## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



## EFECTO DEL miR-660-5p EN LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS E IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO BLANCO EN CÁNCER DE MAMA

POR

## VALERIA VILLARREAL GARCÍA

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

## EFECTO DEL miR-660-5p EN LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS E IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO BLANCO EN CÁNCER DE MAMA

Comité de Tesis

uney González

Dra. Vianey González Villasana

Presidente

Dra. Diana Reséndez Pérez

Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal

Dra. Claudia Dalila Altamirano Torres

Vocal

Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Vocal Dra. Katiushka Are DIRECCIÓN

Subdirector de Posgrade POSGRADO

## EFECTO DEL miR-660-5p EN LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS E IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO BLANCO EN CÁNCER DE MAMA

Dirección de Tesis

luney González V.

Dra. Vianey González Villasana

Presidente

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.

## LUGAR DE TRABAJO



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, a cargo de la Dra. Vianey González Villasana; y por el programa National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) Support for Research Excellence (SuRE) Program (R16) grant, 5R16GM145558-02, a cargo del Dr. Pablo E. Vivas-Mejía.

Gracias al apoyo económico brindado por el CONAHCYT como becario (CVU) 779906 en el programa del Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

Gracias al apoyo económico brindado por los programas National Institute on Minority Health and Health Disparities (NIMHD) CCRHD (U54MD007600), y National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) Support for Research Excellence (SuRE) Program (R16) grant, 5R16GM145558-02.

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 también al Centro Comprensivo de Cáncer de la Universidad de Puerto Rico.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comisión de tesis, integrada por la Dra. Vianey González Villasana, que confió en mí al integrarme a su equipo de trabajo y me guio durante mi doctorado. Al Dr. Pablo E. Vivas Mejía, gracias por ser una gran inspiración, por apoyarnos tanto durante el doctorado y por recibirnos en su laboratorio, dicha estancia enriqueció grandemente mi formación académica. A la Dra. Diana Reséndez Pérez, gracias por siempre enseñarme y prepararme para ser una mejor persona. A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, gracias por ser un gran ejemplo que seguir y por permitirme ser parte del Laboratorio de Inmunología y Virología. A la Dra. Claudia Altamirano Torres, gracias por su apoyo en la realización de experimentos. Al Dr. José Manuel Vázquez Guillén, gracias por su guía, enseñanzas, paciencia y dedicación. La experiencia y consejos de todos no solo enriquecieron este proyecto, sino también mi formación personal y profesional.

A Roberto Estupiñan Jiménez, que inició como mi compañero de laboratorio desde el primer día del doctorado y terminó siendo un gran amigo. Gracias por apoyarme constantemente, por tu paciencia y enseñanzas. A todos mis amigos del doctorado, gracias por siempre motivarme, apoyarme y recordarme de que puedo con todo lo que me propongo. A los estudiantes de licenciatura que fueron parte de nuestro laboratorio, gracias por su confianza y por las risas que llenaban de alegría mis días difíciles. A todas las personas que tuve el privilegio de conocer en mi estancia, gracias por enseñarme tanto. Son personas maravillosas, un gran ejemplo a seguir, y lograron que mis días inolvidables. Gracias Puerto Rico por recibirme con tanto amor.

A mis padres, Abadin Villarreal Garza y Doris García Alvarado, gracias por su gran amor y apoyo incondicional. Son mi mayor inspiración para continuar con cada desafío y soy quien soy gracias a ustedes. A mi hermano, Abadin Villarreal García, por siempre aconsejarme, apoyarme y acompañarme. Al resto de mi familia, gracias por su amor, paciencia y apoyo en cada paso de este camino. Los amo inmensamente y los llevo siempre en mi corazón.

A Dios, por ser mi guía, mi fortaleza en momentos difíciles y por enseñarme tanto a lo largo de mi vida.

## DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico a mis padres, Abadin Villarreal Garza y Doris García Alvarado, que siempre han sido mi mejor guía, mi fortaleza y me han apoyado grandemente en todos mis sueños. Gracias por creer en mí, incluso en los momentos más difíciles en que yo no lo hacía. Gracias por enseñarme que los sueños se logran con tesón, esfuerzo, dedicación y perseverancia. Este gran logro es tanto mío como suyo.

A mi hermano, Abadin Villarreal García, gracias por siempre estar presente, por animarme, cuidarme, hacerme reír y por todos los momentos compartidos. Eres el mejor hermano que pude tener.

A mi tía Olinda Mireya Villarreal Garza, por permitirme ser una hija más para usted, por siempre escucharme, aconsejarme y acompañarme durante todos estos años en mi formación académica.

Y a toda mi familia, que siempre me tienen presente en sus oraciones, gracias por apoyarme y alentarme a continuar con todos mis ideales.

Los amo infinitamente a todos.

# ÍNDICE

Sección	Página
LUGAR DE TRABAJO	i
FINANCIAMIENTO	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xi
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer de mama	3
2.2 Progresión del cáncer de mama	4
2.3 Tratamientos del cáncer de mama	5
2.4 MiRNAs	7
2.5 MiRNAs y cáncer	8
2.6 MiRNAs y cáncer de mama	9
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14

5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo General	15
5.2 Objetivos Específicos	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Estrategia Experimental	16
6.2 Cultivo celular	16
6.3 Transfección celular	17
6.4 Determinación de la concentración del inhibidor del miR-660-5p	17
6.5 Ensayo de formación de colonias	17
6.6 Ensayos de migración e invasión celular	18
6.7 Ensayo de angiogénesis	18
6.8 Predicción de blancos del miR-660-5p	19
6.9 RT-qPCR para validar los blancos del miR-660-5p predichos	19
6.10 Análisis de Western Blot	20
6.11 Ensayo de luciferasa dual	21
6.12 Análisis de bases de datos de supervivencia de pacientes	21
6.13 Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	23
7.1 Evaluación de la eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-660-5p	23
7.2 Determinación de la concentración óptima del inhibidor del miR-660-5p	23
7.3 La inhibición del miR-660-5p disminuye la proliferación en células	24
de cáncer de mama	26
<ul> <li>/.4 La inhibición del miR-660-5p disminuye la migración y la invasión en células de cáncer de mama</li> </ul>	26

7.5 La inhibición del miR-660-5p disminuye la angiogénesis in vitro	28
7.6 Identificación de genes blanco del miR-660-5p en células de cáncer	29
de mama	
7.7 Validación de TMEM41B como blanco directo del miR-660-5p en	33
células de cáncer de mama	
7.8 Los niveles de expresión de miR-660 y TMEM41B se correlacionan	38
con la supervivencia global y libre de recaída en pacientes con cáncer de	
mama	
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIÓN	43
10. PERSPECTIVAS	44
11. REFERENCIAS	45

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	Selección de los blancos potenciales del miR-660-5p después del	30
	análisis bioinformático	
Tabla 2.	Selección de los blancos potenciales del miR-660-5p mediante el	31
	Kaplan-Meier Plotter	
Tabla 3.	Blancos potenciales del miR-660-5p	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

#### Página Figura 5 Figura 1. Procesos clave en la progresión del cáncer 8 Figura 2. Biogénesis de los miRNAs Figura 3. 10 MiRNAs asociados al cáncer de mama Figura 4. Expresión del miR-660-5p en muestras de tejido tumoral y tejido 11 normal mamario Figura 5. Niveles basales del miR-660-5p en células de cáncer de mama 12 Figura 6. 23 Eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-660-5p Figura 7. Determinación de la concentración del inhibidor del miR-660-5p 24 Figura 8. 25 Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la proliferación en células de cáncer de mama 27 Figura 9. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la migración en células de cáncer de mama Figura 10. 28 Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la invasión en células de cáncer de mama Figura 11. 29 Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la angiogénesis en células HUVEC 34 Figura 12. Validación de genes blancos del miR-660-5p por RT-qPCR Figura 13. Determinación de la posible vía de señalización que involucra al 35 miR-660-5p y TMEM41B en cáncer de mama Figura 14. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la expresión de 36 TMEM41B en células de cáncer de mama MDA-MB-231 Expresión de TMEM41B en diferentes células de cáncer de mama Figura 15. 36 Validación de TMEM41B como blanco directo del miR-660-5p 37 Figura 16. en células de cáncer de mama Figura 17. Correlación entre la expresión del miR-660 y TMEM41B en cáncer de mama

Figura 18. Asociación de la expresión de miR-660-5p y TMEM41B con la 39 supervivencia global y libre de recaída en pacientes con cáncer de mama

# LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no traducida
Ago2	Argonauta 2
AKT	Proteína cinasa B
AOC3	Amina oxidasa de cobre 3
APLP2	Proteína similar al precursor de beta amiloide 2
ARHGAP36	Proteína activadora de la GTPasa Rho 36
ARL4C	Proteína similar al factor ADP-ribosilación 4C
CALM1	Calmodulina 1
CD8A	CD8 subunidad alfa
CDH13	Cadherina 13
CDKN1A	Inhibidor 1A de la cinasa dependiente de ciclina
CDDJ	Proteína similar al gen relacionado con la degeneración cerebelar
CDR2L	2
CLEC3A	Miembro A de la familia de dominio lectinas de tipo C
CNGA3	Canal de sodio y calcio regulado por nucleótidos cíclicos tipo A3
DGKE	Quinasa épsilon de diacilglicerol
DMFS	Supervivencia libre de metástasis a distancia
EPAS1	Proteína 1 que contiene el dominio PAS del endotelio
ETV1	Factor de transcripción ETS variante 1
FOLH1	Folato hidrolasa 1
HAO1	D-aminoácido oxidasa 1
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano
HIF1A	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
IFT57	Transporte intraflagelar 57
JPH1	Junctofilina 1
KBTBD8	Proteína 8 conteniendo dominios Kelch repetidos y BTB
KIF3A	Miembro 3A de la familia de cinasas
KPNA4	Karioferina subunidad alfa 4
LIFR	Receptor del factor inhibidor de la leucemia

miRNAs	MicroRNAs
MMP-2	Metaloproteinasa de matriz 2
Mrna	RNA mensajero
mTOR	Blanco de rapamicina en células de mamífero
NR3C1	Receptor nuclear de glucocorticoides I
oncomiRs	microRNAs oncogénicos
OS	Supervivencia global
PDCD4	Proteína de muerte celular programada 4
PGLYRP4	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano 4
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PPP6R3	Proteína reguladora 3 de la fosfatasa 6 serina/treonina
PPS	Escala de rendimiento paliativo
Pre-miRNAs	microRNAs precursores
Pri-miRNAs	microRNAs primarios
PRRG1	Proteína rica en prolina y dominio Gla 1
RE-	Receptor de estrógeno negativo
RE+	Receptor de estrógeno positivo
RFS	Supervivencia libre de recaídas
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNF219	Proteína de dedo de anillo y dominio RBR 219
RP-	Receptor de progesterona negativo
RP+	Receptor de progesterona positivo
SLC46A3	Miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 46
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TET2	Tet metilcitosina dioxigenasa 2
TFCP2	Factor de transcripción CP2
TMED7-TICAM2	Proteína TMED7-TICAM2
TMEM41B	Proteína transmembranal 41B
TPD52L2	Proteína tumoral D52-Like 2
TPP2	Tripeptidil peptidasa II
TRBP	Proteína de unión a RNA de doble cadena

tsmiRs	microRNAs supresores de tumores
TSP-1	Trombospondina-1
UNC79	Proteína homóloga Unc-79
USP53	Peptidasa especifica de ubiquitina 53
VDAC1	Canal aniónico dependiente de voltaje 1
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular A
WDR36	Dominio de repetición WD 36
YTHDF1	Proteína de unión al RNA YTH N6-metiladenosina 1

