

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas

Informe Final

**Establecimiento del perfil de eficacia *in vitro* del Hsa-miR-198 en dos líneas
celulares derivadas de cáncer gástrico humano**

**Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciatura en
Biotecnología**

B.Sc. David Andrés Vega Zumbado

Cédula: 1-1816-0248

Campus Omar Dengo

Heredia, 2024


Este trabajo de graduación fue APROBADO por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

JAVIER ALVARADO
MESEN (FIRMA)  Firmado digitalmente por JAVIER
ALVARADO MESEN (FIRMA)
Fecha: 2024.12.10 10:48:01
-06'00'


Dr. Javier Alvarado Mesén
Representante, Decano, quién preside

FRANK MARTIN SOLANO CAMPOS (FIRMA)
PERSONA FISICA, CPF-06-0334-0937.
Fecha declarada: 10/12/2024 11:29:02 AM
Esta es una representación gráfica únicamente,
verifique la validez de la firma.

Dr. Frank Solano Campos
Representante de la Dirección de la (ECB)

CHRISTIAN
ROBERTO
MARIN MULLER
(FIRMA)  Firmado digitalmente
por CHRISTIAN
ROBERTO MARIN
MULLER (FIRMA)
Fecha: 2024.12.11
13:22:58 -06'00'

Dr. Christian Marín Müller
Tutor

OSVALDO
VEGA
MARTINEZ
(FIRMA)  Digitally signed by
OSVALDO VEGA
MARTINEZ (FIRMA)
Date: 2024.12.11
10:57:01 -06'00'

M.Sc. Osvaldo Vega Martínez
Asesor

MBA & MPM. Abad Rodríguez Rodríguez
Asesor

Agradecimientos

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas por su colaboración en el presente trabajo:

A los miembros de la empresa Speratum CR: PhD. Christian Marín Müller, Msc. Osvaldo Vega Martínez y B. Sc María José López Brenes por su valiosa guía, apoyo y paciencia durante la ejecución del proyecto.

Al profesor asesor: MPM & MBA. Abad Rodríguez Rodríguez por sus aportes y sugerencias durante la ejecución del proyecto.

Dedicatoria

A mi madre, por su apoyo incondicional durante mi etapa universitaria, que me permitió rendir al máximo en la elaboración y redacción de mi tesis de licenciatura. Ha sido y seguirá siendo uno de mis mayores ejemplos en todas las áreas de mi vida.

A mi familia, por su abundante paciencia y apoyo a lo largo de mi carrera universitaria.

A Speratum CR, por ser la empresa que me apoyó durante mi desarrollo científico y la redacción de mi trabajo final de graduación. A cada uno de los miembros de la empresa, cuya invaluable colaboración me permitió realizar ciencia de alta calidad en el campo biomédico.

Índice de contenido

| | |
|--|------|
| Portada..... | I |
| Agradecimientos | III |
| Dedicatoria..... | IV |
| Índice de contenido | V |
| Índice de cuadros..... | VII |
| Índice de figuras..... | VIII |
| Abreviaturas o acrónimos | IX |
| Resumen..... | X |
| 1. Introducción..... | 11 |
| 1.1. Antecedentes | 11 |
| 1.2. Justificación..... | 13 |
| 1.3. Planteamiento del problema..... | 14 |
| 1.4. Objetivos | 14 |
| 1.4.1. Objetivo General | 14 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos..... | 15 |
| 2. Marco metodológico..... | 16 |
| 2.1. Área de estudio..... | 16 |
| 2.2. Cultivo celular | 16 |
| 2.3. Transfección celular | 16 |
| 2.4. Determinación de transfectabilidad..... | 17 |
| 2.5. Proliferación celular | 17 |
| 2.6. Migración e invasión celular | 18 |
| 2.6.1. Cicatrización de herida..... | 18 |
| 2.6.2. Cámaras de Boyden..... | 19 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 2.7. Análisis estadístico..... | 20 |
| 3. Resultados..... | 21 |
| 4. Discusión | 26 |
| 5. Conclusiones..... | 29 |
| 6. Recomendaciones | 30 |
| 7. Fuente de financiamiento..... | 31 |
| 8. Conflicto de interés..... | 32 |
| 9. Bibliografía..... | 33 |

Índice de cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Cantidad de células post transfección con pHMGFP en líneas celulares gástrico .. | 22 |
| Cuadro 2. Cicatrización en la línea celular AGS posterior a las 72 horas. | 25 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de las “heridas” realizada en cada uno de los pozos para el ensayo de cicatrización celular | 19 |
| Figura 2. Transfección celular por medio de vector de expresión de la proteína GFP fluorescente (pHMGFP) en la línea celular AGS. A1: control negativo con luz transmitida y A2: vector de transfección con luz transmitida; B1: control negativo con cubo de luz GFP (Ex: 470/22 nm; Em: 524/34) y B2: vector de transfección con cubo de luz GFP..... | 21 |
| Figura 3. Transfección celular por medio de un plásmido humano con expresión de la proteína GFP fluorescente (pHMGFP) en la línea celular KATO III. A1: control negativo con luz transmitida y A2: vector de transfección con luz transmitida; B1: control negativo con cubo de luz GFP (Ex: 470/22 nm; Em: 524/34) y B2: vector de transfección con cubo de luz GFP..... | 22 |
| Figura 4. Efecto de miR-198 en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de gástrico. A: Cambio en la viabilidad celular 48 horas post transfección en la línea celular AGS. B: Cambio en la viabilidad celular 24 horas post transfección en la línea celular KATO III. | 23 |
| Figura 5. Efecto de miR-198 en la migración de la línea celular de cáncer de gástrico AGS durante un período de 24 horas. | 24 |
| Figura 6. Efecto de miR-198 en la invasión de la línea celular de cáncer de gástrico AGS.... | 25 |

Abreviaturas o acrónimos

| | |
|-------------|--|
| miARN / miR | microARN |
| miR-198 | Hsa-miR-198 |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ARNcirc | ARN circular |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| phMGFP | Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP Vector |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| miR-NC | microARN – control negativo |
| UT | Sin tratamiento |
| MTS | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio |
| OptiMEM | Opti-MEM Reduced Serum Media |
| FBS | Suero Fetal Bovino |
| TL-4 | Toll Like Receptor 4 |
| P13K | Fosfoinosítido 3-quinasa |
| AKT | Proteína serina-treonina quinasa |
| mTOR | Diana de rapamicina en células de mamífero |
| NF-κB | Factor Nuclear Kappa de las células B activadas |
| FGFR | Factor de Crecimiento de Fibroblastos |

Resumen

El cáncer gástrico se caracteriza por ser uno de los tipos de cáncer con mayor mortalidad e incidencia a nivel mundial. Terapias convencionales como la radioterapia y quimioterapia, empleadas en etapas avanzadas, tienen eficacia limitada. En contraste, las terapias génicas han avanzado significativamente en los últimos años. Las tecnologías basadas en ácidos nucleicos se destacan como herramientas prometedoras en la búsqueda de nuevas estrategias contra el cáncer. Entre ellas, los microARNs (miARNs) han ganado atención por su capacidad para interactuar con dianas genéticas en procesos moleculares y celulares de diversas patologías. Se ha documentado que la expresión alterada de múltiples miARNs está asociada con diferentes procesos de la patogénesis del cáncer gástrico. En particular, el Hsa-miR-198 ha emergido como un elemento crucial, dado que presenta una regulación negativa en tejidos de cáncer gástrico, lo que sugiere su potencial como agente terapéutico.

En este estudio, se evaluó el uso potencial de un vector de expresión del Hsa-miR-198 encapsulado en nanopartículas de Lipofectamina 3000 para determinar su efecto terapéutico en diversos procesos celulares, tales como el crecimiento, migración e invasión celular en dos líneas de cáncer gástrico. Los resultados obtenidos indican que el Hsa-miR-198 actúa como un supresor tumoral, reduciendo las variables tumorigénicas, especialmente en la línea celular AGS. Este efecto podría atribuirse a la influencia de varias dianas moleculares que regulan estos procesos y que, al disminuir el miR-198, sufren mutaciones o se descontrolan, generando cambios proliferativos y tumorigénicos. Por otro lado, la línea celular KATO III mostró una mayor resistencia en las variables de migración e invasión, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad para adherirse a tejidos y mantenerse en suspensión, lo que le confiere características altamente tumorigénicas. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el Hsa-miR-198 posee un gran potencial como terapia contra el cáncer gástrico. No obstante, es imprescindible realizar investigaciones más profundas para identificar las dianas moleculares involucradas y optimizar su aplicación terapéutica.

