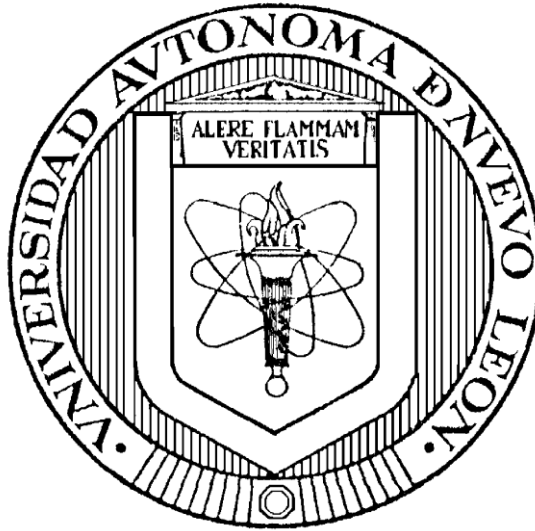


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



miR-1307-3p AFECTA LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE
LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS

POR

JOSÉ ROBERTO ESTUPIÑAN JIMÉNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA


2024

miR-1307-3p AFECTA LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE
LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS

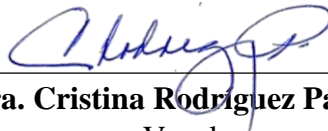
Comité de Tesis



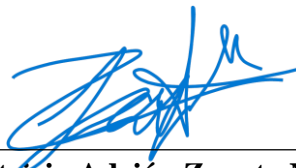
Dra. Vianey González Villasana
Director



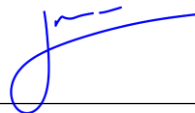
Dra. Diana Reséndez Pérez
Secretario



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal



Dr. Patricio Adrián Zapata Morín
Vocal



Dr. José Manuel Vázquez Guillén
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

miR-1307-3p AFECTA LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE
LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS

Dirección de Tesis



Dra. Vianey González Villasana
Director



Dr. Pablo E. Vivas Mejía
Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

FINANCIAMIENTO

El presente proyecto de investigación se realizó gracias al financiamiento otorgado por el “Fondo Sectorial de Investigación para la educación” CB2017-2018, del Programa Presupuestario F003 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) con clave número A1-S-45974, titulado “Efecto funcional de los miRNAs 1307 y 660 en la progresión del cáncer mamario receptor de estrógeno positivo y receptor de estrógeno negativo”, a cargo de la Dra. Vianey González Villasana.

Gracias al apoyo de The National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) Support for Research Excellence (SuRE) Program (R16) grant, 5R16GM145558-02 (PEVM), institutional seed funds from the University of Puerto Rico Comprehensive Cancer Center (PEVM), and the National Institute of General Medical Sciences-Research Training Initiative for Student Enhancement (NIGMS-RISE) Program R25-GM061838 (MFC).

Gracias a la infraestructura brindada por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Así como al apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) como becario (CVU) 893151 en el programa del Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas, a quienes me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento. En primer lugar, a la Dra. Vianey González Villasana, por ser mi directora durante este proyecto de investigación y permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Siempre confió en mí, incluso cuando yo ya no lo hacía, y por ello le estaré eternamente agradecido. Gracias a su apoyo, logré cumplir uno de mis sueños: obtener un Doctorado. A mi otro director, el Dr. Pablo Vivas, que fue un faro de luz cuando todo el proyecto parecía complicarse. Sin su ayuda y apoyo, no sé qué hubiera pasado. Le agradezco inmensamente todo el tiempo que dedicó a brindarnos su valiosa experiencia, y por permitirnos realizar una estancia en su laboratorio, la cual, aunque breve, fue sumamente enriquecedora para mi formación. A la Dra. Diana Reséndez Pérez, por ser siempre un ejemplo de liderazgo y por brindarnos su apoyo ante cualquier dificultad, ya fuera técnica o académica. Cada conversación con ella fue una experiencia invaluable para mi desarrollo. A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme formar parte del laboratorio de Inmunología y Virología. Aún recuerdo mi primera entrevista con ella para ingresar a la Maestría. Le agradezco profundamente su apoyo y consejos. Al Dr. Patricio Zapata, cuyo aporte al proyecto elevó el nivel de análisis y representación de mis datos. Aprendí mucho a su lado y estoy inmensamente agradecido por su disposición para atender mis dudas. A la Dra. Claudia Altamirano, por su valiosa ayuda y orientación en la realización de los experimentos. Al Dr. Manuel Vázquez, por su apoyo a lo largo de todo el proyecto y sus valiosos consejos desde que fui alumno de Maestría. Siempre estuvo dispuesto a escucharme cuando mis ideas no estaban claras y a brindarme valiosas sugerencias. Más que un asesor de tesis, gané un amigo. Finalmente, agradezco a mi compañera de laboratorio, Valeria Villarreal, con quien recorrí todo este camino desde el primer día. No podría haber tenido un mejor equipo de trabajo, y además, gané una amiga para toda la vida.

A muchas otras personas también les debo mi agradecimiento por haber formado parte de este proceso. Mis disculpas si he olvidado mencionar a alguien.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a la Dra. Jesica Ramírez, mi compañera de vida desde hace 11 años. Sin ti, esto simplemente no hubiera sido posible. No tengo palabras para agradecerte por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo. No imagino este largo viaje sin ti, junto a nuestras gordas, Maty y Lea. Gracias por darme una familia TE AMO.

A mis padres, Roberto Estupiñan y Teresa Jiménez, quienes siempre han estado conmigo desde que, a muy temprana edad, tuve la loca idea de ser científico. Toda mi vida les mencioné que iba a obtener un Doctorado, aunque admito que en muchas ocasiones hasta yo dudé que fuera posible. Sin embargo, gracias a ustedes, esta meta se alcanzó. Este logro es de ustedes.

A los demás integrantes de mi familia (ustedes saben quiénes son), quienes siempre han sido un pilar en todos los aspectos de mi vida, apoyándome en los momentos difíciles o regañándome cuando era necesario.

También quiero agradecer al Dr. José Luis Zacarías, por ser ese amigo que siempre está disponible para cualquier duda, consejo o plan inesperado. Gracias por tu apoyo; sé que serás un amigo para toda la vida.

Cuando inicié el Doctorado, parecía imposible, ¡pero hoy puedo decir que somos bicampeones! ¡Arriba el Atlas!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 El descubrimiento de los MicroRNAs.....	3
2.2 Biogénesis y función de los MicroRNAs	4
2.3 Biogénesis canónica	4
2.4 Biogénesis no canónica	5
2.5 Mecanismo de acción de los microRNAs	5
2.6 MiRNAs y cáncer.....	6
2.7 MiRNAs y cáncer de mama	7
2.8 Cáncer de mama	8
2.9 Progresión del cáncer de mama.....	10
2.10 Tratamiento en cáncer de mama.....	11
2.11 MiRNAs como blancos terapéuticos.....	11
2.12 MiR-1307-3p en cáncer.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1 Cultivo celular	17
6.2 Aislamiento de RNA para perfiles de expresión del miRNA.....	17
6.3 RT-qPCR del miR-1307-3p.....	18
6.4 Determinación de la concentración del inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad (MTS)	19

6.5 Transfección celular	19
6.6 Ensayo clonogénico.....	20
6.7 Ensayos de migración e invasión en placas transwell.....	20
6.8 Angiogénesis	21
6.9 Predicción de blancos de miR-1307-3p.....	21
6.10 RT-qPCR personalizada en placa.....	21
6.11 Análisis de Western blot.....	22
6.12 Ensayos de luciferasa dual	23
6.13 Análisis de los interactomas de miR-1307-3p.....	24
6.14 Correlaciones entre la expresión de blancos, la supervivencia global y la supervivencia libre de recaída	24
6.15 Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1 Aumento de los niveles de expresión del miR-1307-3p en cáncer de mama.....	26
7.2 Eficiencia de transfección del inhibidor del miR-1307-3p.....	27
7.3 Concentración del Inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad	27
7.4 Efecto del miR-1307-3p en la proliferación.....	29
7.5 El mir-1307-3p promueve la migración e invasión en cáncer de mama	30
7.6 El miR-1307-3p promueve la angiogénesis en células HUVEC.....	34
7.7 Identificación de los blancos del miR-1307-3p en cáncer de mama.....	35
7.8 Expresión de la proteína PRM2 en las líneas celulares de cáncer de mama	38
7.9 Validación de la interacción entre el miR-1307-3p y la 3'UTR del mRNA de PRM2.....	40
7.10 Vías de señalización asociadas con miR-1307-3p y PRM2	41
7.11 Asociación entre la expresión del miR-1307-3p y PRM2 con la supervivencia global y la supervivencia libre de recaída en pacientes con cáncer de mama.....	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	48
10. PERSPECTIVAS	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Blancos probables del miR-1307-3p.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Mecanismos regulatorios de los oncomiRs y tsmiRs.	8
2	Expresión del miR-1307-3p en muestras de tejido tumoral mamario.	12
3	Estructura del vector empleado para las pruebas de luciferasa dual	24
4	Niveles de expresión del miR-1307-3p en células de cáncer de mama.	26
5	Eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-1307-3p.	27
6	Determinación de la concentración de inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad.	28
7	Efecto del miR-1307-3p en la proliferación de las células MCF-7.	29
8	Efecto del miR-1307-3p en la proliferación de las células MDA-MB-231.	30
9	Efecto del miR-1307-3p en la migración de las células MCF-7.	31
10	Efecto del miR-1307-3p en la invasión de las células MCF-7.	32
11	Efecto del miR-1307-3p en la migración de las células MDA-MB-231.	33
12	Efecto del miR-1307-3p en la invasión de las células MDA-MB-231.	34
13	Efecto del miR-1307-3p en la angiogénesis de las células HUVEC.	35
14	Cambios en la expresión génica de los genes blanco del miR-1307-3p usando un inhibidor de miR-1307-3p.	38
15	Expresión de PRM2 en cáncer de mama.	39
16	Expresión de PRM2 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.	39
17	Interacción entre el miR-1307-3p y su blanco PRM2.	40

18	Relevancia clínica de la posible vía de señalización que involucra al miR-1307-3p y PRM2 en cáncer de mama.	42
----	---	----

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AGO: Argonauta.

CaMa: Cáncer de mama.

CLL: Leucemia linfocítica crónica.

EMT: Transición epitelio-mesénquima.

hEGF: Factor de crecimiento epidérmico humano.

HRP: Peroxidasa de rábano.

IPA: Ingenuity Pathways Analysis.

MiRISC: Complejo de silenciamiento inducido por miRNAs.

MiRNAs: MicroRNAs.

MREs: Elementos de respuesta a miRNAs.

OncoMir: MicroRNA con actividad oncogénica.

OS: Supervivencia global.

PRM2: Protamina humana 2.

RFS: Supervivencia libre de recaída.

shRNA: RNA de horquilla corta.

TCGA: The Cancer Genome Atlas.

TNM: Sistema tumor, nódulos linfáticos, metástasis.

tsMir: MicroRNA con actividad supresora tumoral.

UTR: Región no traducida.

RESUMEN

Introducción: A pesar de los avances en la detección y terapias disponibles contra el cáncer de mama (CaMa), sigue siendo el tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial, por lo que nuevas alternativas terapéuticas y de diagnóstico son necesarias. Los microRNAs (miRNAs) desempeñan un papel central en todos los tipos de cáncer, incluido el CaMa. El miR-1307-3p se encuentra sobreexpresado en tejido tumoral de mujeres con CaMa. Esta tesis tiene como objetivo determinar la actividad del miR-1307-3p en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis del CaMa, así como identificar posibles blancos sobre los cuales actúa el miR-1307-3p. **Métodos:** Se midieron los niveles basales de miR-1307-3p en líneas celulares de CaMa MCF-7 y MDA-MB-231, así como en las células no tumorales MCF-10A, utilizando RT-qPCR. El efecto del miR-1307-3p en la proliferación, migración e invasión de las células de CaMa se evaluó transfectando las células con un inhibidor del miR-1307-3p, mientras que el proceso de angiogénesis se evaluó en las células endoteliales HUVEC. Posteriormente, se realizó una búsqueda bioinformática en nueve bases de datos para identificar potenciales blancos del miR-1307-3p. La alteración en la expresión de estos blancos a nivel transcripcional y postranscripcional fue confirmada mediante RT-qPCR y Western blot, mientras que para validar la interacción entre el miR-1307-3p y el mRNA de PRM2 se empleó un ensayo de luciferasa dual. **Resultados:** Se encontró que el miR-1307-3p se encuentra sobreexpresado en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación con MCF-10A. La inhibición del miR-1307-3p redujo los procesos de proliferación, migración, invasión y angiogénesis, mientras que el análisis de las bases de datos reveló 17 posibles blancos del miR-1307-3p. La RT-qPCR confirmó la sobreexpresión de PRM2 después de la transfección con el inhibidor del miR-1307-3p. La variación en los niveles proteínicos de PRM2 se confirmó con Western blot y la interacción entre el miR-1307-3p y PRM2 fue validada con una prueba de luciferasa dual. **Conclusiones:** El miR-1307-3p se encuentra sobreexpresado en células de CaMa y promueve la proliferación, migración e invasión de las células de CaMa, así como la angiogénesis en células HUVEC. Además, PRM2 fue identificado como un nuevo blanco del miR-1307-3p en CaMa. Como perspectivas se tiene contemplado evaluar el efecto de inhibir PRM2 con siRNAs para ver su efecto en la progresión del cáncer de mama y escalar a un modelo murino.

ABSTRACT

Introduction: Despite advances in detection and available therapies against breast cancer (BC), it remains the most common type of cancer in women worldwide, thus new therapeutic and diagnostic alternatives are necessary. MicroRNAs (miRNAs) play a central role in all types of cancer, including BC, where the deregulation of these molecules can favor the progression of this disease. MiR-1307-3p is overexpressed in tumor tissue of women with BC compared to healthy tissue. This thesis aims to determine the activity of miR-1307-3p in the proliferation, migration, invasion, and angiogenesis of BC, as well as to identify possible targets on which miR-1307-3p acts. **Methods:** Baseline levels of miR-1307-3p were measured in BC cell lines MCF-7 and MDA-MB-231, as well as in non-tumoral mammary tissue cells MCF-10A, using RT-qPCR. The effect of miR-1307-3p on proliferation, migration, and invasion in BC cells was evaluated by transfecting the cells with a miR-1307-3p inhibitor, while the angiogenesis process was evaluated in HUVEC endothelial cells. Subsequently, a bioinformatic search was performed in nine databases to identify potential targets of miR-1307-3p. Alteration in the expression of these targets at the transcriptional and post-transcriptional levels was confirmed by RT-qPCR and Western blot, while the interaction between miR-1307-3p and PRM2 mRNA was validated using a dual-luciferase assay. **Results:** It was found that miR-1307-3p is overexpressed in the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines compared to the MCF-10A cell line. Inhibition of miR-1307-3p reduced the processes of proliferation, migration, invasion, and angiogenesis, while database analysis revealed 17 possible targets of miR-1307-3p. RT-qPCR confirmed the overexpression of PRM2 after transfection with the miR-1307-3p inhibitor. The variation in protein levels of PRM2 was confirmed by Western blot, and the interaction between miR-1307-3p and PRM2 was validated with a dual-luciferase assay. **Conclusions:** miR-1307-3p is overexpressed in BC cells and promotes proliferation, migration, and invasion, as well as angiogenesis in HUVEC cells. Additionally, PRM2 was identified as a new target of miR-1307-3p in BC. As future perspectives, it is planned to evaluate the effect of inhibiting PRM2 with siRNAs to observe its impact on BC progression and to scale up to a murine model

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de las mejoras en los métodos de diagnóstico y terapia contra el CaMa, continúa siendo el tipo de cáncer más común en mujeres a nivel global. En 2020 se detectaron más de 2.000.000 de casos nuevos y 600.000 defunciones, lo que afecta en gran medida la economía de los sistemas de salud y la calidad de vida de las personas afectadas y sus familias (Sung et al., 2021). Actualmente, existen diversos tratamientos para el manejo del CaMa tales como la quimioterapia, radioterapia y cirugía, sin embargo, no ha sido posible controlar la enfermedad en etapas avanzadas (Barzaman et al., 2020; Obidiro et al., 2023). Lo anterior resalta la importancia de implementar otros enfoques terapéuticos que pueden complementar los existentes, como la inmunoterapia y los microRNAs (miRNAs) (Trayes & Cokenakes, 2021).

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante (21-25 nucleótidos) que pueden regular la expresión génica al interactuar con la región 3'UTR de un mRNA diana a través del apareamiento de bases (Ha & Kim, 2014; Saliminejad et al., 2019). Múltiples evidencias muestran que la expresión de miRNAs en diversos tipos de cáncer, incluido el CaMa, está desregulada, lo que se ha relacionado con la progresión de la enfermedad (Hill & Tran, 2021; Shinde et al., 2023). Debido a que los miRNAs pueden actuar sobre múltiples blancos, la desregulación de algunos puede conducir al desarrollo del CaMa (Arun et al., 2022; Loh et al., 2019). Por ello, investigar el papel de los miRNAs y su mecanismo en la progresión del CaMa es clave en la prevención y en el desarrollo de herramientas terapéuticas (Muñoz et al., 2023).

