

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Mención Biología Celular y Molecular

**MICRORNAS QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN SNAIL, SLUG, ZEB1 Y TWIST REPRIMEN LA
INVASIÓN, LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN
CÁNCER DE MAMA**

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas,
con mención en Biología Celular y Molecular

Por

ELISA VALENTINA PÉREZ MORENO

Directora de Tesis: Dra. Pilar Carvallo

Comisión de Tesis: Dra. Katia Gysling

Dr. Juan Carlos Roa

Dra. María Isabel Yuseff

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi tutora, la Dra. Pilar Carvallo, por guiarme desde que llegué como alumna de pregrado a su laboratorio. Toda la paciencia y dedicación que siempre tuvo para enseñarme, al igual que los viajes a congresos donde tanto aprendí, nunca los olvidaré.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, a quienes siguen trabajando hoy en el laboratorio y a quienes ya partieron. Todos de una u otra forma han contribuido al desarrollo de esta tesis. En especial, quiero agradecer a Victoria Ortega y Patricia Gajardo, quienes además de ser grandes compañeras de laboratorio han sido grandes amigas a lo largo de todo este proceso. Su apoyo ha sido fundamental para poder llegar al final de este camino.

También agradezco a quienes colaboraron desinteresadamente en el desarrollo de esta tesis, ya sea con reactivos o con conocimiento, como la Dra. Viviana Montecinos, el Dr. Vicente Torres, María Isabel Gómez y a Luciano Fernández (Fermelo S.A.). Muchas gracias por su aporte, sin el cual no hubiera podido ser posible desarrollar muchos de los experimentos realizados en este trabajo.

Quiero agradecer también a quienes financiaron esta tesis. Muchas gracias a la Facultad de Ciencias Biológicas y a CONICYT por apoyar mis estudios y la participación a congresos a través de becas. A CONICYT también agradezco el apoyo brindado para la compra de reactivos a través de la beca de Gastos Operacionales, sin la cual no hubiera sido posible financiar los reactivos utilizados en esta tesis.

Finalmente quiero agradecer a toda mi familia, quienes siempre me han apoyado en cada una de las decisiones que he tomado. Gracias por todo.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cáncer de mama	1
1.2. Heterogeneidad tumoral y metástasis	2
1.3 Características celulares y moleculares de la transición epitelio mesénquima (EMT)	3
1.4 El rol de los microRNAs en cáncer	6
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVO GENERAL	11
3.1 Objetivos específicos	11
4. MATERIALES	13
4.1 Muestras biológicas	13
4.1.1 Tumores de cáncer de mama	13
4.1.2 Líneas celulares	13
4.2 Material químico, enzimas y anticuerpos	14
4.2.1 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	14

4.2.2 Clonamiento de regiones 3'UTR y ensayo luciferasa	14
4.2.3 Cultivo celular y de bacterias	16
4.2.4 Western blot	16
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Inmunofluorescencia de E-cadherina y vimentina en tumores de cáncer de mama	18
5.2 Inmunohistoquímica para los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST en tumores de cáncer de mama	19
5.3 Inmunohistoquímica de CCR7 en tumores de cáncer de mama	21
5.4 Selección de microRNAs para su evaluación experimental	22
5.4.1 Identificación de microRNAs diferencialmente expresados en muestras de cáncer de mama utilizando datos de microarreglos de expresión de microRNAs	22
5.4.2 Análisis <i>in silico</i> y selección de microRNAs a evaluar experimentalmente	26
5.5 Clonamiento de la región 3'UTR de SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 en el vector pMIR-REPORT™ luciferasa	30
5.5.1 Clonamiento de la región 3'UTR de SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 en el vector pGEM®-T	30
5.5.2 Confirmación del inserto en el vector pGEM®-T y extracción de DNA plasmidial de bacterias <i>Escherichia coli</i> TOP10 mediante “Mini-Prep”	32
5.5.3 Obtención y purificación del inserto desde el vector pGEM®-T	32

5.5.4 Clonamiento de la región 3'UTR de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST en el vector pMIR-REPORT™ luciferasa	33
5.6. Validación experimental de los microRNAs seleccionados	35
5.6.1 Ensayo de gen reportero luciferasa en células HEK293T	35
5.6.2 Determinación de la eficiencia de transfección de las células MDA-MB-231	38
5.6.3 Ensayos de migración e invasión en células MDA-MB-231	40
5.6.4 Ensayo de formación de colonias en células MDA-MB-231	42
5.6.5 Inmunofluorescencia en células MDA-MB-231	43
5.6.6 Evaluación de los marcadores de EMT y CCR7 en la línea celular MDA-MB-231, mediante western blot	44
5.7 Análisis estadísticos	46
6. MANUSCRITO	47
ABSTRACT	49
INTRODUCTION	51
METHODS	53
RESULTS	57
DISCUSSION	63
ACKNOWLEDGEMENTS	68
REFERENCES	69
FIGURE LEGENDS	75
7. RESULTADOS ADICIONALES	86

7.1 Expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231	86
7.2 Expresión de vimentina en las células MDA-MB-231	88
7.3 Efecto de los microRNAs en estudio sobre la expresión de los factores de transcripción, a diferentes tiempos post-transfección de línea celular MDA-MB-231	90
8. DISCUSIÓN	95
8.1 Expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima en tumores primarios de cáncer de mama	95
8.2 La pérdida de expresión de microRNAs en cáncer contribuye al desarrollo de la metástasis	101
8.3 Relación entre los microRNAs y evaluados y la metástasis a linfonodo	117
8.4 MicroRNAs como biomarcadores y blanco de terapia contra la metástasis	119
9. CONCLUSIONES	122
10. ANEXOS	123
11. REFERENCIAS	127

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la estrategia utilizada para la selección de microRNAs a validar de manera experimental	29
Figura 2. Mapa físico del vector de expresión pMIR-REPORT™ luciferasa	34
Figura 3. Secuencia y posición del Partidor 1	36
Figura 4. Eficiencia de transfección de la línea celular MDA-MB-231	39
Figura 5. Esquema de las cámaras Transwell utilizadas en los ensayos de migración en invasión celular	41
Figura 6. Detección de la expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231	87
Figura 7. Detección de la expresión de vimentina en las células MDA-MB-231	89
Figura 8. Determinación del tiempo de transfección para los microRNAs en estudio	92
Figura 9. Esquema representativo del efecto de los microRNAs estudiados en distintas etapas de la progresión tumoral	123

MANUSCRITO

Figure 1. Detection of EMT transcription factors and E-cadherin in breast cancer tissues as evidence of EMT	80
Figure 2. Selected microRNAs regulates SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST 3'UTR	81
Figure 3. microRNAs miR-196a and miR-22 decreases ZEB1 levels in MDA-MB-231 cell line	82
Figure 4. microRNAs decrease migration and invasion capacity of MDA-MB-231 cells	83

Figure 5. MicroRNAs decreases proliferation of MDA-MB-231 cells

84

Figure 6. CCR7 is regulated by three novel microRNAs

85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. microRNAs disminuidos en tumores con metástasis a linfonodo	24
Tabla 2. microRNAs disminuidos en tumores con expresión alta de CCR7	25
Tabla 3. microRNAs diferencialmente expresados en tumores de cáncer de mama, y predichos como reguladores de los factores de transcripción que inducen la transición epitelio-mesénquima.	27
Tabla 4. Sitios de unión para cada microRNA en su blanco predicho <i>in silico</i>	28
Tabla 5. Partidores utilizados para la amplificación de la región 3'UTR de los genes SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 a partir de DNA genómico	31

MANUSCRITO

Table 1. Clinicopathological features of the 101 breast cancer tumors analyzed	78
Table 2. Association between EMT transcription factors expression and clinicopathological features of the analyzed breast cancer tumors	79

TABLAS ANEXAS

Tabla 6. Características de los 101 tumores utilizados en el estudio	124
---	-----

ABREVIATURAS

AEC: 3-amino-9-ethylcarbazol.

bHLH: basic helix-loop-helix.

Cy3: Cyanine 3.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

EMT: Epithelial-mesenchymal transition.

EMT-TF: Epithelial-mesenchymal transition promoting transcription factor.

ER: estrogen receptor.

HRP: Horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido.

LARII: Luciferase Assay Reagent II.

LB: Lysogeny Broth.

miR-NC: microRNA-negative control.

miRISC: microRNA-induced silencing complex.

ONPG: Orto-nitrofenil- β -galactósido.

PVDF: polyvinylidene difluoride, fluoruro de polivinilideno.

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay

RESUMEN

El cáncer de mama se clasifica en distintos subtipos tumorales, cada uno de los cuales presenta diferentes características moleculares y clínicas, en especial en relación a la aparición de una metástasis y la sobrevida general. Por su parte, la metástasis corresponde a la primera causa de muerte por cáncer, siendo uno de los temas de mayor interés hoy para la investigación en cáncer. Una de las primeras evidencias de metástasis en cáncer de mama es la presencia de tumores en los nodos linfáticos cercanos al tumor, cuya detección es importante, ya que determina el tratamiento al cual será sometida la paciente. A nivel molecular, la metástasis inicia con un cambio fenotípico de las células, denominado transición epitelio-mesénquima, el cual es inducido por los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST. Debido a que estos cambios en la célula deben ser plásticos y reversibles, las alteraciones epigenéticas se han visto involucradas en la transición epitelio-mesénquima. Los microRNAs tienen la habilidad de regular varios genes involucrados en el desarrollo del cáncer y en la metástasis, por lo tanto, han surgido como marcadores moleculares y posibles blancos de terapia. En esta tesis se propuso identificar microRNAs, cuya expresión se encuentra alterada en cáncer de mama, y que participan en el desarrollo de la metástasis a través de la regulación de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST. Para este propósito, se realizó inmunohistoquímica en 101 tumores de mama con el fin de determinar la expresión de estos cuatro factores de transcripción. Esta información fue combinada con datos de microarreglos de expresión de microRNAs previamente realizados en este grupo de tumores. De esta forma, se identificaron 94 microRNAs que se encuentran sub-expresados en tumores con expresión de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST. Mediante análisis *in silico* se encontró que 33 de estos microRNAs se encuentran predichos como reguladores de la

expresión de estos factores de transcripción, y seis fueron seleccionados para su validación: miR-196a, miR-202, miR-210, miR-22, miR-331 y miR-34b. Mediante ensayos de gen reportero luciferasa se confirmó la regulación de estos microRNAs sobre los blancos predichos *in silico*, excepto para miR-34b que no mostró efecto. Además, estos microRNAs son capaces de disminuir la migración, la invasión y/o la proliferación de la línea celular MDA-MB-231, demostrando ser microRNAs anti-metastásicos. Dos de los microRNAs analizados, miR-196a y miR-22, disminuyen los niveles endógenos de ZEB1 en el modelo celular utilizado, confirmando por primera vez a este factor de transcripción como un blanco de regulación de estos dos microRNAs en cáncer. Adicionalmente, demostramos mediante distintas aproximaciones que miR-196a, miR-202 y miR-30a regulan los niveles de CCR7, receptor de quimioquinas involucrado en la migración específica de las células hacia los nodos linfáticos. Nuestros resultados sugieren que la pérdida de expresión de los microRNAs miR-196a, miR-202, miR-210, miR-22, miR-331 y miR-34b en cáncer de mama contribuye a la formación de metástasis en los linfonodos, mediante el aumento de las características metastásicas de las células tumorales y/o de su migración dirigida hacia los nodos linfáticos cercanos al tumor.

SUMMARY

Breast cancer is classified in different tumor subtypes, each one with different molecular and clinical traits, specially in relation to the development of metastasis and overall survival. On the other hand, metastasis is the leading cause of death in cancer, being one of the topics with more interest in cancer research. One of the first signs of metastasis in breast cancer is the presence of tumors in the lymph nodes close to the tumor, whose detection is important because it determines the treatment to which the patient will be subjected. At the molecular level, metastasis begins with a phenotypic change of the cells, called epithelial-mesenchymal transition, which is induced by the transcription factors SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST. Because these changes in cells must be plastic and reversible, epigenetic alterations have been involved in epithelial-mesenchymal transition. MicroRNAs can regulate large sets of genes involved in cancer development and metastasis, and have emerged as molecular markers and potential therapeutic targets. In this thesis, we proposed to identify microRNAs which expression is altered in breast cancer, and that participate in metastasis development through the regulation of SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST. For this purpose, we performed immunohistochemistry in 101 breast tumors to detect the expression of these four transcription factors. This information was combined with data from microRNA microarrays previously performed in this group of tumors. Thus, we identified 94 microRNAs down-regulated in tumors with SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST expression. Through *in silico* analysis we found that 33 of these microRNAs are predicted as regulators of these transcription factors expression, and six were selected for their validation: miR-196a, miR-202, miR-21, miR-22, miR-331 and miR-34b. Through luciferase reporter gene assays, it was confirmed the regulation of these microRNAs over there *in silico* predicted targets,

except for miR-34b who did not show an effect. In addition, these microRNAs are able to decrease migration, invasion and/or proliferation of MDA-MB-231 cell line, proving to be anti-metastatic microRNAs. Two of the analyzed microRNAs, miR-196a and miR-22, decreased endogenous ZEB1 levels in the used cell line model, confirming for the first time this transcription factor as a new regulation target of these two microRNAs in cancer. Additionally, we demonstrated through different approaches that miR-196a, miR-202 and miR-30a regulate CCR7 levels, a chemokine receptor involved in targeted cell migration to lymph nodes. Our results suggest that loss of expression of microRNAs miR-196a, miR-202, miR-210, miR-22, miR-331 and miR-34b in breast cancer contributes to lymph node metastasis formation through an increase of metastatic traits of tumor cells and/or their targeted migration toward the lymph nodes near to the tumor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en el mundo en mujeres, con una tasa de incidencia de 46,3 casos por 100.000 mujeres (Globocan 2018, <https://gco.iarc.fr>). En Chile el cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres por cáncer de acuerdo a los últimos datos entregados por el Ministerio de Salud (2011), con una mortalidad de 15,5x100.000 mujeres (<http://www.deis.cl/defunciones-y-mortalidad-por-causas/>). El fenotipo de esta enfermedad compleja resulta de la acción entre factores genéticos y ambientales, y se presenta de forma esporádica o hereditaria (Harbeck y cols, 2019). Se estima que el cáncer de mama hereditario, definido por la historia familiar de las pacientes, corresponde al 20-30% de los casos totales de cáncer de mama (BreastLink, <https://www.breastlink.com/breast-cancer-101/risk-factors/>).