Palabras claves: cáncer gástrico, terapias génicas, Hsa-miR-198, procesos celulares.

1. Introducción

El cáncer gástrico es una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial, caracterizada por su difícil tratamiento y escasa prevención debido a su detección tardía (Machlowska et al., 2020). Esta investigación se centra en evaluar una posible terapia génica mediante miRNA, los cuales están involucrados en el ciclo celular y los procesos metastásicos del cáncer (Joshi & Badgwell, 2021). Esta estrategia podría representar una alternativa prometedora para contrarrestar esta enfermedad.

1.1. Antecedentes

A nivel global, el cáncer gástrico corresponde al quinto tipo de cáncer con mayor incidencia y el cuarto con mayor mortalidad, representando 1.1 millones de casos nuevos y 770 000 muertes por año en ambos sexos durante lo reportado en el año 2020 (Morgan et al., 2022). A nivel centroamericano, Costa Rica es el país con la mayor incidencia de cáncer gástrico con 15.7 y 11.7 casos por cada 100 000 personas, para hombres y mujeres respectivamente (Guzman et al., 2023). Además, se ha convertido en la sexta causa de muerte en el país, según reportes del INEC, 2021, con porcentajes de mortalidad de 13.7% y 7.2% en hombres y mujeres, respectivamente (Guzman et al., 2023).

El diagnóstico de esta enfermedad se lleva a cabo, en primera instancia, por medio de síntomas como anemia, pérdida de peso, sangrado gastrointestinal y disfagia (Xia & Aadam, 2022). Estos síntomas llevan a exámenes más profundos como la endoscopia, laparoscopia o citología peritoneal, los cuales permiten la detección de procesos metastásicos. No obstante, a pesar de estas herramientas, en muchas ocasiones el diagnóstico se da en etapas avanzadas del cáncer (Joshi & Badgwell, 2021).

Las técnicas actuales para el tratamiento del cáncer para pacientes en etapas tempranas es la cirugía radical como la primera forma de intervención (Li et al., 2021). Sin embargo en

etapas más desarrolladas se explora la posibilidad de combinar con otras terapias como la radioterapia, quimioterapia o inmunoterapia (Li et al., 2021), las cuales actúan como herramientas para reducir el impacto de la enfermedad. No obstante, traen consecuencias negativas y síntomas postratamiento que afectan la calidad de vida de la persona según el tratamiento utilizado (Joshi & Badgwell, 2021).

El avance de las investigaciones científicas de los últimos años ha sido fundamental en el esclarecimiento de muchos aspectos de la biología del cáncer y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, entre las cuales destacan las fundamentadas en el uso de ácidos nucleicos (Sexton et al., 2020), incluyendo los miARNs (Yi et al., 2019). Actualmente se han descrito 2300 miARNs maduros en humanos (Alles et al., 2019) y desde su descubrimiento han sido involucrados en múltiples enfermedades humanas (Lu et al., 2019), incluyendo el cáncer (Mirzaei & Hamblin, 2020).

Los miARN son pequeñas moléculas monocatenarias no codificantes de una longitud alrededor de 22 nucleótidos, que se encargan de la regulación post-transcripcional a través de la unión imperfecta a moléculas de ARNm objetivo (Shah & Shah, 2020).

Se ha descrito la relación de la expresión alterada de múltiples miARN con diferentes procesos de la patogénesis del cáncer gástrico debido a su influencia en procesos celulares como la formación de vasos sanguíneos (Xiangyuan et al., 2017; Yang et al., 2018; Yang et al., 2020) y la regulación de la proliferación, migración e invasión celular durante la formación del cáncer (Lu et al., 2019; Xie et al., 2019).

El miR-198 ha sido identificado en tipos de cáncer como un supresor tumoral con un significativo potencial terapéutico, incluido el cáncer gástrico (Gu et al., 2019; Y. Zhang et al., 2017). La regulación negativa del miR-198 se ha asociado con la progresión del cáncer gástrico, donde desempeña un papel crucial en la inhibición de la proliferación celular por la regulación génica de dianas celulares (Gu et al., 2019). Asimismo, el miR-198 ha demostrado ser un objetivo efectivo en terapias génicas que utilizan ARN circulares (ARNcirc) como esponjas de reguladores negativos de su expresión (Huang et al., 2019). Además, presenta una correlación inversa entre la expresión del miR-198 y las características clinopatológicas agresivas en cáncer gástrico, refuerza aún más su relevancia como potencia agente terapéutico (Cui et al., 2016).

1.2. Justificación

El cáncer gástrico corresponde al quinto tipo de cáncer con mayor incidencia y al cuarto con mayor mortalidad (Morgan et al., 2022). La principal forma de abordaje de esta enfermedad corresponde a la gastrectomía y la quimioterapia, la cual mejora la supervivencia (Machlowska et al., 2020). Sin embargo, el riesgo de generar resistencia es una de las principales causas de fracaso en tratamiento (Biagioni et al., 2019), siendo crucial el desarrollo de nuevas terapias más eficientes que permitan hacer frente a esta situación.

Ante la necesidad de nuevas alternativas para tratamientos contra el cáncer, el uso de ácidos nucleicos como opción terapéutica contra el cáncer se ha posicionado como una estrategia alternativa en los últimos años (Gupta et al., 2021). En caso particular de los miARNs, se han estudiado en prácticamente todos los tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas (Chadda et al., 2022), asociándose con los procesos de iniciación, promoción y progresión tumoral, siendo, por tanto, moléculas clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer (Chadda et al., 2022; Mirzaei & Hamblin, 2020; Shirjang et al., 2019). Además, presentan la capacidad de bloquear sitios de diferenciación celular y control de apoptosis (Montaño-Samaniego et al., 2020; Shirjang et al., 2019). Por lo que están presentes en varias funciones celulares que pueden ser objetivo para terapia génica.

Los miARN son elementos muy heterogéneos, que interactúan con una amplia variedad de elementos genéticos, como los ADN reguladores, transcritos codificantes y no codificantes e incluso directamente con proteínas (Dragomir et al., 2020). Esta versatilidad los convierte en una herramienta muy dinámica para la búsqueda de tratamientos potencial contra el cáncer, ya que participan en la regulación de expresión génica, crecimiento y expansión del microambiente tumoral (Dragomir et al., 2020, Zeng, et al., 2022).

Se ha observado que el miR-198 está regulado a la baja en distintos tipos de cáncer en comparación con tejido normal, esta reducción contribuye a una mayor agresividad del cáncer. En cáncer de próstata ante un incremento del miR-198 de forma exógena se genera una supresión significativa, reduciendo la tumorigenicidad (Ray et al., 2019). En el cáncer gástrico se ha demostrado que está correlacionado negativamente con los hallazgos distintivos del

cáncer, o "hallmarks" como se denominan en inglés. Asimismo, se ha observado que el cisplatino (CDDP) y el paclitaxel (PTX), dos de los tratamientos predominantes para el cáncer gástrico, generan resistencia a través de un ARN circular (circAKT3 y circPLEC, respectivamente), que actúan como esponja del miR-198 (Huang et al., 2019, Zhou et al., 2021).

Debido al potencial del miR-198 como agente terapéutico contra el cáncer, esta investigación pretende evaluar su perfil de acción en dos líneas celulares de cáncer gástrico y determinar su viabilidad como una posible terapia génica contra esta enfermedad.