En CaMa, se han reportado múltiples miRNAs desregulados, incluido el miR-1307-3p. En 2016, se reportó que el miR-1307-3p está aumentado en el suero de pacientes con CaMa (Shimomura et al., 2016). En 2018, empleando herramientas bioinformáticas, se describió una firma de miRNAs que puede usarse para predecir el estadio de CaMa en pacientes, en la que también se encontró al miR-1307-3p sobreexpresado (Sathipati & Ho, 2018). En 2019, un estudio logró mediante la transfección de un vector lentiviral sobreexpresar el miR-1307-3p en la línea celular de tejido mamario MCF-10A, la cual no es tumoral, y conseguir que adquiriera la capacidad de formar tumores en un modelo murino a través de su interacción con la metiltransferasa SMYD4 (Han et al., 2019). Estos

hallazgos sugieren que miR-1307-3p tiene actividad oncogénica y que promueve la progresión del CaMa, sin embargo, los mecanismos y los blancos involucrados siguen siendo poco conocidos. Por otra parte, existe un reporte que describe un papel contrario del miR-1307 en CaMa, es decir un efecto de supresor tumoral, ya que un aumento en su expresión, conduce a la sensibilización de las células de CaMa a la terapia con cisplatino al regular a la baja Mdm4 (Wang & Zhu, 2018). Por lo tanto, es necesario evaluar en profundidad el efecto de miR-1307-3p en la progresión del CaMa y ampliar el conocimiento de su biología en esta patología, con el fin de determinar si desempeña un papel como un miRNA con actividad oncogénica (oncoMir) o como un miRNA con actividad supresora tumoral (tsMir) (Khalife et al., 2020).

En esta tesis, identificamos la sobreexpresión de miR-1307-3p en líneas celulares de CaMa en comparación con células epiteliales de mama, y también encontramos que al inhibir la expresión del miR-1307-3p, se inhiben los procesos de proliferación, migración, invasión y angiogénesis en CaMa, reduciendo así la proliferación de esta patología. Finalmente, identificamos a PRM2 como un nuevo blanco del miR-1307-3p, que no ha sido reportado hasta el momento.

2. ANTECEDENTES

2.1 El descubrimiento de los MicroRNAs

Durante mucho tiempo, las investigaciones sobre la biología del cáncer se han centrado en el RNA codificante, a pesar de que este representa solo un 2% del genoma humano. Recientemente, se ha prestado atención a una clase más abundante de moléculas, que alcanza el 75%, conocidas como RNA no codificantes (ncRNA) (Slack & Chinnaiyan, 2019). Los ncRNA pueden dividirse en dos grandes clases: los ncRNA de mantenimiento (housekeeping), que incluyen a los RNA ribosomales (rRNA), de transferencia (tRNA), pequeños nucleares (snRNA) y pequeños nucleolares (snoRNA); y los ncRNA reguladores, que incluyen a los ncRNA largos, como los largos no codificantes (lncRNA) y los circulares (circRNA), y los ncRNA cortos, entre los que se encuentran los RNA de interferencia (siRNA), los asociados a Piwi (piRNA) y los microRNA (miRNA), en los que nos enfocaremos (Loganathan & Doss, 2023)

El primer miRNA lin-4, fue descubierto en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el año de 1993 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), revolucionando el campo de la biología molecular. A partir de ese momento se han identificado miRNAs en múltiples organismos y se ha observado que algunos se encuentran altamente conservados entre especies (Friedländer et al., 2014).

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes, con un promedio de 22 nucleótidos de longitud que se transcriben a partir de secuencias de DNA en transcritos primarios (pri-miRNAs) los cuales a su vez son procesados para dar lugar a una molécula precursora (pre-miRNAs) para después convertirse en un miRNA maduro. Los miRNAs interactúan comúnmente con la región 3'UTR de los mRNAs blanco para suprimir su expresión (Ha & Kim, 2014; Saliminejad et al., 2019), aunque existen reportes de su interacción con otras regiones como: 5'UTR, secuencias codificantes y promotoras (Broughton et al., 2016). En menor medida se ha observado que pueden activar la expresión de algunos genes bajo ciertas condiciones (Vasudevan, 2012).

Los miRNAs se encuentran involucrados en una amplia gama de procesos biológicos, la desregulación en su expresión se ha asociado con diversas enfermedades humanas (Paul

et al., 2018). Además, pueden ser secretados en fluidos extracelulares, razón por la cual pueden ser potenciales biomarcadores en un amplio rango de enfermedades y ser mediadores en la comunicación célula–célula (Vishnoi & Rani, 2023). Pero ¿Cómo se forman estas interesantes moléculas?

2.2 Biogénesis y función de los MicroRNAs

La biogénesis de los miRNAs da inicio con el procesamiento de los transcritos por la RNA polimerasa II/III post o co-transcripcionalmente (Ha & Kim, 2014; Saliminejad et al., 2019). Aproximadamente la mitad de todos los miRNAs identificados son intragénicos o procesados a partir de intrones, relativamente pocos son procesados a partir de exones de genes codificantes para proteínas, mientras que los restantes son intergénicos, transcritos de manera independiente o regulados por sus propios promotores. La biogénesis de los miRNAs se clasifica en canónica y no canónica (O'Brien et al., 2018).

2.3 Biogénesis canónica

La biogénesis canónica es la vía dominante por la cual los miRNAs son procesados. En ella los pri-miRNAs son transcritos a partir de sus genes y dan lugar a pre-miRNAs gracias a la acción del complejo microprocesador, el cual se encuentra formado al menos por la proteína de la región crítica del síndrome de DiGeorge 8 (DGCR8) y por la enzima ribonucleasa III (Drosha) (Denli et al., 2004). DGCR8 reconoce al motivo GGAC que se encuentra N6-metiladenilado y otros motivos dentro del pri-miRNA, mientras que Drosha corta el pri-miRNA duplex en la base de su horquilla, dando lugar a la formación de un extremo que sobresale de 2 nt 3' en el pre-miRNA (Denli et al., 2004; Shang et al., 2023). Una vez que el pre-miRNA es generado, es exportado al citoplasma por el complejo exportina 5 (XPO5)/RanGTP y después procesado por la endonucleasa RNasa III (Dicer). Este proceso involucra la eliminación del lazo terminal, resultando en un miRNA duplex maduro. La direccionalidad de la cadena del miRNA determina el nombre del miRNA maduro, la cadena 5p surge a partir del extremo 5' de la horquilla del pre-miRNA mientras que la 3p se origina del extremo 3'. Ambas cadenas pueden ser cargadas en la familia de proteínas Argonauta (AGO) (AGO1-4 en humanos) en una forma dependiente de ATP. La selección de la cadena 5p o 3p se basa en la estabilidad termodinámica en el extremo 5' del miRNA duplex o por un nucleótido U5' en la posición 1. Generalmente, la cadena

con la menor estabilidad 5' o con el U es cargada en AGO y se le considera la cadena guía. La otra cadena se denomina "pasajera" y será desenrollada de la cadena guía a través de varios mecanismos dependiendo de su grado de complementariedad. La cadena pasajera del miRNA es cortada por AGO2 y degradada por la maquinaria celular (O'Brien et al., 2018; Shang et al., 2023).

2.4 Biogénesis no canónica

Diversas vías no canónicas han sido descritas. Estas vías hacen uso de diferentes combinaciones de proteínas involucradas en la vía canónica como Drosha, Dicer, exportina 5 y AGO2 (Bartel, 2018). En general, la biogénesis no canónica puede ser agrupada en dos grupos: independiente de Drosha/DGCR8 e independiente de Dicer. Los pre-miRNAs independientes de Drosha/DGCR8 se parecen a los sustratos de Dicer. Un ejemplo de tales pre-miRNAs son los mirtrones, que son producidos a partir de los intrones del mRNA durante el splicing (Babiarz et al., 2008; Bartel, 2018). Otro ejemplo son los pre-miRNA con caperuza 7-metilguanosa, los cuales son exportados al citoplasma a través de la exportina 1 sin la necesidad de un corte por parte de Drosha. Existe una fuerte preferencia por la cadena 3p, probablemente debido a que la caperuza previene que la cadena 5p sea cargada en Argonauta (Xie et al., 2013). Por otra parte, los miRNAs independientes de Dicer son procesados por Drosha a partir de transcritos endógenos de RNA de horquilla corta (shRNA). Estos pre-miRNAs requieren que AGO2 complete su maduración dentro del citoplasma debido a que son de una longitud insuficiente para ser sustratos de Dicer, promoviendo la carga del pre-miRNA completo en AGO2 y un corte dependiente de AGO2 de la cadena 3p. Finalmente, el corte 3'-5' de la cadena 5p completa su maduración (O'Brien et al., 2018).

2.5 Mecanismo de acción de los microRNAs

Los miRNAs se unen principalmente a una secuencia específica ubicada en la región 3' UTR de sus mRNAs blanco (región semilla) para inducir una represión de su expresión, así como una deadenilación y eliminación de la caperuza (Ipsaro & Joshua-Tor, 2015). También se ha identificado la unión de los miRNAs a otros sitios del mRNA, por ejemplo, la región 5' UTR, secuencias codificantes y promotores (Xu et al., 2014). La unión de los

miRNAs a la región 5'UTR y regiones codificantes provoca el silenciamiento de la expresión génica, mientras que la interacción con el promotor puede inducir la transcripción (Brennan & Henshall, 2020; O'Brien et al., 2018).

El complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC) consiste en al menos la cadena guía y AGO (Kawamata & Tomari, 2010). La especificidad del complejo miRISC es gracias a su interacción con la secuencia complementaria del mRNA blanco denominada elemento de respuesta a miRNAs (MREs). El grado de complementariedad por parte del MREs determinará si ocurre un corte del mRNA blanco dependiente de AGO2 o una inhibición mediada por miRISC (Jo et al., 2015; Jungers & Djuranovic, 2022). Una total complementariedad miRNA:MRE induce la actividad endonucleasa de AGO2. Sin embargo, en células animales, la mayoría de las interacciones miRNA:MRE no son completamente complementarias (Jonas & Izaurralde, 2015), lo cual evita la actividad endonucleasa de AGO2 (La Rocca & Cavalieri, 2022). La capacidad de regular la expresión génica que tienen los miRNAs, tiene una influencia directa en diferentes procesos celulares.

2.6 MiRNAs y cáncer

Desde hace más de 20 años se ha reportado la importancia de los miRNAs en la regulación de diversos procesos celulares, tales como proliferación, diferenciación, migración, apoptosis, metabolismo y respuestas a estrés (Hill & Tran, 2021). Previamente se reveló que más del 50% de los genes que codifican para miRNAs se encuentran localizados en regiones genómicas asociadas con cáncer (Di Leva et al. 2014), lo que sugiere que los miRNAs pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad (Shi et al., 2021). La hipótesis de que la desregulación de los miRNAs puede ser importante en la aparición, progresión y diseminación de numerosos tipos de cáncer fue confirmada en leucemia linfocítica crónica (CLL) por el grupo de Calin et al. en 2002, al observar que los miR-15a y miR-16-1 se encontraban regulados a la baja o ausentes en la mayoría de los pacientes con CLL (Calin et al., 2002).

El papel de los miRNAs en cáncer es muy complejo y no ha sido elucidado en su totalidad, estudios previos han encontrado que estos regulan diversos mecanismos moleculares

relacionados con el cáncer a través de su acción sobre oncogenes y genes supresores tumorales durante la formación del tumor, mantenimiento, progresión (Shi et al., 2021; B. Zhang et al., 2007), angiogénesis, transición epitelio-mesénquima (EMT), metástasis y farmacorresistencia (Tan et al., 2018).

Los miRNAs sobre expresados en cáncer se consideran oncogenes, denominados “oncoMirs”, los cuales pueden promover el desarrollo tumoral a través de regular a la baja algunos genes, por ejemplo, aquellos implicados en el control de la diferenciación celular, apoptosis y genes supresores tumorales (Tan et al., 2018). Por otra parte, pueden actuar como supresores de tumor “tsMirs” al inhibir la traducción de mRNA que codifican para proteínas con actividad oncogénica. La desregulación de los miRNA tiene funciones duales en el desarrollo del cáncer, ya sea que promuevan la carcinogénesis al inhibir los mRNA de genes supresores de tumores, o actúen como supresores de tumores al regular a la baja los oncogenes (Pallante et al., 2014; Tume et al., 2016).

2.7 MiRNAs y cáncer de mama

Desde que el papel de la desregulación de miRNAs en CaMa fue reportado en 2005 (Iorio et al., 2005), numerosos estudios han mostrado una alterada expresión de miRNAs en esta patología (Hussen et al., 2021), ya sea que tengan función de oncoMirs o como tsMirs. Los oncoMirs se encuentran comúnmente regulados al alza en CaMa, suprimiendo la expresión de potenciales genes supresores tumorales, dando lugar a tumores en las glándulas mamarias (Li et al., 2021; Wang & Luo, 2015). Mientras que los tsMirs pueden inhibir la expresión de oncogenes que promueven la formación de tumores (Corcoran et al., 2011), por lo tanto, su regulación a la baja puede dar lugar a la formación de tumores (Figura 1). Tanto los oncoMirs como los tsMirs regulan el desarrollo y progresión del CaMa a través de complejas vías de señalización (Mukherjee et al., 2023). Estas vías incluyen a las implicadas en crecimiento y proliferación, inmortalidad replicativa, iniciación de la metástasis e invasión, resistencia a apoptosis y muerte celular, inducción de angiogénesis, activación del metabolismo o procesos energéticos de la célula y escape del sistema inmune (Lee et al., 2023; Loh et al., 2019).

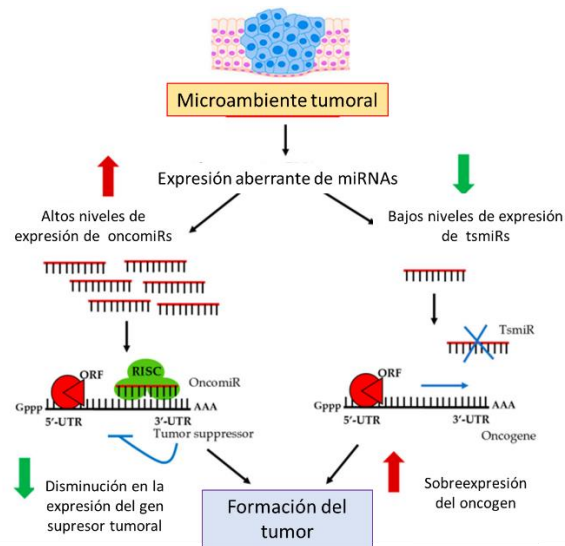


Figura 1. Mecanismos regulatorios de los oncomiRs y tsmiRs. Un incremento en la expresión de oncomiRs en células de cáncer da lugar a la inhibición de genes supresores tumorales. Una disminución en la expresión tsmiRs potencialmente aumenta la expresión de oncogenes. Modificado de Loh et al., 2019.

La desregulación de un solo miRNA o un pequeño grupo puede tener importantes consecuencias en las células y algunas veces dar lugar a procesos patológicos como enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, desordenes autoinmunes, alteraciones óseas y cánceres humanos como el CaMa (Vishnoi & Rani, 2023).

2.8 Cáncer de mama

El CaMa es una enfermedad compleja que supone un gran reto para los sistemas de salud, debido a la reducción en la calidad de vida de las personas y los altos asociados en todos los países (Khan et al., 2022). De acuerdo con los datos más recientes, el CaMa es el tipo de cáncer más diagnosticado a nivel mundial y la principal causa de muertes relacionadas a cáncer en mujeres en todo el mundo (Sung et al., 2021; Wilkinson & Gathani, 2022). Se estima que en 2020 ocurrieron 2,288,849 casos nuevos y 626,679 muertes relacionadas con CaMa a nivel mundial (Sung et al., 2021). La prevalencia y la letalidad del CaMa resaltan la importancia de investigar mecanismos involucrados en la formación de tumores mamarios, así como el desarrollo de nuevos métodos para predecir la evolución de la

enfermedad y la identificación de nuevos blancos terapéuticos (Sarhangi et al., 2022; Wilkinson & Gathani, 2022).

El CaMa ocurre debido a la proliferación anormal de cualquier célula o tejido en el revestimiento de las glándulas y conductos mamarios. La mayoría de las lesiones malignas son carcinomas, que pueden ser clasificados como adenocarcinomas (Barzaman et al., 2020; Makki, 2015). Este tipo de cáncer es altamente heterogéneo, con marcadas diferencias entre las personas afectadas (Tsang & Tse, 2020). El CaMa puede ser clasificado en 6 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER+, normal-like, basal (triple negativo) y Claudin-Low, cada uno con un fenotipo único, el cual incluye características como el grado tumoral, caracterizaciones moleculares como receptores hormonales y el estatus del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Dai et al., 2017; Roy et al., 2023).