## RESUMEN

El cáncer de mama presenta la mayor prevalencia en mujeres a nivel mundial. Las nuevas terapias ayudan a atacar las células de cáncer de mama metastásicas y resistentes a los medicamentos. La evidencia sugiere que los microRNAs (miRNAs) desregulados promueven la progresión, metástasis y resistencia a los medicamentos en el cáncer de mama. Esta tesis se centró en el miR-660-5p, que se encuentra altamente sobreexpresado en tejido tumoral de cáncer de mama en comparación con tejido mamario sano. Sin embargo, los efectos río abajo del miR-660-5p en las células de cáncer de mama no han sido completamente elucidados. El objetivo fue investigar el papel del miR-660-5p en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, e identificar sus posibles blancos. La estrategia experimental consistió en evaluar el efecto biológico del miR-660-5p en la proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama. También evaluamos la función del miR-660-5p en la angiogénesis en células HUVEC. Para identificar posibles blancos del miR-660-5p, analizamos nueve bases de datos de predicción de blancos de miRNAs. La expresión de estos blancos fue validada por RT-qPCR, Western blot y ensayos de luciferasa dual. hallazgos demostraron que al inhibir el miR-660-5p disminuye Nuestros significativamente la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer de mama, a la par que la angiogénesis en células HUVEC. Adicionalmente, identificamos 15 posibles blancos del miR-660-5p usando un análisis bioinformático y validamos a TMEM41B como un blanco directo del miR-660-5p utilizando Western blot y ensayos de luciferasa dual. En conclusión, los resultados de esta tesis postulan la implicación del miR-660-5p en la proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama y angiogénesis en células HUVEC, identificando a TMEM41B como un nuevo blanco directo del miR-660-5p en cáncer de mama. Por lo cual, el estudio del eje miR-660-5p/TMEM41B podría revelar su relevancia clínica y potencial terapéutico en el cáncer de mama.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent cancer among women worldwide. Emerging therapies focus on targeting metastatic and drug-resistant breast cancer cells. Evidence indicates that deregulated microRNAs (miRNAs) play a pivotal role in driving progression, metastasis, and drug resistance in this disease. This thesis examines miR-660-5p, a microRNA significantly overexpressed in breast cancer tissue compared to healthy mammary tissue, though its downstream effects in breast cancer cells remain largely unexplored. The study aimed to elucidate the role of miR-660-5p in proliferation, migration, invasion of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, and angiogenesis in HUVEC cells while identifying its potential targets. The methodology involved evaluating the biological effects of miR-660-5p on these processes, alongside target identification through nine miRNA prediction databases and validation using RT-qPCR, Western blot, and dual-luciferase assays. The results demonstrated that miR-660-5p inhibition significantly reduced proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells, as well as angiogenesis in HUVEC cells. Bioinformatic analysis identified 15 potential miR-660-5p targets, with TMEM41B validated as a direct target through Western blot and luciferase assays. In conclusion, this thesis underscores the role of miR-660-5p in key processes driving breast cancer progression and highlights TMEM41B as a novel direct target. Further exploration of the miR-660-5p/TMEM41B axis could provide valuable insights into its clinical relevance and therapeutic potential in breast cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres a nivel mundial, con un estimado de 2.3 millones de casos en 2022. Actualmente sigue siendo la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres (Bray et al., 2024; Sung et al., 2021). Esta enfermedad es altamente heterogénea, presentando diversas características biológicas, morfológicas y moleculares, lo que contribuye a diferentes resultados clínicos y respuestas al tratamiento (Provenzano et al., 2018). De acuerdo con la clasificación molecular del cáncer de mama, que categoriza los tumores en función de la presencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el subtipo luminal A es el más predominante en los Estados Unidos, afectando al 66% de los pacientes, seguido por el luminal B (10%), el basal o triple negativo (10%), y finalmente el subtipo HER2 (4%) (DeSantis et al., 2019). Al igual que en otros tipos de cáncer, la mayoría de las muertes ocasionadas por el cáncer de mama se atribuyen a la metástasis y a la resistencia a los tratamientos. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a células cancerosas altamente metastásicas y resistentes a los tratamientos, como el uso de microRNAs (miRNAs) para modular los mecanismos moleculares subyacentes y mejorar la efectividad de las terapias actuales.

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes que desempeñan funciones importantes en diferentes procesos biológicos (Mu et al., 2021). Regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional al unirse a la región 3'-no traducida (3' UTR) de los mRNAs blanco, lo que lleva a la degradación del mRNA o a la represión de la traducción (Tafrihi and Hasheminasab, n.d.). La importancia de los miRNAs ha sido reconocida este año con el otorgamiento del Premio Nobel de Medicina o Fisiología a Victor Ambros y Gary Ruvkun, por su descubrimiento de los microRNAs y su papel crucial en la regulación génica postranscripcional ("The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2024," n.d.). La desregulación de los miRNAs es común en muchos cánceres, incluido el cáncer de mama, contribuyendo a la progresión de la enfermedad, la metástasis y la resistencia a los medicamentos (P.-S. Chen et al., 2012; Klinge, 2018). Dependiendo de sus niveles de

expresión y la función de sus blancos, los miRNAs pueden actuar como oncogenes o supresores de tumores (P.-S. Chen et al., 2012).

Cuando los miRNAs actúan como oncogenes, están sobreexpresados y reprimen la traducción de genes que normalmente inhiben el crecimiento celular, lo que promueve la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas. En contraste, como supresores tumorales, los miRNAs están regulados a la baja, y su falta de actividad permite que oncogenes se sobreexpresen, acelerando el desarrollo tumoral (Calin and Croce, 2006; Croce, 2009).

Uno de los miRNAs con actividad oncogénica es el miR-660-5p, el cual ha sido reportado que se encuentra significativamente sobreexpresado tanto en pacientes con cáncer de mama (Li et al., 2022; Muñoz-Rodríguez et al., 2015; Nashtahosseini et al., 2021) como en líneas celulares de cáncer de mama (Peng et al., 2020; Shen et al., 2017). También, se ha sugerido como un posible marcador pronóstico en el cáncer de mama (Krishnan et al., 2015). Además, se ha observado que la sobreexpresión del miR-660-5p suprime la apoptosis e induce la proliferación y la metástasis, a través del factor de transcripción CP2 (TFCP2) (Shen et al., 2017), mediante la regulación a la baja de tet metilcitosina desoxigenasa 2 (TET2) y activando la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR (Peng et al., 2020). Sin embargo, análisis bioinformáticos recientes sugieren que el miR-660-5p puede regular otros genes no descritos en células de cáncer de mama.

En este estudio, observamos que la inhibición del miR-660-5p disminuye la proliferación, migración, invasión de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, así como el proceso de angiogénesis. A través de un análisis exhaustivo de bases de datos de predicción de blancos de miRNAs, identificamos TMEM41B como un nuevo blanco directo del miR-660-5p. Así mismo, el análisis de supervivencia reveló asociaciones del miR-660-5p y TMEM41B con la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama.

## **1. ANTECEDENTES**

## 2.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado a nivel mundial, con una incidencia de 2.3 millones de casos en 2022. Aunque la mortalidad de los pacientes con cáncer de mama ha disminuido en la última década, se mantiene como la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, y es la quinta causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial, con alrededor de 685.000 muertes al año (Bray et al., 2024; Sung et al., 2021).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea en la cual las células de la mama adquieren la capacidad de dividirse sin control (Ahmad, 2019). Además, presenta variaciones moleculares, biológicas y morfológicas. La gran mayoría de los cánceres de mama comienzan en los lóbulos o en los conductos que conectan los lóbulos con el pezón (American Cancer Society, n.d.). Esta enfermedad se clasifica en base a características histológicas y moleculares, las cuales son utilizadas para determinar el pronóstico o para predecir la respuesta al tratamiento (Provenzano et al., 2018). Existen diferentes sistemas de clasificación para el cáncer de mama, como la clasificación histológica, el sistema de estadificación TNM y la clasificación molecular.

La clasificación histológica evalúa diferentes parámetros como el tipo de célula tumoral, secreciones extracelulares, características estructurales, perfil inmunohistoquímico, así como el patrón de crecimiento patológico y el origen anatómico (Tsang and Tse, 2020). La estadificación TNM, por otra parte, utiliza información clínica y patológica del tamaño del tumor (T), el estado de los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M). La estadificación combina estos factores y estratifica la enfermedad en cinco estadios (0, I, II, III y IV) (Weiss et al., 2018).

Mientras que la clasificación molecular, divide al cáncer de mama en cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2, basal o triple negativo y tumores de tipo normal (Tsang and Tse, 2020). Esta clasificación es más eficaz que los criterios anatómicos, ya que permite definir individualmente el pronóstico y las opciones de tratamiento, basándose en la presencia de receptores hormonales y el estado del factor de

crecimiento epidérmico humano (HER2) (Sørlie et al., 2001). Por lo cual, conocer el subtipo de cáncer de mama, nos ayudará a determinar el curso de la progresión de esta enfermedad.

#### 2.2 Progresión del cáncer de mama

La progresión del cáncer de mama involucra la activación de varios procesos. La cascada metastásica inicia con la proliferación, donde los tejidos normales controlan la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que dirigen el ciclo de división celular, y el correcto funcionamiento de este proceso asegura la homeostasis de la célula. Estas señales se encuentran desregularizadas en cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011).

Después continúa con la migración, proceso en el que grupos adherentes de células altamente coordinadas se mueven de una manera polarizada; sin embargo, en cáncer, el movimiento de las células tumorales hacia cavidades cercanas, órganos adyacentes y vasos sanguíneos contribuye a la implantación y propagación del tumor (Duff and Long, 2017; Trepat et al., 2012).

Posteriormente la invasión, que implica la pérdida de la capacidad de adhesión célulacélula, dando lugar a la participación de otros factores como la IL-8, cuya sobreexpresión en el tumor estimula la producción de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), que degrada la membrana basal del estroma circundante, remodela la matriz extracelular y facilita la angiogénesis (Duff and Long, 2017), la cual consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este es un mecanismo crucial debido a que realiza el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor y facilita la eliminación de productos de desecho (Duff and Long, 2017; Viallard and Larrivée, 2017). El vaso sanguíneo en la vecindad del tumor puede entonces proporcionar una ruta para que las células desprendidas entren en el sistema circulatorio y hagan metástasis en sitios distantes (Roa et al., 2016).

En conjunto estos procesos son la base para entender la biología de la enfermedad. Conforme las células normales evolucionan a un estado neoplásico, van adquiriendo cada uno de estos procesos, es así como las células obtienen progresivamente las características que las vuelven tumorigénicas y finalmente malignas (Figura 1) (Hanahan, 2022).



**Figura 1. Procesos clave en la progresión del cáncer.** Los sellos distintivos del cáncer permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica, proporcionando una base sólida para la comprensión de la biología del cáncer (Modificado de Hanahan, 2022).

Conocer los procesos involucrados en la progresión del cáncer de mama es crucial para comprender la biología de esta enfermedad. Esta comprensión abre el camino hacia el desarrollo de enfoques terapéuticos más eficaces y dirigidos, que buscan interrumpir estos mecanismos clave y mejorar las opciones de tratamiento disponibles para los pacientes.

## 2.3 Tratamientos del cáncer de mama

El tratamiento para el cáncer de mama es complejo y tiene como objetivo la regresión del tumor de la mama y/o detener la propagación del cáncer. Las estrategias terapéuticas

disponibles contra el cáncer de mama son de naturaleza sistémica o local. La terapia sistémica va dirigida tanto al cáncer de mama no metastásico como al metastásico a través de la terapia endocrina y la quimioterapia, mientras que en el cáncer de mama no metastásico se suele optar por la terapia local, como la cirugía y la radiación. Sin embargo, en muchos casos de cáncer de mama, las terapias sistémicas y locales se usan en combinación (Waks and Winer, 2019). La elección del tratamiento depende en gran medida del subtipo molecular, así como del estadio del cáncer de mama (Trayes and Cokenakes, 2021; Waks and Winer, 2019).

No obstante, el tratamiento del cáncer de mama sigue siendo un desafío debido a la heterogeneidad de la enfermedad, la variedad de objetivos terapéuticos, la resistencia terapéutica, la enfermedad residual y la recurrencia (Al-Mahmood et al., 2018). Por ello la necesidad de buscar nuevas y mejores terapias que complementen a las ya existentes.

En este sentido, los microRNAs (miRNAs) han cobrado importancia como biomarcadores y blancos terapéuticos en el cáncer de mama (Asiaf et al., 2018). Los miRNAs son considerados potenciales blancos terapéuticos en el cáncer de mama. Los tratamientos que emplean miRNAs se basan en la inhibición de miRNAs oncogénicos o en la restauración de miRNAs supresores de tumores (Chakraborty et al., 2018; Ho et al., 2022). Estas terapias se basan en ácidos nucleicos modificados químicamente, sintéticos, estables y funcionales, empleados para incrementar o reducir el miRNA de interés durante la terapia basada en miRNAs (Kaboli et al., 2015), siendo estos miRNAs mimics y miRNAs antagonistas o inhibidores, respectivamente.