1.3. Planteamiento del problema

El cáncer gástrico es una de las enfermedades más comunes a nivel mundial, caracterizada por una baja tasa de detección y una gran cantidad de factores de riesgo. La búsqueda de alternativas para su tratamiento ha sido uno de los principales focos de investigación, y el uso de terapias génicas ha resultado revolucionario. Ante esta situación, surge la pregunta: ¿Puede el Hsa-miR-198 influir en la proliferación, migración e invasión celular en dos tipos de líneas celulares de cáncer gástrico?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Establecer el perfil de eficacia *in vitro* del Hsa-miR-198 en dos líneas celulares derivadas de cáncer gástrico humano mediante ensayos funcionales como parte de los requerimientos científicos necesarios para su desarrollo como potencial agente terapéutico.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de dos líneas celulares derivadas de cáncer gástrico humano para la transfección con material genético exógeno mediante ensayos de fluorescencia.
- Determinar la eficacia *in vitro* del Hsa-miR-198 en dos líneas celulares derivadas de cáncer gástrico humano mediante ensayos de viabilidad celular.
- Determinar la eficacia *in vitro* del Hsa-miR-198 en dos líneas celulares derivadas de cáncer gástrico humano mediante ensayos de migración e invasión celular.

2. Marco metodológico

2.1. Área de estudio

El Trabajo Final de Graduación se llevó a cabo en la empresa Speratum CR, ubicada en Geroma, Pavas, San José, Costa Rica.

2.2. Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer gástrico AGS (CRL-1739, ATCC) y KATO III (HTB-103, ATCC) se establecieron con los medios de cultivo RPMI (Sigma Aldrich) y F-12K (Sigma Aldrich) respectivamente. Ambos medios de cultivo se suplementaron con 10 % de FBS (Sigma Aldrich), 1 % de Antibiótico Antimicótico (Sigma Aldrich) y Penicilina Estreptomicina (Sigma Aldrich). Se incubaron a una temperatura de 37 °C con un ambiente de 5 % de CO₂. Estas condiciones se mantuvieron tanto durante el mantenimiento celular como en cada uno de los ensayos. (Zhang et al., 2020).

2.3. Transfección celular

Las líneas celulares de cáncer gástrico fueron transfectadas por medio de un vector de expresión de una proteína verde fluorescente (pHMGFP, Promega) para la verificación de la transfección de ambas líneas celulares, posteriormente se utilizó el Hsa-miR-198 (miR-198, Bio-Syntesis) y el Hsa-miR-239 como control negativo (miR-NC, Bio-Syntesis). Se sembraron las células en placas de 96 pozos con medio de cultivo OptiMEM, 24 horas después fueron transfectadas con 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos usando el reactivo de transfección comercial Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo del fabricante (Thermo

Fisher Scientific, 2016). Después de 24 horas, las células se colectaron para ser usadas en los respectivos ensayos.

2.4. Determinación de transfectabilidad

Las líneas celulares AGS y KATO III se sembraron en una placa de 96 pozos y 24 horas después se transfectaron con 500 ng del plásmido pHMGFP, usando Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher). Se incubaron las placas a 37 °C con 5 % de CO₂. Posterior a las 24 horas de la transfección, se tiñeron los núcleos celulares con 5 µL de la solución de Hoeschst 33342 (Thermo Fisher) durante 20 min y se procedió a analizar las placas al microscopio invertido de fluorescencia (Evos M5000, Thermo Fisher Scientific); se tomaron fotos con el cubo de luz GFP (Ex; 470/22 nm; Em; 510/42 nm), el cubo de luz DAPI (Ex: 358/44 nm; Em: 447/60 nm) y luz transmitida. Por medio de la herramienta de análisis de imágenes ImageJ 1.8.0_345 (National Institutes of Health, USA) fue determinado cuantitativamente el nivel de fluorescencia celular post-transfección celular y la cantidad de células totales, mediante la tinción de núcleos con Hoeschst, para contrastar la cantidad de células transfectadas con GFP con la siguiente fórmula (1).

$$\text{Células totales transfectadas} = \left(\frac{\text{Células MGFP positivas}}{\text{Células Hoescht positivas}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.5. Proliferación celular

En placas de 96 pocillos, se sembraron por quintuplicado células con cada uno de los tratamientos transfectados con miR-198 y miR-NC, además de un control negativo sin tratamiento (UT) y un control blanco sin contenido celular, se mantuvo a una temperatura de 37°C y 5 % de CO₂. La placa se evaluó a 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Se utilizó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTS) para cada lectura y fue

analizado en un lector de placas (Biotek H1, Agilent) a una longitud de onda de 490 nm, según el protocolo del reactivo (Promega, 2022).

2.6. Migración e invasión celular

2.6.1. Cicatrización de herida

Se demarcaron placas de 24 pozos con líneas guía (Figura 1), posteriormente las placas se sembraron con un total de 75 000 células para la línea celular AGS y 100 000 células para KATO III y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, fueron transfectados con los tratamientos miR-198 y miR-NC. Después de una incubación de 24 horas, se agregó un volumen de 5 μ L de la solución de Hoeschst 33342 durante 20 min. Se realizaron tres heridas sobre la monocapa con una punta de micropipeta para generar un área donde observar el movimiento celular (Figura 1). Se evaluó el cierre de la herida durante un período de 24, 48, 72 y 96 horas, las fotos fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Evos M5000), mediante el cubo de luz transmitida y el cubo de luz DAPI (Ex: 357/44 nm, Em: 447/60 nm). Con la herramienta de análisis de imágenes ImageJ 1.8.0_345 (National Institutes of Health, USA) fue determinado el área total y de la herida posterior a la transfección celular de cada uno de los tratamientos, fue calculado el porcentaje de cicatrización según la fórmula (2).

$$\% \text{ de cicatrización} = \left(\frac{A_t - A_h}{A_t} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde A_t es el área total y A_h el área de la herida.

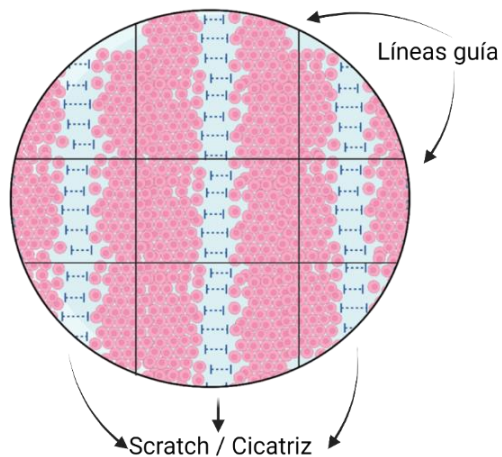


Figura 1. Esquema de las tres “heridas” sobre la monocapa con una punta de micropipeta realizada en cada uno de los pozos para el ensayo de cicatrización celular.

2.6.2. Cámaras de Boyden

En una placa de 6 pozos se sembró una total de 150 000 células en AGS y 200 000 células en KATO III, con el correspondiente medio para el crecimiento de ambas líneas celulares. Posterior a las 24 horas de incubación, se trasladaron en una placa Transwell de 24 pozos (Corning) con una membrana porosa del inserto de 8 μm , en donde fueron sembradas con una confluencia de 50 000 células para la línea celular AGS y 100 000 células de KATO III con 200 mL de OptiMEM, con el fin de generar una abstinencia de FBS. Por debajo del inserto, se agregó un volumen de 600 mL del medio correspondiente a cada línea celular, con un 20 % de FBS extra para favorecer la migración por atracción química. Se evaluó a las 24 y 42 horas, por medio de imágenes de microscopía y la lectura fluorescente con la tinción de 600 μL calceína-AM (Calbiochem) en el lector de placas (Biotek H1, Agilent) a una longitud de onda de 495 nm para determinar la migración celular. Se realizaron dos lecturas (Lectura 1: Absorbancia células totales (Abs_{totales}) y Lectura 2: Absorbancia células migradas (Abs_{migradas})). Se calcularon los valores y proporciones delta por medio de la siguiente fórmula para determinar la migración celular (3).

$$\text{Migración celular} = \frac{Abs_{migradas}}{Abs_{totales}} \times 100 \quad (3)$$

2.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se hicieron mediante el paquete estadístico SPSS Statistics v23.0, IBM, Armonk, NY, EE. UU. Los parámetros de normalidad y homogeneidad de la varianza se estimaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se estimaron por medio de t de Student o ANOVA en el caso de datos paramétricos, y la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis en el caso de datos no paramétricos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

3. Resultados

Transfección celular

Se evaluó la capacidad de transfección de agentes exógenos en ambas líneas celulares por medio de la inserción de un plásmido con la proteína verde fluorescente (pHMGFP). Como se muestra en las Figuras 2 y 3, la transfección fue efectiva para ambas líneas celulares. Esto se corroboró mediante la tinción nuclear con Hoechst para cuantificar la cantidad de células, donde se observó un porcentaje de transfección del 45 % en AGS y del 79 % en KATO III, respectivamente (Cuadro 1).