El desarrollo del cáncer se debe principalmente a mutaciones en tres tipos de genes: 1) los proto-oncogenes, 2) los genes supresores de tumor, y 3) los genes de reparación al daño en el DNA (Vogelstein y Kinzler, 2004). Los proto-oncogenes han sido descritos como los aceleradores del ciclo celular, y la investigación en cáncer ha demostrado que las alteraciones genéticas relevantes para la progresión del tumor son aquellas que les permiten una ganancia de función, transformando los proto-oncogenes en oncogenes. Por el otro lado, los genes supresores de tumor son los encargados de frenar el ciclo celular. Se ha demostrado que los genes supresores de tumor que participan en el desarrollo tumoral pierden la función de sus dos alelos, siendo ésta una de las causas de la desregulación del ciclo celular. Los genes de reparación del daño en el ADN, como su nombre lo señala, codifican proteínas que participan en la reparación del daño

en el ADN. Cuando este sistema de reparación es defectuoso, la acumulación de mutaciones en el genoma se eleva, pudiendo afectar tanto a genes supresores de tumor como a proto-oncogenes, y aumentando el riesgo de desarrollar cáncer.

1.2 Heterogeneidad tumoral y metástasis

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, la cual se manifiesta en distintos ámbitos, como los distintos tipos tumorales observados en pacientes, la presencia o ausencia de metástasis en los linfonodos cercanos al tumor, la expresión de proteínas específicas de uso pronóstico y predictivo, y la variabilidad en la respuesta que presentan las pacientes a distintos tratamientos.

Mediante análisis de expresión génica en los tumores se han identificado distintos subtipos tumorales en cáncer de mama: luminal A, luminal B, HER2+, tipo-basal, y bajo en Claudina. Cada uno de estos subtipos presenta distintas características moleculares y clínicas (Herschkowitz y cols, 2007; Perou y cols, 2000; Sørlie y cols, 2001). Dos de estos subtipos, el tipo-basal y bajo en claudina, se distinguen del resto en que un alto porcentaje de los tumores pierde sus características epiteliales y adquieren un fenotipo mesenquimal (Prat y cols, 2010; Sarrió y cols, 2008). Este cambio de fenotipo también se encuentra asociado a la capacidad metastásica en distintos tipos de cáncer (Kalluri y cols, 2009). La metástasis es responsable del 90% de las muertes por cáncer, y comprende un proceso complejo a nivel molecular, en donde las células tumorales deben soltarse del tumor primario y colonizar un órgano distante (Chaffer y Weinberg, 2011). La formación de una metástasis consiste en una serie de pasos secuenciales y relacionados entre sí, en donde las células tumorales deben adquirir la capacidad de migrar e invadir el tejido que las rodea, romper y atravesar la membrana basal, entrar a la circulación y

propagarse a través de ella, extravasar a órganos distantes, y asentarse y proliferar hasta formar una metástasis detectable (Nguyen y cols, 2009). Se ha observado que distintos tipos de cáncer tienden a formar metástasis con mayor frecuencia en órganos específicos. En cáncer de mama, la metástasis suele ocurrir preferentemente en pulmones, hígado y huesos (Chambers y cols, 2002; Fidler, 2003; Weigelt y cols, 2005). Una primera evidencia de metástasis en cáncer de mama corresponde a la presencia de tumores en los linfonodos cercanos al tumor primario, y su detección es importante ya que determina el tratamiento al cual será sometida la paciente (Dowlathshahi y cols, 1997; Kelley y cols, 2004). Además, la presencia de metástasis en linfonodos está relacionada a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Fisher y cols, 1983; Soerjomataram y cols, 2008). Debido a esto, es importante establecer modelos predictivos e identificar marcadores moleculares para establecer el riesgo que presentan los pacientes con cáncer de mama a desarrollar metástasis a linfonodo.

1.3 Características celulares y moleculares de la transición epitelio mesénquima (EMT)

Se ha propuesto que para que una célula epitelial tumoral pueda invadir y colonizar sitios distantes es necesario que sufra una reprogramación y pierda su fenotipo epitelial en forma parcial o total, y adquiera un fenotipo mesenquimal (Meng y Wu, 2012; Thiery, 2002). Esto se logra por la activación de un programa denominado transición epitelio-mesénquima (EMT), el cual es reversible. Durante la EMT la célula epitelial pierde sus características tales como las adhesiones célula-célula y la polaridad, reorganiza su citoesqueleto y sufre cambios en la expresión génica. Estos cambios provocan un aumento en la motilidad de las células y permite la adquisición de un fenotipo invasivo (Lamouille y cols, 2014). Una característica de esta transición en cuanto a cambios en la expresión génica es la disminución de expresión de E-cadherina para desestabilizar las uniones adherentes, la cual es balanceada por el aumento de

expresión de N-cadherina, alterando la adhesión celular (Huang y cols, 2012; Wheelock y cols, 2008). Junto con esto, la composición de los filamentos intermedios cambia, reemplazando las moléculas de citoqueratina por vimentina, lo cual deriva en un aumento de la movilidad celular (Hendrix y cols, 1997; Huang y cols, 2012). Los cambios de expresión de estos marcadores de linajes epiteliales y mesenquimales han sido descritos en distintos tipos de cáncer. En cáncer de mama, estos cambios se asocian principalmente a tumores con fenotipo tipo basal, y se relacionan a una mala evolución clínica (Liu y cols, 2013; Sarrió y cols, 2008; Shargh y cols, 2014). Es importante entonces determinar los mecanismos moleculares que promueven la transición epitelio-mesénquima, para comprender de mejor manera el proceso de metástasis.

La pérdida de marcadores epiteliales y adquisición de características mesenquimales se logra a través de un programa transcripcional regulado por tres grandes familias de factores de transcripción. Estas tres familias se llaman SNAIL, ZEB y bHLH (De Herreros y cols, 2010). Los miembros de estas familias de factores de transcripción son capaces de unirse al promotor de E-cadherina y reprimir su expresión, además de promover la expresión de marcadores mesenquimales. En el año 2000 se describió en líneas celulares tumorales que SNAIL reprime la expresión de E-cadherina a través de su unión a secuencias específicas en el promotor del gen de E-cadherina, denominadas E-box (Batlle y cols, 2000; Cano y cols, 2000). Esta pérdida de expresión de E-cadherina es acompañada por la expresión de proteínas mesenquimales como vimentina y fibronectina. Al mutar las secuencias E-box, E-cadherina pierde la capacidad de ser reprimida por SNAIL. Algo similar fue descrito para la familia ZEB, en donde el silenciamiento de ZEB1 mediante siRNAs induce la expresión de E-cadherina en cultivo celular (Spaderna y cols, 2006). En el caso de la familia bHLH se ha demostrado que la expresión ectópica de TWIST, uno de sus miembros, en líneas celulares epiteliales disminuye los niveles de E-

cadherina e incrementa la expresión de vimentina y N-cadherina, aumentando la migración e invasión celular (Ansieau y cols, 2008). Todos estos factores de transcripción son capaces de unirse a las secuencias E-box en el promotor de E-cadherina e inhibir su expresión mediante el reclutamiento de proteínas y enzimas remodeladoras de la cromatina.

La expresión de estos factores de transcripción que promueven EMT puede ser inducida por distintas moléculas. Entre los inductores de su expresión se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y proteínas como Wnt y Notch (Grünert y cols, 2003; Lo y cols, 2007; Wu y cols, 2012), siendo TGF- β el más estudiado. Un dato importante es que en cultivo celular y en modelos animales las células epiteliales de mama que sufren EMT en respuesta a TGF- β migran preferencialmente hacia el sistema linfático, donde forman un tumor secundario. Esta migración dirigida obedece a la expresión del receptor de quimioquina CCR7, el cual es expresado por las células tumorales epiteliales en respuesta al tratamiento con TGF- β (Pang y cols, 2016).

Diversos estudios han relacionado la expresión quimioquinas y sus receptores en el proceso metastásico, debido a su importancia en la migración celular. La expresión de estos receptores en la superficie celular induce la migración dirigida de las células tumorales a través de gradientes de quimioquinas, de manera similar a como ocurre con los linfocitos (Kakinuma y Hwang, 2006). Los receptores de quimioquinas más estudiados en cáncer son CXCR4 y CCR7, los cuales participan en la formación de metástasis de distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Mishan y cols, 2016). En el año 2001 fue publicado el primer trabajo en donde se relaciona la expresión de los receptores CXCR4 y CCR7 a metástasis en cáncer de mama

(Müller y cols, 2001). En este trabajo, los autores describen que CXCR4 y CCR7 son los receptores que presentan el mayor grado de sobre-expresión en cáncer de mama en comparación al tejido de mama normal. También se describe su participación en la migración celular en respuesta a medio de cultivo condicionado de médula ósea y linfonodos, y extracto de proteína de hígado y pulmón, indicando que estos órganos producen las señales que atraen a las células tumorales a través de estos receptores. A partir de esta publicación, distintos autores han profundizado en la participación de CXCR4 y CCR7 en la metástasis. En el caso de CCR7, se ha descrito que la activación del receptor por su ligando CCL19 induce la expresión de SNAIL en líneas celulares de cáncer gástrico, promoviendo EMT (Zhang y cols, 2015). En líneas celulares de cáncer de mama también se ha demostrado que CCR7 promueve EMT actuando a través de la vía de señalización de la proteína quinasa AKT (Xu y cols, 2017). Estos trabajos demuestran que CCR7 no sólo participa en la migración dirigida de las células tumorales, sino que también promueve los cambios fenotípicos necesarios para el desarrollo de la metástasis.

1.4 El rol de los microRNAs en cáncer

Otras moléculas involucradas en el desarrollo tumoral y en la metástasis, y que han tomado relevancia durante los últimos años son los microRNAs. Estos pequeños RNAs no codificantes regulan la expresión génica a través de su unión a los RNA mensajeros de sus genes blanco (Bartel, 2009). En cáncer, incluyendo el cáncer de mama, su expresión se ha visto desregulada en comparación al tejido normal (Iorio y cols, 2005). Además de promover el crecimiento tumoral, los microRNAs se han visto involucrados en la metástasis a través de la regulación de EMT. Una de las familias de microRNAs más estudiadas en la regulación de esta transición es la familia miR-200. Esta familia de microRNAs cumple un rol fundamental en la mantención

del fenotipo epitelial, ya que dentro de sus genes blanco se encuentran proteínas de las familias ZEB y SNAIL (Korpál y cols, 2008; Perdigão-Henriques y cols, 2016). Gregory y cols (2008) describieron que al inducir EMT con TGF- β en células MDCK, disminuye la expresión de los miembros de la familia miR-200, y que la re-expresión de estas moléculas es capaz de revertir, por sí sola, la pérdida del fenotipo epitelial inducida por TGF- β . Además, esta familia de microRNAs puede regular la expresión de moesina, la cual promueve una reorganización del citoesqueleto de actina característica de una célula mesenquimal, aumentando la capacidad metastásica de las células (Li y cols, 2014). En un estudio en cáncer de mama que utilizó líneas celulares y tumores de pacientes, se determinó que la expresión de la familia miR-200 se encuentra disminuida en tumores y líneas celulares de cáncer tipo metaplásico, el cual se caracteriza por presentar una alta probabilidad de desarrollar metástasis. Esta disminución de la expresión de microRNAs está acompañada por el aumento del mRNA de SNAIL y ZEB1 en este subtipo tumoral, sin embargo, no se realizaron estudios a nivel de proteína de estos factores de transcripción (Castilla y cols, 2012). Es importante destacar que un gran porcentaje de los trabajos en donde se estudia la familia miR-200 están realizados en cultivo celular y en modelos animales. Aún es carente la información en relación a esta familia de microRNAs en tumores de pacientes con cáncer, y su relación con sus blancos de regulación. Otros ejemplos de microRNAs involucrados en invasión, migración y metástasis son miR-10b, el cual promueve la migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama y metástasis en modelos animales (Ma y cols, 2007); la familia Let-7, que se encuentra disminuida en líneas celulares que presentan fenotipo mesenquimal y en tumores de ovario de estado avanzado (Shell y cols, 2007); miR-335, cuya re-expresión en líneas celulares de mama disminuye la capacidad de formar metástasis en estudios en xenografos (Tavazoie y cols, 2008); y miR-21, cuyo bloqueo mediante

oligonucleótidos anti-sentido disminuye la migración e invasión de una línea celular metastásica de cáncer de mama (Zhu y cols, 2008).

Existen pocos trabajos que estudian la relación entre metástasis a linfonodo y la expresión de microRNAs en tumores primarios de mama. Dos de estos trabajos han logrado identificar grupos de microRNAs que se expresan diferencialmente en tumores primarios de cáncer de mama en relación a la presencia de metástasis en linfonodo (Avery-Kiejda y cols, 2014; Rask y cols, 2014), sin embargo, no hay estudios funcionales que permitan comprender la participación de estos microRNAs en el desarrollo de la metástasis. Sólo dos estudios van un paso más allá, evaluando el efecto de microRNAs diferencialmente expresados en tumores con metástasis a linfonodo, sobre la migración e invasión celular (Wang y cols, 2014; Chen y cols, 2018). Si bien estos trabajos han permitido identificar microRNAs que podrían ser utilizados como marcadores de metástasis, ninguno de los estudios mencionados profundiza en el mecanismo mediante el cual éstos microRNAs actúan, lo cual es importante para entender como los cambios en la expresión de estas moléculas afecta la capacidad metastásica de las células tumorales.