Los miRNAs mimics son oligonucleótidos sintéticos análogos a los miRNAs, que se modifican químicamente para mejorar la vida media celular y su entrega, y así restaurar los miRNAs supresores de tumores que se encuentran regulados a la baja en células de cáncer de mama (Chakraborty et al., 2018). Mientras que los miRNAs antagonistas o inhibidores son oligonucleótidos sintéticos antisentido que antagonizan blancos de miRNAs de naturaleza oncogénica, estos se unen a miRNAs oncogénicos a través de la base complementaria, inhibiendo la funcionalidad del miRNA blanco e interrumpiendo la interacción miRNA-mRNA blanco. Teniendo como resultado la reducción de la expresión del miRNA oncogénico dentro de la célula (Kaboli et al., 2015).

#### 2.4 MiRNAs

Los miRNAs descubiertos en 1993, son pequeñas moléculas de RNA endógeno no codificante y altamente conservados entre diferentes especies eucarióticas, están conformados por 18-25 nucleótidos y desempeñan un papel clave en diversos procesos biológicos a través de la degradación post-transcripcional o la represión traduccional del mRNA (Lee et al., 1993; Moazed, 2009; Tian et al., 2015). Este año, Victor Ambros y Gary Ruvkun fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus estudios pioneros sobre estas moléculas, que han transformado nuestra comprensión de la regulación génica y sus aplicaciones en biomedicina ("The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2024," n.d.)

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo y termina en el citoplasma. Inicialmente los genes de los miRNAs se transcriben por medio de la RNA polimerasa II a miRNAs primarios (pri-miRNAs), los cuales pueden contener una o varias estructuras en forma de horquilla que son segmentadas por el complejo Drosha-DGCR8 para producir un transcrito de miRNA precursor (pre-miRNA), que se transporta al citoplasma mediante Ran-GTP y el receptor de exportación Exportina-5 a través de los poros nucleares. Finalmente, el pre-miRNA madura por el complejo Dicer con la proteína de unión a RNA de doble cadena (TRBP), que escinde la horquilla del pre-miRNA a su longitud madura de 18 a 25 pares de bases de doble cadena de RNA, esta se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y forma el miRNA maduro. La hebra funcional del miRNA maduro se carga junto con las proteínas Argonauta (Ago2) en el complejo RISC, el cual lo guía para silenciar los mRNA diana mediante la escisión del mRNA, la represión traduccional o la deadenilación, mientras que el otro segmento se degrada. Se ha demostrado que la mayoría de los sitios de unión de los miRNAs están en la región 3' no traducida (3'UTR) de las moléculas de mRNA diana, y la interacción con el objetivo produce la degradación del mRNA o la represión de la traducción (Winter et al., 2009). Si la complementariedad es imperfecta, se reprime la traducción del mRNA; en cambio, si la complementariedad es perfecta, se induce un corte y posteriormente ocurre la degradación del mRNA (Figura 2) (Finnegan and Pasquinelli, 2013; Ryan et al., 2015).



**Figura 2. Biogénesis de los miRNAs.** La biogénesis inicia en el núcleo con la transcripción de genes de miRNA por la RNA polimerasa II, produciendo pri-miRNAs. Estos son procesados por el complejo Drosha-DGCR8 para formar pre-miRNAs y ser transportados al citoplasma por Exportina-5. En el citoplasma, el complejo Dicer-TRBP corta los pre-miRNAs para generar un miRNA dúplex. La hebra guía se incorpora en el complejo RISC, uniéndose a mRNAs específicos, resultando en la degradación o en la inhibición de la traducción del mRNA blanco, regulando así la expresión génica (Tomado y modificado de Villarreal-García et al., 2025).

Los miRNAs pueden influir en la expresión de múltiples blancos de mRNAs y regular simultáneamente varios procesos biológicos (Finnegan and Pasquinelli, 2013). La alteración en la expresión de los miRNAs da como resultado cambios en el perfil de los genes que involucran una gran variedad de procesos biológicos, lo que contribuye a numerosos trastornos humanos, incluido el cáncer (Ho et al., 2022).

### 2.5 MiRNAs y cáncer

En cáncer los miRNAs se expresan de manera diferente en comparación con las células sanas que en células cancerígenas. La desregulación en la expresión de los miRNAs en cáncer se debe a alteraciones en la regulación genética o epigenética de los genes de los miRNAs, la interrupción del control transcripcional de miRNAs y biogénesis aberrantes de miRNAs (Peng and Croce, 2016). La primera descripción de la asociación de la expresión de miRNAs con el desarrollo del cáncer fue en la leucemia linfocítica crónica. Encontrando que en pacientes que padecen este tipo de cáncer, la región del cromosoma 13q14 y el grupo miR-15a/16a se encuentra frecuentemente eliminada, indicando que estos miRNAs probablemente eran supresores tumorales (Calin et al., 2002).

Después del primer reporte de la asociación de los miRNAs con cáncer, se comenzó a investigar su participación en esta enfermedad. Múltiples investigaciones reportan que la desregulación de los miRNAs está relacionada con la proliferación de células cancerosas, la inhibición de la muerte celular, la invasión, la metástasis y la angiogénesis (Peng and Croce, 2016).

Los miRNAs asociados a cáncer se clasifican en dos categorías, miRNAs oncogénicos (oncomiRs) y miRNAs supresores de tumores (tsmiRs). Los oncomiRs generalmente se encuentran altamente expresados, contribuyendo a la progresión del cáncer. Mientras que los tsmiRs inhiben la tumorigenesis, a través de la regulación del crecimiento celular, desarrollo de células del sistema inmune y apoptosis; frecuentemente este tipo de miRNAs se encuentran regulados a la baja en distintos tipos de cáncer (Fridrichova and Zmetakova, 2019). Sin embargo, también hay miRNAs asociados a cáncer que están reportados con ambas funciones según el tejido en el que se encuentren (Hemmatzadeh et al., 2016).

### 2.6 MiRNAs y cáncer de mama

La expresión aberrante de los miRNAs en las glándulas mamarias puede alterar procesos funcionales que llevan al desarrollo de cáncer de mama. Iorio y colaboradores en 2005, fueron los primeros en reportar que la expresión de algunos miRNAs estaba desregulada entre tejido normal y tejido con cáncer de mama, siendo los miRNAs desregulados miR-125b, miR-145, miR-21 y miR-155 (Iorio et al., 2005).

Esta investigación inició la búsqueda de miRNAs en cáncer de mama, encontrando más miRNAs involucrados en esta enfermedad. Sólo por mencionar algunos, se reportó que el miR-10b, que fue de los primeros oncomiRs en ser reportado en cáncer de mama metastásico (Gee et al., 2008). La inducción de miR-21 en cáncer de mama puede reprimir

la expresión de un gen supresor de tumores, la proteína de muerte celular programada 4 (PDCD4), que inhibe la proliferación celular al activar la proteína p21 (Frankel et al., 2008). El miR-155 es un oncomiR que se asocia con un incremento en la proliferación celular, metástasis y angiogénesis (Wang and Wu, 2012; Yu et al., 2015) (Figura 3).



**Figura 3. MiRNAs asociados al cáncer de mama.** Recopilación de algunos miRNAs que se encuentran desregulados en el cáncer de mama. Datos recopilados de (Fridrichova and Zmetakova, 2019; Rahman et al., 2019).

El desarrollo de herramientas bioinformáticas ha facilitado el trabajo de los investigadores. The Cancer Genome Atlas (TCGA) es un programa genómico de cáncer que caracterizó molecularmente más de 20,000 muestras de cánceres primarios y muestras sanas, abarcando 33 tipos de cáncer. Con la finalidad de recopilar datos genómicos, epigenómicos, transcriptómicos y proteómicos, con el afán de mejorar la capacidad para diagnosticar, tratar y prevenir el cáncer ("The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) - NCI," 2022).

En colaboración con el MD Anderson Cancer Center y empleando la base de datos del TCGA, realizamos la búsqueda de miRNAs como blancos terapéuticos a través de un análisis de la expresión de miRNAs en cáncer de mama. A partir de este análisis se identificó que el miR-660-5p se encuentra significativamente sobreexpresado en muestras de tejido tumoral, en comparación con muestras de tejido normal circundante de mama (Figura 4A), además se encontró que esta sobreexpresión está asociada a una baja supervivencia en los pacientes con cáncer de mama (Figura 4B).



Figura 4. Expresión del miR-660-5p en muestras de tejido tumoral y tejido normal mamario. La secuenciación de miRNAs se llevó a cabo a partir de muestras de tejido tumoral y tejido normal mamario de cada paciente (n=67). (A) Sobreexpresión del miR-660-5p (p=0.0015) en tejido tumoral en comparación con tejido sano. (B) El análisis de supervivencia global muestra que una alta expresión (en rojo) del miR-660-5p disminuye significativamente la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. La baja expresión (en azul) incrementa significativamente la supervivencia.

Los reportes sobre el miR-660-5p en la progresión del cáncer de mama son limitados, está reportado que el miR-660-5p se encuentra sobreexpresado en muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama, además de ser propuesto como un potencial marcador de pronóstico (Krishnan et al., 2015). De igual manera, se encontró que el miR-660 está sobreexpresado en tejido de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama 5.2 años después del parto (Muñoz-Rodríguez et al., 2015). Así mismo, se reportó que el miR-660-5p se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, además de regular la proliferación, migración e invasión, e inducir la apoptosis a través de la vía miR-660-5p/TFCP2/CDKN1A en células MCF-7 (Shen et al., 2017). Mientras que Peng y colaboradores en 2020, reportaron que el miR-660-5p promueve la progresión del cáncer

de mama a través de la regulación a la baja de TET2 y la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR (Peng et al., 2020).

Previamente en nuestro equipo de trabajo, encontramos que el miR-660-5p se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-321 en comparación con células epiteliales de mama humana MCF-10A (Figura 5) (Ancira, 2021).

En este proyecto, proponemos determinar el efecto biológico del miR-660-5p e identificar sus blancos implicados en la progresión del cáncer de mama, con el objetivo de asociarlos con la supervivencia global de pacientes con esta enfermedad. Los resultados de esta investigación contribuirán a ampliar el conocimiento sobre el papel del miR-660-5p en la progresión del cáncer de mama.



**Figura 5.** Niveles basales del miR-660-5p en células de cáncer de mama. Los niveles del miR-660-5p fueron evaluados mediante RT-qPCR utilizando primers específicos para este miRNA, observando que el miR-660-5p se encuentra significativamente sobreexpresado en células de cáncer de mama con respecto al control sano. Los experimentos se realizaron por triplicado. Barras: medias  $\pm$  DE. \*\*\* p<0.001.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de miRNAs como blancos terapéuticos en el cáncer de mama es crucial debido a la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento. Nuestro estudio ha identificado que el miR-660-5p está sobreexpresado y está asociado con una baja supervivencia en pacientes con cáncer de mama, lo que lo convierte en un blanco prometedor para terapias futuras. Se ha reportado que el miR-660-5p induce los procesos de proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama y se han propuesto algunos blancos del miR-660-5p involucrados en la progresión del cáncer de mama. Sin embargo, análisis bioinformáticos de bases de datos de miRNAs sugieren que el miR-660-5p puede regular otros genes no descritos previamente en células de cáncer de mama. Por lo cual identificar nuevos blancos permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer de mama basadas en la modulación de la expresión del miR-660-5p.

# 3. HIPÓTESIS

El miR-660-5p regula la progresión del cáncer de mama al interactuar con un blanco específico en las células tumorales.

## **4. OBJETIVOS**

## 5.1 Objetivo General

Analizar el efecto del miR-660-5p en los procesos de proliferación, invasión, migración y angiogénesis en la progresión del cáncer de mama e identificar nuevos blancos potenciales.

## 5.2 Objetivos Específicos

- 1. Determinar el efecto del miR-660-5p en los procesos de proliferación, invasión, migración y angiogénesis en la progresión del cáncer de mama.
- 2. Identificar y validar un nuevo blanco del miR-660-5p en cáncer de mama.
- 3. Asociar la expresión del miR-660-5p y su blanco con la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama empleando bases de datos.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS



## 6.1 Estrategia Experimental

## 6.2 Cultivo celular

Las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y las células endoteliales de vena umbilical humana HUVEC fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC). Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (GenClone, USA) al 10% y antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) al 1% (Gibco, USA). Las condiciones de cultivo para todas las líneas celulares empleadas fueron a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los experimentos se realizaron empleando una confluencia del 60-80%.