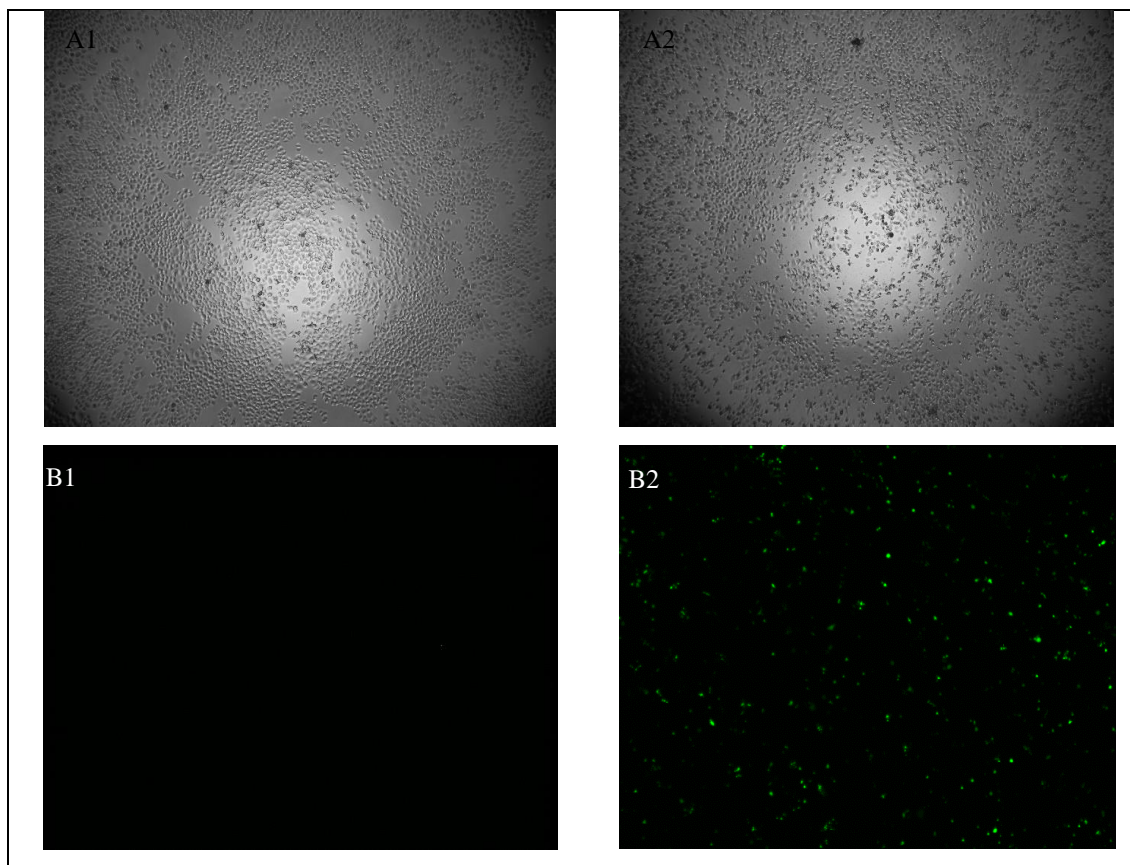


Figura 2. Transfección celular por medio de vector de expresión de la proteína verde fluorescente (pHMGFP) en la línea celular AGS. A1: control negativo con luz transmitida y A2: vector de transfección con luz transmitida; B1: control negativo con cubo de luz GFP (Ex: 470/22 nm; Em: 524/34 nm) y B2: vector de transfección con cubo de luz GFP.

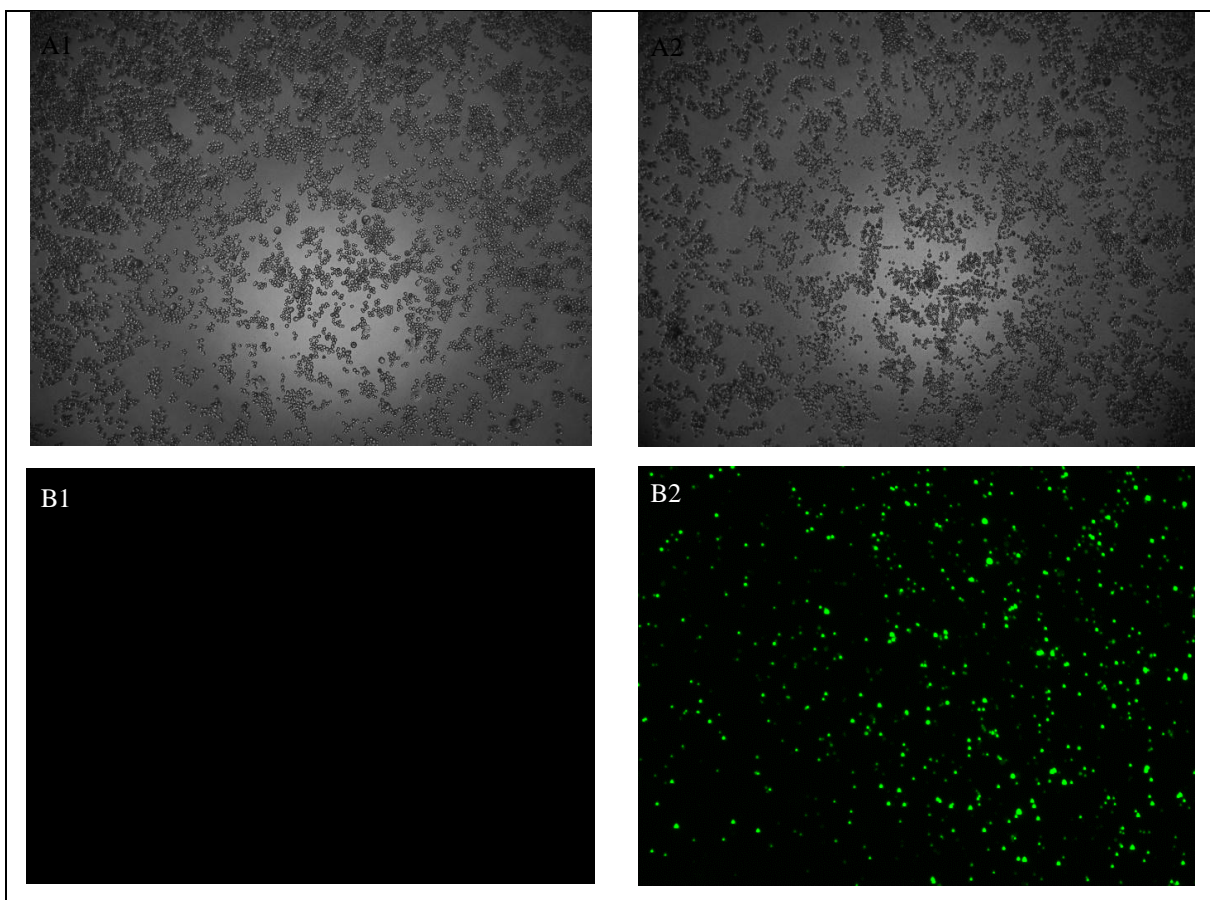


Figura 3. Transfección celular por medio vector de expresión de la proteína verde fluorescente GFP fluorescente (phMGFP) en la línea celular KATO III. A1: control negativo con luz transmitida y A2: vector de transfección con luz transmitida; B1: control negativo con cubo de luz GFP (Ex: 470/22 nm; Em: 524/34 nm) y B2: vector de transfección con cubo de luz GFP.