Desde el punto de vista clínico, es importante estudiar la participación de microRNAs en la metástasis a linfonodo en cáncer de mama y establecer su rol como marcadores de pronóstico para las pacientes. Además, entender el mecanismo mediante el cual actúan en el desarrollo de la metástasis permitiría elaborar terapias basadas en estas moléculas. Debido a que la metástasis es la principal causa de muerte por cáncer, la reversión de la EMT podría ser un mecanismo que ayude a frenar el proceso de la metástasis, mejorando así el pronóstico de las pacientes con cáncer.

Dados todos los antecedentes presentados, en esta tesis hemos propuesto identificar microRNAs

que presenten expresión diferencial en tumores de cáncer de mama con y sin metástasis a linfonodo, y su relación con la expresión de los factores de transcripción que promueven la transición epitelio mesénquima.

2. HIPÓTESIS

Tumores primarios de pacientes con cáncer de mama con y sin metástasis a linfonodo presentan expresión diferencial de microRNAs que regulan la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar microRNAs que tengan expresión diferencial entre tumores con y sin expresión de los factores de transcripción que promueven la transición epitelio-mesénquima. Además, validar los microRNAs como reguladores de la expresión de estos factores de transcripción.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 **Seleccionar y validar microRNAs que se encuentran sub-expresados en tumores de mama con expresión de los factores de transcripción que promueven la transición epitelio-mesénquima.**

3.1.1.1 Identificar microRNAs candidatos, a partir de resultados obtenidos previamente de microarreglos de expresión de microRNAs.

3.1.1.2 Realizar estudios *in silico* para determinar si los microRNAs seleccionados en el objetivo 1 tienen como blanco el mRNA de proteínas involucradas en la transición epitelio-mesénquima.

3.1.1.3 Verificar experimentalmente la unión de cada miRNA a su mRNA blanco predicho *in silico*, mediante ensayos de gen reportero en la línea celular HEK293T.

3.1.1.4 Determinar el efecto de los microRNAs seleccionados sobre su blanco predicho *in silico*, en una línea celular de cáncer de mama.

3.1.1.5 Evaluar el efecto de los microRNAs seleccionados en migración, invasión y proliferación celular.

3.1.2 Determinar la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima en tumores de mama.

3.1.2.1 Evaluar la expresión de E-cadherina y vimentina en tumores de mama mediante inmunofluorescencia, y relacionar con metástasis a linfonodo.

3.1.2.2 Evaluar la expresión de los factores de transcripción SNAIL, SLUG , ZEB1 y TWIST en tumores de mama mediante inmunohistoquímica, y relacionar con metástasis a linfonodo.

3.1.3 Determinar la expresión de CCR7 en tumores de cáncer de mama

3.1.3.1 Determinar la expresión de CCR7 en tumores de mama mediante inmunohistoquímica, y relacionar con metástasis a linfonodo.

4. MATERIALES

4.1. Muestras biológicas

4.1.1. Muestras de cáncer de mama

Se utilizó 101 tumores de pacientes con cáncer de mama provenientes de dos centros hospitalarios de la ciudad de Santiago de Chile: el Hospital San Borja Arriarán (HSBA) y la Fundación Arturo López Pérez (FALP). Las muestras utilizadas en esta investigación doctoral están dentro del proyecto FONDECYT #1120200 a cargo de la Dra. Pilar Carvallo, y fueron recolectadas entre los años 2012-2015.

Las muestras utilizadas en este estudio están fijadas en formalina y embebidas en parafina, y dispuestas en microarreglos de tejidos. El protocolo de consentimiento informado se encuentra aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile y por el Comité ético-científico del Servicio de Salud Metropolitano Central.

En este caso no se utilizó ningún criterio de selección en particular para la elección de los tumores.

Las características de los tumores utilizados en este estudio se encuentran detalladas en la tabla 1, Anexo.

4.1.2. Líneas celulares

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos líneas celulares, una de tejido de riñón y una de cáncer de mama. Se utilizó la línea celular de tejido embrionario humano de riñón HEK293T, la cual fue una donación de la Dra. Estela Andrés, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231,

ampliamente utilizada como modelo de metástasis, fue donada por el Dr. Vicente Torres de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

4.2. Material químico, enzimas y anticuerpos

4.2.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

- NeoClear (Merk Millipore).
- Anticuerpo Anti-E-cadherina (Abcam). Donación Dra. Viviana Montecinos, Laboratorio de Biología Tumoral. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Anticuerpo Anti-vimentina (Dako). Donación Dra. Viviana Montecinos, Laboratorio de Biología Tumoral. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Anticuerpo Anti-vimentina (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo Anti-SNAIL (Cell Signaling).
- Anticuerpo Anti-SLUG (Cell Signaling).
- Anticuerpo Anti-ZEB1 (Cell Signaling)
- Anticuerpo Anti-ZEB1 (Santa Cruz Biotechnology). Donación Dr. Hector Contreras, Laboratorio de Andrología Celular y Molecular. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Anticuerpo Anti-TWIST (Abcam).
- Anticuerpo Anti-CCR7 (Abcam).
- Anticuerpo Anti-Ki67 (Cell Signaling).
- Anticuerpo Alexa-Fluor® 488 anti-conejo (Life Technologies).
- Anticuerpo Alexa-Fluor® 594 anti-ratón (Life Technologies).

- Dako Fluorescent Mounting Medium (Agilent).
- Sistema comercial Histostain-Plus® (Invitrogen).
- Sistema comercial VECTASTAIN® Elite ABC HRP (Vector Laboratories). Donación Dra. Carolina Llanos, Laboratorio de Inmunoterapia. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- ImmPACT™ AEC (Vector Laboratories). Donación Dra. Carolina Llanos, Laboratorio de Inmunoterapia. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

4.2.2. Clonamiento de regiones 3'UTR y ensayo luciferasa.

- Taq DNA Polimerasa (ThermoFisher Scientific).
- Partidores específicos de DNA (Integrated DNA Technologies).
- Enzima de restricción MluI (Promega).
- Enzima de restricción PmeI (ThermoFisher Scientific).
- DNA Ligasa T4 (ThermoFisher Scientific).
- Fosfatasa Alcalina (Roche). Donación Dra. Estela Andrés. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Vector pGEM®-T (Invitrogen).
- Sistema pMIR-REPORT miRNA Expression Reporter Vector (ThermoFisher Scientific).
- Wizard SV gel and PCR Clean-up System (Promega).
- Sistema comercial Zyppy® Plasmid Miniprep (Zymo Research).
- Reporter Lysis Buffer 1X (Promega)
- Luciferase Assay System (Promega)

4.2.3. Cultivo celular y de bacterias.

- Bacterias *Escherichia coli* TOP10. Donación Laboratorio Dr. Xavier Jordana. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Agar (ThermoFisher Scientific)
- Extracto de levadura (ThermoFisher Scientific)
- Bactotripton (USBiological)
- NaCl (Merck Millipore)
- Penicilina/estreptomicina (ThermoFisher Scientific)
- 1X Passive Lysis Buffer (Promega)
- Cy3 Transfection Control DsiRNA (Integrated DNA Technologies)
- PBS 10X (Merck Millipore)
- Tripsina 2.5% (Gibco)
- Suero Fetal Bovino (ThermoFisher Scientific)
- Dulbecco Modified Eagle's Medium (ThermoFisher Scientific)
- Opti-MEM 1X (Gibco)
- mirVana™ miRNA Mimics (ThermoFisher Scientific)
- Lipofectamina RNAiMAX (ThermoFisher Scientific)
- Lipofectamina 3000 (ThermoFisher Scientific)
- Sistema comercial Luciferase Assay System (Promega)
- Matrigel (BD Biosciences)

4.2.4. Western blot

- Tris (Winkler)

- Glicina (Winkler)
- Metanol técnico (Winkler)
- RIPA 10X (Merck Millipore)
- Halt Protease Inhibitor Cocktail 100X (ThermoFisher Scientific)
- Anticuerpo Anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo Anti-conejo HRP (Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo anti-raton HRP (Jackson ImmunoResearch).
- Sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (ThermoFisher Scientific).
- Membrana PVDF (Immobilon-P, Merck Milipore)

5. METODOLOGÍA

5.1. Inmunofluorescencia de E-cadherina y vimentina en tumores de cáncer de mama.

Se utilizan cortes histológicos de 3µm de grosor, obtenidos desde los microarreglos de tejido de tumores de cáncer de mama fijados en formalina y embebidos en parafina. Los cortes de tejido se ponen en porta-objetos de vidrio. Cada microarreglo contiene aproximadamente 14 tumores diferentes, con 3 réplicas de cada uno. Las muestras son calentadas en una estufa a 70° durante 1h. Luego se elimina la parafina realizando tres lavados con Neo-Clear®. Para esto, se disponen tres recipientes independientes con la solución para quitar la parafina, y en cada uno de ellos se sumergen las muestras durante 5 min. Luego, las muestras se lavan durante 5 min con etanol al 100%. Una vez eliminada la parafina, se procede con la rehidratación de los tejidos, con lavados sucesivos de etanol al 100%, 95% y 70%. Esta vez los lavados se realizan dos veces en cada solución, durante 5 min cada lavado. Para finalizar con este proceso, las muestras se sumergen durante 10 min en Tris-HCl (Tris 10 mM, KH_2HPO_4 3,5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 8,4 mM, NaCl 120 mM, pH 7,8) a temperatura ambiente.

Para desenmascarar el antígeno, se incuban las muestras en una solución amortiguadora de Citrato de Sodio (Citrato de Sodio 10mM, Tween-20 al 0,1%, pH 6,0) durante 20 min a 90° en un horno microondas. Luego se dejan enfriar a temperatura ambiente y se lavan tres veces con Tris-HCl, 5 min cada lavado. Posterior a esto, se realiza la incubación de las muestras con ambos anticuerpos primarios de manera simultánea. El anticuerpo anti-E-cadherina hecho en conejo se utiliza a una dilución de 1:500, y el anticuerpo anti-vimentina hecho en ratón a 1:100. Ambos se diluyen en BSA al 1% en Tris HCl.

Las muestras se ponen en una cámara húmeda, y se incuban durante toda la noche a 4°. Al día siguiente, las muestras se sacan del frío y se dejan 30 min a temperatura ambiente antes de continuar. Se descarta la solución que contiene los anticuerpos primarios, drenándola cuidadosamente, y se realizan tres lavados con Tris-HCl, 10 min cada lavado. Luego se procede a la incubación con ambos anticuerpos secundarios, durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo hecho en cabra anti-conejo Alexa Fluor® 488, y el anticuerpo hecho en burro anti-ratón Alexa Fluor® 594 son diluidos 1:400 en BSA al 2,5%, Tritón al 0,1%, preparado en Tris HCl. Una vez transcurrida la hora, se lava con Tris-HCl durante 10 min, 3 veces. Para continuar con la tinción nuclear, se incuban las muestras con el marcador fluorescente de DNA Hoescht (dilución 1:10.000) durante 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente se realizan 3 lavados con Tris-HCl, durante 5 min cada lavado. Luego se lavan las muestras con agua destilada durante 5 min, 3 veces. Finalmente se realiza el montaje de las muestras. Este se realiza agregando medio de montaje para fluorescencia a las muestras, y poniendo un cubre-objeto sobre estas. Las muestras se analizan en un microscopio de epifluorescencia, y se almacenan en oscuridad a 4°.

5.2. Inmunohistoquímica para los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST en tumores de cáncer de mama.

Al igual que en la inmunofluorescencia anteriormente descrita, se utilizan cortes de microarreglos de tejidos de tumores de mama, para realizar la inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica para cada proteína se realiza de manera independiente, utilizando el kit Histostain-Plus®. Se toman los cortes de tejido y se calientan durante una hora a 70°. Luego se procede a quitar la parafina de los cortes realizando tres lavados con la solución Neo-Clear®, 5

min cada lavado. Posterior esto, se lavan las muestras durante 5 min con etanol al 100%, y se procede a la rehidratación de los tejidos. La rehidratación se realiza con dos lavados de 5 min cada uno, con soluciones de etanol al 100%, 95% y 70%. La rehidratación finaliza con un lavado con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Para la inmunohistoquímica es necesario inactivar la peroxidasa endógena de los tejidos, lo cual se realiza incubando las muestras durante 30 min en peróxido de hidrógeno al 3%, preparado en etanol 70%. Luego se procede con el desenmascaramiento del antígeno. Para SNAIL y TWIST, el desenmascaramiento se realiza con la solución amortiguadora Tris-EDTA (Tris Base 10mM, EDTA 1mM, Tween 20 al 0,05%, pH 9,0), y para SLUG y ZEB1, se utiliza Citrato de Sodio. El desenmascaramiento se realiza a 90°, durante 20 min en un horno microondas. Una vez realizado esto, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente antes de continuar con el protocolo. Una vez frías, se procede al bloqueo de epítopes inespecíficos que pudieran interferir con los anticuerpos primarios. El bloqueo se realiza con suero de cabra al 10% (Reactivo A del kit), incubando durante una hora a temperatura ambiente. Luego se drena suavemente la solución bloqueante, y se agrega el anticuerpo primario. Los anticuerpos anti-SNAIL, anti-SLUG y anti-ZEB1 están hechos en conejo, y se diluyen 1:100 en BSA 1% en PBS. En anticuerpo anti-TWIST está hecho en ratón, y se diluye 1:100 en BSA 1% en PBS con Tween-20 0,1%. Las muestras se incuban 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, y luego se dejan toda la noche a 4°, en una cámara húmeda. Al día siguiente, las muestras se retiran del frío y se dejan 30 min a temperatura ambiente antes de continuar. Se lava con PBS tres veces durante 5 min. A continuación, se realiza la incubación con el anticuerpo secundario (Reactivo B) durante una hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo secundario se encuentra biotinilado y reconoce anticuerpos primarios hechos en ratón, conejo, cobaya y

rata. Transcurrido el tiempo, se lava tres veces con PBS, durante 5 min cada lavado. Luego se incuban las muestras con el conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa (Reactivo C) durante 30 min a temperatura ambiente. Se lava tres veces con PBS, 5 min cada lavado. Posterior a esto, se realiza la incubación con el cromógeno AEC (Reactivo D). Para las proteínas SLUG, ZEB1 y TWIST, la incubación con el cromógeno es de 15 min y para SNAIL de 10 min. Luego se lava con agua durante 5 min, y se continúa con la tinción de los núcleos. Las muestras se tiñen con hematoxilina 1:1 diluida en agua, durante 10 s. Inmediatamente se lava con agua, y se ponen los cortes en PBS durante 1 min. Nuevamente se ponen las muestras en agua, durante 5 min. Finalmente se fija la hematoxilina con un lavado de 5 min con agua corriente. Para terminar, se agrega medio de montaje sobre los tejidos, y se pone el cubre-objetos. El medio se deja secar, y se sellan los bordes del cubre objeto con esmalte de uñas. Las muestras son observadas al microscopio, y la expresión de cada factor de transcripción se cuantifica para cada tumor utilizando el puntaje H (H-score), el cual considera el porcentaje de células con tinción, y la intensidad de la marca. La fórmula para calcular el H-score es $[(3 \times \text{el \% de células con tinción fuerte}) + (2 \times \text{el \% de células con tinción moderada}) + (\text{el \% de células con tinción débil})]$.

