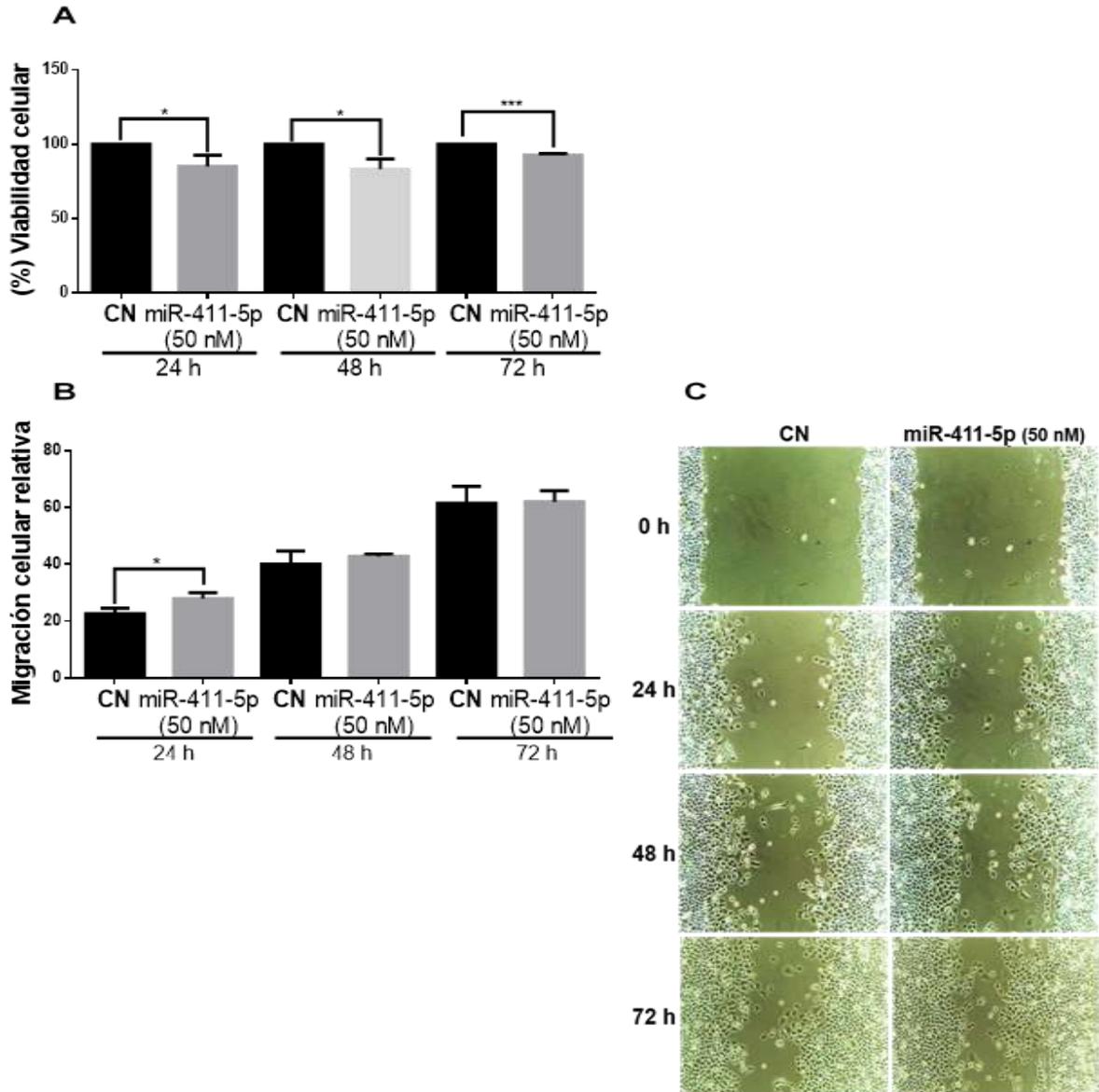


Figura 3: La sobreexpresión de miR-411-5p disminuye la viabilidad y aumenta la migración de las células AGS. (A) viabilidad de las células AGS en respuesta a la transfección de 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN a 24 h, 48 h y 72 h en la línea celular AGS. **(B)** migración de las células AGS en respuesta a la transfección de 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN a 24 h, 48 h y 72 h en la línea celular AGS. **(C)** imágenes representativas del ensayo de cierre de herida por células AGS transfectadas con 50 nM del mimético de miR-411-5p o su CN a 0 h, 24 h, 48 h y 72 h. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos. * ($P < 0.05$), *** ($P < 0.0001$)