## 6.3 Transfección celular

Se sembraron células 9.0 x 10<sup>4</sup> células por pozo de las líneas celulares MDA-MB-231 y HUVEC y 3.0 x 10<sup>5</sup> células por pozo de la línea celular MCF-7 en placas de 6 pozos, las células se incubaron por 24 horas. Se preparó el medio de transfección utilizando inhibidor del miR-660-5p y/o el control negativo del inhibidor del miRNA (Invitrogen, USA) (concentración final de 100 nM), HiPerFect (Qiagen) en una proporción de 1:3 (inhibidor del miR-660-5p: HiPerFect) y Opti-MEM (Gibco) incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. El medio de cultivo de las células se reemplazó con el medio de transfección y se añadió gota a gota. La transfección se llevó a cabo durante 24 horas y al día siguiente se recolectaron las células para experimentos posteriores. Las células transfectadas se emplearon para los ensayos de funcionalidad, RT-qPCR y Western blot.

#### 6.4 Determinación de la concentración del inhibidor del miR-660-5p

Sembramos 5.5 x  $10^3$  células por pozo de la línea celular MDA-MB-231 y 8.0 x  $10^3$  células por pozo de la línea celular MCF-7 en placas de 96 pozos. Después de 24 horas de incubación, se transfectaron las células como se describió anteriormente, utilizando las siguientes concentraciones: 12.5, 25, 50, 100 y 200 nM tanto del inhibidor como del control negativo (Invitrogen, USA). Después de 72 horas de incubación, se agregó 20 µL de MTS del kit CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) a cada uno de los pozos, se incubó por una hora en la oscuridad a 37 °C y posteriormente se realizó la lectura en el lector de placas Biotek Synergy HT a 490 nm.

#### 6.5 Ensayo de formación de colonias

Las células se transfectaron como se describió anteriormente. Veinticuatro horas después de la transfección, se sembraron 400 células por pozo de la línea celular MDA-MB-231 y 800 células por pozo de la línea celular MCF-7 en placas de 6 pozos. Las células MDA-MB-231 se incubaron durante 10 días para observar la formación de las colonias y las células MCF-7 durante 18 días, posteriormente las células se tiñeron con cristal violeta

0.5% en metanol. Se cuantificaron las colonias constituidas de al menos 50 células empleando un microscopio invertido Zeiss Primovert con un aumento de 10x.

## 6.6 Ensayos de migración e invasión celular

Las células de cáncer de mama se transfectaron como se describió anteriormente. Veinticuatro horas después de la transfección, se sembraron 2.1 x 10<sup>4</sup> células MDA-MB-231 en 200 µL de medio sin suero y 1.0 x 10<sup>5</sup> células de la línea celular MCF-7 en 200 µL de medio sin suero en cámaras transwell (Corning, USA) recubiertas con gelatina (100 µL) para migración y cámaras transwell (Corning) recubiertas con Cultrex<sup>TM</sup> Basement Membrane Extract (BME) (R&D Systems, USA) (100 µL) para invasión. Los tiempos de incubación dependieron de la línea celular evaluada, para migración fueron 24 h para células MDA-MB-231 y 72 h para células MCF-7; mientras que para invasión fueron 48 h para células MDA-MB-231 y 72 h para células MCF-7. Posteriormente, las células se fijaron y tiñeron utilizando el sistema de tinción manual Fisher HealthCare<sup>TM</sup> PROTOCOL<sup>TM</sup> Hema 3<sup>TM</sup> (Fisher Scientific, USA). Se tomaron fotografías y se contaron las células migratorias e invasoras en siete campos al azar a 40x de aumento utilizando un microscopio Leica CME. Los porcentajes de las células que migraron e invadieron se calcularon considerando los valores de las células no tratadas como un 100% de migración y/o invasión celular.

#### 6.7 Ensayo de angiogénesis

Se transfectaron las células HUVEC como se mencionó anteriormente. Se sembraron 2.5 x  $10^4$  células por pozo en 100 µL de medio en una placa de 96 pozos previamente cubierta con Cultrex<sup>TM</sup> Basement Membrane Extract (BME) (R&D Systems) (60 µL). La placa se incubó durante 24 h y se tomaron fotografías de cuatro campos (10x) en un microscopio de cultivo celular invertido Zeiss Primovert para observar y cuantificar la formación de loops por campo.

#### 6.8 Predicción de blancos del miR-660-5p

Utilizamos nueve bases de datos (TargetScan, miRDB, RNACentral, RNA22, miSTAR, DIANA, miRmap, miRabel y MicroT) para predecir los blancos potenciales del miR-660-5p. Seleccionamos los 100 genes blanco del miR-660-5p con las puntuaciones más altas en cada base de datos. Luego, seleccionamos los genes que aparecieron en al menos tres de las bases de datos. Posteriormente, para simplificar estos resultados, realizamos un análisis utilizando el Kaplan-Meier Plotter, en el cual evaluamos la expresión de cada gen en la supervivencia global (OS), la supervivencia libre de recaída (RFS), la supervivencia libre de metástasis distante (DMFS) y la escala de rendimiento paliativo (PPS), seleccionando los genes con valores de p significativos (p<0.05).

## 6.9 RT-qPCR para validar los blancos del miR-660-5p predichos

Se adquirió una placa personalizada de 384 pozos de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), que contenía primers forward y reverse prediseñados para cada uno de los genes blancos seleccionados del miR-660-5p. Se sembraron 9.0 x  $10^4$  células MDA-MB-231 en una placa de 6 pozos y se transfectaron con el inhibidor del miR-660-5p (concentración final de 200 nM). Veinticuatro horas después, se aisló el RNA total usando el kit GenElute Mammalian Total RNA Mini Kit (Millipore-Sigma, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la transcripción reversa del RNA usando el kit iScript Reverse Transcription Supermix para RT-qPCR de Bio-Rad. Se realizó qPCR basado en SYBR Green utilizando el kit SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) y un sistema de detección CFX384 Touch Real-Time PCR. Los cambios en la expresión y los valores del ciclo del threshold (Ct) se calcularon con el software interno del instrumento, en relación con las células MDA-MB-231 y se normalizaron con  $\beta$ -actina junto con controles para gDNA, PCR, RT y calidad del RNA.

Para crear el gráfico de volcán, utilizamos R (versión 4.2.2) junto con el paquete ggplot2. La metodología involucró primero el preprocesamiento de los datos de la qPCR para calcular los cambios en el foldchange 2- $\Delta\Delta$ CT y los valores de *p*. Usando ggplot, representamos el logaritmo negativo del valor de *p* contra el cambio en el foldchange,

aplicando un threshold en p=0.05 para significancia estadística. Los genes regulados al alza y a la baja se distinguieron por sus valores de cambio en el foldchange, con codificación de color personalizada para énfasis visual. Este enfoque proporcionó un análisis visual completo de los patrones de expresión génica.

#### 6.10 Análisis de Western Blot

Las células de cáncer de mama se transfectaron como se describió anteriormente, a una concentración final de 200 nM. Las células se recolectaron y lavaron con 1 mL de PBS suplementado con 10  $\mu$ L de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich-Merck). Los lisados celulares se prepararon usando 100 µL de buffer de lisis con 1 µL de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich-Merck), se incubaron en hielo durante 30 minutos y se agitaron cada 10 minutos. Los lisados se centrifugaron, se recolectaron los sobrenadantes y la concentración total de proteínas se determinó usando el reactivo de Bradford (Sigma Aldrich-Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cantidades iguales de cada muestra de proteína (40 µg por pozo) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon durante 1 hora con Blotto, leche desnatada (Santa Cruz Biotechnology, USA) al 5%, y luego se lavaron y se incubaron con el anticuerpo primario durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP. Los anticuerpos unidos se detectaron usando el reactivo ImmunoCruz Western Blotting Luminol (Santa Cruz Biotechnology). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: TMEM41B (1:1000, cat. #68071, Cell Signaling Technology, USA) y β-actina (1:1000, cat. # sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpos secundarios: IgG de cabra anticonejo y anti-ratón (H+L) peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:1000, cat. #31460, #31430, Invitrogen). Se tomaron imágenes de las bandas y se utilizó el programa ImageJ para el análisis densitométrico. Los resultados se normalizaron con el control de carga ( $\beta$ actina).

#### 6.11 Ensayo de luciferasa dual

Se sembraron 7.0 x 10<sup>3</sup> células de la línea celular MDA-MB-231 en placas de 96 pozos y 24 horas después, se transfectaron con 1.5 µg del clon del blanco 3'UTR de miRNA para TMEM41B humano (NM\_015012.3) (HmiT102502-MT06) o con el vector control del blanco del miRNA pEZX-MT06 (CmiT000001-MT06) (GeneCopoeia, USA) utilizando HiPerFect en una proporción 1:3 (v/v) (ADN:HiPerFect) en medio Opti-MEM. Seis horas después de la transfección del plásmido, las células fueron transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p y/o con el control negativo del inhibidor (concentración final de 200 nM) durante toda la noche, como se describió anteriormente. Los vectores utilizados incluían el 3'UTR de TMEM41B y el vector de control. La mezcla de transfección incluía el vector 3'UTR, HiPerFect (proporción 1:3, v/v) y Opti-MEM. Al día siguiente, el medio se cambió por DMEM/F-12 fresco (10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina). Después de 48 horas, se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga y Renilla usando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mediciones de luminiscencia se realizaron en un lector de placas SynergyTM HT (BioTek® Instruments). La actividad de la luciferasa de luciérnaga se normalizó con respecto a la del control de Renilla. La actividad de la luciferasa se representó en relación con la del vector 3'UTR control negativo.

#### 6.12 Análisis de bases de datos de supervivencia de pacientes

Para dilucidar la significancia clínica de la expresión del miR-660-5p y TMEM41B, realizamos un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier utilizando datos disponibles públicamente (miRpower para cáncer de mama y KM para cáncer de mama) en la base de datos del Kaplan-Meier (KM) plotter (<u>https://www.kmplot.com</u>). Al seleccionar hsa-miR-660, los pacientes con cáncer de mama se dividieron en grupos de alta y baja expresión según los mejores valores de corte de la expresión del miRNA determinados por el umbral de mejor rendimiento entre los cuartiles inferior y superior. Se generó un gráfico de supervivencia KM para la supervivencia global (OS) de todos los pacientes con cáncer de mama (n=1062) sin ninguna otra restricción (edad, estadio, grado). De manera similar, evaluamos los niveles de expresión de TMEM41B en pacientes con cáncer de mama. Se

generó un gráfico de supervivencia KM para la supervivencia libre de recaída (RFS) de todos los pacientes con cáncer de mama (n=4929). Los valores de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

#### 6.13 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los análisis estadísticos y la construcción de gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA). Los valores de *p* se calcularon mediante análisis paramétrico (prueba *t* o ANOVA) según lo determinado por las pruebas de normalidad. Los valores de *p* < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Para evaluar la correlación entre la expresión de TMEM41B y el hsa-miR-660, se realizó un análisis de correlación de Spearman. Este método fue elegido por su robustez al manejar distribuciones no normales y menor sensibilidad a valores atípicos. Se recuperaron un total de 1,095 muestras de cáncer de mama de la base de datos del TCGA utilizando la librería RTCGA (versión 1.34). Para enfocar el análisis, solo se incluyeron muestras tumorales que contenían datos del miRNA. El preprocesamiento de los datos incluyó la eliminación de valores faltantes y la retención de observaciones únicas. El análisis estadístico se realizó utilizando la función cor.test() de la librería stats en R, y la prueba de hipótesis evaluó si el coeficiente de correlación de Spearman observado ( $\rho$ ) difería significativamente de cero. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando la versión R 4.4.2 para garantizar la reproducibilidad.

## 6. RESULTADOS

### 7.1 Evaluación de la eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-660-5p

Para evaluar la eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-660-5p, transfectamos células de cáncer de mama MDA-MB-231 con una concentración de 50 nM del inhibidor del miR-660-5p. Los resultados mostraron una disminución del 90% en la expresión del miR-660-5p en presencia del inhibidor en comparación con el control negativo (Figura 6).