5.3. Inmunohistoquímica para CCR7 en tumores de cáncer de mama.

La inmunohistoquímica se realiza de la manera descrita en el punto 5.2, utilizando el kit VECTASTAIN® Elite® ABC HRP, con algunas modificaciones. Los lavados se realizan con PBS, Tween-20 al 0,1%. El desenmascaramiento del antígeno se realiza utilizando una solución amortiguadora de Citrato de Sodio, tal como fue descrito anteriormente. El bloqueo para epítopes inespecíficos se realiza utilizando el Suero Bloqueante incluido en el kit, durante 1 hora

en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de drenar suavemente la solución bloqueante, las muestras se incuban con el anticuerpo primario. El anticuerpo anti-CCR7 está hecho en conejo, y se diluye 1:1000 en BSA 1% en PBS, Tween-20 0,1%. La incubación con el cromógeno AEC se realiza durante 3 min. Luego se enjuaga con agua destilada durante 5 min, y se continúa con la tinción de los núcleos y el montaje de las muestras, tal como se describió en el punto anterior. Las muestras son observadas al microscopio, y la expresión de CCR7 en membrana se cuantifica para cada tumor utilizando el puntaje H. La media de expresión de CCR7 en los tumores fue un puntaje H de 155, la cual se consideró como puntaje de corte para definir una expresión alta de CCR7 (puntaje H >155) y una expresión baja de CCR7 (puntaje H <155).

5.4. Selección de microRNAs para su evaluación experimental.

5.4.1. Identificación de microRNAs diferencialmente expresados en muestras de cáncer de mama utilizando datos de microarreglos de expresión de microRNAs

Para la identificación de microRNAs que estén diferencialmente expresados en tumores de mama, se utilizaron datos de microarreglos de expresión de microRNAs realizados previamente en el laboratorio (Tesis de doctorado Dra. Valentina Zavala). Estos datos corresponden al perfil de expresión de 886 microRNAs realizado en 50 tumores de cáncer de mama, una muestra de tejido de mama normal, y de un pool comercial de RNA extraído de tejido mamario.

Para identificar microRNAs diferencialmente expresados en los tumores según la expresión de los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST, se utilizó el paquete RankProd de la plataforma R (Hong y cols, 2006). En este análisis, se consideran valores de p y predicciones de falsos positivos (pfp) $\leq 0,05$ para la selección de microRNAs. RankProd es un método no

paramétrico que consiste en la identificación de microRNAs que se encuentran ordenados de manera consistente de acuerdo a sus niveles de expresión, en un determinado número de experimentos. Debido a que utiliza el criterio de veces de cambio (Fold Change, FC), es más intuitivo biológicamente que las pruebas de t utilizados comúnmente en los análisis de microarreglos de expresión. RankProd entrega dos listas a partir de cada análisis: una indica cuales microRNAs se encuentran aumentados y otra cuales se encuentran disminuidos con respecto a las muestras de referencia. Se identificaron los microRNAs que se encuentran disminuidos en aquellos tumores que presentan expresión de los factores de transcripción, utilizando como referencia aquellos tumores que no presentan expresión de estas proteínas, para buscar los microRNAs candidatos a evaluar experimentalmente. Se encontraron en promedio 54 microRNAs disminuidos en tumores con expresión de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST. Se realizó el mismo análisis para identificar los microRNAs que se encuentran disminuidos en tumores con metástasis a linfonodo, y para identificar los microRNAs disminuidos en tumores con expresión alta de CCR7. Los resultados de estos análisis se encuentran disponible en la tabla 1 y tabla 2.

Tabla 1. microRNAs disminuidos en tumores con metástasis a linfonodo.

FC: fold change, veces de cambio (tumores sin metástasis/tumores con metástasis). Los valores se encuentran representados como Log₂. pfp: positive false prediction.

microRNAs disminuidos en tumores con metástasis a linfonodo			
microRNA	FC:(class1/class2)	pfp	P.value
hsa-miR-1260	15,053	0	0
hsa-miR-1280	13,661	0	0
hsa-miR-30a	12,131	0	0
hsa-miR-1274a	14,104	0	0
hsa-miR-29c	13,051	0	0
hsa-miR-10a	13,541	0	0
hsa-miR-342-3p	11,981	0	0
hsa-miR-375	12,840	0.0012	0
hsa-miR-29b	12,861	0.001	0
hsa-miR-141	12,600	9,00E-04	0
hsa-miR-148a	12,370	8,00E-04	0
hsa-miR-200c	12,536	7,00E-04	0
hsa-miR-96	12,043	0.0013	0
hsa-miR-425	12,539	0.0012	0
hsa-miR-196a	11,700	0.0012	0
hsa-miR-30a*	12,201	0.0021	0
hsa-miR-193b	11,893	0.002	0
hsa-miR-1274b	12,105	0.0019	0
hsa-miR-15a	11,704	0.004	1,00E-04
hsa-miR-200b	11,472	0.0038	1,00E-04
hsa-miR-200a	11,315	0.0041	1,00E-04
hsa-miR-429	11,333	0.0046	1,00E-04
hsa-miR-142-5p	10,798	0.0048	2,00E-04
hsa-miR-720	12,461	0.0071	2,00E-04
hsa-miR-30b	11,162	0.0081	3,00E-04
hsa-miR-365	11,432	0.0085	3,00E-04
hsa-miR-103	11,484	0.0082	3,00E-04
hsa-miR-30c	11,748	0.0086	3,00E-04
hsa-miR-107	11,430	0.0092	4,00E-04
hsa-miR-197	10,377	0.0211	9,00E-04
hsa-miR-193a-3p	10,620	0.0211	9,00E-04
hsa-miR-548f	10,203	0.0226	0.001
hsa-miR-1973	10,693	0.0253	0.0011
hsa-miR-16	11,198	0.039	0.0019

Tabla 2. microRNAs disminuidos en tumores con expresión alta de CCR7.

FC: fold change, veces de cambio (tumores sin metástasis/tumores con metástasis). Los valores se encuentran representados como Log₂. pfp: positive false prediction.

microRNAs disminuidos en tumores con alta expresión de CCR7			
microRNA	FC:(class1/class2)	pfp	P.value
hsa-miR-494	1.5186	0	0
hsa-miR-30a	1.2863	0	0
hsa-miR-1308_v15.0	1.1477	0	0
hsa-miR-200c	1.2643	0	0
hsa-miR-29c	1.1399	0	0
hsa-miR-342-3p	1.0709	0	0
hsa-miR-142-3p	1.1401	0	0
hsa-miR-1826	1.3002	0	0
hsa-miR-1979	1.2726	0.0011	0
hsa-miR-1181	1.2879	0.003	0
hsa-miR-30a*	1.2362	0.0027	0
hsa-miR-200b	1.1646	0.0033	0
hsa-miR-1260	1.1351	0.0038	1.00E-04
hsa-miR-30c	1.2244	0.0071	1.00E-04
hsa-miR-1975	1.26	0.008	1.00E-04
hsa-miR-200a	1.0798	0.0075	1.00E-04
hsa-miR-1274a	1.0787	0.0088	2.00E-04
hsa-miR-10a	1.0751	0.0089	2.00E-04
hsa-miR-155	1.2156	0.0147	3.00E-04
hsa-let-7b	1.0607	0.025	6.00E-04
hsa-miR-20a	1.1251	0.0291	7.00E-04
hsa-miR-141	1.0541	0.0309	8.00E-04
hsa-miR-103	1.1368	0.0304	9.00E-04
hsa-miR-1973	1.1535	0.0365	0.0011
hsa-miR-15b	1.1702	0.0364	0.0012
hsa-let-7a	1.0908	0.0462	0.0015
hsa-miR-16	1.1393	0.0503	0.0018
hsa-miR-30b	1.0738	0.0488	0.0018
hsa-miR-142-5p	1.0435	0.0497	0.0019

5.4.2. Análisis *in silico* y selección de microRNAs a evaluar experimentalmente.

La predicción de los blancos para los microRNAs identificados en el punto anterior se realiza utilizando dos plataformas de predicción *in silico*: TargetScan (Agarwal y cols, 2015) y RNA22 (Miranda y cols, 2006). Este análisis indicó que existen 9 microRNAs predichos para regular a SNAIL, 12 microRNAs predichos para regular a SLUG, 11 microRNAs predichos para regular a ZEB1 y 13 microRNAs predichos para regular a TWIST1 (tabla 3). Una vez identificados los microRNAs predichos como reguladores de la expresión de los EMT-TF, fueron seleccionados uno a uno aquellos microRNAs que cumplieran con los siguientes requisitos: 1) presentar expresión diferencial respecto al tejido de mama normal (según los resultados de esta tesis), 2) se encuentren descritos en la literatura como represores de la metástasis pero no aún como reguladores de SNAIL, SLUG, ZEB1 o TWIST, y 3) que la interacción miRNA:mRNA sea termodinámicamente estable ($\Delta G < 0$). Además, se privilegiaron aquellos microRNAs que, según los análisis *in silico*, estén predichos como regulador de más de un factor de transcripción. De esta manera se seleccionaron para su validación experimental dos microRNAs para cada factor de transcripción (tabla 4). Además, seleccionamos un microRNA ya validado en la literatura para utilizar como control positivo. En el caso de SNAIL y SLUG, se eligió como control positivo el microRNA miR-30a-5p, el cual está descrito como regulador de la expresión de estos dos factores de transcripción en líneas celulares de cáncer de mama (Chang y cols, 2016; Xiao y cols, 2019), y que se encuentra disminuido en nuestro grupo de tumores. Para ZEB1 y TWIST, se eligió como control positivo el microRNA miR-1271-5p, el cual se encuentra descrito como regulador de la expresión de estos dos factores de transcripción en cáncer pancreático (Liu y cols, 2019). La figura 1 representa un diagrama de flujo de la estrategia utilizada para la selección de microRNAs.

Tabla 3. MicroRNAs diferencialmente expresados en tumores de cáncer de mama, y predichos como reguladores de los factores de transcripción que inducen la transición epitelio-mesénquima.

microRNAs predichos para regular SNAIL	microRNAs predichos para regular SLUG	microRNAs predichos para regular ZEB1	microRNAs predichos para regular TWIST
miR-22	miR-200c	miR-142-3p	miR-142-3p
miR-30a	miR-142-3p	miR-22	miR-324-3p
miR-21	miR130a-3p	miR-29b	miR-1202
miR-27a	miR-27a	miR-141	miR-210
miR-205-3p	miR-30a	miR-96	miR-328
miR-196a	miR-331	miR-324-3p	miR-1258
miR-30c	miR-1260	miR-144	miR-96
miR-210	miR-491	miR-196a	miR-34b
miR-1202	miR-210	miR-27a	miR-595
	miR-663	miR-205-5p	miR-202
	miR-125b	miR-150	miR-2278
	miR-1250		miR-199b-5p
			miR-224

Tabla 4. Sitios de unión para cada microRNA en su blanco predicho *in silico*.

microRNA	Blanco	Posición del sitio de unión (nt)	Energía de interacción (-Kcal/mol)	Interacción predicha mRNA:miRNA (RNA22)
miR-196a-5p	SNAIL	963	-14.3	CTCACTGCCATGGAATTCCTC : : : GGGTTGTTGTACTTTGATGGAT
		1041	-12.0	TCTGGTTCTGTGTCTCTGCCTG : : : : GGGTTGTTGTAC-TTTGATGGAT
		1298	-16.2	CCCTCCACGAGGTGTGACTAACTA : : : GGG--TTGTTGTACTTTGATGGAT
	ZEB1	6035	-12.12	CTCA-CA-TTCCTCACTGCCTA : GGGTTGTTGTACTTTGATGGAT
miR-202-3p	TWIST1	1202	-14.9	GCACCAT-CCTCACACCTCT AAGGGTACGGGATATGGAGA
miR-210-3p	SNAIL	1000	-13.4	CTGGCCAC-ATCAGCCCCACAG : AGTCGGCGACAGTGTGCGTGTC
		1343	-13.7	GCAGCCCCAG-GGCCTGCGGAG : : : AGTCGGCGACAGTGTGCGTGTC
	SLUG	1093	-13.0	ATAGACACACACATATGCACAC : AGTC--GGCGACAGTGTGCGTGTC
		1105	-13.5	ACATATGCACACACACACACAC : AGTCGGCGACAGTGTGCGTGTC
		1137	-14.9	AGAGAGAGCTG-CAAGAGCATGG : AGTC-GGCGACAGTGTGCGTGTC
miR-22-3p	ZEB1	5840	-12.3	AAACCTCTTCA-CAGGTTGCTC : TGTCAGAAGTTGACCGTCGAA
miR-331-3p	SLUG	1612	-15.0	TAACAGTATGTGCCTTGGGGG : : AAGATCCTATCCGGGTCCCCG
miR-34b-3p	TWIST1	1167	-16.6	CAGGCCCCGTGGA--CAGTGATTC TACCG-TCACCTCAATCACTAAC