Además de la clasificación molecular, existen otras que son de gran utilidad para clasificar la extensión o invasión del CaMa al momento del diagnóstico, lo cual es esencial para determinar la estrategia terapéutica que se debe adoptar. Una de ellas es la clasificación histológica, se basa principalmente en la observación microscópica de las células tumorales y su arquitectura tisular (Cserni, 2020). Los principales criterios utilizados para esta clasificación incluyen el tipo de células, donde se observan características de las células tumorales, como su forma, tamaño, núcleo y citoplasma, para determinar si se asemejan a células epiteliales normales o si presentan características atípicas asociadas con el cáncer; el patrón de crecimiento, donde se evalúa cómo las células tumorales se organizan dentro del tejido mamario, es decir, si las células están formando un tumor sólido, un tumor con patrón de crecimiento ductal, o un tumor con características de crecimiento lobulillar (Rakha et al., 2022); la presencia o ausencia de marcadores específicos, como los receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), que pueden influir en el tratamiento y el pronóstico; otro aspecto importante a evaluar es el grado histológico, en el que se evalúa la diferenciación de las células tumorales, es decir, qué tan parecidas son a las células normales del tejido mamario. Esto se clasifica en grados histológicos, que van

desde bien diferenciado (grado I) hasta poco diferenciado (grado III), lo que puede ayudar a predecir la agresividad del tumor (Cserni, 2020; Zubair et al., 2020).

Otra forma de clasificar el CaMa se basa en el sistema tumor, nódulos linfáticos, metástasis (TNM), el cual es útil para conocer la extensión de esta enfermedad en el individuo al momento del diagnóstico, algo esencial para determinar el tipo de terapia que se utilizará para el tratamiento del cáncer (Cserni et al., 2018). El sistema TNM, toma en cuenta el tamaño del tumor, el número de nódulos linfáticos que hayan sido invadidos y la presencia o ausencia de metástasis, estos parámetros sirven para ubicar al paciente en distintos estadios que son I, II, III y IV, siendo la fase I la más temprana y la fase IV la más avanzada (Cserni et al., 2018; Sawaki et al., 2019).

2.9 Progresión del cáncer de mama

La progresión es uno de los principales problemas en el CaMa y en la mayoría de los casos, la principal causa de muerte (Plummer et al., 2016). La cascada metastásica inicia con la proliferación o aumento del número de células tumorales como resultado del crecimiento y la multiplicación celular. A este proceso le continúa la migración o movimiento de las células tumorales hacia cavidades vecinas, órganos adyacentes, vasos sanguíneos y linfáticos donde se puede implantar y propagar el tumor. (Park et al., 2022). A la migración le continúa la invasión, la cual implica la pérdida de la capacidad de adhesión célula-célula, dando lugar a la participación de otros factores como la interleucina 8 (IL-8), cuya sobreexpresión en el tumor estimula la producción del metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), que degrada la membrana basal del estroma circundante, remodela la matriz extracelular y facilita la angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Jiang & Li, 2021). Este es un mecanismo crucial en el desarrollo del cáncer debido a que promueve el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor, facilitando la eliminación de productos de desecho (Park et al., 2022). El vaso sanguíneo en la zona del tumor puede proporcionar una ruta para que las células desprendidas entren en el sistema circulatorio y hagan metástasis en sitios distantes (Liang et al., 2020). Se sabe que la metástasis se presenta en un 10-15% de los pacientes con CaMa, dentro de los primeros tres años a partir del diagnóstico (DeSantis et al., 2015) y es la causante del 90% de las muertes en tumores

sólidos. Se caracteriza por extenderse hacia pulmón, hígado, cerebro y hueso, hasta en el 50% de los pacientes. Uno de cada tres pacientes con CaMa desarrolla metástasis, y hasta el 78% de estos pacientes muere en los siguientes 5 años a pesar de los avances en los tratamientos (McGuire et al., 2015).

2.10 Tratamiento en cáncer de mama

Aunque la cirugía es el tratamiento primario en las etapas tempranas del CaMa, existen otras opciones terapéuticas como la quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal, las cuales han aumentado de manera significativa la tasa de supervivencia de las personas afectadas. En etapas avanzadas de la enfermedad, la quimioterapia y la radioterapia son los principales tratamientos, junto con la terapia hormonal (Trayes & Cokenakes, 2021).

A pesar de los avances médicos en los distintos tratamientos, las estadísticas son alarmantes en etapas avanzadas de la enfermedad, el rango de supervivencia a cinco años para mujeres con CaMa localizado (el cual no se ha diseminado a nódulos linfáticos u otros lugares fuera de la mama) es del 99%, cifra contrastante al ser comparada con el porcentaje de supervivencia en mujeres diagnosticadas con CaMa con metástasis, que es de solo 27% (Siegel et al., 2018). Por tal motivo, es necesario añadir nuevos enfoques terapéuticos que complementen a los ya existentes, como lo son los miRNAs.

2.11 MiRNAs como blancos terapéuticos

Identificar la función de miRNAs asociados a un mal pronóstico o baja supervivencia, permite conocer mejor los mecanismos a través de los cuales los miRNAs favorecen la progresión del CaMa. Las herramientas bioinformáticas, como las bases de datos de miRNAs, ayudan a identificar potenciales moléculas de interés. Una de las bases de datos más empleadas para este fin es The Cancer Genome Atlas (TCGA), la cual cataloga los cambios moleculares de importancia biológica responsables de la aparición del cáncer, a través de mapas multidimensionales en 33 tipos diferentes de esta enfermedad (Ma & Ellis, 2013).

La base de datos del TCGA consta de 2.5 petabytes, que describen el tejido tumoral y tejidos normales emparejados de más de 11,000 pacientes haciendo uso de la

secuenciación genómica por varios métodos como OncoLnc, herramienta que explora correlaciones de supervivencia y datos clínicos asociados a la expresión de mRNAs y miRNAs. Los datos obtenidos del TCGA se han utilizado en diversos estudios, en los que se ha logrado la identificación de diversos miRNAs como potenciales biomarcadores para la detección del cáncer como: miR-15a, miR-16-1, miR-21, miR-146a, miR-608, miR-499 y como blancos terapéuticos en distintos tipos de cáncer, por ejemplo: hsa-miR-509-3, hsa-miR-3653, hsa-miR-3065, hsa-miR-3607, hsa-miR-642a, hsa-miR-487b. (Ghafouri-Fard et al., 2021; Naya Català, 2018; Tume et al., 2016). Por lo que la búsqueda de más miRNAs implicados en la progresión de distintos tipos de cáncer es esencial.

2.12 MiR-1307-3p en cáncer

En colaboración con el MD Anderson Cancer Center, se realizó un análisis de la expresión de miRNAs en CaMa empleando el TCGA. A partir de dicho análisis se identificó que el miR-1307-3p se encuentra significativamente sobreexpresado en muestras de tejido tumoral, en comparación con muestras de tejido normal de mama y esta sobreexpresión está asociada a una baja supervivencia en los pacientes con CaMa (Figura 2).

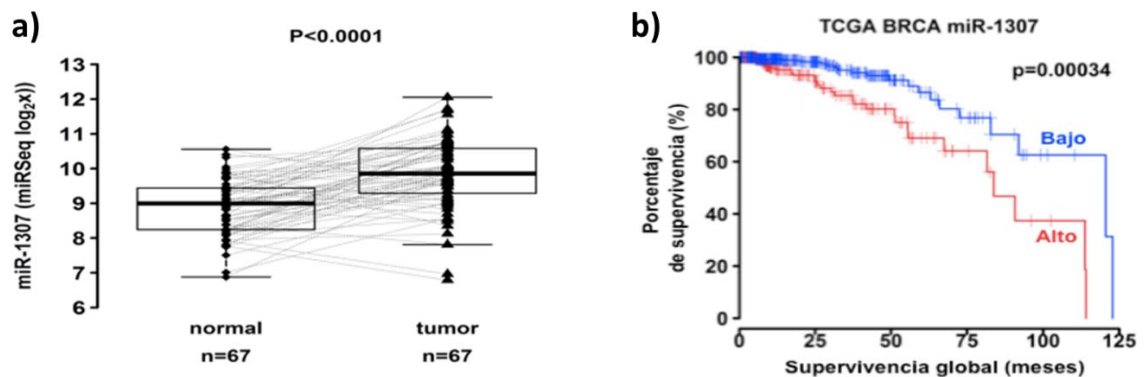


Figura 2. Expresión del miR-1307-3p en muestras de tejido tumoral mamario. a) La secuenciación de miRNAs se llevó a cabo a partir de muestras de tejido tumoral y tejido normal de la mama sana de cada paciente (n=67). En las gráficas se muestra la sobreexpresión de miR-1307-3p ($p < 0.0001$) en las muestras tumorales en comparación con las normales. b) Las gráficas de supervivencia global de pacientes de CaMa muestran que una alta expresión (en rojo) del miR-1307-3p, disminuye significativamente la supervivencia de los pacientes con cáncer mamario, mientras que una baja expresión (azul) se relaciona con un incremento en la supervivencia.

La información acerca de la función que el miR-1307-3p juega en la progresión del cáncer, es aún muy limitada; se sabe que en cáncer de próstata el miR-1307-3p promueve la proliferación celular a través de su blanco directo FOXO3A (Qiu & Dou, 2017). En cáncer de ovario, el miR-1307-3p se ha asociado al desarrollo de quimioresistencia a través de su blanco directo ING5 (Zhou et al., 2015). En cáncer colorrectal el miR-1307-3p se encuentra subexpresado, lo que resulta en un aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (blanco del miR-1307-3p) y del riesgo de contraer cáncer colorrectal (Tang et al., 2015).

En CaMa, se han reportado múltiples miRNAs desregulados, incluyendo el miR-1307-3p. En 2016, Shimomura et al. reportaron que el miR-1307-3p está incrementado en el suero de pacientes con CaMa (Shimomura et al., 2016). En 2018, Sathipati y Ho utilizaron técnicas bioinformáticas para describir una firma de miRNAs que podría usarse para predecir el estadio de los pacientes con CaMa, y el miR-1307-3p estaba involucrado (Sathipati & Ho, 2018). En 2019, Han et al. reportaron que el miR-1307-3p juega un papel en la progresión del CaMa a través de su interacción con la metiltransferasa SMYD4, lo cual fue validado midiendo la expresión proteínica y la interacción entre ambas moléculas utilizando un ensayo de luciferasa (Han et al., 2019). Estos hallazgos sugieren que el miR-1307-3p tiene actividad oncogénica y promueve la progresión del CaMa, sin embargo, los procesos y blancos involucrados aún no se comprenden bien.

A pesar de los estudios previos sobre el miR-1307-3p en CaMa, su papel en procesos clave en la progresión del cáncer como la proliferación, la migración, la invasión y angiogénesis no se encuentra comprendido en su totalidad y no ha sido reportado hasta el momento. Por tal motivo esta tesis se centró en determinar el efecto funcional del miR-1307-3p en la progresión del CaMa y en la identificación de nuevos blancos del miRNA en esta patología.

3. JUSTIFICACIÓN

El CaMa continúa siendo el más frecuente en mujeres alrededor del mundo, la naturaleza de los tumores es bastante heterogénea, lo cual dificulta encontrar tratamientos que funcionen adecuadamente contra los diferentes subtipos, a pesar de que es considerado curable cuando es detectado en etapas tempranas, el CaMa en etapas avanzadas con metástasis es considerado incurable con las terapias actuales, lo cual resalta la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas.

Diversos reportes respaldan el papel de los miRNAs en CaMa, estas moléculas son pieza central de la regulación génica para mantener un estado adecuado de homeostasis, por otra parte, su desregulación puede dar lugar a consecuencias adversas en el desarrollo del CaMa. Por tal motivo, los miRNAs tienen un enorme potencial como blancos terapéuticos o como herramientas en la lucha contra esta enfermedad.

Existen pocos reportes sobre el papel del miR-1307-3p en CaMa. Sin embargo, se ha demostrado su elevada expresión en tejido afectado por esta enfermedad, aunque los mecanismos y las vías implicadas no se encuentran elucidadas. Por tal motivo el miR-1307-3p es un interesante blanco de estudio para comprender mejor los mecanismos implicados en la progresión del CaMa e identificar potenciales blancos terapéuticos.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de miR-1307-3p favorece la progresión del CaMa a través de la inducción de proliferación, migración, invasión y angiogénesis.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto funcional del miR-1307-3p en la progresión del CaMa.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del miR-1307-3p en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis del CaMa.
2. Identificar blancos del miR-1307-3p a través de los cuales induce proliferación, migración, invasión, angiogénesis y asociarlos con la supervivencia global de pacientes con CaMa empleando distintas bases de datos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

La línea celular epitelial mamaria humana MCF-10A fue proporcionada por el Dr. Recep Bayraktar (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). Las células humanas de CaMa MDA-MB-231 fueron obtenidas del Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Las células SUM149, SKBR3, MDA-MB-468 y MDA-IBC-3 fueron proporcionadas por el Dr. Pablo Vivas-Mejía (Centro Comprensivo de Cáncer de la Universidad de Puerto Rico) y las células MCF-7 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) fueron donadas por el Dr. Moisés Franco Molina (UANL). Excepto las células MCF-10A, todas las líneas celulares se mantuvieron en medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM)/mezcla de nutrientes F-12 de Ham (Sigma Aldrich-Merck, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GenClone, EUA) y 1% de antibióticos (Gibco, EUA). Las células MCF-10A se mantuvieron en medio de crecimiento de células epiteliales mamarias (MEBM) suplementado con extracto pituitario bovino (BPE), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), insulina, hidrocortisona y sulfato de gentamicina anfotericina B (GA-1000) (Lonza, Suiza). Para los experimentos, todas las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% CO₂/95% aire a 37°C. Los experimentos se realizaron cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%.

6.2 Aislamiento de RNA para perfiles de expresión del miRNA

Se aisló el RNA total de las células utilizando el Kit miRNeasy Mini (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se transfirieron 1.0×10^7 células MDA-MB-231, MCF-7 o MCF-10A a un tubo de centrifugado de polipropileno. Se retiró el medio de cultivo y se añadieron 700 μ L de reactivo de lisis QIAzol. La mezcla se agitó en un vórtex durante 1 minuto para lisar el pellet. Posteriormente, se dejó reposar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT). Luego, se añadieron 140 μ L de cloroformo al tubo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. La muestra se dejó reposar durante 3 minutos a RT. Después, la mezcla se centrifugó durante 15 minutos a

12,000 x g a 4°C. Después de la centrifugación, se recogió la fase acuosa que contenía el RNA (350 µL) y se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadió 1.5 volúmenes de etanol al 100%, luego se mezcló completamente mediante pipeteo. Se tomaron 700 µL de la muestra y se colocaron en una columna de centrifugado RNeasy Mini en un tubo de recolección de 2 ml. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos a RT. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 700 µL de Buffer RWT a la columna de centrifugado RNeasy Mini. La mezcla se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos a RT, después de lo cual se descartó el sobrenadante. Luego, se pipetearon 500 µL de Buffer RPE sobre la columna de centrifugado RNeasy Mini y se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos a RT, después de lo cual se descartó el sobrenadante. Se añadieron otros 500 µL de Buffer RPE a la columna de centrifugado RNeasy Mini, que posteriormente se centrifugó a 8,000 x g durante 2 minutos. La columna de centrifugado RNeasy Mini se transfirió a un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml. Se pipetearon 30 µL de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna de centrifugado RNeasy Mini, que posteriormente se centrifugó a 8,000 x g durante 1 minuto para obtener el RNA total. La concentración de RNA se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop de Thermo Scientific.

6.3 RT-qPCR del miR-1307-3p

Se utilizó RNA total, con una relación de densidad óptica (A₂₆₀/A₂₈₀) entre 1.8 y 2.1 para RT-qPCR. La RT-qPCR se realizó con el Sistema de Cuantificación de MicroRNA MystiCq™ (Sigma Aldrich-Merck). En resumen, se sintetizó cDNA con el Kit de Mezcla de Síntesis de cDNA de microRNA MystiCq™ según las instrucciones del fabricante. El RT-qPCR se realizó por duplicado utilizando 10 µM de Cebador Universal de PCR MystiCq (Sigma Aldrich-Merck) y 10 µM de cebador miR-1307-3p (5' TGGCGTCGGTCGTGA 3') (IDT, EUA) o cebador SNORD 44 (5' GCAAATGCTGACTGAACATGAA 3') (IDT). Para todas las reacciones, se utilizó un instrumento Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Alemania), siguiendo los parámetros de ciclado sugeridos por el fabricante (Sigma Aldrich-Merck). Se utilizó el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak & Schmittgen, 2001) para medir la expresión del miRNA objetivo, comparado con el control endógeno SNORD44 para

normalizar las diferencias en la carga de muestra. Los resultados representan la diferencia de los niveles de transcritos del miRNA en una muestra en comparación con las células control MCF-10A.

6.4 Determinación de la concentración del inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad (MTS)

Para determinar la concentración óptima del inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad (proliferación, migración, invasión y angiogénesis) se llevó a cabo un ensayo de MTS, empleando distintas concentraciones del inhibidor: 12.5, 25, 50, 100 y 200 nM. Se sembraron 5.5×10^3 células de la línea MDA-MB-231 y 8.0×10^3 de la línea MCF-7 en placas de 96 pozos. Transcurridas 24 h, se prepararon las mezclas de transfección en una proporción 1:3 (v/v) del inhibidor o del control negativo del miRNA (Invitrogen, EUA) con el agente de transfección Hiperfect (Qiagen), las cuales se dejaron incubar 20 minutos a RT en medio Opti-MEM (Gibco). Después se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pozos y se añadió la mezcla de transfección, la cual se dejó en contacto con las células 24 h. Posteriormente, se retiró la mezcla y se añadió medio de cultivo completo, dejando incubar por 48 h. Finalmente, se añadieron 20 μ L de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) del kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) a cada pozo. La placa se incubó durante una hora en la oscuridad a 37°C y, posteriormente, se realizó la lectura en el lector de placas Biotek Synergy HT (BioTek® Instruments, EUA) a 490 nm.