**Figura 6. Eficiencia de la transfección del inhibidor del miR-660-5p.** La eficiencia del inhibidor del miR-660-5p se evaluó en células MDA-MB-231 mediante RT-qPCR 24 horas después de la transfección celular. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*\* p<0.01.

### 7.2 Determinación de la concentración óptima del inhibidor del miR-660-5p

Al trabajar con transfecciones celulares, es importante determinar la concentración de tu molécula de interés, en nuestro caso el inhibidor del miR-660-5p. Por ende, realizamos ensayos de MTS, transfectando las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 con distintas concentraciones del inhibidor del miR-660-5p (12.5, 25, 50, 100 y 200 nM).

De acuerdo con nuestros resultados, encontramos que la concentración óptima del inhibidor del miR-660-5p para utilizar en los ensayos de funcionalidad en ambas líneas

celulares es de 100 nM (Figura 7). Los parámetros que tomamos en cuenta para la selección de esa concentración fueron: A) que la supervivencia de las células transfectadas con el control negativo no debía de disminuir más del 90%, B) que la supervivencia de las células transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p no debía disminuir más del 80%, y C) que presentaran diferencia significativa entre ambos grupos.



**Figura 7. Determinación de la concentración del inhibidor del miR-660-5p.** Se evaluaron las concentraciones 12.5, 25, 50, 100 y 200 nM del inhibidor del miR-660-5p, encontrando que la concentración óptima es de 100 nM. Los experimentos se realizaron por triplicado.

# 7.3 La inhibición del miR-660-5p disminuye la proliferación en células de cáncer de mama

Para comprender la función biológica del miR-660-5p en células de cáncer de mama, llevamos a cabo diversos ensayos de funcionalidad. Para evaluar la proliferación celular, realizamos ensayos de formación de colonias. Como se observa en la Figura 8A-B, hubo una notable disminución en el número de colonias en ambas líneas celulares transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p en comparación con el control negativo (reducción del 10% en células MDA-MB-231, p=0.0134; reducción del 29.67% en células MCF-7,

p=0.0004). Estos resultados indican que la inhibición del miR-660-5p disminuye la proliferación en células de cáncer de mama.



**Figura 8. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la proliferación en células de cáncer de mama.** (A-B) Se observa una disminución en la proliferación de las células MDA-MB-231 y MCF-7 transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p con respecto a las células no tratadas y control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado. \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001.

# 7.4 La inhibición del miR-660-5p disminuye la migración y la invasión en células de cáncer de mama

Después, evaluamos el papel del miR-660-5p en la migración e invasión de células de cáncer de mama. Como se muestra en la Figura 9A-B, se presentó una notable disminución en el número de células que migraron en ambas líneas celulares transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p en comparación con el control negativo. Específicamente, la migración celular se redujo significativamente en un 48.67% (p<0.0001) en células MDA-MB-231 y en un 43.34% (p<0.0001) en células MCF-7 transfectadas con el inhibidor de miR-660-5p.



**Figura 9. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la migración en células de cáncer de mama.** (A-B) Se presenta una disminución en la migración de las células MDA-MB-231 y MCF-7 transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p con respecto a las células no tratadas y control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*\*\*\* p<0.0001.

Se observó una tendencia similar en el ensayo de invasión (Figura 10A-B), donde se presentó una disminución en la capacidad invasiva en ambas líneas celulares de cáncer de mama transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p en comparación con el control negativo. Específicamente, la invasión celular se redujo significativamente en un 42.34% (p<0.0001) en células MDA-MB-231 y en un 41% (p<0.0001) en células MCF-7 transfectadas con el inhibidor de miR-660-5p. Estos resultados sugieren que la inhibición del miR-660-5p disminuye la migración e invasión de células de cáncer de mama, indicando su importante participación en la metástasis.



**Figura 10. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la invasión en células de cáncer de mama.** (A-B) Se observa una disminución en la invasión de las células MDA-MB-231 y MCF-7 transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p con respecto a las células no tratadas y control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*\*\*\* p<0.0001.

#### 7.5 La inhibición del miR-660-5p disminuye la angiogénesis in vitro

Para determinar el impacto de la inhibición del miR-660-5p en la angiogénesis, realizamos un ensayo de formación de túbulos. Como se muestra en la Figura 11A y 11B, observamos una disminución significativa en el número de loops formados por las células HUVEC transfectadas con el inhibidor de miR-660-5p en comparación con aquellas transfectadas

con el control negativo (reducción del 88.43%, p=0.0003). Nuestros resultados muestran que la inhibición del miR-660-5p disminuye la angiogénesis.



**Figura 11. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la angiogénesis en células HUVEC.** (A-B) Se presenta una disminución en el número de loops en las células transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p con respecto a las células no tratadas y control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*\*\* p<0.001.

#### 7.6 Identificación de genes blanco del miR-660-5p en células de cáncer de mama

Para identificar posibles genes blanco del miR-660-5p en células de cáncer de mama, realizamos un análisis bioinformático utilizando nueve bases de datos de predicción de blancos de miRNAs. Seleccionamos los primeros 100 blancos de cada base de datos e identificamos genes predichos por al menos tres bases de datos, resultando en 37 genes blancos del miR-660-5p (Tabla 1).

Gen	Nombre Completo	Base de datos
PPP6R3	Proteína reguladora 3 de la fosfatasa 6 de serina/treonina	miRDB, RNACentral, DIANA, miRABEL
RNF219	Proteína de dedo de anillo y dominio RBR 219	TargetScan, miRDB, DIANA, miRABEL
NR3C1	Receptor nuclear de glucocorticoides 1	miRDB, RNACentral, DIANA
CALM1	Calmodulina 1	TargetScan, mirRDB, DIANA, miRmap
LIFR	Receptor del factor inhibidor de la leucemia	miRDB, RNACentral, DIANA, MicroT
ETV1	Factor de transcripción ETS variante 1	TargetScan, DIANA, miRmap
VDAC1	Canal aniónico dependiente de voltaje 1	TargetScan, miRDB, miRABEL, MicroT
PRRG1	Proteína rica en prolina y dominio Gla 1	TargetScan, miRmap, miRABEL
TPP2	Tripeptidil Peptidasa II	TargetScan, miRmap, miRABEL
HIF1A	Factor inducible por hipoxia 1 alfa	TargetScan, miRDB, miRABEL, MicroT
CD8A	CD8 Subunidad alfa	TargetScan, miRDB, miRABEL, MicroT
ARL4C	Proteína similar al factor de ADP-ribosilación 4C	TargetScan, miRmap, miRABEL
CDH13	Cadherina 13	TargetScan, miRDB, miRABEL, MicroT
HAO1	D-aminoácido oxidasa 1	TargetScan, miRmap, miRABEL
JPH1	Junctofilina 1	miRDB, miRmap, miRABEL
CLEC3A	Miembro A de la familia de dominio lectina de tipo C	TargetScan, miRDB, miRABEL
PGLYRP4	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano 4	miRDB, miRmap, miRABEL
TPD52L2	Proteína tumoral D52 like 2	TargetScan, miRDB, miRmap, miRABEL, MicroT
SLC46A3	Miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 46	TargetScan, miRDB, miRmap, miRABEL
FOLH1	Folato hidrolasa 1	TargetScan, miRmap, miRABEL, MicroT
DGKE	Quinasa épsilon de diacilglicerol	TargetScan, miRDB, miRmap, MicroT
KBTBD8	Proteína 8 conteniendo dominios Kelch repetidos y BTB	TargetScan, miRDB, miRmap, MicroT
USP53	Peptidasa específica de ubiquitina 53	miRDB, miSTAR, MicroT
APLP2	Proteína similar al precursor de beta amiloide 2	RNACentral, DIANA, miRABEL
YTHDF1	Proteína de unión al RNA YTH N6-metiladenosina	DIANA, miRABEL, MicroT

Tabla 1. Selección de los blancos potenciales del miR-660-5p después del análisis bioinformático.

CDR2L	Proteína similar al gen relacionado con la degeneración cerebelar 2	MiRDB, miRABEL, MicroT
AOC3	Amina oxidasa de cobre 3	TargetScan, miRABEL, MicroT
EPAS1	Proteína 1 que contiene el dominio PAS del endotelio	miRDB, miRABEL, MicroT
CNGA3	Canal de sodio y calcio regulado por nucleótidos cíclicos tipo A3	miRDB, miRABEL, MicroT
IFT57	Transporte intraflagelar 57	TargetScan, miRABEL, MicroT
UNC79	Proteína homóloga Unc-79	miRDB, miRmap, MicroT
KPNA4	Karioferina subunidad alfa 4	miRDB, miRmap, MicroT
KIF3A	Miembro 3A de la familia de cinasas	miRDB, miRmap, MicroT
TMEM41B	Proteína Transmembranal 41B	TargetScan, miRmap, MicroT
WDR36	Dominio de repetición WD 36	miRDB, miRmap, MicroT
TMED7-TICAM2	Proteína TMED7-TICAM2	TargetScan, miRDB, MicroT
ARHGAP36	Proteína activadora de la GTPasa Rho 36	TargetScan, miRDB, MicroT

Para identificar posibles genes blanco clínicamente relevantes del miR-660 en cáncer de mama, utilizamos la base de datos Kaplan-Meier plotter, que evalúa las correlaciones entre la expresión génica (mRNA, miRNA, proteína) y los resultados de los pacientes en diferentes tipos de cáncer. Evaluamos parámetros como la supervivencia global (OS), la supervivencia libre de recaídas (RFS), la supervivencia libre de metástasis distantes (DMFS) y la escala de rendimiento paliativo (PPS) para los 37 blancos (Tabla 2).

Tabla 2	2.	Selección	de	los bla	ancos j	potenciales	del miF	<b>R-660-</b>	• <b>5p</b> :	mediante	el Kaj	plan-	Meier	Plotter.
---------	----	-----------	----	---------	---------	-------------	---------	---------------	---------------	----------	--------	-------	-------	----------

Gen	Análisis en Kaplan-Meier Plotter					
	Supervivencia global (OS)	Supervivencia libre de recaídas (RFS)	Supervivencia libre de metástasis distantes (DMFS)	Escala de rendimiento paliativo (PPS)		
PPP6R3	0.0051	0.81	0.3051	0.0314		
RNF219	0.38	0.18	0.8061	0.0026		
NR3C1	0.042	0.81	0.0021	0.7143		
CALM1	0.013	0.00059	0.224	0.4456		
LIFR	0.00013	1.60E-08	0.0078	0.151		
ETV1	0.0909	0.0001	0.1536	0.9739		

VDAC1	0.0227	7.6E-07	0.6867	0.1437
PRRG1	0.0027	1.70E-06	4.9E-07	0.0656
TPP2	0.0271	0.0415	0.0022	0.6922
HIF1A	1.90E-06	1.60E-10	0.016	2.80E-07
CD8A	0.0028	0.0002	0.7163	0.327
ARL4C	0.35	4.7E-05	0.075	0.14
CDH13	0.3773	0.3964	0.6696	0.0319
HAO1	0.904	0.0032	0.5184	0.2595
JPH1	0.0093	0.1239	0.0757	0.8703
CLEC3A	0.1199	0.2589	0.9038	0.0594
PGLYRP4	0.7101	0.0005	0.0277	0.3224
TPD52L2	0.0025	1.00E-07	0.1497	0.1516
SLC46A3	0.6354	0.0041	0.557	0.2489
FOLH1	0.1605	0.0011	0.0406	0.3045
DGKE	0.2803	7.70E-10	0.0105	0.9116
KBTBD8	0.0048	0.0053	0.5069	0.0678
USP53	0.0092	0.4283	0.0471	0.9109
APLP2	0.0002	0.738	0.1171	0.936
YTHDF1	0.0533	0.2133	0.0424	0.7076
CDR2L	0.029	0.0019	0.0146	0.0461
AOC3	0.0076	0.8773	0.9634	0.1099
EPAS1	0.0417	0.829	0.2997	0.0754
CNGA3	0.0097	0.8562	0.0844	0.7623
IFT57	5.7E-05	0.0446	0.0979	0.9381
UNC79	0.044	0.6376	0.0731	0.7425
KPNA4	0.0011	0.8685	0.0191	0.863
KIF3A	3.80E-06	0.1906	0.0069	1.10E-06
TMEM41B	0.0083	0.0634	0.0377	0.5128
WDR36	0.0366	0.0425	0.3323	0.0053
TMED7-TICAM2	0.0553	0.2019	9.30E-05	0.9404
ARHGAP36	0.0002	0.0027	0.0008	0.7725

OS: supervivencia global, RFS: supervivencia libre de recaídas, DMFS: supervivencia libre de metástasis a distancia, PPS: escala de rendimiento paliativo

Basándonos en los valores de p significativos del análisis del Kaplan-Meier plotter, seleccionamos 15 genes blancos del miR-660-5p (Tabla 3).