Cuadro 1. Cantidad de células post transfección con phMGFP en dos líneas celulares de cáncer gástrico

| Variable | Fluorescencia | Cantidad | |
|-------------------------------------|------------------|----------|----------|
| | | AGS | KATO III |
| Tinción Hoechst | Cubo de luz DAPI | 723 | 723 |
| Células GFP positivas | Cubo de luz GFP | 322 | 575 |
| Porcentaje de células transfectadas | | 44.5% | 79.5% |

Proliferación celular

Se evaluó el efecto *in vitro* de la transfección de miR-198 sobre la capacidad de proliferación de las líneas celulares por medio del ensayo del reactivo MTS. En la Figura 4, se observa la regulación de miR-198 sobre las células transfectadas, las cuales reflejaron diferencias significativas, según la prueba t de Student, durante un período de 48 horas para el caso de la línea celular AGS y 24 horas en KATO III.

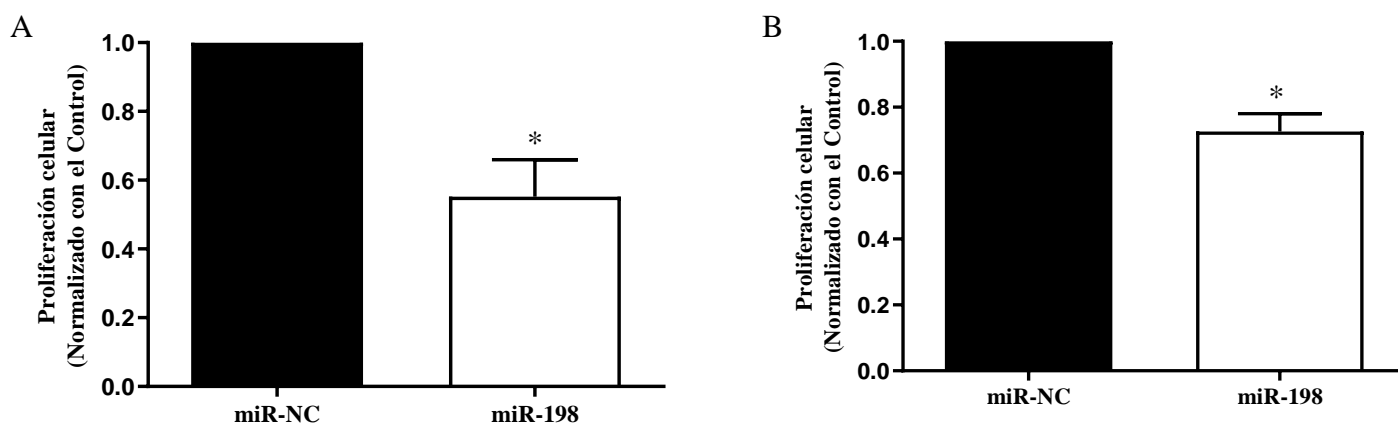


Figura 4. Efecto significativo del miR-198 en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de gástrico. A: Cambio en la viabilidad celular 48 horas post transfección en la línea celular AGS. B: Cambio en la viabilidad celular 24 horas post transfección en la línea celular KATO III. El análisis estadístico se realizó por medio de t de Student. * $p < 0.05$

Migración celular

Se evaluó la migración mediada por un quimioatrayente (20% de FBS) en células transfectadas con miR-198 en ambas líneas celulares de cáncer gástrico, la tinción con Calceína permitió medir la fluorescencia de aquellas células migradas, para la línea celular AGS, la migración reflejó una tendencia en la reducción, con un 7.31% con respecto al control no significativa según la prueba estadística t de Student (Figura 5). En el caso de la línea celular

KATO III, en las réplicas realizadas de dicho ensayo no se obtuvo una diferencia en la migración (Datos no mostrados).

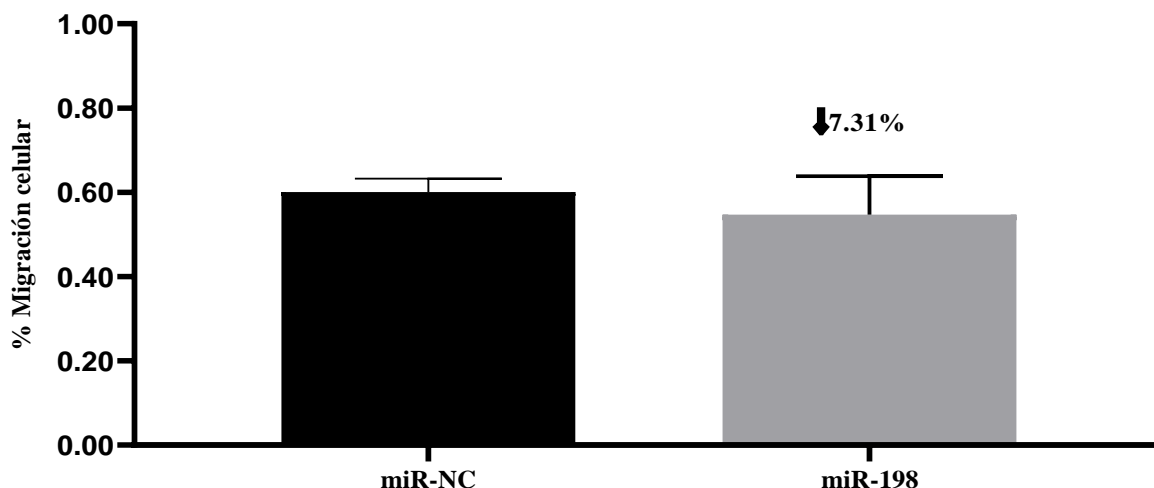


Figura 5. Efecto de miR-198 en la migración de la línea celular de cáncer de gástrico AGS durante un período de 24 horas según la prueba de tinción con calceína.

Invasión celular

Se evaluó el efecto del miR-198 sobre la capacidad celular de migrar ante la generación de una “herida” por medio de los ensayos de cicatrización durante un período de 72 horas, en donde se observó un efecto al disminuir la migración celular en las células transfectadas con miR-198. Como se muestra en el Cuadro 2, el porcentaje de cicatrización con el tratamiento control fue de 94%, sin embargo, el tratamiento del miR-198 presentó una disminución en el proceso de invasión, resultando en un 69% de cicatrización como se muestra en la Figura 6. En el caso de la línea celular KATO III, no presentó resultados debido a que no se pudo realizar los ensayos de esta sección por la complejidad híbrida de la línea celular.

Cuadro 2. Cicatrización en la línea celular AGS posterior a las 72 horas.

| Tratamiento | Área total (cm) | Área de la herida (cm) | Tiempo de exposición | % Cicatrización |
|-------------|-----------------|------------------------|----------------------|-----------------|
| miR-NC | 11.234 | 5.585 | 0h | -- |
| | 11.775 | 0.6248 | 72h | 94.7% |
| miR-198 | 11.237 | 5.799 | 0h | -- |
| | 12.004 | 3.680 | 72h | 69.3% |