6.5 Transfección celular

Para la transfección, se sembraron 9.0×10^4 células (MDA-MB-231 o HUVEC) o 3.0×10^5 células (MCF-7) en placas de 6 pozos. Después de 24 h, las células fueron tratadas con 100 nM del inhibidor de miR-1307-3p o el inhibidor de control negativo (Invitrogen). La transfección se llevó a cabo utilizando la misma proporción mencionada con anterioridad 1:3 (v/v), entre el inhibidor o el control negativo del miRNA con el agente de transfección Hiperfect (Qiagen) en medio Opti-MEM (Gibco). La mezcla se incubó durante 20 minutos a RT. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de las placas de 6 pozos y se añadió la mezcla de transfección. Las células fueron incubadas con la mezcla

durante 24 horas. Después de este período de incubación, se recolectó el pellet celular para experimentos posteriores, que incluyeron ensayos de clonogenicidad, migración, invasión y angiogénesis, así como análisis de RT-qPCR y Western blot.

6.6 Ensayo clonogénico

Las células de CaMA transfectadas fueron sembradas en placas de 6 pozos. Debido a las diferencias en las tasas de proliferación de ambas líneas celulares, se sembraron diferentes cantidades de células (800 para las células MCF-7 y 400 para las células MDA-MB-231). El número de colonias formadas se evaluó a los 10 días para las células MDA-MB-231 y a los 18 días para las células MCF-7. Las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0.5% en metanol. Las colonias que contenían al menos 50 células fueron cuantificadas utilizando un microscopio para cultivo celular invertido Zeiss Primovert bajo una magnificación de 10X. Los porcentajes de clonogenicidad se calcularon en relación con el grupo control.

6.7 Ensayos de migración e invasión en placas transwell

Se utilizó una placa transwell con poros de 8 μ M (Corning, EUA) para evaluar la migración e invasión celular. Se sembraron un total de 2.1×10^4 células MDA-MB-231 y 1.0×10^5 células MCF-7 transfectadas con el inhibidor o control del inhibidor en 200 μ L de medio libre de suero en cámaras transwell pretratadas con gelatina para ensayos de migración y el Extracto de Membrana Basal Cultrex™ (BME) (R&D Systems, EUA) para invasión. El compartimento inferior se llenó con 700 μ L de medio de cultivo completo. El tiempo de incubación varió según el ensayo y la línea celular analizada. Los ensayos de migración se realizaron durante 72 h para las células MCF-7 y 24 horas para las células MDA-MB-231, y los ensayos de invasión se realizaron durante 72 horas para las células MCF-7 y 48 horas para las células MDA-MB-231. Posteriormente, se retiraron las cámaras superiores que contenían células residuales, y las células debajo de la superficie se fijaron utilizando el Sistema de Tinción Manual Hema 3™ PROTOCOL™ de Fisher HealthCare™ (Fisher Scientific, EUA). Se contaron ocho campos aleatorios bajo un microscopio Leica CME (40X de magnificación), y se calculó el porcentaje de células migradas e invadidas en relación con el grupo control.

6.8 Angiogénesis

Las células HUVEC transfectadas con el inhibidor o control del inhibidor se utilizaron para evaluar la formación de tubos por células endoteliales. Se sembraron 2.5×10^4 células en una placa de 96 pozos pretratada con Extracto de Membrana Basal Cultrex™ (BME) (R&D Systems) (60 μ L). La placa se incubó durante 24 horas, y se tomaron fotografías de 4 campos utilizando un microscopio de cultivo celular invertido Zeiss Primovert (10X de magnificación) para observar la formación de anillos.

6.9 Predicción de blancos de miR-1307-3p

Se realizó una búsqueda en nueve bases de datos (TargetScan, miRDB, RNA Central, RNA22, miSTAR, DIANA, miRmap, miRabel, MicroT) para identificar potenciales blancos del miR-1307-3p. De cada base de datos, seleccionamos los 100 blancos principales según sus puntajes. Posteriormente, filtramos los blancos que estaban presentes en al menos tres bases de datos. Este enfoque aumenta la probabilidad de seleccionar blancos genuinos, ya que cada base de datos emplea sus propios algoritmos. Los blancos seleccionados se utilizaron luego para diseñar una placa de qPCR personalizada de 384 pocillos (Bio Rad-EUA).

6.10 RT-qPCR personalizada en placa

Se adquirió una placa de 384 pozos personalizada con cebadores prediseñados de sentido y antisentido de los blancos identificados en las bases de datos (Bio-Rad). Se extrajo RNA total de células MDA-MB-231 utilizando el kit GenElute Mammalian Total RNA Mini (Millipore Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el RNA se retrotranscribió utilizando el iScript Reverse Transcription Supermix para RT-qPCR (Bio-Rad). Se realizó una qPCR basada en SYBR Green utilizando el SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), junto con un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX384 Touch. Los cambios en la expresión (fold-changes) y los valores del umbral de ciclo (Ct) se calcularon utilizando el software interno del instrumento, en relación con las células MDA-MB-231 transfectadas con 200 nM del inhibidor de miR-1307-3p o el control negativo, y se normalizaron frente a β -actina. Esta normalización se

realizó junto con controles para ADN genómico (gDNA), eficiencia de PCR, eficiencia de RT y calidad del RNA.

Para representar los cambios en la expresión génica, utilizamos el entorno R (versión 4.2.2) y el paquete ggplot2. El proceso comenzó con el preprocesamiento de los datos de qPCR para calcular los cambios de plegamiento $2^{-\Delta\Delta CT}$. Establecimos umbrales de cambio de plegamiento de 0.15 para la sobreexpresión y -0.15 para la disminución de la expresión para clasificar los genes en consecuencia. Este cambio metodológico subraya un enfoque refinado para visualizar alteraciones en la expresión génica, utilizando el cambio de expresión como la métrica principal para evaluar la variación en la actividad génica.

6.11 Análisis de Western blot

Las células fueron transfectadas siguiendo el protocolo previamente descrito; sin embargo, se utilizó una concentración de 200 nM del inhibidor miR-1307-3p o el control negativo, como se empleó en el ensayo previo de RT-qPCR de alto rendimiento. Las células de CaMa fueron desprendidas utilizando tripsina-EDTA al 0.25% a 37°C y lavadas con 1 mL de PBS que contenía 10 µL de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich-Merck). Los lisados celulares se prepararon utilizando un tampón de lisis en frío (1% Triton-X, 150 mM de NaCl, 25 mM de Tris HCl) y 1% de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich-Merck), incubados sobre hielo durante 30 minutos y agitados periódicamente. Los lisados se centrifugaron, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración total de proteínas utilizando el reactivo de Bradford (Sigma Aldrich-Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cargaron cantidades iguales de proteína, 40 µg por pozo, y se separaron por SDS-PAGE, transfiriéndose a membranas de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon durante 1 h con leche en polvo sin grasa (Santa Cruz Biotechnology, EUA) al 5%, se lavaron y se incubaron con un anticuerpo primario contra PRM2 (Anti-Protamina 2 antibody [EPR15738], Abcam) diluido 1/10000 durante 24 horas a 4°C. Después de la incubación, se lavaron las membranas y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG (H+L) HRP (31460, Invitrogen) diluido 1/1000, y se lavaron nuevamente. Las bandas de proteínas se detectaron utilizando el reactivo Luminol Immunocruz (Santa Cruz Biotechnology). Se utilizaron anticuerpos contra GAPDH (sc-47724) (Santa Cruz Biotechnology) y β -actina (sc-47778) (Santa Cruz

Biotechnology) como controles de carga. Las densidades de las bandas se analizaron mediante el software ImageJ (Stael et al., 2022).

6.12 Ensayos de luciferasa dual

Se sembraron un total de 7.0×10^3 células MDA-MB-231 en una placa de 96 pozos. Después de 24 h, se transfirieron 1.5 μg de un vector que contenía la región 3'UTR del gen humano PRM2 (NM_002762.3) (HmiT107027-MT06) (GeneCopoeia, EUA) (Figura 3.) o un vector control pEZX-MT06 (CmiT000001-MT06) (GeneCopoeia) utilizando Hiperfect en una relación 1:3 (v/v) en medio Opti-MEM. Ambos vectores fueron adquiridos comercialmente y el proceso de clonación fue realizado por la compañía. En el caso del vector control, la única diferencia es que no contiene el sitio 3'UTR de PRM2.

Después de 6 h de la transfección con los vectores, se retiró la mezcla y se realizó una segunda transfección con 200 nM del inhibidor miR-1307-3p utilizando la metodología previamente descrita, durante 24 h. Después de 24 h de incubación, se retiró la segunda mezcla de transfección y se reemplazó con medio completo DMEM/F-12. Transcurridas 48 h, se midieron las actividades de luciferasa de luciérnaga y *Renilla* utilizando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit (Promega, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mediciones de luminiscencia se realizaron utilizando un lector de placas SynergyTM HT (BioTek[®] Instruments, EUA). La actividad de luciferasa de luciérnaga se normalizó respecto al control de *Renilla*. La actividad relativa de luciferasa se graficó en relación con la del vector control.

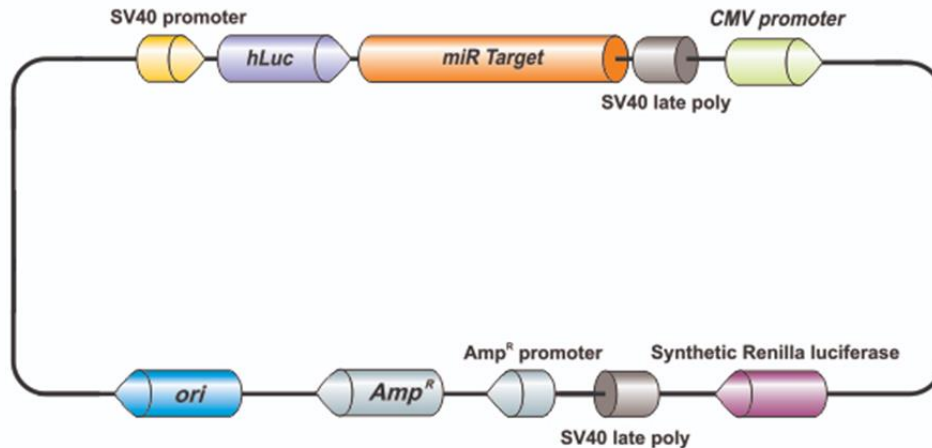


Figura 3. Estructura del vector empleado para las pruebas de luciferasa dual. El vector contiene una secuencia de origen de replicación (ori), dos genes para la expresión de luciferasa: hLuc y Synthetic Renilla luciferase, con sus respectivas regiones promotoras SV40 y CMV, además de secuencias de poliadenilación SV40. El vector también incluye un gen reportero Amp y su región promotora. (Estructura del vector proporcionada por GeneCopoeia™)

6.13 Análisis de los interactomas de miR-1307-3p

Los blancos identificados mediante análisis bioinformático en diferentes bases de datos de expresión de miRNAs fueron sometidos a un análisis utilizando Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN) para identificar interacciones potenciales entre miR-1307-3p y sus blancos candidatos, con el objetivo de predecir vías de señalización.

6.14 Correlaciones entre la expresión de blancos, la supervivencia global y la supervivencia libre de recaída

Para realizar los análisis de supervivencia, utilizamos la herramienta KM plotter (www.kmplot.com), que utiliza conjuntos de datos de expresión de diversas bases de datos públicas. Examinamos la expresión de miR-1307-3p y el mRNA de PRM2 en pacientes con CaMa, y ambos parámetros se correlacionaron con la supervivencia global (OS) y la supervivencia libre de recaída (RFS), respectivamente. Se generó un gráfico de supervivencia Kaplan-Meier para OS y RFS en todos los pacientes con CaMa, sin restricciones basadas en estadio, grado o edad. Se consideraron valores de $p < 0.05$ como indicativos de significancia estadística.

6.15 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en 3 repeticiones biológicas, a menos que se indique lo contrario. Los análisis estadísticos y la construcción de gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc, EUA). Los valores de p se calcularon utilizando pruebas paramétricas (prueba t o ANOVA), según lo determinado por pruebas de normalidad. Se consideraron valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Aumento de los niveles de expresión del miR-1307-3p en cáncer de mama

Evaluamos los niveles de expresión del miR-1307-3p, que previamente habíamos identificado sobreexpresado en el tejido tumoral de mujeres con CaMa (Figura 2). Se realizó el análisis en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, utilizando la línea celular MCF-10A como control que representa tejido mamario no tumorigénico. La expresión de miR-1307-3p fue significativamente mayor en MCF-7 ($p=0.0001$) y MDA-MB-231 ($p=0.0003$), en comparación con las células control (Figura 4).

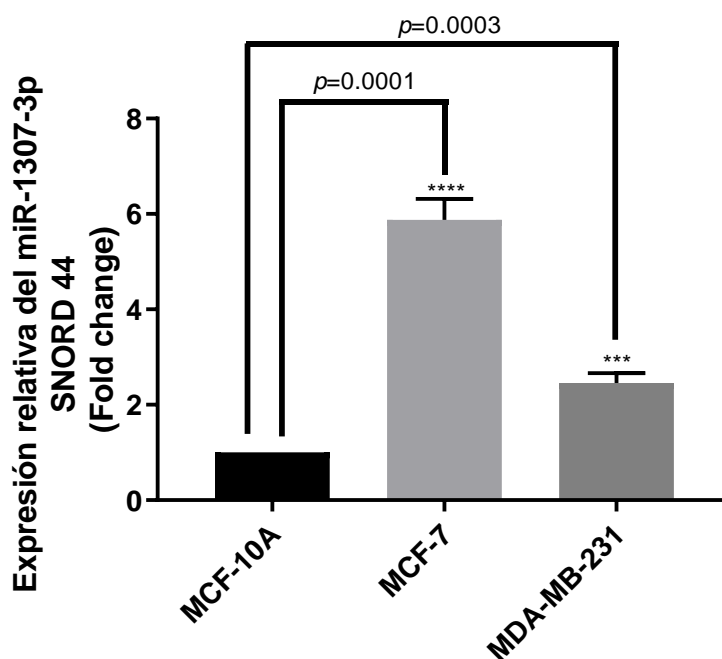


Figura 4. Niveles de expresión del miR-1307-3p en células de cáncer de mama. Los niveles de expresión del miR-1307-3p se encuentran elevados en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación con los de las células epiteliales mamarias MCF-10A. Los datos fueron analizados con la prueba t de Student. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de experimentos por duplicado de 3 réplicas biológicas.

7.2 Eficiencia de transfección del inhibidor del miR-1307-3p

Debido a la sobreexpresión de miR-1307-3p en las líneas de CaMa, decidimos utilizar el inhibidor de este miRNA para bajar sus niveles de expresión, por lo que el siguiente paso fue evaluar la eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-1307-3p. La línea celular MDA-MB-231 fue transfectada con el inhibidor del miR-1307-3p a una concentración de 50 nM y posteriormente los niveles del miRNA fueron analizados por RT-qPCR. El inhibidor provocó una disminución en los niveles del miR-1307-3p del 53.2% con respecto al control negativo (Figura 5).

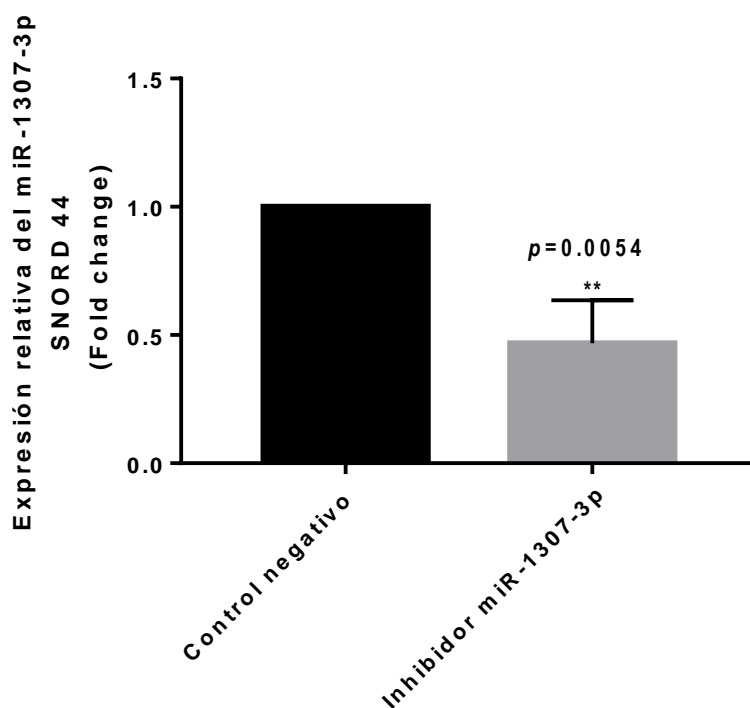


Figura 5. Eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-1307-3p. La transfección con el inhibidor del miR-1307-3p provocó una disminución del miR-1307-3p del 53.2% en la línea MDA-MB-231. Los datos fueron analizados con la prueba t de Student. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

7.3 Concentración del Inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad

Para analizar el efecto que tiene el inhibidor del miR-1307-3p en las pruebas de funcionalidad en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, fue necesario determinar la concentración de inhibidor correcta para transfectar ambas líneas celulares. Se evaluaron

distintas concentraciones del inhibidor del miR-1307-3p (12.5, 25, 50, 100 y 200 nM) a las 72 h, con el ensayo de MTS. Tanto en MCF-7 (Figura 6a) como en MDA-MB-231 (Figura 6b) se seleccionó la concentración de 100 nM, debido a que el control negativo no ocasionaba una disminución de la supervivencia mayor al 10%, mientras que el inhibidor del miR-1307-3p provocó una disminución cercana al 20%, algo deseable en las pruebas de funcionalidad que se evaluaron después, ya que si la disminución fuera superior al 20%, el efecto en las siguientes pruebas podría ser atribuido a una disminución en el número de células y no a una inhibición de los procesos evaluados.