Tabla 3. Blancos potenciales del miR-660-5p.

Gen	Función biológica		
CALM1	Participa en vías de señalización que modulan la proliferación, la movilidad y la		
	diferenciación (Chin and Means, 2000).		
CDH13	Tiene un papel importante en la neovascularización tumoral, la apoptosis, el ciclo		
	y la proliferación celular (Andreeva and Kutuzov, 2010).		
CDR2L	Miembro de la familia de proteínas relacionadas con la degeneración cerebelar		
~ ~ ~ ~ .	(CDR) (Yshii et al., 2020).		
CLEC3A	Promueve la diferenciación celular, migración y proliferación (Lau et al., 2018).		
FOLH1	En el intestino, es necesario para la absorción del folato (Rais et al., 2016).		
	Participa en la progresión del tumor de próstata (Bahler et al., 2020).		
KBTBD8	Promueve la progresión del cáncer epitelial de ovario (Du et al., 2020).		
NR3C1	Promueve la proliferación y migración en el carcinoma de células renales de		
	tipo claro (Yan et al., 2023).		
PGLYRP4	Bactericida para bacterias Gram positivas y Gram negativas (Dziarski and		
	Gupta, 2010).		
PPP6R3	Regula la progresión del ciclo celular (Stefansson and Brautigan, 2007).		
RNF219	La sobreexpresión promueve la proliferación, invasión y migración de células de carcinoma nasofaríngeo (Li et al., 2023).		
SLC46A3	La sobreexpresión suprime la metástasis en el carcinoma hepatocelular (Zhao et al. 2010)		
TMEN//1D	al., 2019). Easter hasnedere er infessiones vireles (Haffmann et al. 2021; Sahneider et al.		
IMEM41B	2021; Trimarco et al., 2021).		
TPP2	La sobreexpresión promueve el crecimiento celular, la inestabilidad genética y		
	la resistencia a la apoptosis (Tomkinson, 2019).		
USP53	La sobreexpresión promueve la metástasis en cáncer de mama triple negativo		
	(Liu et al., 2023).		
WDR36	Involucrado en la progresión del ciclo celular, apoptosis, transducción de señales y regulación génica (K. Liu et al., 2017; Monemi et al., 2005).		

# 7.7 Validación de TMEM41B como blanco directo del miR-660-5p en células de cáncer de mama

Posteriormente, realizamos RT-qPCR para evaluar los cambios en la expresión de estos 15 genes después de la inhibición del miR-660-5p. La Figura 12 muestra un diagrama de volcán que ilustra la expresión diferencial de los posibles genes blanco del miR-660-5p. La línea horizontal indica genes significativamente expresados de manera diferencial (p<0.05) entre el control negativo y el inhibidor del miR-660-5p. Las líneas verticales denotan los umbrales de cambio de pliegue para genes regulados a la baja (-0.25) y regulados al alza (0.75). En este gráfico, TMEM41B (en azul) se reguló al alza, mientras que PPP6R3 (en rojo) se reguló a la baja tras la inhibición del miR-660-5p. Los genes

restantes (en gris) no alcanzaron significancia estadística o se encontraban dentro de los umbrales de cambio de pliegue definidos, indicando niveles de expresión estables.



**Figura 12. Validación de genes blanco del miR-660-5p por RT-qPCR.** Diagrama de volcán que muestra los cambios en la expresión del mRNA de los posibles blancos identificados a través del análisis bioinformático. La expresión génica se evaluó en función de la significancia estadística y el cambio en el foldchange, con una línea horizontal en un valor p de 0.05 que indica significancia, y líneas verticales que delinean los umbrales de cambio en el foldchange de (-0.25) para abajo y (0.75) para arriba. La expresión de los genes está representada por los siguientes símbolos: azul (TMEM41B) para genes sobreexpresados, rojo (PPP6R3) para genes subexpresados, y gris para genes estables.

TMEM41B ha sido reportado como un supresor tumoral en cáncer de próstata (15). TMEM41B, una proteína transmembranal involucrada en la biogénesis de los autofagosomas en el retículo plasmático, además de ser requerida para la maduración de fagóforos (16–18). Para entender el papel de TMEM41B en el cáncer de mama, realizamos un análisis mediante el Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Sin embargo, el análisis no reveló ninguna vía de señalización potencial asociada con el cáncer de mama o cualquier otro proceso (Figura 13), asimismo no encontramos reportes previos en la literatura sobre el papel de este gen en el cáncer de mama.



**Figura 13. Determinación de la posible vía de señalización que involucra al miR-660-5p y TMEM41B en cáncer de mama.** Análisis IPA demostrando la interacción del miR-660-5p con TMEM41B.

Posteriormente, evaluamos los niveles de expresión de la proteína de TMEM41B después de la inhibición del miR-660-5p. Nuestros hallazgos revelaron un aumento significativo (p=0.0077) en los niveles de la proteína de TMEM41B en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 en comparación con las células transfectadas con el control negativo (Figura 14). Este resultado es consistente con los hallazgos obtenidos en la RT-qPCR, los cuales revelaron que la inhibición del miR-660-5p conduce a un aumento en la expresión de TMEM41B.



Figura 14. Efecto de la inhibición del miR-660-5p en la expresión de TMEM41B en células de cáncer de mama MDA-MB-231. (A-B) Se presenta un aumento en los niveles de proteína de TMEM41B en células transfectadas con el inhibidor del miR-660-5p con respecto a las células no tratadas y control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*\* p<0.01.

Asimismo, evaluamos la expresión de TMEM41B en distintas líneas de cáncer de mama, demostrando que TMEM41B se expresa en todas las células analizadas, pero con distintos niveles de expresión (Figura 15).



**Figura 15. Expresión de TMEM41B en diferentes células de cáncer de mama**. El análisis de la expresión de TMEM41B en diversas líneas celulares de cáncer de mama reveló su presencia en todas ellas, aunque con niveles de expresión variables. Los mayores niveles se encontraron en las células SUM149 y MDA-IBC-3.

Para confirmar la interacción directa entre el miR-660-5p y la región 3´ UTR del mRNA de TMEM41B, realizamos ensayos de luciferasa dual. La co-transfección del inhibidor del miR-660-5p con el vector que contiene la región 3´UTR de TMEM41B en células MDA-MB-231 resultó en un aumento significativo en la actividad de luciferasa en comparación con el vector control (p<0.0001), indicando que miR-660-5p regula la expresión de TMEM41B al unirse directamente a su región 3´UTR del mRNA (Figura 16A y 16B). Estos hallazgos proporcionan una evidencia sólida de que el mRNA de TMEM41B es el blanco directo del miR-660-5p en células de cáncer de mama.

A			
	Posición 991-998 de 3'UTR TMEM41B	5'	.ACUGUGCAUAUGCAAAAUGGGUA
	hsa-miR-660-5p	3' G	SUUGAGGCUAUACGUUACCCAU
	Posición 1767-1774 de 3'UTR TMEM41B	5'	.UUUUGCUGCUUGGUAAAUGGGUA
	hsa-miR-660-5p	3'	GUUGAGGCUAUACGUUACCCAU





**Figura 16. Validación de TMEM41B como blanco directo del miR-660-5p en células de cáncer de mama.** (A) Los sitios de unión entre miR-660-5p y TMEM41B fueron predichos mediante el software en línea TargetScan. (B) Ensayo de luciferasa dual, las células MDA-MB-231 fueron cotransfectadas transitoriamente con el inhibidor del miR-660-5p y un vector que contiene el 3'UTR de TMEM41B. La actividad de la luciferasa de luciérnaga se normalizó con la del control de Renilla. Los experimentos se realizaron por triplicado. \*\*\*\* p<0.0001.

El coeficiente de correlación por rangos de Spearman ( $\rho$ ) se calculó como -0.1466, y junto con el estadístico de prueba (S=249,526,638), el valor p correspondiente (1.132×10<sup>-6</sup>) proporcionó evidencia para rechazar la hipótesis nula ( $\rho = 0$ ) (Figura 17). Estos hallazgos indican que niveles más altos de expresión del hsa-miR-660 están asociados con niveles más bajos de expresión de TMEM41B, lo que sugiere que su interacción podría desempeñar un papel en la biología tumoral del cáncer de mama.



**Figura 17.** Correlación entre la expresión del miR-660 y TMEM41B en cáncer de mama El coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho = -0.1466$ ) y el valor p ( $1.132 \times 10^{-6}$ ) indican una asociación negativa significativa entre ambas variables.

# 7.8 Los niveles de expresión del miR-660 y TMEM41B se correlacionan con la supervivencia global y libre de recaída en pacientes con cáncer de mama

Para evaluar la significancia clínica de miR-660 en el cáncer de mama, realizamos un análisis de Kaplan-Meier utilizando la herramienta Kaplan-Meier Plotter. Las curvas de supervivencia demostraron una correlación significativa (p=0.0035) entre los niveles de miR-660 y la supervivencia global (OS) en pacientes con cáncer de mama (n=1062). Los

pacientes con niveles bajos de miR-660 tuvieron una mediana de 215.2 meses, mientras que aquellos con niveles altos de miR-660 tuvieron una mediana de 122.3 meses (Figura 17A). Además, evaluamos la relevancia clínica de TMEM41B en el cáncer de mama. Las curvas de supervivencia mostraron una correlación significativa (p=0.0083) entre los niveles de TMEM41B y la supervivencia libre de recaída (RFS) en pacientes con cáncer de mama (n=4929). Los pacientes con niveles bajos de TMEM41B tuvieron una mediana de 191.21 meses, mientras que aquellos con niveles altos de TMEM41B tuvieron una mediana de 228.85 meses (Figura 17B). Estos hallazgos muestran el valor pronóstico tanto de miR-660 como de TMEM41B en el cáncer de mama, destacando su potencial como biomarcadores para la estratificación de pacientes y el direccionamiento terapéutico.



Figura 18. Asociación de la expresión de miR-660-5p y TMEM41B con la supervivencia global y libre de recaída en pacientes con cáncer de mama. Gráficos de Kaplan-Meier (K-M) para (A) el análisis de la supervivencia global (OS) basada en la expresión del miR-660 y (B) el análisis de la supervivencia libre de recaída (RFS) basada en la expresión de TMEM41B. Los gráficos K-M de pacientes con cáncer de mama se generaron utilizando la base de datos K-M plotter (www.kmplot.com). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p<0.05.

## 8. DISCUSIÓN

En esta investigación, encontramos que el miR-660-5p tiene un papel oncogénico en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7. La inhibición de la expresión del miR-660-5p disminuyó los procesos de proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama y angiogénesis en células HUVEC. Por lo que nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión del miR-660-5p está implicada en la progresión del cáncer de mama. Otro hallazgo importante fue que identificamos a TMEM41B como un nuevo blanco del miR-660-5p en células de cáncer de mama.

Se han reportado altos niveles del miR-660-5p en células de cáncer de mama (Peng et al., 2020; Shen et al., 2017) y en pacientes con cáncer de mama (Krishnan et al., 2015; Muñoz-Rodríguez et al., 2015). Además, el miR-660-5p se ha propuesto como un biomarcador tanto pronóstico (Krishnan et al., 2015) como diagnóstico (Nashtahosseini et al., 2021). A diferencia de otros miRNAs que presentan funciones específicas en diferentes tejidos, como supresores de tumores u oncogenes (Guo et al., 2014), el miR-660-5p se reporta consistentemente como un oncomiR en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Qi et al., 2019), carcinoma hepatocelular (Wu et al., 2020) y osteosarcoma (Zhang et al., 2018).