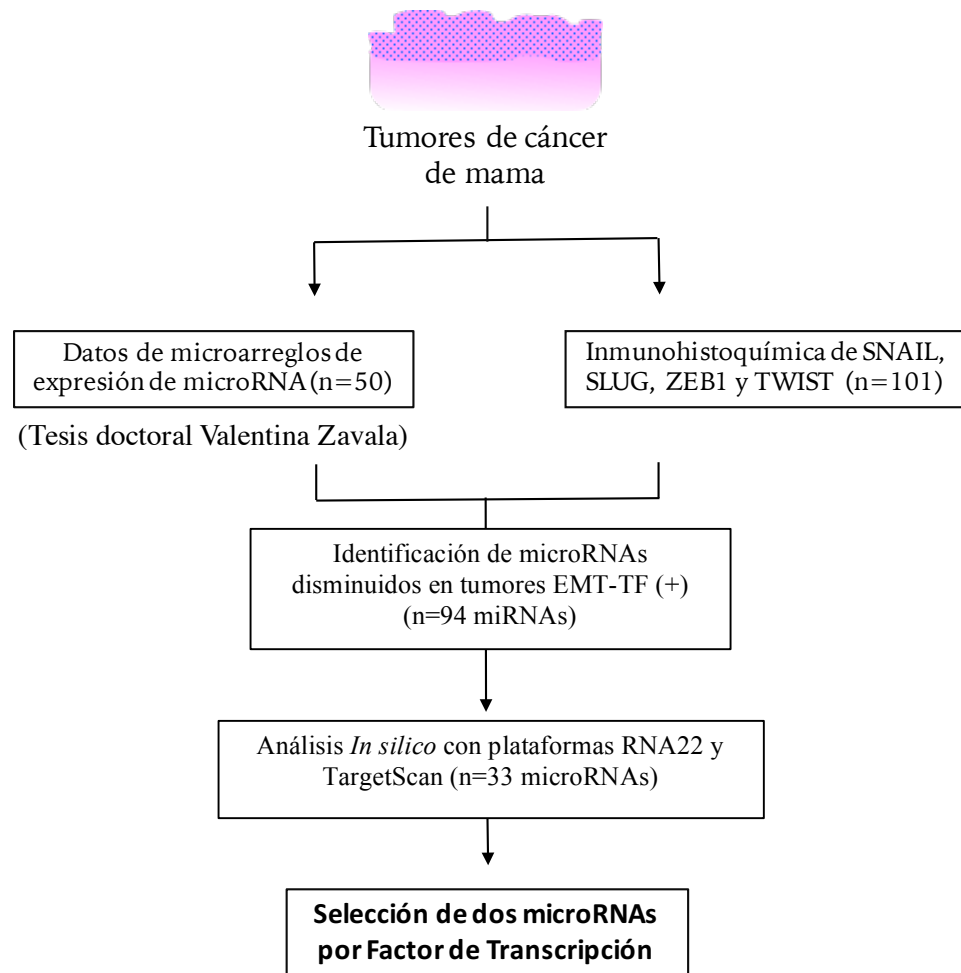


Figura 1. Diagrama de flujo de la estrategia utilizada para la selección de microRNAs a validar de manera experimental.

5.5. Clonamiento de la región 3'UTR de SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 en el vector pMIR-REPORT™ luciferasa.

5.5.1. Clonamiento de la región 3'UTR de SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 en el vector pGEM®-T.

A partir de DNA genómico de una persona sana, se amplifica mediante PCR la región 3'UTR de los genes SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 utilizando partidores específicos que cuentan con sitios de corte para las enzimas de restricción PmeI y MluI (tabla 5). La especificidad de los partidores se confirma utilizando la herramienta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Una vez amplificados los fragmentos, se toma una alícuota del producto de PCR y se diluye 1:10 en agua destilada. De esta dilución se toman 50 ng de producto de PCR para ser ligados al vector de clonamiento pGEM®-T, según las recomendaciones del proveedor. La reacción de ligación se realiza durante toda la noche a 4°.

Con el inserto ligado al vector pGEM®-T se transforman bacterias competentes *Escherichia coli* TOP10. Para esto, se toman 50 µl de bacterias competentes y se mezclan con 25 ng del vector a clonar en un tubo de 1,5 ml. La mezcla se incuba durante 30 min en hielo. Luego se aplica un shock térmico a las bacterias, incubándolas a 37° durante 20 s, e inmediatamente se ponen en hielo durante 2 min. A continuación, se le agrega al tubo con bacterias 900 µl de medio de cultivo Lysogeny Broth (LB) previamente entibiado. Se incuban las bacterias a 37° durante 1 h en un baño termoregulado. Transcurrido este tiempo, se centrifuga el tubo a 900×g durante 2 min a temperatura ambiente. Se retiran 500 µl de medio LB del tubo, y con el volumen restante se resuspende el sedimento de bacterias. De esta suspensión de bacterias se siembran 100 µl en una placa de Petri que contiene medio LB-agar, ampicilina 100 µg/ml, X-Gal 80 µg/ml e IPTG

Tabla 5. Partidores utilizados para la amplificación de la región 3'UTR de los genes SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST y CCR7 a partir de DNA genómico.

Partidor	Secuencia
Snail3'UTR-F	TATACGCGTTCAGGATGTCCCCGCTGAC
Snail3'UTR-R	TATGTTTAAACACTGTACATATAACTATACAAAACGTTTCCT
Slug3'UTR-F	TATACGCGTCTGAGTGACGCAATCAATGTT
Slug3'UTR-R	TATGTTTAAACTTCTTTGTACAGTGTTTGGTA
Twist1-3'UTR-F	TATACGCGTGGGCCGAGACCTAGATGT
Twist1-3'UTR-R	TATGTTTAAACTGAATGCATTTAGACACCGGAT
ZEB 3'UTR-F Sh 2	TATACGCGTATAAACAGTGTTGGGAACAATG
ZEB 3'UTR-R Sh	TATGTTTAAACCCCTGTTAGGCAGTGAGGAA
CCR7 3UTR-F	TATACGCGTCGACTCTTCTGCCTGGACT
CCR7 3UTR-R	TATGTTTAAACGTGTGGGTAAAATGTTGCTCT

0,5 mM. La placa se incuba a 37° en una estufa durante 14 h. Una vez transcurrido este tiempo, se observa el crecimiento de colonias blancas y azules de bacterias en la placa. Luego se procede a la extracción de DNA plasmidial a partir de las colonias blancas.

5.5.2. Confirmación del inserto en el vector pGEM®-T y extracción de DNA plasmidial de bacterias Escherichia coli TOP10 mediante “Mini-Prep”.

Para confirmar la presencia del inserto en las bacterias transformadas con el vector pGEM®-T (Métodos 5.5.1), se seleccionan 5 colonias de color blanco, y se pican para realizar un PCR. La reacción de PCR se realiza utilizando los mismos partidores con los que fueron amplificadas las regiones 3'UTR a partir de DNA genómico. De aquellas colonias que presenten amplificación para el inserto, se selecciona una para realizar la extracción de DNA plasmidial.

Para la extracción de DNA plasmidial, se pica la colonia seleccionada y se dispone en un tubo de 15 ml con 3 ml de medio de cultivo LB y ampicilina (100 µg/ml). Se deja crecer durante 14 h en un baño termoregulado y con agitación. Luego de la incubación se toman los 3 ml de bacterias crecidas y se reparten en dos tubos de 1,5 ml. Ambos tubos se centrifugan durante 30 s a 13.000xg. Se junta el sedimento de ambos tubos, y se resuspende en 600 µl de agua. La extracción de DNA plasmidial se realiza utilizando el kit Zyppy® Plasmid Miniprep, según las recomendaciones del proveedor. El DNA extraído se cuantifica y se almacena a -20°.

5.5.3. Obtención y purificación del inserto desde el vector pGEM®-T.

Se toma 1 µg del vector pGEM®-T con inserto purificado (Métodos 5.5.2) y se digiere con la enzima de restricción PmeI. La reacción de digestión se realiza a 37° durante 4 h en un baño termoregulado, en un volumen final de reacción de 25 µl. Transcurridas las 4 h, se toman los 25

μl del producto de digestión y se digieren con la enzima MluI durante 16 h a 37° en un baño termoregulado, en un volumen final de reacción de 50 μl. Una vez digerida la muestra con ambas enzimas, se separa el producto de digestión en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, preparado en solución amortiguadora de TBE (Tris Base 89mM, Ácido Bórico 89mM, EDTA 2mM), de todo el volumen del producto de digestión.

Para la purificación del DNA correspondiente al inserto desde el gel de agarosa, se utiliza el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System. Cuidadosamente se corta la banda utilizando un bisturí y se pone en un tubo de 1,5 ml. La purificación es realizada según las recomendaciones del proveedor. De esta manera se obtiene el inserto con los extremos cortados por las enzimas de restricción, y se puede insertar en un vector cortado con las mismas enzimas. El DNA obtenido se cuantifica y se almacena a -20°.

5.5.4. Clonamiento de la región 3'UTR de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST en el vector pMIR-REPORT™ luciferasa.

Los insertos purificados y digeridos con las enzimas de restricción PmeI y MluI (Métodos 5.5.3) se insertan direccionalmente en el vector de expresión pMIR-REPORT™ luciferasa. Este vector cuenta con un sitio de clonamiento múltiple en la región 3' del gen de la luciferasa y presenta sitios de corte para las enzimas MluI y PmeI (figura 2). Para realizar esto, se toman 100 ng del vector pMIR-REPORT™ luciferasa previamente digerido con las enzimas de restricción PmeI y MluI, y desfosforilado con fosfatasa alcalina, y se agrega el inserto en un exceso molar de 5 veces en relación al vector. La reacción de ligación se realiza utilizando la enzima T4 DNA Ligasa durante toda la noche a 4°. Con el vector pMIR-REPORT™ luciferasa ligado al inserto

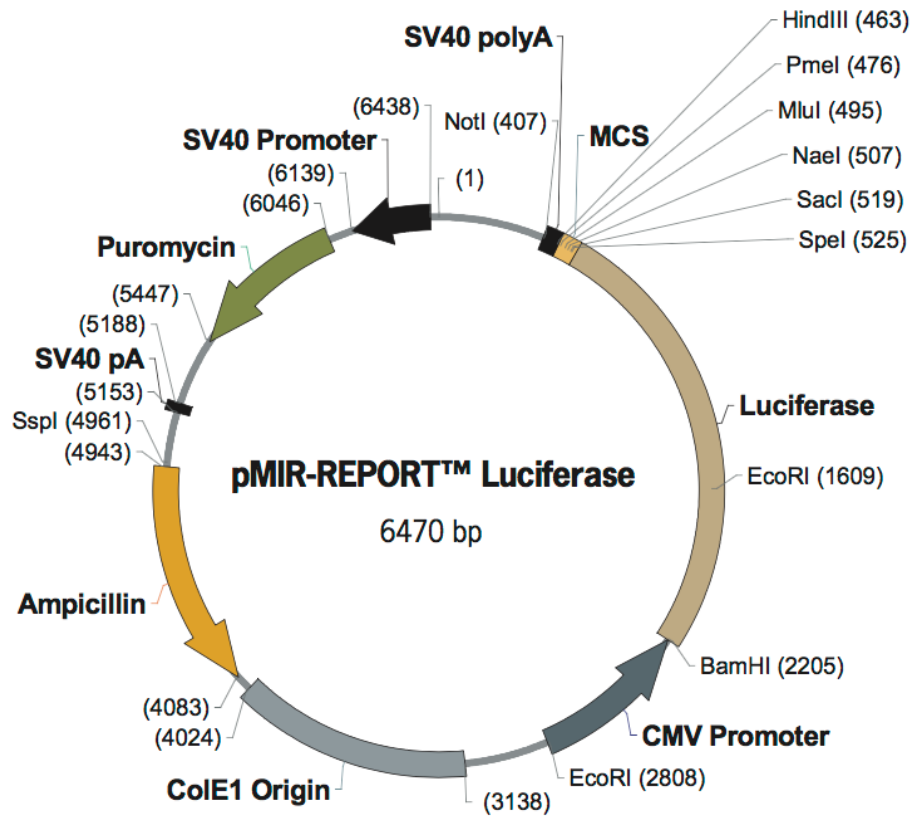


Figura 2. Mapa físico del vector de expresión pMIR-REPORT™ luciferasa. El vector cuenta con un sitio de clonamiento múltiple en el extremo 3' del gen de la luciferasa, donde se ligan los insertos a estudiar.

se transforman bacterias competentes *Escherichia coli* DH5 α , de la misma forma que la descrita en Métodos 5.5.1. Las bacterias competentes transformadas se siembran en una placa Petri con medio de cultivo LB-agar con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, y se incuban durante 14 h en una estufa a 37°. Finalizado este tiempo, se procede a la confirmación del inserto mediante PCR en las colonias de bacterias crecidas y a la extracción de DNA plasmidial de una colonia seleccionada, tal como se describió en Métodos 5.5.2.

Una vez purificado el DNA plasmidial a partir de las bacterias transformadas, se confirma la integridad de la secuencia del inserto, en el vector pMIR-REPORT™ luciferasa, mediante secuenciación Sanger. La reacción de secuenciación se realiza utilizando un partidador que reconoce una región río abajo del sitio de clonamiento múltiple del vector (Partidor 1, figura 3), y que corrobora la correcta posición del inserto en el vector.

5.6. Validación experimental de los microRNAs seleccionados.

5.6.1. Ensayo de gen reportero luciferasa en células HEK293T.

Se siembran células HEK293T en una placa de 24 pocillos, utilizando 1×10^5 células por cada pocillo. Una vez alcanzada una confluencia cercana al 80%, las células se transfectan con el vector reportero luciferasa.

Para la transfección se utiliza por pocillo 1 μl de Lipofectamina RNAiMAX, 100 ng del vector pMIR-REPORT luciferasa ligado a la región 3'UTR a evaluar y 100 ng del vector pMIR-REPORT β -Galactosidasa. Cada uno de los microRNAs a evaluar se transfecta en dos concentraciones, 10nM y 50nM. También se utiliza un microRNA control negativo. Cada transfección se realiza por duplicado.