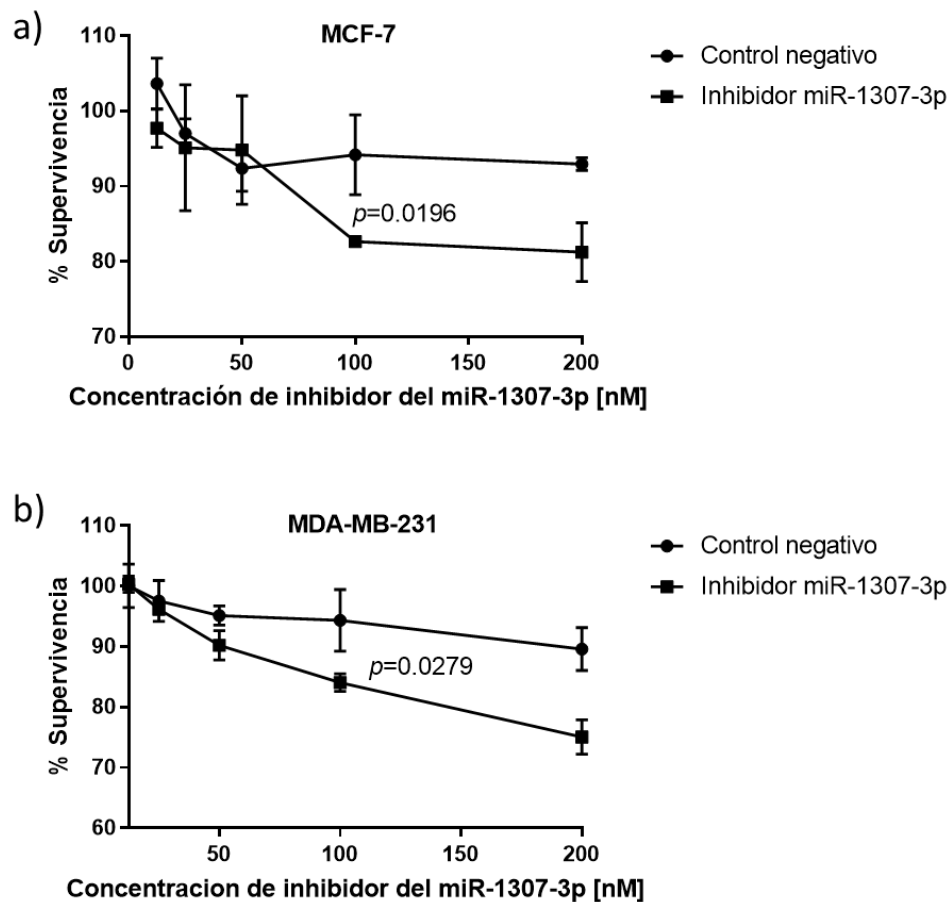


Figura 6. Determinación de la concentración de inhibidor del miR-1307-3p para las pruebas de funcionalidad. Empleando el reactivo MTS, se evaluó la supervivencia de las líneas celulares a) MCF-7 y b) MDA-MB-231 a las 72 h, con la finalidad de identificar la concentración correcta de inhibidor para la transfección. En ambas líneas celulares la concentración seleccionada fue 100 nM de inhibidor. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

7.4 Efecto del miR-1307-3p en la proliferación

Después de determinar la concentración de inhibidor del miR-1307-3p correcta para los ensayos de funcionalidad, se procedió a evaluar el efecto del miRNA en la proliferación de ambas líneas celulares empleando la técnica de formación de colonias. Los resultados obtenidos muestran que la transfección del inhibidor del miR-1307-3p a una concentración de 100 nM provoca una disminución del 16.92% en la formación de colonias en la línea MCF-7 (Figura 7), mientras que en la línea MDA-MB-231, se observa una disminución del 32.02% (Figura 8). Nuestros resultados sugieren que el miR-1307-3p promueve la capacidad clonogénica de ambas líneas celulares.

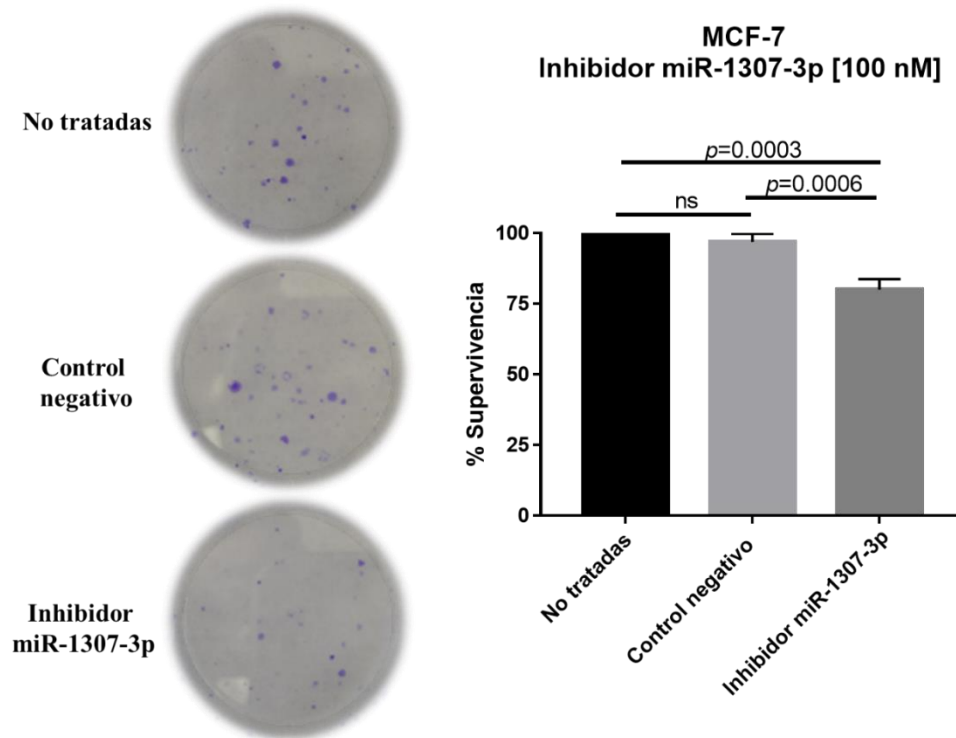


Figura 7. Efecto del miR-1307-3p en la proliferación de las células MCF-7. La línea celular MCF-7 transfectada con 100 nM del inhibidor del miR-1307-3p presentó una disminución del 16.92% en la capacidad de formar colonias en comparación con las células tratadas con el control negativo. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

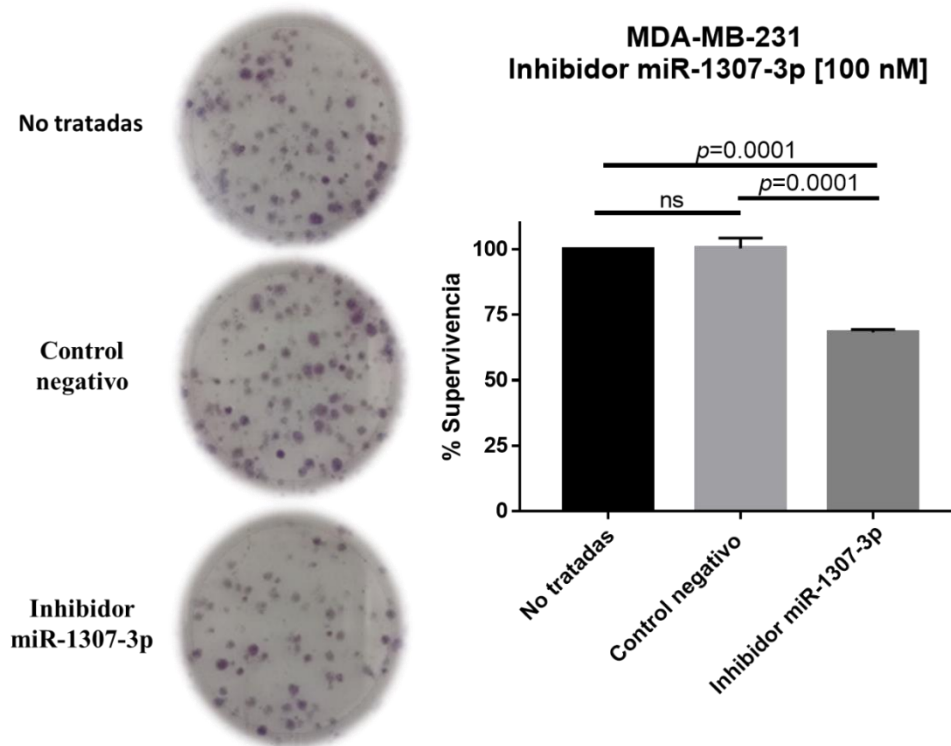


Figura 8. Efecto del miR-1307-3p en la proliferación de las células MDA-MB-231. La línea celular MCF-7 transfectada con [100 nM] del inhibidor del miR-1307-3p presentó una disminución del 16.92% en la capacidad de formar colonias en comparación con las células tratadas con el control negativo y con las células no tratadas. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

7.5 El mir-1307-3p promueve la migración e invasión en cáncer de mama

A continuación, evaluamos el efecto de la inhibición de miR-1307-3p en otros procesos implicados en la progresión del CaMa, específicamente la migración y la invasión, que están asociadas con el potencial metastásico (Saha et al., 2021). Las células MCF-7 mostraron una reducción del 42.31% en la migración ($p=0.0001$) (Figura 9) y una reducción del 49.88% en la invasión ($p=0.0001$) (Figura 10), mientras que las células MDA-MB-231 presentaron una disminución del 50.51% en la migración ($p=0.0001$) (Figura 11) y una disminución del 59.91% en la invasión ($p=0.0001$) (Figura 12). Estos hallazgos indican que miR-1307-3p contribuye a la promoción de la migración y la invasión en ambas líneas celulares.

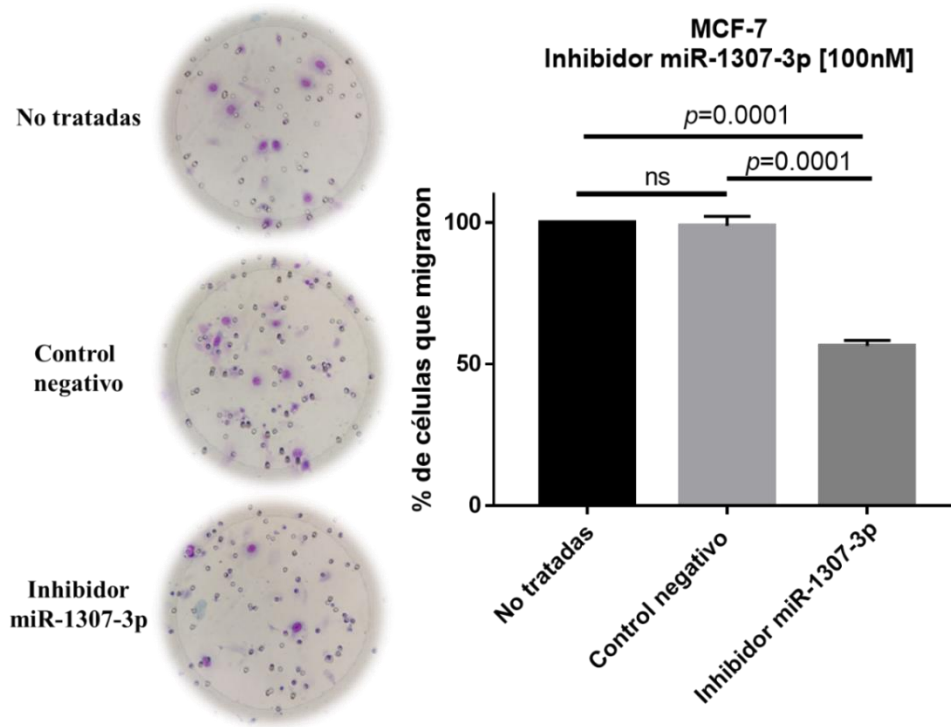


Figura 9. Efecto del miR-1307-3p en la migración de las células MCF-7. La línea celular MCF-7 transfectada con 100 nM del inhibidor del miR-1307-3p presentó una disminución del 42.31% en la capacidad migratoria en comparación con las células tratadas con el control negativo y con las células no tratadas. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

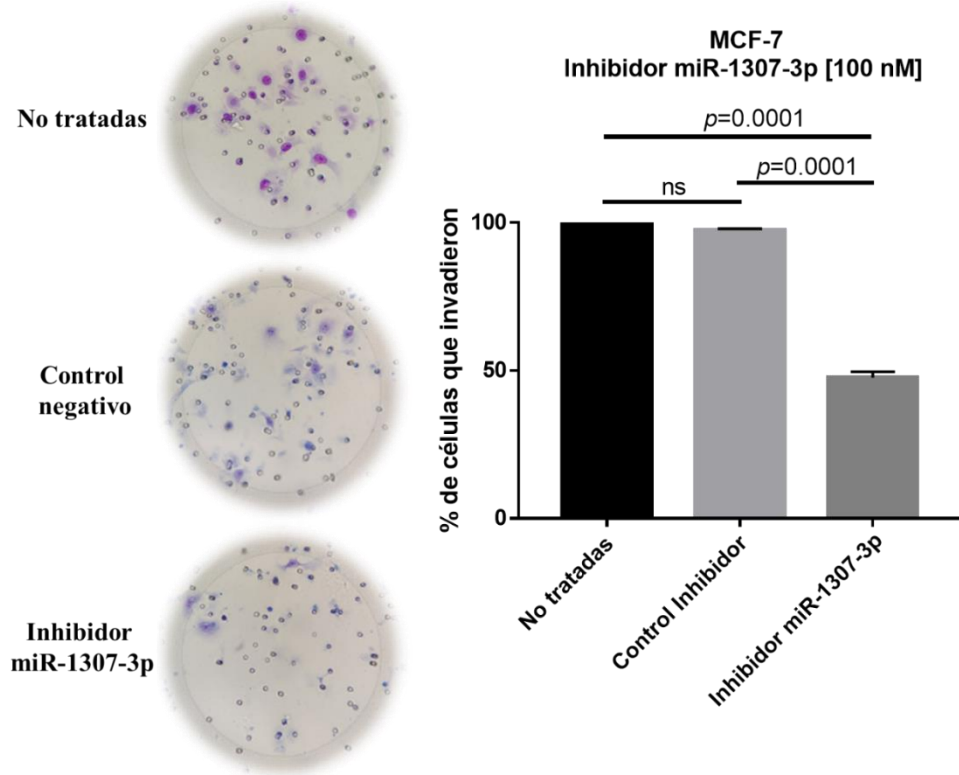


Figura 10. Efecto del miR-1307-3p en la invasión de las células MCF-7. La línea celular MCF-7 transfectada con 100 nM del inhibidor del miR-1307-3p presentó una disminución del 49.88% en su capacidad invasiva en comparación con las células tratadas con el control negativo y con las células no tratadas. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

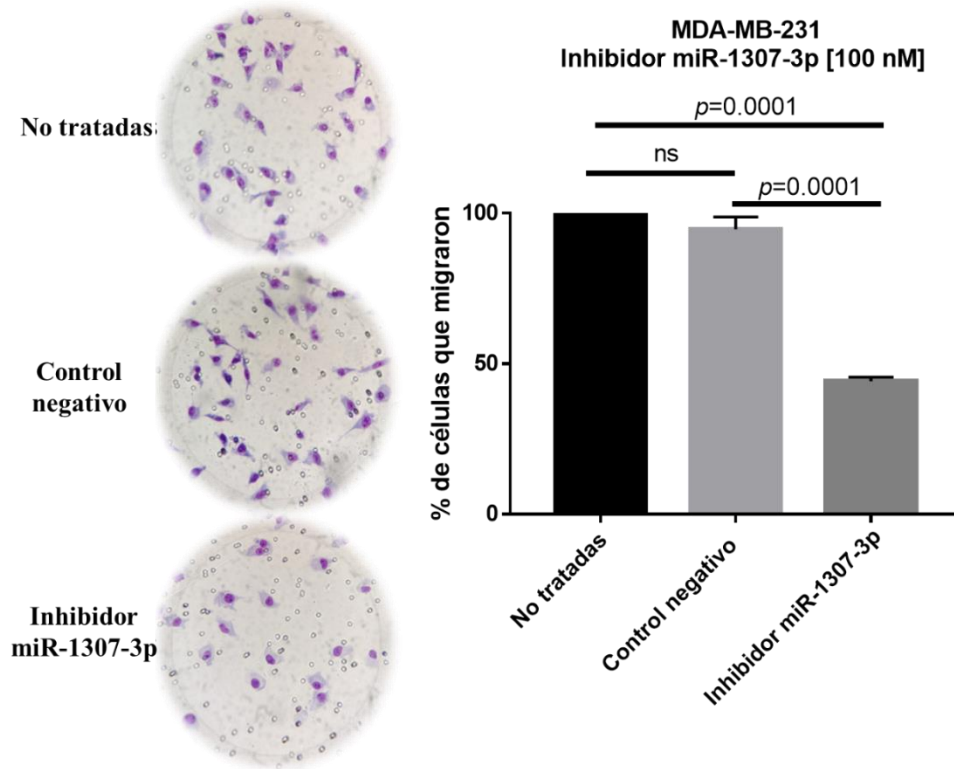


Figura 11. Efecto del miR-1307-3p en la migración de las células MDA-MB-231. La línea celular MDA-MB-231 transfectada con 100 nM del inhibidor del miR-1307-3p presentó una disminución del 50.51% en su capacidad migratoria en comparación con las células tratadas con el control negativo y con las células no tratadas. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