Para determinar el efecto biológico del miR-660-5p en la progresión del cáncer de mama, realizamos diversos ensayos de funcionalidad. Observamos que la inhibición del miR-660-5p en células de cáncer de mama resultó en la disminución de la proliferación celular, la migración y la invasión, resultados que son consistentes con los reportados previamente (Peng et al., 2020; Shen et al., 2017). De igual manera, observamos el mismo efecto en la angiogénesis, siendo este el primer reporte que determina el efecto del miR-660-5p sobre la angiogénesis. La disminución fue más evidente en los procesos de migración, invasión y angiogénesis en comparación con la proliferación celular. Los resultados son consistentes con lo reportado por Peng y colaboradores, quienes demostraron que la inhibición del miR-660-5p disminuye significativamente la invasión y migración en células de cáncer de mama, en comparación con la proliferación (Peng et al., 2020). Sugiriendo que los genes regulados por el miR-660-5p pueden estar más estrechamente asociados con la metástasis y la angiogénesis. De manera similar, se ha reportado que la

inhibición del miR-660-5p reduce la proliferación, migración e invasión en células de cáncer de pulmón (Qi et al., 2019), carcinoma hepatocelular (Wu et al., 2020) y osteosarcoma (Zhang et al., 2018). Mientras que, en células de leucemia mieloide crónica, la sobreexpresión del miR-660-5p inhibe la apoptosis (Salati et al., 2017).

Para identificar posibles blancos del miR-660-5p, realizamos un análisis bioinformático exhaustivo, con el cual identificamos y validamos a TMEM41B como un nuevo blanco del miR-660-5p en células de cáncer de mama. Sin embargo, en comparación con reportes previos que limitaron su búsqueda a pocas bases de datos, identificaron a TFCP2 (Shen et al., 2017) y TET2 (Peng et al., 2020) como blancos del miR-660-5p.

TMEM41B ha sido implicado en distintas patologías, actúa como un factor hospedero en infecciones causadas por coronavirus y flavivirus (Hoffmann et al., 2021; Schneider et al., 2021; Trimarco et al., 2021) y como un supresor tumoral en cáncer de próstata (Ergün, 2019). Además de TMEM41B, identificamos a LIFR entre los posibles blancos del miR-660-5p, previamente reportado por D. Chen et al., en 2012 como un supresor tumoral en la metástasis del cáncer de mama; en este reporte detectaron niveles de expresión de LIFR solo en líneas celulares de cáncer de mama no metastásico, como SUM149, SUM159, MCF7, T47D y SUM229, mientras que, en células metastásicas, como MDA-MB-231 y SUM1315, no fue detectado (D. Chen et al., 2012). Se ha demostrado que la expresión ectópica de LIFR en células metastásicas 4T1 y MDA-MB-231 inhibe la invasión y migración de células de cáncer de mama. LIFR actúa río abajo del miR-9 y río arriba de la vía de señalización Hippo-YAP (D. Chen et al., 2012). Estos hallazgos resaltan la importancia de validar la interacción entre el miR-660-5p y LIFR, además de explorar su papel mediante ensayos funcionales. En contraste, la mayoría de los posibles blancos del miR-660-5p, incluidos VDAC1 (Yang et al., 2023), TPD52L2 (Zhang et al., n.d.) y YTHDF1 (Sun et al., 2022), desempeñan roles oncogénicos en el cáncer de mama. No obstante, las funciones biológicas del resto de los blancos identificados en este proyecto para el cáncer de mama siguen siendo desconocidas.

La función de TMEM41B en el cáncer de mama sigue siendo poco comprendida. Investigaciones futuras deben centrarse en explorar los mecanismos moleculares y los efectos biológicos derivados de la sobreexpresión o el silenciamiento de TMEM41B en células de cáncer de mama. Nuestros hallazgos no lograron determinar de manera concluyente si uno o ambos sitios de unión del miR-660-5p en la región 3' UTR de TMEM41B son responsables de los efectos observados. Por lo tanto, se requieren más estudios para clarificar el mecanismo molecular por el cual el miR-660-5p regula a TMEM41B en células de cáncer de mama. En este sentido, sería recomendable realizar experimentos adicionales, como la mutagénesis dirigida a los sitios de unión en vectores reporteros de luciferasa.

Se han reportado mutaciones de TMEM41B en tumores carcinoides pulmonares, relacionándolo con la vía de señalización del NF- $\kappa$ B a través del análisis IPA (Asiedu et al., 2018). La desregulación de la señalización del NF- $\kappa$ B promueve procesos como la proliferación celular, la metástasis, la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la inflamación (Asiedu et al., 2011; T. Liu et al., 2017; Xia et al., 2014), todos estos procesos críticos en la progresión del cáncer de mama. Además, el NF- $\kappa$ B está ampliamente involucrado en la regulación de la iniciación del cáncer de mama, la angiogénesis y la metástasis al aumentar la expresión de genes sensibles a NF- $\kappa$ B (Dolcet et al., 2005; Zhou et al., 2007). Estos hallazgos señalan la compleja interacción entre miR-660-5p, TMEM41B y la posible participación de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B en el cáncer de mama, destacando posibles opciones para la intervención terapéutica.

Asimismo, realizamos la validación de TMEM41B mediante Western blot, encontrando que aumenta su expresión al inhibir al miR-660-5p. Además, identificamos que al evaluar a TMEM41B en distintas líneas celulares de cáncer de mama, éste se presenta con diferentes niveles de expresión. Finalmente, el ensayo de luciferasa nos ayudó a confirmar que TMEM41B es un nuevo blanco del miR-660-5p en cáncer de mama.

En resumen, hemos demostrado que la inhibición de la expresión del miR-660-5p reduce de manera significativa los procesos de proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama y angiogénesis en células HUVEC, reafirmando su papel como miRNA oncogénico. Identificamos a TMEM41B como un nuevo blanco del miR-660-5p en este tipo de cáncer. No obstante, es crucial investigar el mecanismo mediante el cual el miR-660-5p regula a TMEM41B en células de cáncer de mama. Dado su impacto en procesos clave para la progresión tumoral, el miR-660-5p presenta un notable potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama.

## 9. CONCLUSIÓN

La inhibición del miR-660-5p reduce significativamente la proliferación, migración, invasión en células de cáncer de mama y angiogénesis en células HUVEC. Estos efectos biológicos del miR-660-5p probablemente están mediados por la regulación negativa de TMEM41B, lo que sugiere que este blanco puede tener un papel de supresor tumoral en el cáncer de mama. Asimismo, se determinó que la alta expresión del miR-660-5p está asociada a una baja supervivencia, mientras que la alta expresión de TMEM41B aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. Por lo cual, la exploración adicional del eje miR-660-5p/TMEM41B podría proporcionar valiosos conocimientos sobre su potencial terapéutico y relevancia clínica en el manejo del cáncer de mama.

## **10.PERSPECTIVAS**

- Estudiar el efecto biológico de TMEM41B en el proceso carcinogénico mamario.
- Validar la participación de la vía de señalización del NF-κB en la progresión del cáncer de mama.
- Evaluar el efecto de la inhibición del miR-660-5p y la sobreexpresión de TMEM41B en la progresión del cáncer de mama mediante un modelo murino.
- Evaluar los niveles de expresión del miR-660-5p en muestras de pacientes con cáncer de mama de México.

## **11.REFERENCIAS**

- Ahmad, A. (Ed.), 2019. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6
- Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O.B., Minko, T., 2018. Metastatic and triplenegative breast cancer: challenges and treatment options. Drug Deliv. and Transl. Res. 8, 1483–1507. https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3
- American Cancer Society, n.d. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020.
- Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A., 2010. Cadherin 13 in cancer. Genes Chromosomes Cancer 49, 775–790. https://doi.org/10.1002/gcc.20787
- Asiaf, A., Ahmad, S.T., Arjumand, W., Zargar, M.A., 2018. MicroRNAs in Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Potential, in: Wu, W. (Ed.), MicroRNA and Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 23–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7435-1\_2
- Asiedu, M.K., Ingle, J.N., Behrens, M.D., Radisky, D.C., Knutson, K.L., 2011. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. Cancer Res 71, 4707–4719. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4554
- Asiedu, M.K., Thomas, C.F., Jr, Dong, J., Schulte, S.C., Khadka, P., Sun, Z., Kosari, F., Jen, J., Molina, J., Vasmatzis, G., Kuang, R., Aubry, M.C., Yang, P., Wigle, D.A., 2018.
  Pathways Impacted by Genomic Alterations in Pulmonary Carcinoid Tumors. Clinical Cancer Research 24, 1691–1704. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0252
- Bahler, C.D., Johnson, M.M., Davicioni, E., Zhang, J., Cheng, L., Green, M.A., Koch, M.O., 2020. Predictors of Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA/FOLH1) Expression in a Genomic Database. Urology 144, 117–122. https://doi.org/10.1016/j.urology.2020.06.025
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A., 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 74, 229– 263. https://doi.org/10.3322/caac.21834
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 6, 857– 866. https://doi.org/10.1038/nrc1997
- 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 99, 15524–15529. https://doi.org/10.1073/pnas.242606799
- Chakraborty, C., Sharma, A.R., Sharma, G., Sarkar, B.K., Lee, S.-S., 2018. The novel strategies for next-generation cancer treatment: miRNA combined with chemotherapeutic agents for the treatment of cancer. Oncotarget 9, 10164–10174. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24309
- Chen, D., Sun, Y., Wei, Y., Zhang, P., Rezaeian, A.H., Teruya-Feldstein, J., Gupta, S., Liang, H., Lin, H.-K., Hung, M.-C., Ma, L., 2012. LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. Nat Med 18, 1511–1517. https://doi.org/10.1038/nm.2940
- Chen, P.-S., Su, J.-L., Hung, M.-C., 2012. Dysregulation of MicroRNAs in cancer. Journal of Biomedical Science 19, 90. https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-90
- Chin, D., Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends in Cell Biology 10, 322–328. https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01800-6

- Croce, C.M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. Nat Rev Genet 10, 704–714. https://doi.org/10.1038/nrg2634
- DeSantis, C.E., Ma, J., Gaudet, M.M., Newman, L.A., Miller, K.D., Sauer, A.G., Jemal, A., Siegel, R.L., 2019. Breast cancer statistics, 2019. CA: A Cancer Journal for Clinicians 69, 438–451. https://doi.org/10.3322/caac.21583
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Matias-Guiu, X., 2005. NF-kB in development and progression of human cancer. Virchows Arch 446, 475–482. https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9
- Du, L., Li, C.-R., He, Q.-F., Li, X.-H., Yang, L.-F., Zou, Y., Yang, Z.-X., Zhang, D., Xing, X.-W., 2020. Downregulation of the ubiquitin ligase KBTBD8 prevented epithelial ovarian cancer progression. Molecular Medicine 26, 96. https://doi.org/10.1186/s10020-020-00226-7
- Duff, D., Long, A., 2017. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. Cellular Signalling 35, 250–255. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.005
- Dziarski, R., Gupta, D., 2010. Review: Mammalian peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in innate immunity. Innate Immun 16, 168–174. https://doi.org/10.1177/1753425910366059
- Ergün, S., 2019. Cross-Kingdom Gene regulation via miRNAs of Hypericum perforatum (St. John's wort) flower dietetically absorbed: An in silico approach to define potential biomarkers for prostate cancer. Computational Biology and Chemistry 80, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.02.010
- Finnegan, E.F., Pasquinelli, A.E., 2013. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 48, 51–68. https://doi.org/10.3109/10409238.2012.738643
- Frankel, L.B., Christoffersen, N.R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., Lund, A.H., 2008. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. J Biol Chem 283, 1026–1033. https://doi.org/10.1074/jbc.M707224200
- Fridrichova, I., Zmetakova, I., 2019. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. Cells 8, 1361. https://doi.org/10.3390/cells8111361
- Gee, H.E., Camps, C., Buffa, F.M., Colella, S., Sheldon, H., Gleadle, J.M., Ragoussis, J., Harris, A.L., 2008. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. Nature 455, E8–E9. https://doi.org/10.1038/nature07362
- Guo, Z., Maki, M., Ding, R., Yang, Y., Zhang, B., Xiong, L., 2014. Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. Sci Rep 4, 5150. https://doi.org/10.1038/srep05150
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov 12, 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hemmatzadeh, M., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F., Asghari, F., Yousefi, M., 2016. The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy 78, 129–139. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.026
- Ho, P.T.B., Clark, I.M., Le, L.T.T., 2022. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. International Journal of Molecular Sciences 23, 7167. https://doi.org/10.3390/ijms23137167
- Hoffmann, H.-H., Schneider, W.M., Rozen-Gagnon, K., Miles, L.A., Schuster, F., Razooky, B., Jacobson, E., Wu, X., Yi, S., Rudin, C.M., MacDonald, M.R., McMullan, L.K., Poirier, J.T., Rice, C.M., 2021. TMEM41B Is a Pan-flavivirus Host Factor. Cell 184, 133-148.e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.005