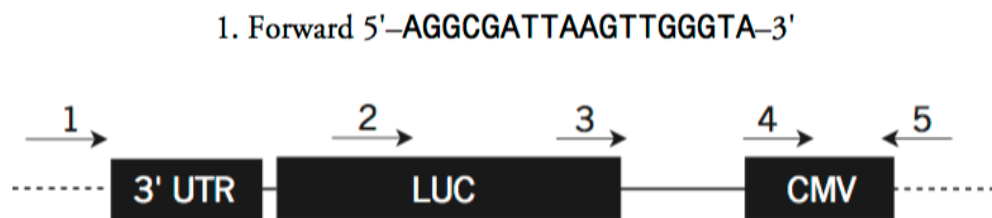


Figura 3. Secuencia y posición del Partidor 1. El Partidor 1 se utiliza para la secuenciación del vector pMIR-REPORT™ luciferasa y confirmar la correcta posición del inserto.

Antes de realizar la transfección, se retira el medio de cultivo de las células, y se reemplaza por medio Opti-MEM®, recomendado para realizar transfecciones. Luego, en un tubo de 1,5 ml se mezclan ambos vectores, el mimic del microRNA a evaluar, y medio Opti-MEM®. De manera paralela, en otro tubo de 1,5 ml se mezcla la Lipofectamina con medio Opti-MEM®. Luego se juntan ambos tubos y la mezcla se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se agrega cuidadosamente este volumen final a las células. Las células son incubadas en la estufa a 37° y en presencia de CO₂ al 5%, y luego de 48 h se lisan para medir la actividad de las enzimas luciferasa y β -Galactosidasa.

Para lisar las células se utilizan 150 μ l de la solución Reporter Lysis Buffer, el cual se agrega directamente a la placa luego de retirar el medio de cultivo y lavar las células con solución amortiguadora PBS. Las células con la solución de lisis se incuban durante 15 min a temperatura ambiente, moviendo la placa de vez en cuando. Finalizado este tiempo, se toma el lisado celular, se transfiere a un tubo de 1,5 ml, y se mantiene en hielo hasta terminar con todos los pocillos de la placa. Luego los tubos se centrifugan a 13.000xg durante 2 min a 4°. Finalmente se toma el sobrenadante y se transfiere a un tubo de 0,6 ml. Con este sobrenadante se realiza la medición de la actividad enzimática.

La medición de la actividad luciferasa se realiza utilizando el kit Luciferase Assay System. Para esto, se distribuyen alícuotas de 20 μ l de reactivo LARII en tubos de 1,5 ml y se mezclan con 4 μ l de lisado celular. La emisión de luz se mide inmediatamente utilizando un luminómetro.

La medición de la actividad de la enzima β -Galactosidasa se realiza en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se ponen 50 μ l del lisado celular, y se mezclan con 50 μ l de la solución “Assay 2X Buffer” (solución amortiguadora de fosfato de sodio 200mM pH 7,3, MgCl₂ 2mM, β -

mercaptoetanol 100mM, ONPG 1,33 mg/ml). Esta mezcla se incuba a 37° durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se detiene la reacción agregando a cada pocillo 150 µl de carbonato de sodio 1M. Inmediatamente se mide la absorbancia de las muestras a 420nm en un espectrofotómetro. El valor de la actividad β -Galactosidasa se utiliza para normalizar la actividad luciferasa de cada muestra. Cada experimento se realiza tres veces, y por duplicado.

5.6.2. Determinación de la eficiencia de transfección de las células MDA-MB-231

Para determinar la eficiencia de transfección de la línea celular MDA-MB-231, se siembran las células en cubreobjetos y se transfectan con un siRNA control marcado con Cy3. La transfección se realiza utilizando Lipofectamina RNAiMAX, y con una concentración de siRNA de 50 nM. Luego de la transfección, las células son incubadas en una estufa durante 24 h a 37°, en presencia de CO₂ al 5%. Una vez transcurrido el tiempo se retira el medio de cultivo y las células se lavan tres veces con PBS. Se realiza la fijación de las células utilizando paraformaldehído al 4% en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados con PBS, durante 5 min cada uno. Una vez fijadas las células se tiñen los núcleos incubando las células con Hoechst 1:10.000, durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las células se lavan tres veces con PBS, durante 5 min cada lavado. Luego se realiza un lavado con agua durante 5 min, y se procede al montaje de los cubreobjetos utilizando medio de montaje para fluorescencia. Una vez seco el medio de montaje las muestras se observan al microscopio de epifluorescencia y se toman tres fotos de cada cubre-objeto. Utilizando el software ImageJ se cuentan los núcleos y el número de células positivas para Cy3. Utilizando estos datos se calcula el porcentaje de células transfectadas con el siRNA (figura 4).

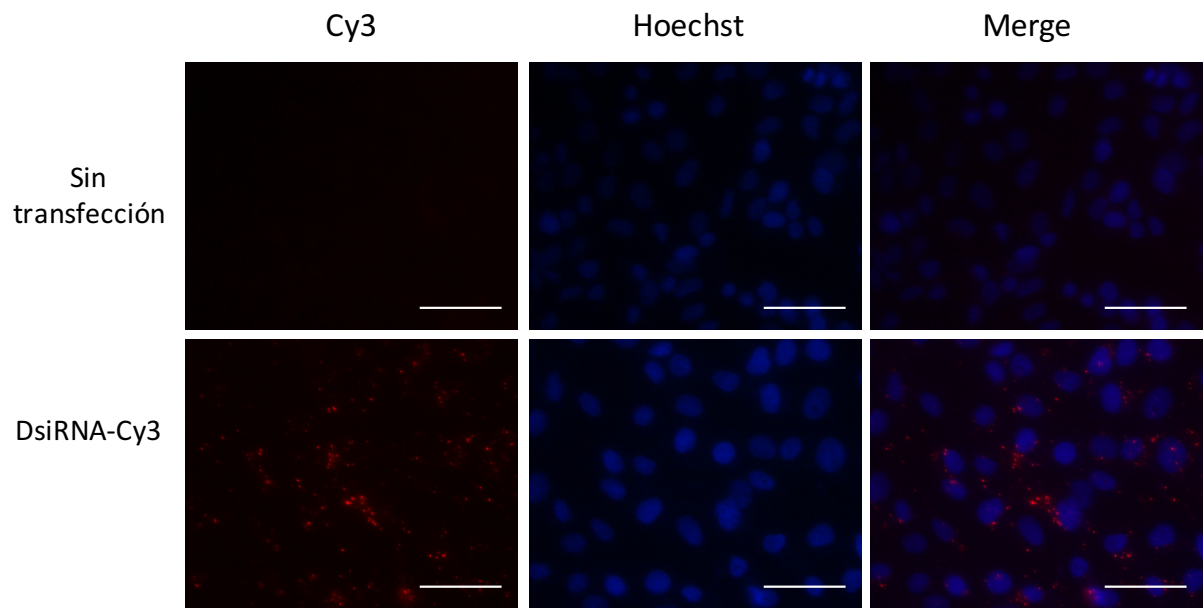
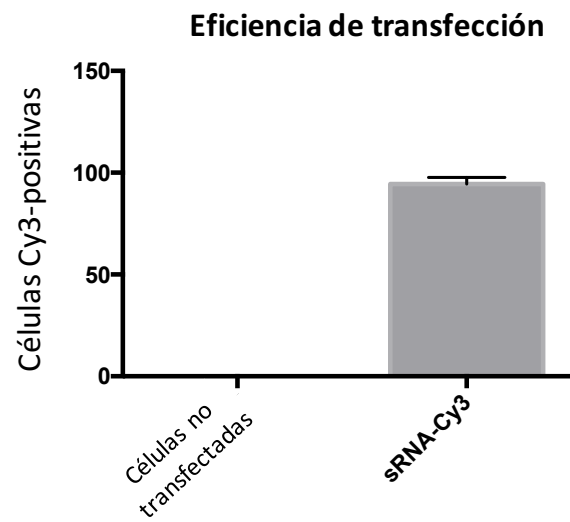
A.**B.**

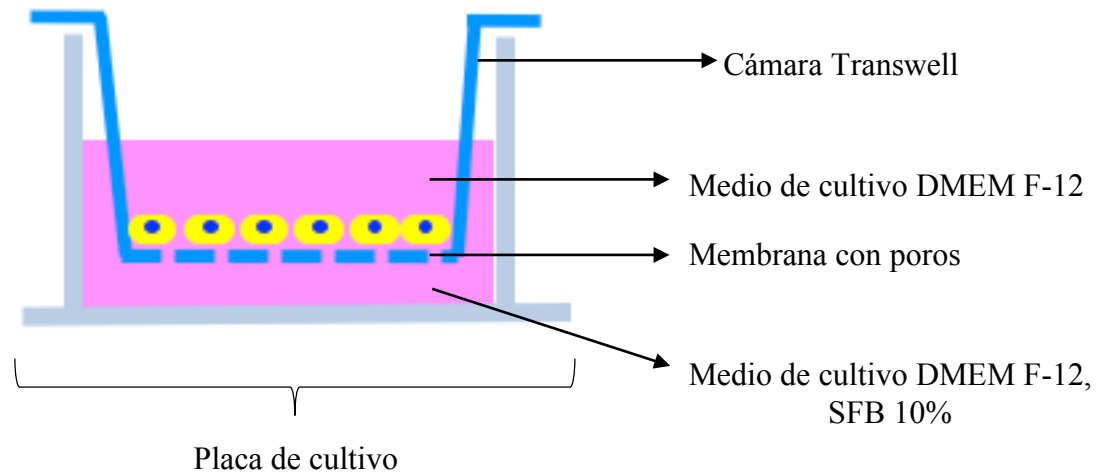
Figura 4. Eficiencia de transfección de la línea celular MDA-MB-231. A) Imágenes representativas de las células MDA-MB-231 transfectadas con un siRNA marcado con Cy3 (DsiRNA-Cy3, color rojo), o sin transfectar. B) Cuantificación de las células que presentan fluorescencia roja. En todos los casos, cerca del 95% de los núcleos presentan marca roja asociada, indicando una alta eficiencia de transfección con RNAs pequeños. Barra de escala: 50µm.

5.6.3. Ensayos de migración e invasión en células MDA-MB-231.

Para los ensayos de migración e invasión, se siembran células MDA-MB-231 en placas de 24 pocillos, con 1×10^5 células en cada pocillo. Una vez que las células alcanzan una confluencia cercana a un 80%, se transfectan con cada mimic de microRNA y un mimic control negativo, a una concentración de 50nM, utilizando Lipofectamina RNAiMAX tal como se describió en la sección 5.6.1. Luego de la transfección, las células son incubadas durante 24 h a 37°, en presencia de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo, las células se sueltan de la placa de cultivo utilizando tripsina (tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM, preparada en PBS), se centrifugan y se resuspenden en medio DMEM F-12 para luego contarlas. Para realizar los ensayos, se toman 3×10^4 células transfectadas y resuspendidas en medio de cultivo sin suero, y se siembran cámaras “Transwell”, las cuales poseen una membrana con poros de 8 µm por donde migran las células (figura 5). Estas cámaras se posicionan dentro de cada pocillo de la placa de cultivo celular. En la parte inferior del pocillo se ponen 400 µl de medio DMEM F-12 suplementado con Suero Fetal Bovino al 10%, el cual funciona como quimioattractante. Los ensayos de invasión celular se realizan de la misma manera, pero recubriendo la membrana de las cámaras Transwell con 30 ng de Matrigel.

Las células se dejan migrar o invadir durante 48 h, incubando las placas en una estufa a 37°, en presencia de CO₂ al 5%. Una vez finalizado este tiempo, se procede a la tinción y conteo de las células que lograron migrar e invadir. Para la tinción de las células, se lavan primero con PBS, y se retiran con un hisopo estéril todas las células que no migran y que quedan adheridas en la parte interior de la cámara Transwell. Luego se fijan las células con metanol absoluto frío durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez fijadas, se tiñen las células con cristal violeta durante 20 min, y se lavan con agua. Luego de esperar a que se sequen las cámaras Transwell,

A.



B.

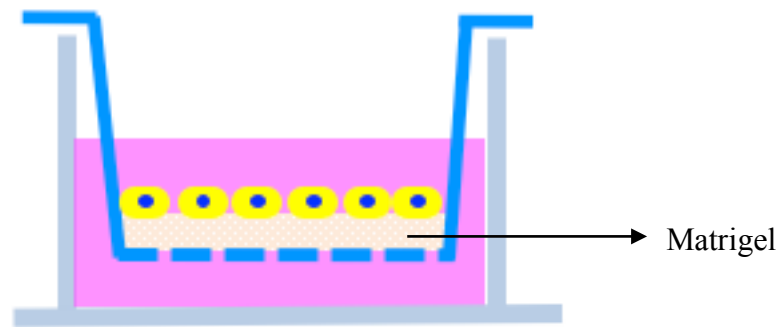


Figura 5. Esquema de las cámaras Transwell utilizadas en los ensayos de migración e invasión celular. Para los ensayos de migración (A) e invasión (B) se utilizan cámaras Transwell que se insertan dentro de las placas de cultivo. Para los ensayos de invasión, el Matrigel se pone sobre la membrana con poros.

se procede a su observación en el microscopio y fotografía. Cinco secciones son analizadas por cada inserto, y cada ensayo se realiza tres veces.

5.6.4. Ensayo de formación de colonias en células MDA-MB-231.

Para determinar el efecto de los microRNAs seleccionados en la capacidad de formar colonias de la línea celular MDA-MB-231, se siembran las células en una placa de 24 pocillos, con 5×10^4 células por pocillo. Una vez alcanzada una confluencia cercana al 80%, las células se transfectan con 50 nM de microRNAs, y se incuban en una estufa durante 24 h a 37°, en presencia de CO₂ al 5%. Luego de transcurrido el tiempo, las células son tratadas con tripsina y resuspendidas en medio DMEM-F12. Se realiza el conteo de las células, y se toman 2×10^3 células transfectadas para sembrar en placas de cultivo de 3,5 cm, con medio DMEM-F12 suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Cada experimento se realiza en duplicado. Las células se dejan crecer durante 10 días en una incubadora a 37° en presencia de CO₂ al 5%, realizando cambios de medio cada 2 días. Una vez transcurrido el tiempo, se lavan las células con PBS y se fijan con metanol frío durante 15 min a temperatura ambiente. El metanol es retirado y las células se tiñen con cristal violeta durante 20 min. Luego se lavan las células con agua para retirar el exceso de colorante, y se dejan secar a temperatura ambiente. Una vez secas, se procede al conteo de colonias bajo el microscopio, contando todas las colonias de la placa que se encuentren formadas por más de 50 células. Cada ensayo es realizado tres veces de manera independiente.