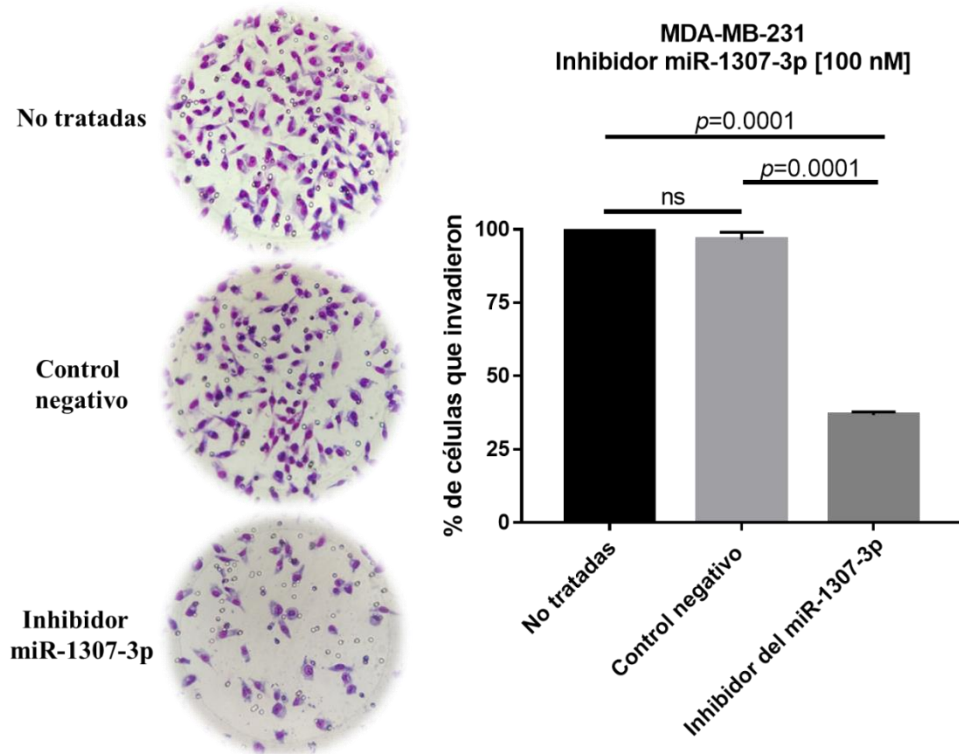


Figura 12. Efecto del miR-1307-3p en la invasión de las células MDA-MB-231. La línea celular MDA-MB-231 transfectada con 100 nM del inhibidor del miR-1307-3p presentó una disminución del 59.91% en su capacidad invasiva en comparación con las células tratadas con el control negativo y con las células no tratadas. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

7.6 El miR-1307-3p promueve la angiogénesis en células HUVEC

Otro proceso importante involucrado en la progresión del CaMa es la formación de nuevos vasos sanguíneos, conocido como angiogénesis, la cual es esencial en el microambiente tumoral, ya que permite que el tumor obtenga los nutrientes necesarios para seguir creciendo. Después de la transfección con 100 nM de inhibidor del miR-1307-3p, se observó una disminución significativa ($p=0.0022$) en la capacidad de las células de formar anillos, en comparación con el grupo tratado con el control negativo del inhibidor y con las células no tratadas (Figura 13). Los datos obtenidos indican que el miR-1307-3p promueve la angiogénesis en las células Huvec.

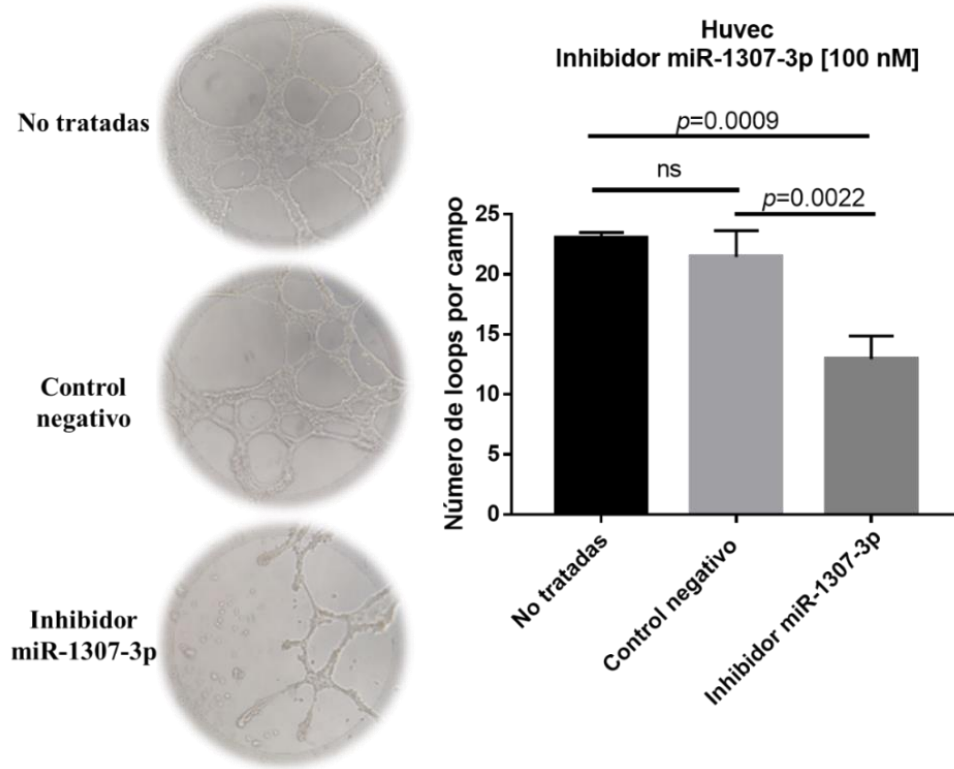


Figura 13. Efecto del miR-1307-3p en la angiogénesis de las células HUVEC. La línea celular HUVEC fue transfectada con 100 nM del inhibidor del miR-1307-3p. Presentó una disminución significativa en su capacidad de formar anillos en comparación con las células tratadas con el control negativo ($p=0.0022$) y con las células no tratadas ($p=0.0009$). Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

7.7 Identificación de los blancos del miR-1307-3p en cáncer de mama

Para comprender mejor el efecto del miR-1307-3p en la progresión del CaMa, exploramos los posibles genes blanco del miR-1307-3p en diversas bases de datos especializadas de miRNAs y se seleccionaron los 100 blancos principales de cada una de ellas. Después, seleccionamos los genes que aparecen en al menos tres bases de datos distintas. Este enfoque aumenta la probabilidad de seleccionar blancos verdaderos del miR-1307-3p, debido a los diversos algoritmos y criterios de selección empleados por cada base de datos. El siguiente paso consistió en evaluar los genes identificados mediante RT-qPCR para confirmar experimentalmente el efecto del miR-1307-3p sobre estos posibles blancos. El análisis de nueve bases de datos: TargetScan, miRDB, RNA Central, RNA22, miSTAR,

DIANA, miRmap, miRabel, MicroT, reveló 17 potenciales blancos (Tabla 1). Los resultados mostraron 1 blanco que incrementó su expresión, 11 blancos cuya expresión no sufrió cambios y 5 blancos regulados negativamente (Figura 14). La Figura 14 presenta un análisis simplificado de la expresión diferencial de genes, centrándose en los cambios de expresión empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ con los datos obtenidos de la qPCR. Esta representación ofrece una clara imagen de las variaciones en la actividad de los genes. Los genes regulados positivamente que superan el umbral de 0.15 y los genes regulados negativamente que caen por debajo de -0.15, lo que facilita una comprensión inmediata de su estado regulatorio. Este enfoque resalta la utilidad del cambio de expresión como una métrica singular para evaluar los patrones de expresión génica, simplificando el proceso interpretativo mientras se proporcionan valiosos conocimientos sobre los mecanismos de regulación génica. Solo un blanco, PRM2, cumplió los criterios para una evaluación adicional, que incluían un aumento en su expresión después de la transfección con el inhibidor del miR-1307-3p y una actividad reportada o sugerida como supresor tumoral. Basados en estos criterios, PRM2 fue seleccionado para evaluar su expresión a nivel de proteína mediante Western blot.

Tabla 1. Blancos probables del miR-1307-3p

<i>Gen</i>	<i>Nombre</i>
<i>RASSF2</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2
<i>NADSYN1</i>	NAD synthetase 1
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
<i>SPERT</i>	Spermatid associated
<i>TMEM158</i>	Transmembrane protein 158
<i>BAIAP3</i>	BAI1-associated protein 3
<i>BRD3</i>	Bromodomain containing 3
<i>RP9</i>	Retinitis pigmentosa 9
<i>VKORC1L1</i>	Vitamin K epoxide reductase complex. subunit 1-like 1
<i>TAGLN3</i>	Transgelin 3
<i>VPS37C</i>	Vacuolar protein sorting 37 homolog C
<i>PRKCZ</i>	Protein kinase C. zeta
<i>AGAP1</i>	ArfGAP with GTPase domain. ankyrin repeat and PH domain 1
<i>PRM2</i>	Protamine 2
<i>TNPO2</i>	Transportin 2
<i>ISM1</i>	Isthmin 1
<i>NUCKS1</i>	Nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1

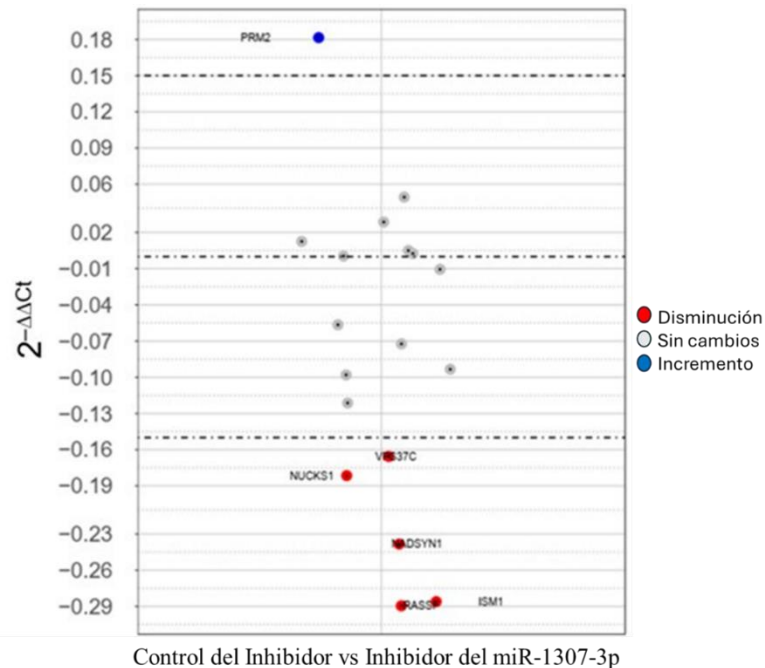


Figura 14. Cambios en la expresión génica de los genes blanco del miR-1307-3p usando un inhibidor de miR-1303-3p. El eje Y muestra los cambios de expresión, estableciendo la muestra transfectada con el control del inhibidor como la línea base (con un valor de 0). Los cambios de expresión mostrados se calculan utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que compara directamente la expresión diferencial con esta línea base. Este enfoque cuantifica efectivamente la diferencia en abundancia en relación con la muestra transfectada con el inhibidor del miR-1307-3p. Este gráfico de volcán simplificado distingue entre genes regulados positivamente, estables y regulados negativamente utilizando umbrales de cambio de expresión de 0.15 y -0.15, respectivamente. Los genes regulados negativamente están marcados en rojo, los genes regulados positivamente en azul y los genes con expresión estable en gris. El experimento se realizó en una réplica técnica única en triplicado.

7.8 Expresión de la proteína PRM2 en las líneas celulares de cáncer de mama

Los cambios en el nivel de proteína PRM2 tras la transfección con el inhibidor de miR-1307-3p se confirmaron mediante Western blot. PRM2 mostró un aumento del 14% ($p=0.0009$) en la expresión en comparación con las células tratadas con el control negativo, lo que indica que PRM2 es un blanco del miR-1307-3p (Figura 15). También evaluamos la expresión de PRM2 en un panel de líneas celulares de CaMa para determinar si PRM2 se expresaba en diferentes líneas celulares de esta patología (Figura 16). Los resultados obtenidos mostraron que PRM2 se expresa con intensidad variable en diferentes líneas celulares de CaMa.

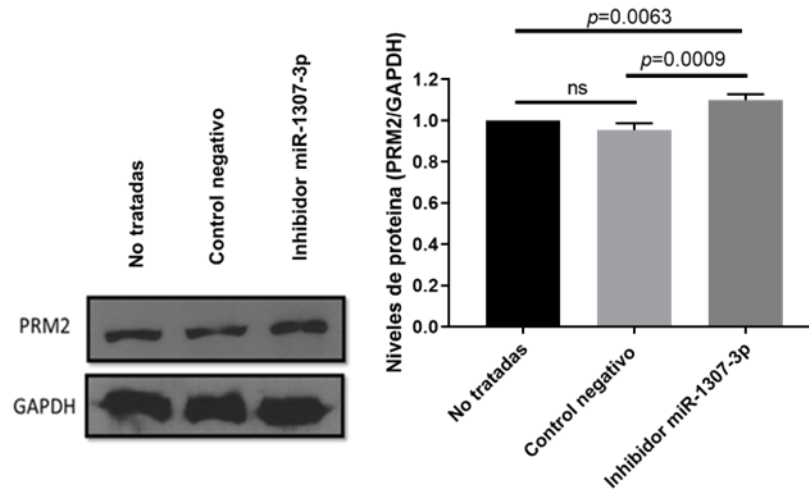


Figura 15. Expresión de PRM2 en cáncer de mama. Expresión de PRM2 en la línea celular MDA-MB-231. La transfección con el inhibidor del miR-1307-3p a una concentración de 200 nM provocó un aumento en la expresión de la proteína PRM2 en las células de CaMa. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes

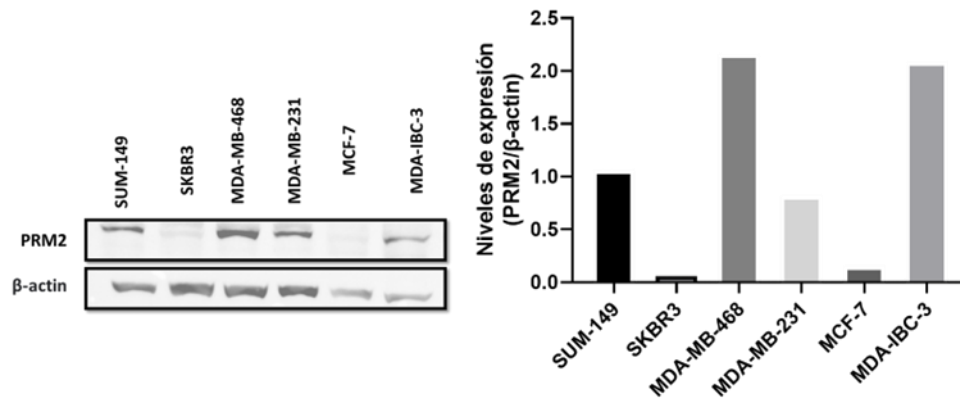


Figura 16. Expresión de PRM2 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. El análisis de la expresión de PRM2 en 6 líneas celulares de CaMa demostró que se expresa con diferente intensidad en cada una de ellas, pero que se encuentra presente en todas. Los resultados representan una medición independiente en cada línea celular.

7.9 Validación de la interacción entre el miR-1307-3p y la 3'UTR del mRNA de PRM2

Para confirmar la interacción entre el miR-1307-3p y la 3'UTR del mRNA de PRM2, realizamos un ensayo de luciferasa dual, el cual mide la unión directa del miR-1307-3p a la región 3'UTR del mRNA de PRM2. La Figura 17a muestra la unión predicha por la plataforma TargetScan (www.targetscan.org) (Agarwal et al., 2015; McGeary et al., 2019). En comparación con la transfección con el control negativo del inhibidor, la transfección con el inhibidor del miR-1307-3p en células MDA-MB-231 resultó en un aumento en la actividad de la luciferasa ($p=0.0067$), debido a que el inhibidor bloquea la unión del miR-1307-3p endógeno con la región del vector que contiene la secuencia de PRM2 (Figura 3.), lo que indica que el miR-1307-3p se une directamente a la 3'UTR del mRNA de PRM2 (Figura 17b). En conjunto, estos resultados indican que PRM2 es un blanco directo del miR-1307-3p en las células de CaMa.