VI. Discusión

Múltiples estudios han demostrado la dualidad de miR-411-5p en cáncer; tal como ocurre en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Zhang *et al.*, 2021) y cáncer de pulmón (Zhang *et al.*, 2019) donde se encuentra sobreexpresado y es considerado un oncomir. Mientras que, en cáncer de hígado (Xia *et al.*, 2015), cáncer de vejiga (Jin *et al.*, 2018), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Xia *et al.*, 2018), cáncer colorrectal (Zhao *et al.*, 2018), y cáncer cervical (Wei and Liu, 2020) es clasificado como microRNA supresor de tumor. En cáncer gástrico aún se desconoce qué función cumple miR-411-5p. Este es el primer estudio que pretende dilucidar si este miRNA es un supresor de tumor en cáncer gástrico. Nuestros resultados de la figura 1A y 1B, muestran una disminución no significativa de miR-411-5p en muestras de cáncer gástrico con respecto a tejido no tumoral, datos que son similares a lo reportado por Azarbarzin *et al.*, (2016), quienes concluyen que en cáncer gástrico, miR-411-5p se encuentra disminuido en comparación con tejido no tumoral. Un dato relevante de este trabajo es que se observa una posible relación entre la infección por *H. pylori* con la disminución de miR-411-5p en tejido gástrico no tumoral, sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar este resultado. Un estudio publicado por Yang *et al.*, (2020), identificó que en muestras de cáncer gástrico con *H. pylori*, el nivel de miR-411-5p es significativamente menor que en cáncer gástrico sin *H. pylori*. Este resultado fortalece la evidencia de que *H. pylori* y sus factores de virulencia, contribuyen a la desregulación de los microRNAs a través de la alteración de vías de señalización dependiente de NF- κ B (Dastmalchi *et al.*, 2019). Aunque se desconoce el mecanismo que causa la disminución de miR-411-5p en cáncer gástrico, un estudio publicado por Sun *et al.*, (2015) demostró que en células de rhabdomyosarcoma, la sobreexpresión de TGF- β 1 reprime la transcripción de miR-411-5p a través de la vía de señalización dependiente de R-Smad/Co-Smad. En cáncer gástrico, Ma *et al.*, (2013) demostraron que TGF- β 1 se encuentra sobreexpresado, lo que sugiere que la sobreexpresión de TGF- β 1 podría estar promoviendo la disminución de miR-411-5p en cáncer gástrico y causando la sobreexpresión de genes blanco como PUM1, PIK3R3 y GRB2.

Datos publicados por Zhang *et al.*, (2016) demostraron que el transcrito de GRB2 es blanco de miR-411-5p y observaron que la inducción de la sobreexpresión de miR-411-5p en líneas celulares de cáncer de mama, causa la disminución del nivel de GRB2. En la línea celular AGS y tejido de cáncer gástrico, se encontró un aumento no significativo del mensajero (Figura 1C-1F) y proteína de GRB2 (Figura 1D) en comparación con la línea celular GES-1 y muestras de gastritis crónica. Estos datos están de acuerdo con los reportados por Yu *et al.*, (2009) quienes demostraron que GRB2 se encuentra sobreexpresado en muestras de cáncer gástrico. Adicionalmente, reportaron que la sobreexpresión de GRB2 se asociaba con una menor tasa de supervivencia en los pacientes. Dada la evidencia de que GRB2 se encuentra sobreexpresado en muestras de cáncer gástrico y miR-411-5p esta disminuido, se investigó el efecto de la sobreexpresión de miR-411-5p sobre el nivel de expresión de GRB2 y sobre la proliferación y migración, dos procesos celulares que se asocian con la sobreexpresión de este oncogén (Zhang *et al.*, 2016).

Los resultados muestran que al transfectar las células AGS con el mimético de miR-411-5p, se induce un incremento en los niveles de miR-411-5p y se disminuye de forma no significativa el mensajero de GRB2 a 24 h y 48 h, siendo hasta las 72 h donde se observa el nivel más bajo ($P < 0.0001$; Figura 2C). Estos datos sugieren que GRB2 podría ser regulado por miR-411-5p en cáncer gástrico, ya que el mensajero de GRB2 presenta en su región 3' UTR, 2 elementos de reconocimiento para microRNAs (MRE) que al ser reconocidos por miR-411-5p, se induce la degradación del transcrito de GRB2. Sin embargo, a nivel proteínico observamos un aumento a las 24 h y 48 h, perdiéndose este efecto a las 72 h al compararlo con el control negativo. Con base en los resultados, sugerimos que, de manera indirecta, la sobreexpresión de miR-411-5p favorece la estabilización de GRB2. Un estudio publicado por Lv *et al.*, (2020) en un modelo de carcinoma hepatocelular se demostró que la sobreexpresión de la deubiquitinasa PSMD14 favorece la estabilización de la proteína de GRB2 al eliminar la ubiquitinación e inhibir la degradación por el proteosoma. Es probable que este mecanismo descrito en carcinoma hepatocelular, suceda en células de cáncer gástrico, sin embargo, hasta

el momento no hay datos de la expresión de PSMD14 en cáncer gástrico, por lo que son necesarios más estudios para confirmarlo.