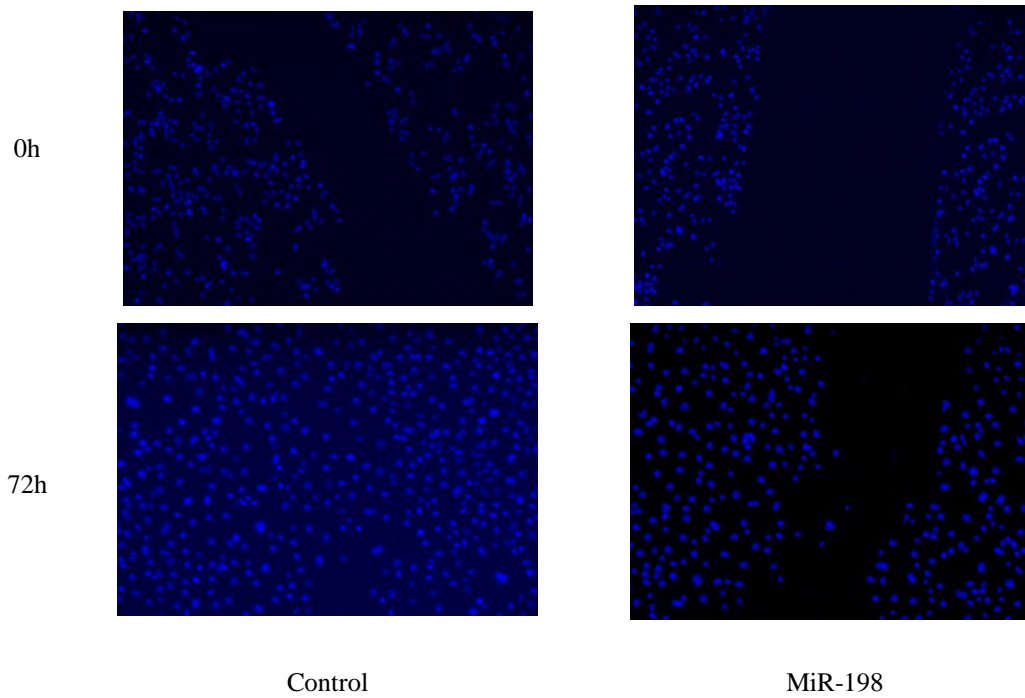


Figura 6. Efecto de miR-198 en la invasión de la línea celular de cáncer de gástrico AGS.

4. Discusión

Las terapias genéticas, como los miARN, han captado la atención al ser parte de cadenas de regulación genética en procesos de expresión postranscripcional y señalización en diversas enfermedades, con una influencia directa en procesos celulares (Ghafouri-Fard et al., 2020; Shah & Shah, 2020). Para el Hsa-miR-198 se ha reportado su expresión anómala en una amplia variedad de tipos de cáncer, donde mantiene una expresión irregular negativa (Wang et al., 2022). La restitución o el uso terapéutico dirigido de Hsa-miR-198 podría representar una estrategia alternativa en el tratamiento del cáncer gástrico, ofreciendo un enfoque más específico y potencialmente menos invasivo que las terapias tradicionales.

En la presente investigación se evaluó la capacidad de transfección de células carcinogénicas gástricas con material exógeno, en donde se comprobó la viabilidad de la transfección celular en ambas líneas celulares estudiadas, bajo condiciones estables, utilizando un vector de expresión de una proteína verde fluorescente en las líneas celulares AGS y KATO III. Diversos estudios han demostrado que estas líneas son transfectables utilizando nanopartículas como Lipofectamina 2000/3000 en estudios de viabilidad y apoptosis celular (Lin et al., 2019; Streleckiene et al., 2020; Yin et al., 2019), además se ha confirmado la estabilidad de las cargas al formularse con moléculas lipídicas junto a agentes como ADN, ARNm y miRs en condiciones *in vitro* reflejando un envío completo del agente de interés para este tipo de pruebas celulares (Fus-Kujawa et al., 2021).

Para determinar la eficacia *in vitro* del Hsa-miR-198 en las líneas de cáncer gástrico, se utilizaron tres factores principales. Primero, la viabilidad celular fue evaluada mediante la exposición al miR-198, y se midió la cantidad de células vivas tras la sobreexpresión del miR-198 utilizando el reactivo MTS. Segundo, se analizó la invasión celular para evaluar la influencia del Hsa-miR-198 en dianas celulares asociadas con la cicatrización de la monocapa celular durante un período determinado, comparando los efectos del Hsa-miR-198 y el miR-NC. Por último, el ensayo en cámara de Boyden se utilizó para determinar la capacidad del Hsa-miR-198 de interferir en procesos de migración celular, empleando una placa tipo Transwell con un atrayente químico para potenciar la atracción celular.

El perfil de eficacia del Hsa-miR-198 en la línea celular AGS reflejó un impacto significativo en las tres variables celulares analizadas. La tasa de crecimiento se redujo con la presencia del miR-198, mostrando una diferencia notable en la viabilidad celular, indicando una influencia en procesos asociados a la proliferación celular, similar a lo presentado por Quan et al (2018) mediante absorbancia con el reactivo MTS en células de cáncer renal bajo condiciones similares (Yuan et al., 2021). Además, la migración celular reflejó una tendencia al disminuir su capacidad, concordando con lo reportado por Zheng et al. (2022), donde se observa una reducción en la migración e invasión celular al inhibir la expresión de un ARNcirc asociado con la regulación de la expresión del Hsa-miR-198 y su influencia en estos procesos celulares, de la misma forma en los ensayos de invasión celular, la expresión del Hsa-miR-198 en la “herida” disminuyó la cicatrización del área total con una única exposición, este mismo comportamiento ha sido también reportado con el Hsa-miR-198 en varios tipos de cáncer, como pulmón (Jin et al., 2021) y ovario (Xiao et al., 2021).

La intervención del miR-198 en la línea celular AGS puede afectar múltiples dianas celulares, ya que estas están alteradas en las células cancerígenas. (Gu et al., 2019; Huang et al., 2023). Dentro de las cuales, se pueden destacar los receptores Toll-Like 4 (Jin et al., 2021), la ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR (Amaravadi et al., 2019) y los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (Kim et al., 2019; J. Zhang et al., 2019). Están relacionados con la inhibición de procesos de invasión y metástasis por la señalización del receptor TL4, evitando una estimulación crónica por otros agentes que pueden sobreexpresar factores de necrosis tumoral y el factor NF- κ B que promueven el desarrollo del cáncer (Li et al., 2023; Sameer & Nissar, 2021). Asimismo, el miR-198 cumple como sustrato directo para los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) que se encuentran sobreexpresados en cáncer, desencadenando rutas transcripcionales que impulsan la tumorigénesis, como la PI3K/AKT/mTOR (Gu et al., 2019), en donde el miR-198 es objetivo directo de la proteína P13K (Zheng et al., 2021) manteniendo la estabilidad metabólica, crecimiento celular (Unni & Arteaga, 2019) y autofagia (Amaravadi et al., 2019; Zou et al., 2020). Debido a mutaciones en estas rutas celulares, se promueve la metástasis en el cáncer gástrico. (Fattahi et al., 2020).

Por el contrario, la línea celular KATO III, al aplicar el tratamiento del Hsa-miR-198 reflejó un menor impacto en las variables analizadas. El factor del crecimiento celular sufrió

una reducción en la viabilidad celular a las 24 horas, sin embargo, el crecimiento continuó durante el período analizado, además en los ensayos de migración e invasión celular no se reflejó afectación con la expresión del miR-198, este comportamiento anti-proliferativo, sin afectar procesos celulares como migración e invasión se ha observado en otros estudios con distintos miR en la misma línea celular (Baghbanzadeh et al., 2022; Luo et al., 2021).

A diferencia de la línea celular AGS, la línea celular KATO III presenta una fase metastásica más avanzada, con características más agresivas en los procesos de proliferación e invasión celular (Tapia, 2022). Esta línea celular tiene la capacidad de adherirse a estructuras celulares y, al mismo tiempo, permanecer en suspensión. Estas características la clasifican como un cáncer agresivo debido a su capacidad proliferativa, migratoria e invasiva, tal como se refleja en los tratamientos analizados. La inconsistencia de resultados entre líneas celulares puede derivarse por la complejidad molecular de cada una, incluyendo variables genéticas y epigenéticas presentes en cada línea celular. Por lo tanto, es necesario un análisis genético más profundo para determinar con mayor precisión la función y concentración del microARN específico en la línea celular KATO III, para la identificación de las posibles dianas celulares que están involucradas en estos procesos celulares (Baghbanzadeh et al., 2022).