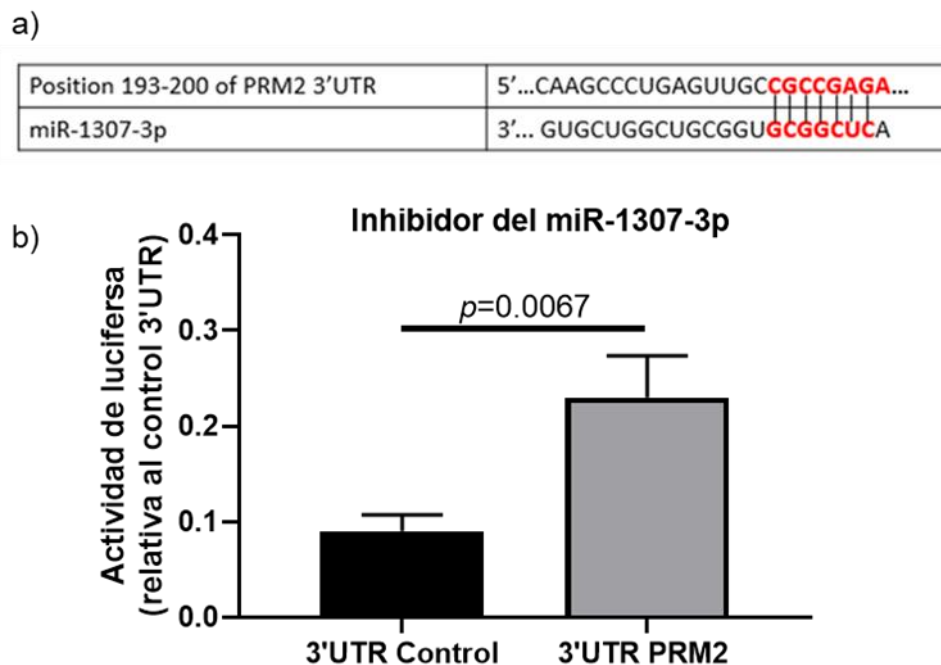


Figura 17. Interacción entre el miR-1307-3p y su blanco PRM2. a) Representación esquemática de la región apareada entre el miR-1307-3p y PRM2, según lo predicho por TargetScan. b) Se realizó un ensayo dual de luciferasa para evaluar la unión del miR-1307-3p a la 3'UTR de PRM2 utilizando 200 nM de inhibidor de miR-1307-3p. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado.

7.10 Vías de señalización asociadas con miR-1307-3p y PRM2

Para determinar las interacciones moleculares entre PRM2 y otros genes, utilizamos el software IPA. El análisis reveló interacciones entre PRM2 y RAB, un miembro de la subfamilia RAS, familia oncogénica RAS similar a 6 (RABL6), que ha sido reportado como una molécula importante en diversos tipos de cáncer, incluido el CaMa (Feng et al., 2020; Kohlmeyer et al., 2020; Li et al., 2013) (Figura 18a). Además, con la ayuda de IPA, construimos una posible vía de señalización como resultado de la interacción entre el miR-1307-3p y PRM2 en células de CaMa (Figura 18b). Es importante destacar que estos datos sirven como punto de partida para estudios posteriores donde se pueden validar experimentalmente.

7.11 Asociación entre la expresión del miR-1307-3p y PRM2 con la supervivencia global y la supervivencia libre de recaída en pacientes con cáncer de mama

Para determinar la relevancia clínica de la expresión de miR-1307-3p y PRM2 en CaMa, realizamos un análisis de Kaplan-Meier utilizando la base de datos de pacientes KM-plotter (www.kmplot.com). Los gráficos generados muestran que los pacientes con una mayor expresión del miR-1307-3p exhiben una menor supervivencia global (OS) en comparación con aquellos con una expresión disminuida del miR-1307-3p ($p=0.00022$) (Figura 18c). Por el contrario, los pacientes con una mayor expresión de PRM2 tuvieron una supervivencia libre de recaída (RFS) más prolongada que aquellos con una baja expresión de PRM2 ($p=0.012$) (Figura 18d). Estos resultados indican que la regulación de PRM2 por el miR-1307-3p está asociada con la OS y la RFS de los pacientes con BC.

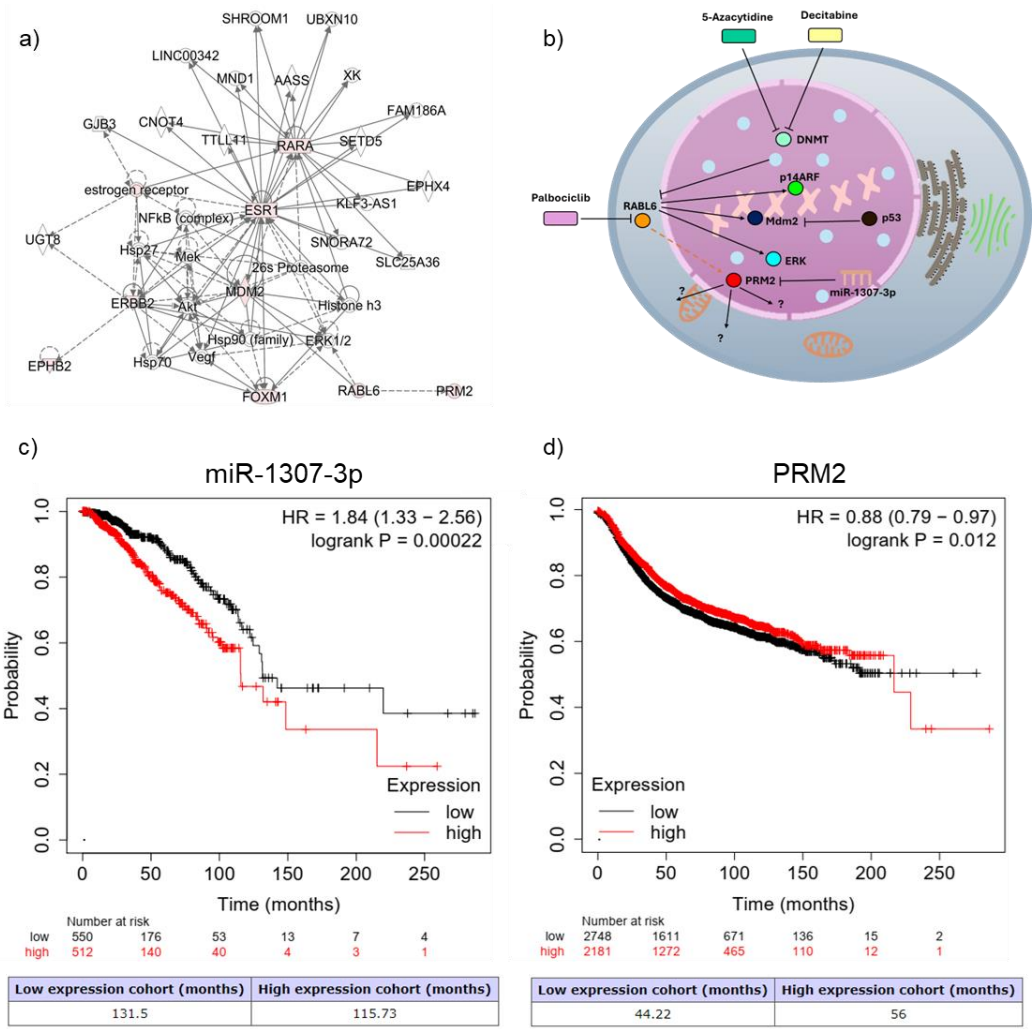


Figura 18. Relevancia clínica de la posible vía de señalización que involucra al miR-1307-3p y PRM2 en cáncer de mama. a) Análisis IPA en el que se muestra la interacción de PRM2 con RABL6. b) Construcción de un posible modelo de vía de señalización entre el miR-1307-3p y PRM2 en CaMa a través del análisis IPA. c) Gráfico de Kaplan-Meier (KM) que muestra que la supervivencia global (OS) se reduce en pacientes con CaMa que tienen niveles más altos de expresión del miR-1307-3p. d) Por el contrario, una mayor expresión de PRM2 conduce a un aumento en la supervivencia libre de recaída (RFS). Los gráficos se generaron utilizando el plotter de Kaplan-Meier (KM) (www.kmplot.com).

8. DISCUSIÓN

En nuestro trabajo identificamos que el miR-1307-3p desempeña un papel oncogénico en la progresión del CaMa, ya que la disminución del miR-1307-3p redujo la proliferación, migración e invasión de las células de CaMa y la angiogénesis de las células HUVEC. Además, encontramos PRM2 un blanco del miR-1307-3p que no había sido reportado previamente en CaMa.

Observamos una sobreexpresión de miR-1307-3p en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, consistente con los hallazgos reportados por Han et al. en 2019. Sin embargo, ellos reportaron una mayor expresión del miRNA en la línea celular MDA-MB-231 (Han et al., 2019), mientras que nosotros, detectamos una expresión incrementada en las células MCF-7. Estas discrepancias pueden deberse al uso de SNORD44 como control endógeno en lugar de U6, que fue utilizado por Han et al. en 2019 (Han et al., 2019). Se ha documentado que U6 exhibe fluctuaciones en la expresión a través de múltiples líneas celulares, lo que lo hace poco confiable para el análisis de expresión de miRNAs (Appaiah et al., 2011; Xiang et al., 2014). En otros estudios, Shimomura et al. reportaron un aumento en los niveles de miR-1307-3p en el suero de pacientes en las etapas tempranas de CaMa, utilizando miR-149-3p como control endógeno, lo que sugiere un efecto como oncoMir del miR-1307-3p (Shimomura et al., 2016). Sin embargo, la comparación entre los datos de distintos grupos de trabajo no siempre es sencilla, debido a variaciones en la naturaleza de las muestras o al uso de diferentes controles endógenos para la normalización de valores (Chugh & Dittmer, 2012; Schwarzenbach et al., 2015). Nuestros datos confirman la sobreexpresión de miR-1307-3p en células de CaMa, alineándose con hallazgos previos y proporcionando evidencia de su papel oncogénico.

Por otra parte, existe un informe que describe un papel contrastante de miR-1307-3p en CaMa, es decir, un efecto supresor tumoral, ya que su elevada expresión conduce a la sensibilización de las células de CaMa a la terapia con cisplatino al regular negativamente a MDM4 (X. Wang & Zhu, 2018). Este efecto contrario del miR-1307-3p podría atribuirse a los cambios metabólicos inducidos por la exposición prolongada al cisplatino durante el proceso de establecimiento de líneas celulares de CaMa resistentes a este fármaco (Cocetta

et al., 2020). Estos efectos contrastantes resaltan la necesidad de realizar más estudios para comprender mejor el efecto del miR-1307-3p en la progresión del CaMa.

Una limitación de nuestro estudio es que los niveles de expresión basal del miR-1307-3p solo se analizaron en dos líneas celulares de CaMa. Por lo tanto, es necesario evaluar la expresión de este miRNA en una mayor variedad de líneas celulares de CaMa, utilizando SNORD44 como control endógeno, para obtener un panorama más claro de la expresión de miR-1307-3p en esta patología.

Hay pocos informes sobre el efecto funcional del miR-1307-3p en la progresión del CaMa. Nuestros hallazgos indican que la inhibición de miR-1307-3p disminuyó significativamente la proliferación de las células de CaMa. Los resultados son coherentes con los reportados por Han et al., quienes demostraron que la inhibición de la expresión de miR-1307-3p mediante un vector lentiviral resultó en una reducción de la proliferación de las células de CaMa MDA-MB-468, ocasionando una disminución del crecimiento en agar blando (Han et al., 2019). Ambos estudios destacan el papel del miR-1307-3p en la proliferación, a pesar del uso de diferentes métodos experimentales y técnicas de transfección.

Además, al emplear el inhibidor del miR-1307-3p observamos una reducción en las capacidades migratorias e invasivas de las células de CaMa. Hasta el momento, nuestro estudio es el único en el que se ha evaluado el papel de miR-1307-3p en los procesos de migración e invasión en CaMa. Sin embargo, hay estudios que examinan estos procesos en otros tipos de cáncer. En 2019, Chen et al. reportaron que una reducción en los niveles del miR-1307-3p conduce a una disminución de la migración y la invasión en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular MHCC97H y HCCLM3 (Chen et al., 2019). Por otro lado, en 2022, Guo et al. demostraron que la inhibición del miR-1307-3p a través del RNA circular circDIDO1 afecta significativamente la migración y la invasión de las células de cáncer gástrico MGC-803 y HCG-27 (Guo et al., 2022). En 2020, Jiao et al. encontraron que el RNA circular circRNA_101308 puede reducir la migración y la invasión en las líneas celulares de cáncer cervical SiHa, CaSki y HeLa al afectar al miR-26a-5p, miR-196a-5p, miR-196b-5p, miR-355-3p y miR-1307-3p (Jiao et al., 2020).

Es notable que los miRNAs pueden exhibir diferentes funciones dependiendo de su localización en distintos tejidos y órganos. (Nalawade & Singh, 2023; Zhang et al., 2017). La ubicación de estas moléculas puede determinar si actúan como oncoMirs o tsMirs (Svoronos et al., 2016). Sin embargo, todos los informes sobre el papel de miR-1307-3p en la migración y la invasión se alinean con su comportamiento oncogénico, independientemente del tipo de cáncer estudiado.

En cuanto al papel del miR-1307-3p en la angiogénesis, nuestros datos mostraron por primera vez que la inhibición de miR-1307-3p reduce significativamente la capacidad de las células HUVEC para formar nueva vasculatura, lo cual es crucial para el mantenimiento tumoral. Previamente se ha reportado que los miRNAs desempeñan papeles clave en la regulación de la angiogénesis (Hussen et al., 2021). En 2015, García-Donas et al. empleando técnicas de bioinformática y secuenciación, demostraron que el miR-1307-3p podría estar involucrado en la respuesta a fármacos antiangiogénicos como los inhibidores de la tirosina quinasa en células de carcinoma de células renales metastásico (García-Donas et al., 2016). El enfoque mencionado podría aplicarse para predecir el efecto de miR-1307-3p en otros tipos de cáncer, como el CaMa (Chen et al., 2019).

A pesar de los informes sobre el miR-1307-3p y su efecto oncogénico en CaMa, se sabe poco sobre los blancos de este miRNA que se encuentran involucrados en su función. Los resultados obtenidos de la RT-qPCR en placa personalizada empleando blancos identificados bioinformáticamente, revelaron solo un blanco potencial del miR-1307-3p, PRM2, que fue confirmado por ensayos de Western blot y de luciferasa dual. También evaluamos a PRM2 en diferentes líneas celulares de CaMa, observando que se expresa con niveles variables y que esta expresión es inversamente proporcional a la expresión del miR-1307-3p. Detectamos una mayor expresión de este miRNA en las células MCF-7 que en las células MDA-MB-231. En contraste, la expresión de PRM2 fue mayor en las células MDA-MB-231 que en las células MCF-7, lo que indica una relación inversa entre la expresión del miR-1307-3p y PRM2, una relación esperada entre la interacción de un oncoMir y su mRNA blanco.

Los humanos expresan dos tipos de protaminas: PRM1 y PRM2, ambas desempeñan roles en la condensación de la cromatina (Günther et al., 2015). Las protaminas se caracterizan por su riqueza en arginina y cisteína, lo que les permite interactuar con el esqueleto de ADN cargado negativamente, conduciendo así a la represión transcripcional (Millar et al., 2000). Además, se ha demostrado que su inducción en células somáticas suprime la división celular en células tumorales. Un estudio demostró que en *E. coli* y en células cancerosas cervicales HeLa, la expresión de protamina disminuye la proliferación celular. Sin embargo, su expresión se ha asociado principalmente con el tejido testicular y problemas de fertilidad masculina (Günther et al., 2015; Ren et al., 2021). Por esta razón, fue inesperado detectar la expresión de la proteína PRM2 en la línea celular MDA-MB-231, a pesar de que múltiples bases de datos indican que es un blanco potencial del miR-1307-3p. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que reporta la presencia de PRM2 en células de CaMa, lo que presenta una oportunidad significativa para investigar más a fondo su papel y obtener conocimientos sobre la biología de esta proteína en el tejido mamario y sus implicaciones.

En general, inhibir la expresión del miR-1307-3p reduce la progresión del CaMa al disminuir la proliferación, migración, invasión y angiogénesis. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto del miR-1307-3p sobre estos procesos después de usar el inhibidor de miRNA a diferentes concentraciones, algo que se abordará en estudios futuros. Los efectos biológicos asociados con los niveles elevados del miR-1307-3p observados en el CaMa podrían ocurrir a través de su blanco PRM2, identificado por primera vez en este proyecto de investigación. Por lo que, en este sentido, sería importante evaluar el efecto biológico de inhibir la expresión de PRM2 con siRNAs en los procesos involucrados en la progresión del CaMa, al igual que escalar a un modelo *in vivo*.

La vía de señalización predicha por IPA indica una interacción entre el oncogén RABL6 y el gen blanco PRM2. Esta interacción disminuye la expresión de PRM2, lo que, en conjunto con la expresión del miR-1307-3p, resulta en una inhibición aún mayor de este gen. Esto podría provocar una descondensación de la cromatina en regiones genómicas asociadas con la expresión de oncogenes, favoreciendo la progresión del cáncer de mama,

lo que podría explicar la disminución en la supervivencia observada en los análisis bioinformáticos.