- 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, 7065–7070. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783
- Kaboli, P.J., Rahmat, A., Ismail, P., Ling, K.-H., 2015. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. Pharmacological Research 97, 104–121. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.04.015
- Klinge, C.M., 2018. Non-Coding RNAs in Breast Cancer: Intracellular and Intercellular Communication. Non-Coding RNA 4, 40. https://doi.org/10.3390/ncrna4040040
- Krishnan, P., Ghosh, S., Wang, B., Li, D., Narasimhan, A., Berendt, R., Graham, K., Mackey, J.R., Kovalchuk, O., Damaraju, S., 2015. Next generation sequencing profiling identifies miR-574-3p and miR-660-5p as potential novel prognostic markers for breast cancer. BMC Genomics 16, 735. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1899-0
- Lau, D., Elezagic, D., Hermes, G., Mörgelin, M., Wohl, A.P., Koch, M., Hartmann, U., Höllriegl, S., Wagener, R., Paulsson, M., Streichert, T., Klatt, A.R., 2018. The cartilagespecific lectin C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A) enhances tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. J Biol Chem 293, 203–214. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.818930
- 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, 843–854. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y
- Li, C., Li, R., Hu, X., Zhou, G., Jiang, G., 2022. Tumor-promoting mechanisms of macrophagederived extracellular vesicles-enclosed microRNA-660 in breast cancer progression. Breast Cancer Res Treat 192, 353–368. https://doi.org/10.1007/s10549-021-06433-y
- Li, X.-D., Zhong, Q.-L., Luo, D.-J., Liang, Q., Qiu, J., Du, Q.-H., Xiao, L., Zhou, Y., Long, Y.-B., Liu, W.-Q., Li, J., 2023. RNF219 Promotes Nasopharyngeal Carcinoma Progression by Activating the NF-κB Pathway. Mol Biotechnol 65, 1318–1326. https://doi.org/10.1007/s12033-022-00593-y
- Liu, K., He, W., Zhao, J., Zeng, Y., Cheng, H., 2017. Association of WDR36 polymorphisms with primary open angle glaucoma: A systematic review and meta-analysis. Medicine 96, e7291. https://doi.org/10.1097/MD.00000000007291
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF-κB signaling in inflammation. Sig Transduct Target Ther 2, 1–9. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23
- Liu, Y., Tang, W., Yao, F., 2023. USP53 Exerts Tumor-Promoting Effects in Triple-Negative Breast Cancer by Deubiquitinating CRKL. Cancers 15, 5033. https://doi.org/10.3390/cancers15205033
- Moazed, D., 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence [WWW Document]. Nature. https://doi.org/10.1038/nature07756
- Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Héon, E., Crick, R.P., Child, A., Sarfarazi, M., 2005. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. Hum Mol Genet 14, 725–733. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi068
- Mu, H., Zhang, W., Qiu, Y., Tao, T., Wu, H., Chen, Z., Xu, G., 2021. miRNAs as potential markers for breast cancer and regulators of tumorigenesis and progression (Review). Int J Oncol 58, 16. https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5196
- Muñoz-Rodríguez, J.L., Vrba, L., Futscher, B.W., Hu, C., Komenaka, I.K., Meza-Montenegro, M.M., Gutierrez-Millan, L.E., Daneri-Navarro, A., Thompson, P.A., Martinez, M.E., 2015. Differentially expressed microRNAs in postpartum breast cancer in Hispanic women. PLoS One 10, e0124340. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124340

- Nashtahosseini, Z., Aghamaali, M.R., Sadeghi, F., Heydari, N., Parsian, H., 2021. Circulating status of microRNAs 660-5p and 210-3p in breast cancer patients. The Journal of Gene Medicine 23, e3320. https://doi.org/10.1002/jgm.3320
- Peng, B., Li, C., He, L., Tian, M., Li, X., 2020. miR-660-5p promotes breast cancer progression through down-regulating TET2 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling. Braz J Med Biol Res 53, e9740. https://doi.org/10.1590/1414-431X20209740
- Peng, Y., Croce, C.M., 2016. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduct Target Ther 1, 15004. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4
- Provenzano, E., Ulaner, G.A., Chin, S.-F., 2018. Molecular Classification of Breast Cancer. PET Clinics 13, 325–338. https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004
- Qi, Y., Zha, W., Zhang, W., 2019. Exosomal miR-660-5p promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer. J BUON 24, 599–607.
- Rahman, M.M., Brane, A.C., Tollefsbol, T.O., 2019. MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer. Cells 8, 1214. https://doi.org/10.3390/cells8101214
- Rais, R., Jiang, W., Zhai, H., Wozniak, K.M., Stathis, M., Hollinger, K.R., Thomas, A.G., Rojas, C., Vornov, J.J., Marohn, M., Li, X., Slusher, B.S., 2016. FOLH1/GCPII is elevated in IBD patients, and its inhibition ameliorates murine IBD abnormalities. JCI Insight 1. https://doi.org/10.1172/jci.insight.88634
- Roa, I., Cantín, M., Muñoz, M., Rosas, C., Lemus, D., 2016. Celecoxib/PLGA Suprime Angiogénesis y Metástasis Pulmonar de un Cáncer Mamario Murino Experimental. International Journal of Morphology 34, 335–341. https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000100048
- Ryan, B., Joilin, G., Williams, J.M., 2015. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. Frontiers in Molecular Neuroscience 8.
- Salati, S., Salvestrini, V., Carretta, C., Genovese, E., Rontauroli, S., Zini, R., Rossi, C., Ruberti, S., Bianchi, E., Barbieri, G., Curti, A., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Rosti, G., Bergamaschi, M., Tafuri, A., Tagliafico, E., Lemoli, R., Manfredini, R., 2017. Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in CML leukemic stem cells. Oncotarget 8, 49451–49469. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17706
- Schneider, W.M., Luna, J.M., Hoffmann, H.-H., Sánchez-Rivera, F.J., Leal, A.A., Ashbrook, A.W., Pen, J.L., Ricardo-Lax, I., Michailidis, E., Peace, A., Stenzel, A.F., Lowe, S.W., MacDonald, M.R., Rice, C.M., Poirier, J.T., 2021. Genome-Scale Identification of SARS-CoV-2 and Pan-coronavirus Host Factor Networks. Cell 184, 120-132.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.006
- Shen, Y., Ye, Y.F., Ruan, L.W., Bao, L., Wu, M.W., Zhou, Y., 2017. Inhibition of miR-660-5p expression suppresses tumor development and metastasis in human breast cancer. Genet Mol Res 16. https://doi.org/10.4238/gmr16019479
- Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 10869–10874. https://doi.org/10.1073/pnas.191367098
- Stefansson, B., Brautigan, D.L., 2007. Protein phosphatase PP6 N terminal domain restricts G1 to S phase progression in human cancer cells. Cell Cycle 6, 1386–1392. https://doi.org/10.4161/cc.6.11.4276
- Sun, Y., Dong, D., Xia, Y., Hao, L., Wang, W., Zhao, C., 2022. YTHDF1 promotes breast cancer cell growth, DNA damage repair and chemoresistance. Cell Death Dis 13, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04672-5

- 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 n/a. https://doi.org/10.3322/caac.21660
- Tafrihi, M., Hasheminasab, E., n.d. MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. MicroRNA 8, 4–27.
- The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) NCI [WWW Document], 2022. URL https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga (accessed 5.26.23).
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2024 [WWW Document], n.d. . NobelPrize.org. URL https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2024/press-release/ (accessed 10.11.24).
- Tian, T., Wang, J., Zhou, X., 2015. A review: microRNA detection methods. Organic & Biomolecular Chemistry 13, 2226–2238. https://doi.org/10.1039/C4OB02104E
- Tomkinson, B., 2019. Tripeptidyl-peptidase II: Update on an oldie that still counts. Biochimie, Proteases: goldies enzymes always on the agenda 166, 27–37. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.05.012
- Trayes, K.P., Cokenakes, S.E.H., 2021. Breast Cancer Treatment. afp 104, 171–178.
- Trepat, X., Chen, Z., Jacobson, K., 2012. Cell Migration, in: Comprehensive Physiology. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 2369–2392. https://doi.org/10.1002/cphy.c110012
- Trimarco, J.D., Heaton, B.E., Chaparian, R.R., Burke, K.N., Binder, R.A., Gray, G.C., Smith, C.M., Menachery, V.D., Heaton, N.S., 2021. TMEM41B is a host factor required for the replication of diverse coronaviruses including SARS-CoV-2. PLOS Pathogens 17, e1009599. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009599
- Tsang, J.Y.S., Tse, G.M., 2020. Molecular Classification of Breast Cancer. Advances in Anatomic Pathology 27, 27–35. https://doi.org/10.1097/PAP.00000000000232
- Viallard, C., Larrivée, B., 2017. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. Angiogenesis 20, 409–426. https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9
- Waks, A.G., Winer, E.P., 2019. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA 321, 288–300. https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323
- Wang, J., Wu, J., 2012. Role of miR-155 in breast cancer. FBL 17, 2350–2355. https://doi.org/10.2741/4056
- Weiss, A., Chavez-MacGregor, M., Lichtensztajn, D.Y., Yi, M., Tadros, A., Hortobagyi, G.N., Giordano, S.H., Hunt, K.K., Mittendorf, E.A., 2018. Validation Study of the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Prognostic Stage Compared With the Anatomic Stage in Breast Cancer. JAMA Oncol 4, 203–209. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4298
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology 11, 228–234. https://doi.org/10.1038/ncb0309-228
- Wu, Y., Zhang, Y., Wang, F., Ni, Q., Li, M., 2020. MiR-660-5p promotes the progression of hepatocellular carcinoma by interaction with YWHAH via PI3K/Akt signaling pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications 531, 480–489. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.034
- Xia, Y., Shen, S., Verma, I.M., 2014. NF-κB, an active player in human cancers. Cancer Immunol Res 2, 823–830. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112
- Yan, M., Wang, J., Wang, H., Zhou, J., Qi, H., Naji, Y., Zhao, L., Tang, Y., Dai, Y., 2023. Knockdown of NR3C1 inhibits the proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma through activating endoplasmic reticulum stress–mitophagy. Journal of Translational Medicine 21, 701. https://doi.org/10.1186/s12967-023-04560-2

- Yang, H., Wang, Z., Hu, S., Chen, L., Li, W., Yang, Z., 2023. miRNA-874-3p inhibits the migration, invasion and proliferation of breast cancer cells by targeting VDAC1. Aging 15, 705–717. https://doi.org/10.18632/aging.204474
- Yshii, L., Bost, C., Liblau, R., 2020. Immunological Bases of Paraneoplastic Cerebellar Degeneration and Therapeutic Implications. Front. Immunol. 11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00991
- Yu, D., Lv, M., Chen, W., Zhong, S., Zhang, X., Chen, L., Ma, T., Tang, J., Zhao, J., 2015. Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer. Tumor Biol. 36, 1395–1401. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3263-z
- Zhang, P., Gao, H., Li, Q., Chen, X., Wu, X., 2018. Downregulation of microRNA-660 inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by directly targeting forkhead box O1. Molecular Medicine Reports 18, 2433–2440. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9165
- Zhang, Xin, O'Brien, D., Zhang, Xiaohui, n.d. Investigation of Transcript Variant 6 of TPD52L2 as a Prognostic and Predictive Biomarker in Basal-Like MDA-MB-231 and MDA-MB-453 Cell Lines for Breast Cancer. https://doi.org/10.1155/2022/7078787
- Zhao, Q., Zheng, B., Meng, S., Xu, Y., Guo, J., Chen, Li-jie, Xiao, J., Zhang, W., Tan, Z., Tang, J., Chen, Lei, Chen, Y., 2019. Increased expression of SLC46A3 to oppose the progression of hepatocellular carcinoma and its effect on sorafenib therapy. Biomedicine & Pharmacotherapy 114, 108864. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108864
- Zhou, Y., Yau, C., Gray, J.W., Chew, K., Dairkee, S.H., Moore, D.H., Eppenberger, U., Eppenberger-Castori, S., Benz, C.C., 2007. Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. BMC Cancer 7, 59. https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-59