Evidencia publicada por Fang *et al.*, (2020) concluye que tras su sobreexpresión, miR-411-5p actúa como un microRNA supresor de tumor, al disminuir de manera significativa la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de las células tumorales. En cáncer gástrico, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de miR-411-5p disminuye la capacidad proliferativa de las células AGS en comparación con el control negativo. Esto posiblemente ocurre debido a que tras inducir la recuperación del nivel de miR-411-5p en las células tumorales, también se restituye su función como regulador negativo de la traducción de sus transcritos blanco. Tal como lo demostraron Deguchi *et al.*, (2017), quienes reportaron que en células de glioma, miR-411-5p induce la disminución de la capacidad proliferativa al regular negativamente la expresión de la topoisomerasa 2 alfa (TOP2A). Por otro lado, también se ha asociado a miR-411-5p con la migración celular. En cáncer gástrico, nuestros resultados mostraron un aumento significativo de la capacidad migratoria de las células tumorales en la condición de 24 h postransfección al comparar con CN. Sin embargo, el efecto se perdió a las 48 h y 72 h. Posiblemente, este aumento de la migración se deba a la sobreexpresión de los niveles proteínicos de GRB2, que ocurre posterior a la transfección de las células AGS con el mimético de miR-411-5p. Ya que se ha demostrado que el complejo GRB2-DENND1A-Rab35 promueve la migración de células de cáncer gástrico tras el estímulo con EGF (Ye *et al.*, 2018). En conjunto, nuestros resultados muestran un comportamiento de supresor de tumor de miR-411-5p en cáncer gástrico. Ya que induce la degradación del transcrito de GRB2 y disminuye la proliferación en la línea celular AGS.

VII. Conclusiones

1. Los niveles de miR-411-5p muestran una tendencia de disminución en tejido de cáncer gástrico con respecto a tejido no tumoral.
2. *Helicobacter pylori* podría contribuir a la disminución de miR-411-5p en tejido gástrico.
3. El nivel de expresión de GRB2 en cáncer gástrico, muestra una tendencia de aumento con respecto a tejido no tumoral.
4. La sobreexpresión de miR-411-5p induce la disminución de GRB2 a nivel de mRNA
5. La sobreexpresión de miR-411-5p contribuye de manera indirecta al incremento del nivel proteínico de GRB2 en células AGS.
6. La sobreexpresión de miR-411-5p promueve la disminución de la proliferación y aumenta la migración de las células AGS.

VIII. Referencias

- 1 Azarbarzin, S., Feizi, M.A.H., Safaralizadeh, R., Ravanbakhsh, R., Karimi, N., Kazemzadeh, M., *et al.* 2016. Reduced expression of miR-411 in intestinal type of gastric adenocarcinoma. *Meta Gene* 10, 23–26.
- 2 Dastmalchi, N., Safaralizadeh, R., Banan Khojasteh, S.M., 2019. The correlation between microRNAs and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Pathog. Dis.* 77.
- 3 Deguchi, S., Katsushima, K., Hatanaka, A., Shinjo, K., Ohka, F., Wakabayashi, T., *et al.*, 2017. Oncogenic effects of evolutionarily conserved noncoding RNA ECONEXIN on gliomagenesis. *Oncogene* 36, 4629–4640.
- 4 Dexheimer, P.J., Cochella, L., 2020. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- 5 F, H., D, Z., C, L., J, N., X, N., 2020. hsa-microRNA-411-5p regulates proliferation, migration and invasion by targeting the hyaluronan mediated motility receptor in ovarian cancer. *Exp. Ther. Med.* 20.
- 6 Guo, L., Yuan, J., Xie, N., Wu, H., Chen, W., Song, S., *et al.*, 2016. miRNA-411 acts as a potential tumor suppressor miRNA via the downregulation of specificity protein 1 in breast cancer. *Mol. Med. Rep.* 14, 2975–2982.
- 7 Ijaz, M., Wang, F., Shahbaz, M., Jiang, W., Fathy, A.H., Nesa, E.U., 2018. The Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. *Protein Pept. Lett.* 24, 1084–1095.
- 8 Jin, H., Sun, W., Zhang, Y., Yan, H., Liufu, H., Wang, S., *et al.*, 2018. MicroRNA-411 Downregulation Enhances Tumor Growth by Upregulating MLLT11 Expression in Human Bladder Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 11, 312–322.