5.6.5. Inmunofluorescencia en células MDA-MB-231.

Para realizar inmunofluorescencia en las células MDA-MB-231, se siembran las células en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio. Una vez alcanzada una confluencia cercana al 80%, se transfectan las células con mimic de microRNAs tal como se describió anteriormente. Realizada la transfección, se incuban las células en una estufa durante 48h a 37°, en presencia de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo se procede con la inmunofluorescencia. Se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS, realizando tres lavados de 5 min cada uno. Luego se fijan las células con paraformaldehído 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavan nuevamente las células realizando tres lavados con PBS de 5 min cada uno, y se permeabilizan con PBS, Tritón X-100 al 0,1%, incubándolas durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavan nuevamente las células con PBS, realizando tres lavados de 5 min cada uno. Luego se procede al bloqueo de uniones inespecíficas, incubando las muestras con suero de cabra 10%, durante 1 h a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Luego del bloqueo, se drena suavemente el exceso de solución bloqueante, y se incuban las muestras con el anticuerpo primario. El anticuerpo anti-Ki67 está hecho en conejo, y se diluye 1:400 en BSA 1% en PBS, el anticuerpo anti-vimentina está hecho en ratón, y se diluye 1:100 en BSA al 1%, preparado en Tris-HCl, y el anticuerpo anti-E-cadherina está hecho en ratón, y se diluye 1:100 en BSA al 1%. Primero se incuban las muestras con el anticuerpo primario 30 min a temperatura ambiente, y luego se dejan toda la noche a 4° en una cámara húmeda. Al día siguiente, se dejan las muestras 30 min a temperatura ambiente, y se realizan 3 lavados con PBS, 5 min cada lavado. Luego de los lavados se incuban las muestras con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios utilizados son Alexa Fluor® 488, hecho en cabra y anti-conejo, diluido

1:400 en BSA al 2,5%, PBS, y Alexa Fluor® 488, hecho en burro y anti-ratón, 1:400 en BSA al 2,5% en PBS. Se lavan las muestras tres veces con PBS, 5 min cada lavado, y se procede a la tinción nuclear. Los núcleos son teñidos incubando las muestras con Hoechst 1:10.000 durante 10 min. Se lavan las muestras tres veces con PBS, y se realiza un lavado con agua durante 5 min. Finalmente se elimina el exceso de agua, y se montan las muestras en un portaobjetos utilizando medio de montaje para fluorescencia. Las muestras se analizan en un microscopio de epifluorescencia, y se almacenan en oscuridad a 4°. Cada experimento se realiza tres veces de manera independiente. Los resultados de la inmunofluorescencia de E-cadherina y vimentina se encuentran en los resultados adicionales, figuras 6 y 7, respectivamente.

5.6.6. Evaluación de los marcadores de EMT y CCR7 en la línea celular MDA-MB-231, mediante western blot.

Se siembran células MDA-MB-231 en placas de 12 pocillos, y al alcanzar una confluencia cercana al 80% se transfectan los microRNAs tal como se describió anteriormente. Para cada factor de transcripción se determina experimentalmente el tiempo óptimo de transfección utilizando los microRNAs seleccionados como control positivo (miR-30a y miR-1271, figura 8, resultados adicionales). Luego de la transfección, se incuban las células a 37° por tiempos variables, y se realiza la extracción de proteínas. Para la extracción de proteínas, se retira el medio de cultivo de las células y se realizan dos lavados con PBS frío. Luego se homogenizan las células utilizando la solución amortiguadora RIPA (Tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 1 µg/ml), junto con el inhibidor de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail. Las células se incuban sobre hielo durante 5 min con

la mezcla. Transcurrido este tiempo, se raspan las células con un raspador plástico, y se colecta el lisado celular en un tubo de 1,5 ml. El lisado celular se centrifuga a 15.000xg durante 10 min a 4°. Luego, se toma una alícuota del lisado celular para determinar la cantidad de proteína extraída mediante el método de Bradford. El resto del sobrenadante se traspara a un tubo limpio de 0,6 ml y se almacenan a -80°.

Para el ensayo de western se usan 50 µg de proteína total para cada ensayo. Las muestras se calientan a 94° durante 5 min, y luego se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente del 6-12%. La electroforesis se realiza durante 30 min a 70V y luego 1:30 h a 120V. Una vez finalizada la electroforesis, se realiza la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF a una corriente constante de 0,4 Amp, durante 3 h, a 4°. Una vez realizada la transferencia se procede a la tinción del gel con azul de Coomassie (azul Coomassie 0,2%, metanol 45%, ácido acético 10%) y de la membrana con rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,1%, en ácido acético al 5%) durante 15 min. Luego de esto, se procede a lavar el gel con solución de desteñido (metanol 25%, ácido acético 10%) para observar las bandas de proteína que no se transfirieron a la membrana. Por otro lado, la membrana se lava con agua destilada para poder observar las bandas de las proteínas transferidas, y se incuba con una solución bloqueante de leche al 5% en T-TBS (Tris 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, Tween-20 al 0,1%,) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido este tiempo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario, durante toda la noche a 4°, con agitación suave. Los anticuerpos primarios utilizados son los siguientes: SNAIL diluido 1:1.000 en leche 2% en T-TBS, SLUG diluido 1:1.000 en leche 2% en T-TBS, ZEB1 diluido 1:500 en BSA 5% en T-TBS, TWIST diluido 1:50 en leche al 2% en T-TBS, CCR7 diluido 1:20.000 en leche al 5% en T-TBS, β-actina diluido 1:1.000 en leche 5% en T-TBS, E-cadherina diluido 1:10.000 en leche 5% en T-TBS.

Al día siguiente se recolecta el anticuerpo utilizado y se lavan las membranas 4 veces con T-TBS durante 15 min cada vez. Luego del lavado se incuban las membranas con el anticuerpo secundario: anti-conejo diluido 1:5.000 en leche al 2% en T-TBS para SNAIL, y SLUG; anti-conejo diluido 1:5.000 en leche 5% en T-TBS para ZEB1, CCR7 y E-cadherina; anti-ratón 1:2.500 en leche 2% en T-TBS para TWIST1; anti-ratón 1:5.000 en leche al 5% en T-TBS para β -actina. La incubación se realiza durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Transcurrido este tiempo se recolecta el anticuerpo secundario utilizado, y se lavan las membranas con T-TBS durante 15 min, 4 veces. Una vez finalizados los lavados se procede al revelado de las membranas utilizando el sustrato SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate.

5.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6. Los datos se encuentran graficados como la media $\pm$ desviación estándar. Para comparar la media entre dos grupos, se utilizó la prueba t de Student. Para la comparación entre más de dos grupos se utilizó ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett de múltiples comparaciones. La prueba exacta de Fisher y chi-cuadrado se utilizaron para analizar tablas de contingencia. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

6. MANUSCRITO

Novel microRNAs downregulated in breast cancer tumors bind the 3'UTR of SNAIL, SLUG, ZEB1 and/or TWIST and decrease metastatic behavior in breast cancer cells

Short running title: MicroRNAs inhibit metastatic behavior of breast cancer cells

Elisa Pérez-Moreno¹, Victoria Ortega-Hernández¹, Valentina A Zavala¹, Viviana Montecinos², Jorge Gamboa³, Wanda Fernández⁴, Pilar Carvallo¹

¹ Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

² Departamento de Hematología y Oncología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

³ Unidad de Patología Mamaria, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile

⁴ Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile

Corresponding author:

Pilar Carvallo PhD.

Departamento de Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Pontificia Universidad Católica de Chile

Casilla 144-D

Santiago, Chile

Tel: 56 2 2 686 2705 (2693)

E-mail: pcarvallo@bio.puc.cl

Conflict of interests: We declare no conflicts of interest.

Word count: 4000 words

Abstract

The repression of metastasis has been a major issue of research in cancer due to the high mortality caused by this state in patients. In this sense lymph node metastasis is a first alarm of the presence of an invading tumor and a poor prognosis. Metastasis is promoted in part by the transcription factors SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST, main actors of the epithelial-mesenchymal transition (EMT), enhancing the metastatic behavior of cancer cells. Several evidences suggest that a process similar to EMT occurs in human tumors, increasing the risk to develop a metastasis. MicroRNAs are gaining relevance in metastasis development because of their ability to regulate large sets of targets, acting as metastasis suppressors or inhibitors. Although there have been advances in identifying targets of microRNAs that participate in distant metastasis, to our knowledge, no targets have been identified for microRNAs involved in lymph node metastasis. Because of this reason, we investigated microRNAs downregulated in tumors expressing EMT transcription factors, selecting miR-30a, miR-2171, miR-196a, miR-202, miR-210, miR-22, miR-331 and miR-34b for experimental validation. Seven of the selected microRNAs acted through the 3'UTR of the EMT transcription factors to decrease luciferase activity, and all proved to decrease cell migration, invasion and/or proliferation. In addition, miR-1271, miR-196a and miR-22 decreased endogenous ZEB1 levels in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231, confirming them as ZEB1 regulators in breast cancer. Also, miR-30a decreased endogenous CCR7 levels, a chemokine receptor involved in targeted migration of cancer cells to the lymph nodes. Our results suggest that the above-described microRNAs contribute to EMT regulation through SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST, and may control the development of lymph node metastasis through the regulation of specific chemokine receptors, like CCR7 inhibiting targeted migration on cancer cells to lymph nodes.

Key words: microRNA, breast cancer, lymph node metastasis.

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the principal causes of death in women, which occurs mainly after a process of metastasis. In breast cancer, lymph nodes near to the primary tumor have a high chance to be colonized by cancer cells to develop metastasis, and its detection determines the treatment to which the patient will be submitted [1,2]. Also, presence of lymph node metastasis is associated to a poor prognostic in breast cancer patients [3,4], converting inhibition of metastasis a major objective in breast cancer treatment.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been studied in several cancer cell lines describing that at the transcriptional level, EMT is mainly promoted by three transcription factor families, being SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST their principal members [5-7]. Studies in cancer cell lines and animal models have demonstrated that these transcription factors enhance the metastatic ability of cancer cells [8-13]. These transcription factors bind to E-cadherin promoter repressing its expression, which is considered a hallmark of EMT.

Several evidences strongly suggest that a process like EMT is occurring also in human cancer tumors [14]. For example, SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST expression have been associated to the presence of lymph node metastasis in patients [15-18]. Also, loss of E-cadherin in breast cancer tumors has been associated to the presence of metastasis in lymph nodes or distant organs [19-20]. In addition, diverse studies have related, with lymph node metastasis, the chemokine receptor CCR7, which expression induces EMT and targets migration of breast cancer cells to lymph nodes [21-22].

MicroRNAs are small non-coding RNAs that are gaining relevance in metastasis development because of their ability to regulate large sets of target genes. Their role as metastasis promoters

or inhibitors has been described in several cancer types, including breast cancer, through the regulation of epithelial-mesenchymal transition [23]. One of the most studied families in EMT is miR-200. These microRNAs play a fundamental role in the epithelial phenotype maintenance, regulating EMT relevant actors like SNAIL and ZEB1[24-25]. Together with miR-200, other microRNAs have been described to participate in metastasis development such as miR-10b, let-7 and miR-21 [26-28]. Although there have been advances in identifying targets of microRNAs that participate in distant metastasis [29], to our knowledge, no targets have been identified for microRNAs involved in lymph node metastasis [30-33]. From the clinical point of view, the identification of microRNAs regulating specific targets, as EMT transcription factors, and therefore modulating some steps of metastasis, is highly relevant to design future therapies to improve prognosis in cancer patients.

Considering the above mentioned, we proposed to identify microRNAs down regulated in breast cancer tumors expressing EMT transcription factors and able to regulate these factors *in vivo*. In addition, to study their involvement in cell migration, invasion and proliferation as relevant steps in metastasis progression. Finally, we aimed to determine the association of those microRNAs with lymph node metastasis through CCR7 regulation.

METHODS

Tissue samples

A total of 101 FFPE unselected breast cancer tumors were collected from patients prior to chemotherapy or radiotherapy, from two hospital centers of Santiago of Chile. All patients signed an informed consent, and this protocol was approved by the Ethics Committee of the “Servicio de Salud Metroplitano Central”. A pathologist previously determined histological type, tumor grade and hormonal receptor status (ER, PR and HER2). The clinicopathological features of the tumor samples are listed in Table I.

Immunohistochemistry and immunofluorescence in breast cancer tissues

Tumor samples disposed in tissue microarrays were used for immunostaining. Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed as previously described [34]. The following primary antibodies were used: SNAIL (1:100, Cell Signaling #3879), SLUG (1:100, Cell Signaling #9585), ZEB1 (1:100, Cell Signaling #3396), TWIST (1:100, Abcam ab50887), CCR7 (1:1000, Abcam ab32527) and E-cadherin (1:500, Abcam ab40772). CCR7 antibody specificity and validation was performed in human tonsil tissue. For the immunohistochemistry, H-score was calculated for each tumor. For immunofluorescence, the percentage of tumoral cells with E-cadherin stain was determined. Only membrane stain was considered as positive stain, reflecting the functional localization of the protein. Tumors with E-cadherin expression in more than 80% of the cells were considered as high E-cadherin, whereas tumors with loss of expression in more than 20% of the tumoral cells were considered

as low/absent E-cadherin.

Selection of microRNAs for experimental validation

Candidate microRNAs were selected from microRNA microarrays previously performed in 50 breast cancer tumors from our cohort (Zavala et al, manuscript in preparation), presenting expression of the four EMT transcription factors. RNA22 and TargetScan were used for *in silico* analysis to identify potential microRNAs as regulators of the EMT transcription factors. To select microRNAs for experimental validation we considered three parameters: 1) its downregulation compared to normal breast, 2) the potential ability to regulate more than one transcription factor, and 3) the stability of the microRNA:mRNA interaction. We selected six microRNAs meeting the three criteria: miR-196a-5p for SNAIL and ZEB1, miR-202-3p and miR-34b for TWIST, miR-210-3p for SNAIL and SLUG, miR-22-3p for ZEB1 and miR-331-3p for SLUG. In addition, two previously validated microRNAs were used as positive controls: miR-30a-5p for SNAIL and SLUG, and miR-1271-5p for ZEB1 and TWIST [35-38].