Durante el estudio se demostró que el miR-198 influye en procesos de proliferación, migración e invasión celular. Estos resultados sugieren que el Hsa-miR-198 tiene una aplicabilidad viable como agente terapéutico anticancerígeno en cáncer gástrico. Es necesario continuar con estudios de caracterización para determinar su influencia en genes específicos, lo que permitirá un mayor entendimiento de su potencial.

5. Conclusiones

La transfección celular con complejos de nanopartículas lipídicas en ambas líneas celulares de cáncer gástrico resultó efectiva para estudios posteriores con los microARN de interés, al verificarse mediante un vector de expresión de una proteína verde fluorescente.

El Hsa-miR-198 demostró su capacidad para reducir la viabilidad, migración e invasión celular en la línea celular AGS, lo cual puede asociarse con varias dianas celulares, incluyendo los receptores Toll-Like 4 (TL4), la ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR y los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Este efecto también se ha observado en otros tipos de cáncer, como el de pulmón y ovario.

En la línea celular KATO III, el Hsa-miR-198 tuvo un impacto menor, reduciendo la viabilidad celular a las 24 horas, pero sin afectar significativamente la migración e invasión celular. Este comportamiento es consistente con otros estudios que reportan características más agresivas y una fase metastásica avanzada en la línea celular.

Las diferencias entre las líneas celulares AGS y KATO III pueden deberse a su complejidad molecular, incluyendo variables genéticas y epigenéticas.

Estos hallazgos subrayan el potencial del Hsa-miR-198 como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer gástrico, destacando su capacidad para influir en la reducción de la migración e invasión celular a través de múltiples dianas celulares y rutas de señalización. Esto sugiere un potencial terapéutico hacia una estrategia efectiva y menos invasiva para el tratamiento del cáncer gástrico.

6. Recomendaciones

- Realizar análisis genéticos exhaustivos como RT-qPCR, para identificar las dianas celulares implicadas en estos procesos celulares.
- Llevar a cabo estudios de caracterización de genes específicos asociados con el miR-198, con el fin de determinar con mayor precisión su potencial terapéutico.
- Incluir el análisis de otras variables celulares como ensayos de apoptosis celular o migración por medio de Matrigel o kits de ensayos de migración e invasión, en la línea celular KATO III para evaluar su interacción con el miR-198 y su influencia en los procesos tumorigénicos.
- Evaluar los procesos celulares mediante diferentes metodologías complementarias permite un mejor entendimiento y variabilidad en los comportamientos celulares al trabajar en condiciones *in vitro*.

7. Fuente de financiamiento

El financiamiento para la realización del Trabajo Final de Graduación fue proporcionado en su totalidad por la empresa SPERATUM CR.

8. Conflicto de interés

Esta tesis se realizó en el marco de una pasantía en Speratum Biopharma, Inc., empresa enfocada en terapias basadas en miARNs. Speratum financió esta investigación sin influir en el diseño del estudio, la recopilación, análisis e interpretación de datos, la redacción del documento ni la presentación de resultados. Asimismo, el autor no posee beneficios financieros ni derechos de propiedad intelectual relacionados con esta investigación.

9. Bibliografia

- Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., Backes, C., Galata, V., Minet, M., Hart, M., Abu-Halima, M., Grässer, F. A., Lenhof, H. P., Keller, A., & Meese, E. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3353–3364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz097>
- Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., & Debnath, J. (2019). Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions. In *Cancer Discovery* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1167–1181). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0292>
- Baghbanzadeh, A., Baghbani, E., Hajiasgharzadeh, K., Noorolyai, S., Khaze, V., Mansoori, B., Shirmohamadi, M., Baradaran, B., & Mokhtarzadeh, A. (2022). microRNA-193a-5p Suppresses the Migratory Ability of Human KATO III Gastric Cancer Cells through Inhibition of Vimentin and MMP-9. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 12(1), 169–175. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.018>
- Biagioni, A., Skalamera, I., Peri, S., Schiavone, N., Cianchi, F., Giommoni, E., Magnelli, L., & Papucci, L. (2019). Update on gastric cancer treatments and gene therapies. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 38, Issue 3, pp. 537–548). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09803-7>
- Chadda, K. R., Blakey, E. E., Coleman, N., & Murray, M. J. (2022). The clinical utility of dysregulated microRNA expression in paediatric solid tumours. In *European Journal of Cancer* (Vol. 176, pp. 133–154). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.09.010>
- Cui, Z., Zheng, X., & Kong, D. (2016). Decreased miR-198 expression and its prognostic significance in human gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0784-x>
- Dragomir, M. P., Kopetz, S., Ajani, J. A., & Calin, G. A. (2020). Non-coding RNAs in GI cancers: From cancer hallmarks to clinical utility. In *Gut* (Vol. 69, Issue 4, pp. 748–763). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318279>

- Fattahi, S., Amjadi-Moheb, F., Tabaripour, R., Ashrafi, G. H., & Akhavan-Niaki, H. (2020). PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond. In *Life Sciences* (Vol. 262). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118513>
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., & Sieron, A. L. (2021). An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells *in vitro*. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701031>
- Ghafouri-Fard, S., Vafaee, R., Shoorei, H., & Taheri, M. (2020). MicroRNAs in gastric cancer: Biomarkers and therapeutic targets. In *Gene* (Vol. 757). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144937>
- Gu, J., Li, X., Li, H., Jin, Z., & Jin, J. (2019a). MicroRNA-198 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly suppressing FGFR1 in gastric cancer. *Bioscience Reports*, 39(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20181258>
- Gu, J., Li, X., Li, H., Jin, Z., & Jin, J. (2019b). MicroRNA-198 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly suppressing FGFR1 in gastric cancer. *Bioscience Reports*, 39(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20181258>
- Gupta, A., Andresen, J. L., Manan, R. S., & Langer, R. (2021). Nucleic acid delivery for therapeutic applications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 178). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113834>
- Guzman, P., Calderon, A., & Murphy, J. D. (n.d.). *An overview of the epidemiology of cancer in Costa Rica up to 2020*. <https://ssrn.com/abstract=4366141>
- Huang, X., Li, Z., Zhang, Q., Wang, W., Li, B., Wang, L., Xu, Z., Zeng, A., Zhang, X., Zhang, X., He, Z., Li, Q., Sun, G., Wang, S., Li, Q., Wang, L., Zhang, L., Xu, H., & Xu, Z. (2019). Circular RNA AKT3 upregulates PIK3R1 to enhance cisplatin resistance in gastric cancer via miR-198 suppression. *Molecular Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0969-3>
- Huang, X., Ma, Z., & Qin, W. (2023). Screening and Bioinformatics Analyses of Key miRNAs Associated with Toll-like Receptor Activation in Gastric Cancer Cells. *Medicina (Lithuania)*, 59(3). <https://doi.org/10.3390/medicina59030511>
- INEC. (2021). *Estadísticas Vitales 2020 POBLACIÓN, NACIMIENTOS DEFUNCIONES Y MATRIMONIOS*.

- Jin, W., Shu, Y., Wang, X., Lu, S., & Shi, H. (n.d.-a). MicroRNA 198 Inhibits Invasion and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting Toll-Like Receptor 4. In *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 758). www.ijpsonline.com
- Jin, W., Shu, Y., Wang, X., Lu, S., & Shi, H. (n.d.-b). MicroRNA 198 Inhibits Invasion and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting Toll-Like Receptor 4. In *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 758). www.ijpsonline.com
- Joshi, S. S., & Badgwell, B. D. (2021). Current treatment and recent progress in gastric cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 264–279. <https://doi.org/10.3322/caac.21657>
- Kim, H. S., Kim, J. H., & Jang, H. J. (2019). Pathologic and prognostic impacts of FGFR2 amplification in gastric cancer: A meta-analysis and systemic review. *Journal of Cancer*, 10(11), 2560–2567. <https://doi.org/10.7150/jca.29184>
- Li, D., Zhu, L., Wang, Y., Zhou, X., & Li, Y. (2023). Bacterial outer membrane vesicles in cancer: Biogenesis, pathogenesis, and clinical application. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 165). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115120>
- Li, K., Zhang, A., Li, X., Zhang, H., & Zhao, L. (2021). Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1876, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188615>
- Lin, J., Shen, J., Yue, H., & Cao, Z. (2019). MiRNA-183-5p.1 promotes the migration and invasion of gastric cancer AGS cells by targeting TPM1. *Oncology Reports*, 42(6), 2371–2381. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7354>
- Lu, Q., Wu, R., Zhao, M., Garcia-Gomez, A., & Ballestar, E. (2019). miRNAs as Therapeutic Targets in Inflammatory Disease. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 40, Issue 11, pp. 853–865). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.09.007>
- Luo, H., Yi, T., Huang, D., Chen, X., Li, X., Wan, Q., Huang, H., Huang, H., Wei, H., Song, Y., Que, T., Hu, R., Huang, H., Luo, K., Li, C., Qin, C., Zheng, C., Lan, C., Chen, W., ... Luo, Q. (2021). circ_PTN contributes to -cisplatin resistance in glioblastoma via PI3K/AKT signaling through the miR-542-3p/PIK3R3 pathway. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 26, 1255–1269. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.034>
- Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020). Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies.