9. CONCLUSIONES

- El miR-1307-3p se encuentra sobreexpresado en las líneas de CaMa.MCF-7 y MDA-MB-231.
- La sobreexpresión de miR-1307-3p promueve la proliferación del CaMa.
- La sobreexpresión de miR-1307-3p favorece los procesos de migración e invasión en CaMa.
- La sobreexpresión de miR-1307-3p promueve el proceso de angiogénesis.
- PRM2 se encuentra expresado en células de CaMa y constituye un blanco del miR-1307-3p.
- PRM2 podría actuar como un gen supresor de tumores que es regulado a nivel postranscripcional por el miR-1307-3p

Por lo tanto, se debe investigar más a fondo el mecanismo molecular mediante el cual PRM2 es regulado por miR-1307-3p en las células de CaMa. Por todo lo anterior nuestros resultados indican un papel oncogénico del miR-1307-3p en CaMa, que podría ser mediado a través de su blanco PRM2, ampliando el conocimiento de este miRNA en la progresión del CaMa y abriendo la posibilidad de emplearlo como blanco terapéutico en conjunto con los tratamientos ya existentes en CaMa.

También se debe examinar el efecto biológico de eliminar o disminuir la expresión de PRM2 en los procesos involucrados en la progresión del CaMa. En este sentido, el uso de moléculas como los siRNA podría ser un enfoque adecuado, al igual que escalar a un modelo *in vivo*. Así como evaluar si la sobreexpresión de PRM2 provoca una disminución de miR-1307-3p en células de CaMa. Utilizar inhibidores del miR-1307-3p junto con

tratamientos existentes podría representar un enfoque novedoso para el tratamiento del CaMa.

10. PERSPECTIVAS

- Validar el efecto de PRM2 empleando siRNAs en las pruebas de funcionalidad: proliferación, migración, invasión y angiogénesis.
- Evaluar el efecto del miR-1307-3p y PRM2, solos y en combinación con quimioterapia en un modelo murino para determinar su efecto en la progresión del CaMa.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Appaiah, H. N., Goswami, C. P., Mina, L. A., Badve, S., Sledge, G. W., Liu, Y., & Nakshatri, H. (2011). Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Research: BCR*, 13(5), R86. <https://doi.org/10.1186/bcr2943>
- Arun, R. P., Cahill, H. F., & Marcato, P. (2022). Breast Cancer Subtype-Specific miRNAs: Networks, Impacts, and the Potential for Intervention. *Biomedicines*, 10(3), 651. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030651>
- Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P., & Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*, 22(20), 2773–2785. <https://doi.org/10.1101/gad.1705308>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- Brennan, G. P., & Henshall, D. C. (2020). MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nature Reviews. Neurology*, 16(9), 506–519. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0369-8>
- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular Cell*, 64(2), 320–333. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Chen, L., Heikkinen, L., Wang, C., Yang, Y., Sun, H., & Wong, G. (2019). Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Briefings in Bioinformatics*, 20(5), 1836–1852. <https://doi.org/10.1093/bib/bby054>

- Chen, S., Wang, L., Yao, B., Liu, Q., & Guo, C. (2019). miR-1307-3p promotes tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by repressing DAB2 interacting protein. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *117*, 109055. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109055>
- Chugh, P., & Dittmer, D. P. (2012). Potential pitfalls in microRNA profiling. *WIREs RNA*, *3*(5), 601–616. <https://doi.org/10.1002/wrna.1120>
- Cocetta, V., Ragazzi, E., & Montopoli, M. (2020). Links between cancer metabolism and cisplatin resistance. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *354*, 107–164. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.01.005>
- Corcoran, C., Friel, A. M., Duffy, M. J., Crown, J., & O’Driscoll, L. (2011). Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clinical Chemistry*, *57*(1), 18–32. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.150730>
- Cserni, G. (2020). Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*, *112*(1), 25–41. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20>
- Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, *472*(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, *8*(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- DeSantis, C. E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B. O., & Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *24*(10), 1495–1506. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0535>
- Feng, Y., Yan, S., Huang, Y., Huang, Q., Wang, F., & Lei, Y. (2020). High expression of RABL6 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, *20*(1), 602. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07068-w>
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J., Bezdán, D., Báñez-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., González, J., Chen, K. C., LeProust, E. M., Martí, E., & Estivill, X. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*, *15*(4), R57. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57>
- García-Donas, J., Beuselinck, B., Inglada-Pérez, L., Graña, O., Schöffski, P., Wozniak, A., Bechter, O., Apellániz-Ruiz, M., Leandro-García, L. J., Esteban, E., Castellano, D. E.,

- González Del Alba, A., Climent, M. A., Hernando, S., Arranz, J. A., Morente, M., Pisano, D. G., Robledo, M., & Rodriguez-Antona, C. (2016). Deep sequencing reveals microRNAs predictive of antiangiogenic drug response. *JCI Insight*, *1*(10), e86051. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86051>
- Ghafouri-Fard, S., Khanbabapour Sasi, A., Abak, A., Shoorei, H., Khoshkar, A., & Taheri, M. (2021). Contribution of miRNAs in the Pathogenesis of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.768949>
- Günther, K., Paradowska-Dogan, A., Bärman, B., Klein, H., von Eichel-Streiber, C., Hartley, R., Weidner, W., Behr, R., & Steger, K. (2015). Expression of sperm-specific protamines impairs bacterial and eukaryotic cell proliferation. *Histochemistry and Cell Biology*, *143*(6), 599–609. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1309-3>
- Guo, Z., Zhang, Y., Xu, W., Zhang, X., & Jiang, J. (2022). Engineered exosome-mediated delivery of circDIDO1 inhibits gastric cancer progression via regulation of MiR-1307-3p/SOCS2 Axis. *Journal of Translational Medicine*, *20*(1), 326. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03527-z>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Han, S., Zou, H., Lee, J.-W., Han, J., Kim, H. C., Cheol, J. J., Kim, L.-S., & Kim, H. (2019). miR-1307-3p Stimulates Breast Cancer Development and Progression by Targeting SMYD4. *Journal of Cancer*, *10*(2), 441–448. <https://doi.org/10.7150/jca.30041>
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer. *Disease Models & Mechanisms*, *14*(4), dmm047662. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
- Hussen, B. M., Abdullah, S. T., Rasul, M. F., Salihi, A., Ghafouri-Fard, S., Hidayat, H. J., & Taheri, M. (2021). MicroRNAs: Important Players in Breast Cancer Angiogenesis and Therapeutic Targets. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*, 764025. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.764025>
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Research*, *65*(16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>
- Ipsaro, J. J., & Joshua-Tor, L. (2015). From Guide to Target: Molecular Insights into Eukaryotic RNAi Machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(1), 20–28. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2931>
- Jiang, H., & Li, H. (2021). Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, *21*(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07860-2>

- Jiao, J., Jiao, X., Liu, Q., Qu, W., Ma, D., Zhang, Y., & Cui, B. (2020). The Regulatory Role of circRNA_101308 in Cervical Cancer and the Prediction of Its Mechanism. *Cancer Management and Research*, *12*, 4807–4815. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S242615>
- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell*, *59*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.027>
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, *16*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Jungers, C. F., & Djuranovic, S. (2022). Modulation of miRISC-Mediated Gene Silencing in Eukaryotes. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*, 832916. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.832916>
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(7), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
- Khalife, H., Skafi, N., Fayyad-Kazan, M., & Badran, B. (2020). MicroRNAs in breast cancer: New maestros defining the melody. *Cancer Genetics*, *246–247*, 18–40. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.08.005>
- Khan, S. A., Hernandez-Villafuerte, K., Hernandez, D., & Schlender, M. (2022). Estimation of the stage-wise costs of breast cancer in Germany using a modeling approach. *Frontiers in Public Health*, *10*, 946544. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.946544>
- Kohlmeyer, J. L., Kaemmer, C. A., Pulliam, C., Maharjan, C. K., Moreno Samayoa, A., Major, H., Cornick, K., Knepper-Adrian, V., Khanna, R., Sieren, J. C., Leidinger, M. R., Meyerholz, D. K., Zamba, G., Weimer, J. M., Dodd, R. D., Darbro, B. W., Tanas, M. R., & Quelle, D. E. (2020). RABL6A is an essential driver of MPNSTs that negatively regulates the RB1 pathway and sensitizes tumor cells to CDK4/6 inhibitors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(12), 2997–3011. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2706>
- La Rocca, G., & Cavalieri, V. (2022). Roles of the Core Components of the Mammalian miRISC in Chromatin Biology. *Genes*, *13*(3), 414. <https://doi.org/10.3390/genes13030414>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, S. H., Ng, C. X., Wong, S. R., & Chong, P. P. (2023). MiRNAs Overexpression and Their Role in Breast Cancer: Implications for Cancer Therapeutics. *Current Drug Targets*, *24*(6), 484–508. <https://doi.org/10.2174/1389450124666230329123409>

- Li, B., Cao, Y., Sun, M., & Feng, H. (2021). Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(10), e21916. <https://doi.org/10.1096/fj.202100294RR>
- Li, Y.-Y., Fu, S., Wang, X.-P., Wang, H.-Y., Zeng, M.-S., & Shao, J.-Y. (2013). Down-regulation of c9orf86 in human breast cancer cells inhibits cell proliferation, invasion and tumor growth and correlates with survival of breast cancer patients. *PloS One*, 8(8), e71764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071764>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., & Yang, Q. (2020). Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loganathan, T., & Doss C, G. P. (2023). Non-coding RNAs in human health and disease: Potential function as biomarkers and therapeutic targets. *Functional & Integrative Genomics*, 23(1), 33. <https://doi.org/10.1007/s10142-022-00947-4>
- Loh, H.-Y., Norman, B. P., Lai, K.-S., Rahman, N. M. A. N. Abd., Alitheen, N. B. M., & Osman, M. A. (2019). The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194940>
- Ma, C. X., & Ellis, M. J. (2013). The cancer genome atlas: Clinical applications for breast cancer. *Oncology*, 27(12), 1263–1263.
- Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8, 23–31. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>
- McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6472), eaav1741. <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
- McGuire, A., Brown, J. A. L., & Kerin, M. J. (2015). Metastatic breast cancer: The potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(1), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9551-7>
- Millar, M. R., Sharpe, R. M., Weinbauer, G. F., Fraser, H. M., & Saunders, P. T. (2000). Marmoset spermatogenesis: Organizational similarities to the human. *International Journal of Andrology*, 23(5), 266–277. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00236.x>
- Mukherjee, S., Dhar, R., Jonnalagadda, S., Gorai, S., Nag, S., Kar, R., Mukerjee, N., Mukherjee, D., Vatsa, R., Ariketh, D., Krishnan, A., Gundamaraju, R., Jha, S. K.,

- Alexiou, A., & Papadakis, M. (2023). Exosomal miRNAs and breast cancer: A complex theranostics interlink with clinical significance. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 28(6), 502–518. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2023.2229537>
- Muñoz, J. P., Pérez-Moreno, P., Pérez, Y., & Calaf, G. M. (2023). The Role of MicroRNAs in Breast Cancer and the Challenges of Their Clinical Application. *Diagnostics*, 13(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13193072>
- Nalawade, R., & Singh, M. (2023). Intracellular Compartmentalization: A Key Determinant of MicroRNA Functions. *MicroRNA*, 12(2), 114–130. <https://doi.org/10.2174/2211536612666230330184006>
- Naya Català, F. (2018). *Uso de datos genómicos para la identificación de miRNAs predictores de supervivencia en adenocarcinoma*. <https://openaccess.uoc.edu/handle/10609/73266>
- Obidiro, O., Battogtokh, G., & Akala, E. O. (2023). Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics*, 15(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071796>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Pallante, P., Battista, S., Pierantoni, G. M., & Fusco, A. (2014). Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(2), 88–101. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.223>
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6806. <https://doi.org/10.3390/ijms23126806>
- Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R.K. S., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2007–2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.25854>
- Plummer, M., Martel, C. de, Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: A synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Qiu, X., & Dou, Y. (2017). miR-1307 promotes the proliferation of prostate cancer by targeting FOXO3A. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 88, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.120>

- Rakha, E., Toss, M., & Quinn, C. (2022). Specific cell differentiation in breast cancer: A basis for histological classification. *Journal of Clinical Pathology*, *75*(2), 76–84. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207487>
- Ren, S., Chen, X., Tian, X., Yang, D., Dong, Y., Chen, F., & Fang, X. (2021). The expression, function, and utilization of Protamine1: A literature review. *Translational Cancer Research*, *10*(11), 4947–4957. <https://doi.org/10.21037/tcr-21-1582>
- Roy, M., Fowler, A. M., Ulaner, G. A., & Mahajan, A. (2023). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics*, *18*(4), 441–458. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2023.04.002>
- Saha, T., Solomon, J., Samson, A. O., & Gil-Henn, H. (2021). Invasion and Metastasis as a Central Hallmark of Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(16), 3498. <https://doi.org/10.3390/jcm10163498>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Sarhangi, N., Hajjari, S., Heydari, S. F., Ganjizadeh, M., Rouhollah, F., & Hasanzad, M. (2022). Breast cancer in the era of precision medicine. *Molecular Biology Reports*, *49*(10), 10023–10037. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07571-2>
- Sawaki, M., Shien, T., & Iwata, H. (2019). TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Japanese Journal of Clinical Oncology*, *49*(3), 228–231. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy182>
- Schwarzenbach, H., da Silva, A. M., Calin, G., & Pantel, K. (2015). Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clinical Chemistry*, *61*(11), 1333–1342. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239459>
- Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., & Lai, E. C. (2023). microRNAs in action: Biogenesis, function and regulation. *Nature Reviews. Genetics*, *24*(12), 816–833. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>
- Shi, Y., Liu, Z., Lin, Q., Luo, Q., Cen, Y., Li, J., Fang, X., & Gong, C. (2021). MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. *Genes*, *12*(8), 1289. <https://doi.org/10.3390/genes12081289>
- Shimomura, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono, M., Takeshita, F., Niida, S., Shimizu, C., Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Tamura, K., & Ochiya, T. (2016). Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Science*, *107*(3), 326–334. <https://doi.org/10.1111/cas.12880>
- Shinde, S. S., Ahmed, S., Malik, J. A., Hani, U., Khanam, A., Ashraf Bhat, F., Ahmad Mir, S., Ghazwani, M., Wahab, S., Haider, N., & Almezizia, A. A. (2023). Therapeutic

- Delivery of Tumor Suppressor miRNAs for Breast Cancer Treatment. *Biology*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biology12030467>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 179(5), 1033–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>
- Stael, S., Miller, L. P., Fernández-Fernández, Á. D., & Van Breusegem, F. (2022). Detection of Damage-Activated Metacaspase Activity Activities by Western Blot in Plants. In M. Klemenčič, S. Stael, & P. F. Huesgen (Eds.), *Plant Proteases and Plant Cell Death: Methods and Protocols* (pp. 127–137). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2079-3_11
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666–3670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>
- Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology Letters*, 15(3), 2735–2742. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638>
- Tang, R., Qi, Q., Wu, R., Zhou, X., Wu, D., Zhou, H., Mao, Y., Li, R., Liu, C., Wang, L., Chen, W., Hua, D., Zhang, H., & Wang, W. (2015). The polymorphic terminal-loop of pre-miR-1307 binding with MBNL1 contributes to colorectal carcinogenesis via interference with Dicer1 recruitment. *Carcinogenesis*, 36(8), 867–875. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv066>
- Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast Cancer Treatment. *American Family Physician*, 104(2), 171–178.
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Tume, L., Cisneros, C., Sevillano, J., Pacheco-Tapia, R., Matos, D., Acevedo-Espínola, R., Ubidia-Incio, R., & Rodríguez, W. (2016). Desregulación de microARN en el cáncer: Un enfoque terapéutico y diagnóstico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(5), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.08.004>
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 3(3), 311–330. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>

- Vishnoi, A., & Rani, S. (2023). miRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Updated Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2595, 1–12. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2823-2_1
- Wang, W., & Luo, Y. (2015). MicroRNAs in breast cancer: Oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400184>
- Wang, X., & Zhu, J. (2018). Mir-1307 regulates cisplatin resistance by targeting Mdm4 in breast cancer expressing wild type P53. *Thoracic Cancer*, 9(6), 676–683. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12607>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, 95(1130), 20211033. <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>
- Xiang, M., Zeng, Y., Yang, R., Xu, H., Chen, Z., Zhong, J., Xie, H., Xu, Y., & Zeng, X. (2014). U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(1), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.064>
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., & Steitz, J. A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, 155(7), 1568–1580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>
- Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z., & Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, 15 Suppl 7(Suppl 7), S4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S7-S4>
- Yerukala Sathipati, S., & Ho, S.-Y. (2018). Identifying a miRNA signature for predicting the stage of breast cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 16138. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34604-3>
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>
- Zhang, Y., Tang, C., Yu, T., Zhang, R., Zheng, H., & Yan, W. (2017). MicroRNAs control mRNA fate by compartmentalization based on 3' UTR length in male germ cells. *Genome Biology*, 18(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1243-x>
- Zhou, Y., Wang, M., Wu, J., Jie, Z., Chang, S., & Shuang, T. (2015). The clinicopathological significance of miR-1307 in chemotherapy resistant epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 8, 23. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0143-5>

Zubair, M., Wang, S., & Ali, N. (2020). Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 632079. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079>