- 9 Jishnu, P.V., Jayaram, P., Shukla, V., Varghese, V.K., Pandey, D., Sharan, K., *et al.*, 2020. Prognostic role of 14q32.31 miRNA cluster in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Metastasis* 37, 31–46.
- 10 Lv, J., Zhang, S., Wu, H., Lu, Jing, Lu, Y., Wang, F., *et al.*, 2020. Deubiquitinase PSMD14 enhances hepatocellular carcinoma growth and metastasis by stabilizing GRB2. *Cancer Lett.* 469, 22–34.
- 11 Ma, G.-F., Miao, Q., Zeng, X.-Q., Luo, T.-C., Ma, L.-L., Liu, Y.-M., *et al.*, 2013. Transforming Growth Factor- β 1 and - β 2 in Gastric Precancer and Cancer and Roles in Tumor-Cell Interactions with Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro. *PLOS ONE* 8, e54249.
- 12 Mahmoudian-Sani, M.-R., Mehri-Ghahfarrokhi, A., Shojaeian, A., Asadi-Samani, M., Luther, T., 2017. The role of microRNAs in human cancers. *Immunopathol. Persa* 4, e05.
- 13 Mens, M.M.J., Ghanbari, M., 2018. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev.* 14, 309–322.
- 14 Nihal, M., Wood, G.S., 2016. c-CBL regulates melanoma proliferation, migration, invasion and the FAK-SRC-GRB2 nexus. *Oncotarget* 7, 53869–53880.
- 15 O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* 9.
- 16 Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., *et al.*, 2018. Interplay between miRNAs and human diseases. *J. Cell. Physiol.* 233, 2007–2018.
- 17 Sun, M., Huang, F., Yu, D., Zhang, Y., Xu, H., Zhang, L., *et al.*, 2015. Autoregulatory loop between TGF- β 1/miR-411-5p/SPRY4 and MAPK pathway in rhabdomyosarcoma modulates proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.* 6, e1859.
- 18 Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S., Dalgaard, L.T., 2017. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 219, 346–361.
- 19 Wei, W., Liu, C., 2020. Prognostic and predictive roles of microRNA-411 and its target STK17A in evaluating radiotherapy efficacy and their effects on cell migration and invasion via the p53 signaling pathway in cervical cancer. *Mol. Med. Rep.* 21, 267–281.
- 20 Xia, K., Zhang, Y., Cao, S., Wu, Y., Guo, W., Yuan, W., *et al.*, 2015. miR-411 regulated ITCH expression and promoted cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* 70, 158–163.
- 21 Xia, L.-H., Yan, Q.-H., Sun, Q.-D., Gao, Y.-P., 2018. MiR-411-5p acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer through targeting PUM1. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 5546–5553.
- 22 Yang, P., Liu, J., Yang, T., Zhang, L., Gong, P., Li, B., *et al.*, 2020. Construction and Investigation of MicroRNA-mRNA Regulatory Network of Gastric Cancer with Helicobacter pylori Infection. *Biochem. Res. Int.* 2020, 6285987.
- 23 Ye, B., Duan, B., Deng, W., Wang, Y., Chen, Y., Cui, J., *et al.*, 2018. EGF Stimulates Rab35 Activation and Gastric Cancer Cell Migration by Regulating DENND1A-Grb2 Complex Formation. *Front. Pharmacol.* 9.

- 24 Yu, G.Z., Chen, Y., Wang, J.J., 2009. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 1331–1339.
- 25 Zhang, C., Wang, H., Deng, M., He, L., Ping, F., He, Y., *et al.*, 2021. Upregulated miR-411-5p levels promote lymph node metastasis by targeting RYBP in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 47.
- 26 Zhang, C., Wang, H., Liu, X., Hu, Y., Ding, L., Zhang, X., *et al.*, 2019. Oncogenic microRNA-411 promotes lung carcinogenesis by directly targeting suppressor genes SPRY4 and TXNIP. *Oncogene* 38, 1892–1904.
- 27 Zhang, X., Zhang, M., Cheng, J., Lv, Z., Wang, F., Cai, Z., 2017. MiR-411 functions as a tumor suppressor in renal cell cancer. *Int. J. Biol. Markers* 32, e454–e460.
- 28 Zhang, Y., Xu, G., Liu, G., Ye, Y., Zhang, C., Fan, C., *et al.*, 2016. MiR-411-5p inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cell via targeting GRB2.
- 29 Zhao, J., Xu, J., Zhang, R., 2018. MicroRNA-411 inhibits malignant biological behaviours of colorectal cancer cells by directly targeting PIK3R3. *Oncol. Rep.* 39, 633–642.