- In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21114012>
- Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). Regulation of Glycolysis by Non-coding RNAs in Cancer: Switching on the Warburg Effect. In *Molecular Therapy - Oncolytics* (Vol. 19, pp. 218–239). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.10.003>
- Montaño-Samaniego, M., Bravo-Estupiñan, D. M., Méndez-Guerrero, O., Alarcón-Hernández, E., & Ibáñez-Hernández, M. (2020). Strategies for Targeting Gene Therapy in Cancer Cells With Tumor-Specific Promoters. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.605380>
- Morgan, E., Arnold, M., Constanza Camargo, M., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H. A., Er^ Ome Vignat, J., Laversanne, M., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2022a). *The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Morgan, E., Arnold, M., Constanza Camargo, M., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H. A., Er^ Ome Vignat, J., Laversanne, M., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2022b). *The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Quan, X.-Q., Xie, Z.-L., Ding, Y., Feng, R., Zhu, X.-Y., & Zhang, Q.-X. (2018). *miR-198 regulated the tumorigenesis of gastric cancer by targeting Toll-like receptor 4 (TLR4)*.
- Ray, J., Hoey, C., Huang, X., Jeon, J., Taeb, S., Downes, M. R., Boutros, P. C., & Liu, S. K. (2019). MicroRNA-198 suppresses prostate tumorigenesis by targeting MIB1. *Oncology Reports*, 42(3), 1047–1056. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7234>
- Sameer, A. S., & Nissar, S. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. In *BioMed Research International* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/1157023>
- Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Issue 4, pp. 1179–1203). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09925-3>

- Shah, V., & Shah, J. (2020). Recent trends in targeting miRNAs for cancer therapy. In *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 72, Issue 12, pp. 1732–1749). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jphp.13351>
- Shirjang, S., Mansoori, B., Asghari, S., Duijf, P. H. G., Mohammadi, A., Gjerstorff, M., & Baradaran, B. (2019). MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 139, pp. 1–15). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.017>
- Streleckiene, G., Inciuraite, R., Juzenas, S., Salteniene, V., Steponaitiene, R., Gyvyte, U., Kiudelis, G., Leja, M., Ruzgys, P., Satkauskas, S., Kupcinskiene, E., Franke, S., Thon, C., Link, A., Kupcinkas, J., & Skieceviciene, J. (2020). Mir-20b and mir-451a are involved in gastric carcinogenesis through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: Data from gastric cancer patients, cell lines and ins-gas mouse model. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030877>
- Tapia, R. (n.d.). *Evaluación del efecto de la fracción clorofórmica de AGS y KATO III*.
- ThermoFisher Scientific. (2016). *Lipofectamine TM 3000 Reagent Protocol Protocol Outline*. www.lifetechnologies.com/termsandconditions.
- Unni, N., & Arteaga, C. L. (2019). Is Dual mTORC1 and mTORC2 Therapeutic Blockade Clinically Feasible in Cancer? In *JAMA Oncology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 1564–1565). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2525>
- Wang, X., Zhu, Y., & Xie, Q. (2022). The promising role and prognostic value of miR-198 in human diseases. In *Am J Transl Res* (Vol. 14, Issue 4). www.ajtr.org
- Xia, J. Y., & Aadam, A. A. (2022). Advances in screening and detection of gastric cancer. In *Journal of Surgical Oncology* (Vol. 125, Issue 7, pp. 1104–1109). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jso.26844>
- Xiangyuan, Z., Jiaqiang, D., Yan, H., Ming, Z., Zhen, L., Na, W., Mingzuo, J., Zhe, Z., Gang, L., Haiming, L., Yongzhan, N., Daiming, F., & Jun, T. (2017). miR-218 inhibited tumor angiogenesis by targeting ROBO1 in gastric cancer. *Gene*, 615, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.022>

- Xiao, H., Zheng, Y., Chen, J., & She, H. (2021). MiR-198 inhibits proliferation, invasion and migration of ovarian cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Acta Biochimica Polonica*, 68(4), 673–677. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5546
- Yang, H., Zhang, H., Ge, S., Ning, T., Bai, M., Li, J., Li, S., Sun, W., Deng, T., Zhang, L., Ying, G., & Ba, Y. (2018). Exosome-Derived miR-130a Activates Angiogenesis in Gastric Cancer by Targeting C-MYB in Vascular Endothelial Cells. In *Molecular Therapy* (Vol. 26, Issue 10, pp. 2466–2475). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.023>
- Yang, L., Ying, X., Liu, S., Lyu, G., Xu, Z., Zhang, X., Li, H., Li, Q., Wang, N., & Ji, J. (2020). Gastric cancer: Epidemiology, risk factors and prevention strategies. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(6), 695–704. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.03>
- Yi, J., Li, S., Wang, C., Cao, N., Qu, H., Cheng, C., Wang, Z., Wang, L., & Zhou, L. (2019). Potential applications of polyphenols on main ncRNAs regulations as novel therapeutic strategy for cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 113). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108703>
- Yin, Y., Li, X., Guo, Z., & Zhou, F. (2019). MicroRNA-381 regulates the growth of gastric cancer cell by targeting TWIST1. *Molecular Medicine Reports*, 20(5), 4376–4382. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10651>
- Yuan, C., Su, Z., Liao, S., Li, D., Zhou, Z., Wang, Y., Quan, M., Zeng, L., Lv, C., Shen, C., Gong, W., Wu, J., Chen, X., Hu, W., Lv, X., Si, W., & Yu, X. (2021). miR-198 inhibits the progression of renal cell carcinoma by targeting BIRC5. *Cancer Cell International*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02092-7>
- Zhang, J., Tang, P. M. K., Zhou, Y., Cheng, A. S. L., Yu, J., Kang, W., & To, K. F. (2019). Targeting the oncogenic FGF-FGFR axis in gastric carcinogenesis. In *Cells* (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8060637>
- Zhang, Y., Li, M., Ding, Y., Fan, Z., Zhang, J., Zhang, H., Jiang, B., & Zhu, Y. (2017). Serum MicroRNA profile in patients with colon adenomas or cancer. *BMC Medical Genomics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s12920-017-0260-7>
- Zheng, W., Wu, C., Wu, X., Cai, Y., Liu, B., & Wang, C. (2021). Genetic variants of autophagy-related genes in the PI3K/Akt/mTOR pathway and risk of gastric cancer in the Chinese population. *Gene*, 769. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145190>

- Zheng, Y., Li, P., Ma, J., Yang, C., Dai, S., & Zhao, C. (2022). Cancer-derived exosomal circ_0038138 enhances glycolysis, growth, and metastasis of gastric adenocarcinoma via the miR-198/EZH2 axis. *Translational Oncology*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101479>
- Zhou, N., Wang, W., Xu, C., & Yu, W. (2021). Circular RNA PLEC acts as a sponge of microRNA-198 to promote gastric carcinoma cell resistance to paclitaxel and tumorigenesis. *Pathology Research and Practice*, 224. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153487>
- Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020). MTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges. In *Cell and Bioscience* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>