Cell culture and transfections

Metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 and HEK-293T cells were maintained in DMEM/F12 medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C and 5% CO₂. Transient transfections were carried out with mirVana microRNA mimics (Ambion, ThermoFisher Scientific), using Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions.

Luciferase reporter assay

The 3'UTR region of human SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST and CCR7 mRNAs were amplified

by PCR from control genomic DNA. The amplified 3'UTR regions were inserted in the multiple cloning site of the pMIR-REPORT luciferase vector (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). HEK-293T cells were co-transfected with pMIR-REPORT luciferase plasmid mimics at a final concentration of 10nM or 50nM. Luciferase activity was detected using Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA), and normalized to β -gal activity.

Cell migration and cell invasion assays

For migration assays, 3×10^4 transfected MDA-MB-231 cells were seeded in the top chamber of non-coated membranes (24-well insert; pore size 8 μ m; SPL Life Sciences, San Jose, CA, USA) using serum-free DMEM/F12 medium. Invasion assays were performed equally, using Matrigel coated membranes (BD Bioscience). Medium supplemented with 10% FSB was used as chemoattractant in the lower chamber. After incubation, cells that did not migrate/invade through the membrane were removed using a cotton swab. Cells attached to the lower surface of the membrane were fixed with methanol, and stained with crystal violet. Photos of five random regions were captured, and cells were counted using ImageJ.

Colony formation assay

Two-thousand previously transfected MDA-MB-231 cells were plated and growth in 3.5 cm wells, with complete medium. After 10 days, the cells were carefully washed with PBS 1X, fixed with methanol, and stained with crystal violet. Colonies were observed under the microscope and counted.

Immunofluorescence in MDA-MB-231 cells

MDA-MB-231 cells were plated over glass coverslips, and microRNA transfection was performed as previously mentioned. Cells were washed with PBS 1X, and fixed with 4%

paraformaldehyde. Cells were permeabilized with Triton X-100 0.1% and blocked with 10% goat serum. Incubation with antibodies, nuclei staining and sample mounting was done as in tumors. Coverslips were incubated with antibodies against Ki67 (1:400, Cell signaling #9129), vimentin (1:100, Santa Cruz Biotechnology sc-6260) and E-cadherin (1:100, Santa Cruz Biotechnology sc-8426). Three zones of each coverslip were photographed and considered for the analysis.

Western blot in MDA-MB-231 cells

MDA-MB-231 cells previously transfected with microRNAs were lysed using RIPA lysis buffer supplemented with protease inhibitors. Total cell extracts (50 µg) were separated in 6%-12% gradient polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were incubated with antibodies against SNAIL (Cell Signaling), SLUG (Cell Signaling), ZEB1 (Santa Cruz Biotechnology), TWIST (Abcam), CCR7 (Abcam), β -actin (Santa Cruz), anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) and anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology). Protein detection was assessed using the SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher).

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. Data is presented as the mean $\pm$ standard deviation. Student's t test was used for comparing two groups, and one-way ANOVA and Dunnett test for comparisons between different groups. Fisher's exact test and chi-squared test were used to analyze contingency tables. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Expression of SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST in breast cancer

The expression of the transcription factors SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST has been detected in 53/101 primary breast cancer tumors (Figure 1A). Each transcription factor was detected at least in one tumor, being ZEB1 the most frequently expressed (36/53 tumors, 68%), followed by SNAIL (21/53 tumors, 40%), SLUG (12/53 tumors, 22.6%) and TWIST (11/53 tumors, 20.8%). The possible association between transcription factor expression and different clinopathological features was analyzed (Table 2). Tumor grade showed association with SLUG expression ($p=0.0039$), and tumor size with the presence of TWIST ($p=0.0241$), agreeing with previous reports [16,18].

Loss of E-cadherin expression is considered the principal hallmark of epithelial-mesenchymal transition and it has been associated with metastasis in cancer. We analyzed the expression of E-cadherin in breast cancer tissues by immunofluorescence (Figure 1B) and studied the association with the expression of the four transcription factors. As shown in Table 2, we did not find association between the presence of SNAIL, SLUG, ZEB1 and/or TWIST and loss of E-cadherin, since 43 tumors not expressing E-cadherin revealed the absence of all transcription factors. These results may reflect a transient presence of each transcription factor acting as E-cadherin repressor, in breast cancer tumors. When we looked at tumors that still maintain the expression of one (or more) transcription factors, the great majority, 42/53 (79.2%) presented low/absent E-cadherin expression, which in this case reveals a concordance between these main markers of EMT (Figure 1C). Taking together, our results indicate that the loss of E-cadherin expression is related to the expression of the EMT transcription factors in breast tumors. Also

suggests that the expression of the EMT transcription factors could be transient to induce the persistent molecular changes observed in tumors, explaining the occurrence of tumors with E-cadherin loss, but without expression of SNAIL, SLUG, ZEB1 and/or TWIST.

Selected microRNAs regulate luciferase translation through the 3'UTR of EMT transcription factors

We selected six microRNAs as candidate regulators of EMT transcription factor expression as described in Methods. To validate these candidates, we performed luciferase reporter gene assays. MicroRNAs were co-transfected with pMIR-REPORT constructions in HEK293T cell line and compared to a negative control microRNA (miR-NC). As expected, the two positive control microRNAs selected for this assay (miR-30a and miR-1271) reduced the luciferase activity in presence of their reported targets (Figure 2, first graph in A-D). From the selected microRNAs, miR-196a diminished luciferase activity through both SNAIL and ZEB1 3'UTRs (Figure 2A and C), suggesting that this microRNA may suppress the expression *in vivo* of these two transcription factors. MicroRNA miR-210 decreased luciferase activity through SNAIL 3'UTR, confirming it as a regulator of its expression (Figure 2A). In the case of SLUG 3'UTR, although there is no significance, a 37.5% decrease in luciferase activity was obtained (Figure 2B). MicroRNAs miR-202, miR-22 and miR-331 were also confirmed as inhibitors of TWIST, ZEB1 and SLUG through their 3'UTR, respectively (Figure 2B, C and D). Only miR-34b failed to decrease luciferase activity through its predicted 3'UTR target, discarding it as a direct regulator of TWIST expression (Figure 2D). These results reveal that miR-196a, miR-210, miR-331, miR-22 and miR-202 interact with their predicted 3'UTR targets to downregulate protein

synthesis, suggesting that these microRNAs are good candidates to regulate EMT *in vivo* through the repression of EMT transcription factors.

miR-196a and miR-22 suppress ZEB1 expression in MDA-MB-231 cells

To evaluate if the selected microRNAs can regulate endogenous levels of SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST, we transfected the microRNAs in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. TWIST is absent in MDA-MB-231 under the employed experimental conditions, therefore mir-202 and mir-34b were not evaluated for this transcription factor. Endogenous SNAIL and SLUG levels were not affected by any of the microRNAs shown in the previous experiment to inhibit luciferase reporter through the transcription factor 3'UTR (Figure 3A and B). Contrary to this, endogenous ZEB1 levels decreased with miR-1271, validating this microRNA, previously described as ZEB1 regulator in pancreatic cancer [35], as a regulator in breast cancer. Transfection of miR-196a and miR-22 also decreased ZEB1 level in MDA-MB-231 cells (Figure 3C), revealing miR-196a and miR-22 as novel regulators of ZEB1 expression in breast cancer. Co-transfection of both microRNAs did not have a different effect over ZEB1 level. These results, together with the luciferase reporter assays, strongly suggest that miR-1271, miR-196a and miR-22 are direct regulators of ZEB1 expression in breast cancer.

Selected microRNAs decrease migration and invasion capacity in MDA-MB-231 cell line.

Tumor cells in culture acquire the ability to migrate and invade, during EMT, as a previous step to metastasis [39]. We tested the capacity of the selected microRNAs, to regulate cell migration and invasion, using miR-30a and miR-1271 as controls since they were previously described as inhibitors of these metastatic traits [35,36,38]. Transfection of miR-210, miR-22, miR-331 and

miR-34b decreased migration capacity of MDA-MB-231 cells close to 50% (Figure 4A). MicroRNAs miR-196a and miR-202 also decreased cell migration (30-36%), but this effect is not statistically significant. In addition, all these microRNAs decreased cell invasion, indicating that they can modify the aptness of cancer cells to degrade a matrix to invade (Figure 4B). To our knowledge, these results demonstrate for the first time that miR-202, miR-210, miR-331 and miR-34b-3p are migration and invasion suppressor microRNAs in a breast cancer metastatic cell line.

Selected microRNAs decrease proliferation and colony formation of MDA-MB-231 cell line

MicroRNAs that inhibit key steps in the metastatic cascade may also repress cell proliferation and colony formation [40,41]. We evaluated proliferation status through Ki67 marker and colony formation in transfected cells. MicroRNAs miR-22, miR-30a and miR-1271 decreased the proliferative potential of MDA-MB-231 cells (Figure 5A) and cell colony formation (Figure 5B) as described previously [42,43]. The effects of miR-196a for cell proliferation (Figure 5A) and miR-210 in colony formation (Figure 5B) have not been described previously in breast cancer, indicating that these two microRNA are novel tumor suppressor microRNAs in breast cancer. Interestingly, miR-210 only reduced the number of colonies, suggesting that this microRNA can control clonogenic capacity through another mechanism distinct from proliferation, as for example apoptosis or cell detachment.

CCR7 is another target of candidate microRNAs

CCR7 is a chemokine receptor which expression has been associated to lymph node metastasis in breast cancer [44,45]. Due to this relevance, we performed immunohistochemistry for CCR7 in our group of breast cancer tumors, detecting membranous stain in 96 of the 101 analyzed samples (Figure 6A). Among tumors from patients with lymph node metastasis 42/44 were positive for CCR7 expression. Breast cancer tumors from patients not presenting lymph node metastasis were also positive for the presence of CCR7 leading into no association between the receptor expression and metastasis stage. In addition, the mean of CCR7 expression was similar between tumors with or without lymph node metastasis (H-score 148.3 vs 143.9, respectively). Interestingly, CCR7 expression was associated to tumor size ($p=0.0369$). These results indicate that the solely expression of CCR7 in breast cancer tissues is not a prediction of lymph node metastasis.

Looking for a relationship between microRNAs involved in proliferation, migration and/or invasion and the expression of CCR7, we did an *in-silico* analysis which suggested miR-196a, miR-202 and miR-210 as potential regulators of CCR7. We confirmed this prediction through luciferase reporter gene assays, where miR-196a and miR-202 decreased luciferase activity in a significant 50% (Figure 6B). Next, we transfected of miR-196a, miR-202 and miR-210 in MDA-MB-231 not finding an effect in endogenous CCR7 levels (data not shown), indicating that in this cell line, these microRNAs are not able to regulate CCR7 expression. We next tested the rest of microRNAs from previous experiments and we found that transfection of miR-30a produced a decrease in endogenous CCR7 expression close to 50% in MDA-MB-231 cells. This microRNA has not predicted *in silico* binding sites in CCR7 mRNA. In conclusion, we found that miR-30a is a novel regulator of CCR7 expression, and maybe acting through an indirect mechanism to suppress its expression in breast cancer cells.

The Venn diagram in Figure 6D shows that from the 94 miRNAs downregulated in tumors with EMT transcription factors expression, 29 are downregulated also in the group of tumors from patients with lymph node metastasis, and 16 coincide with high expression of CCR7. Among all these, miR-30a affected CCR7 expression. This suggest that downregulation of miR-30a would contribute to lymph node metastasis, due its ability to decrease invasion, cell proliferation and CCR7 expression in breast cancer cells.

DISCUSSION

Epithelial mesenchymal transition (EMT) has been proposed as the mechanism by which tumor cells acquire the ability to detach from tumor and migrate either to lymph nodes or to distant organs to metastasize. Among the main inducers of EMT in cell culture, are the transcription factors SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST [5-7]. On the other hand, microRNAs have been described as regulators of metastasis in several studies [23]. For these reasons, we studied the involvement of microRNAs that may regulate EMT transcription factors expression, in the process of metastasis of breast cancer tumors.

Expression of SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST in primary breast tumors has been associated to lymph node metastasis [15-18]. In this study, we found expression of the four transcription factors in breast cancer tumors, either alone or in combination of 2, 3 or 4, but no association with lymph node metastasis was found. Although this lack of association, EMT transcription factors expression is related to E-cadherin loss in 79.2% (42/53) of tumors. Expression of the EMT transcription factors is an early event in metastasis progression, inducing persistent molecular changes in tumor cells that ultimately would lead into metastasis, like loss of E-cadherin expression [5]. Because these three events occur in a sequential mode, we would not expect to find a co-occurrence of those in a same tumor. For this reason, a lack of association between the expression of EMT transcription factors and E-cadherin loss or the occurrence of metastasis, does not discard that an EMT process is occurring in breast cancer tumors. Experiments in animal models demonstrate that a transient SNAIL expression is necessary to increase the development of metastasis in mice, but a continuous expression leads into a decrease of metastasis [9]. In relation to this, we propose that a similar scenario may occur in

human tumors, existing a temporal expression of the EMT transcription factors. This proposal is concordant by the fact that 81.5% (44/54) of the tumors with lymph node metastasis present loss of E-cadherin expression, among those only 37% (20/54) maintain EMT transcription factor expression.

SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST inhibits E-cadherin expression by recruiting chromatin remodeling complexes at the E-cadherin promoter [46-52]. In addition, E-cadherin promoter methylation is a common event in breast cancer tissues [53], and methyltransferase (DNMT1) is recruited by ZEB1 to the E-cadherin promoter in breast cancer cell lines [54]. This evidence supports the idea of a transient expression and binding to E-cadherin promoter of the EMT transcription factor ZEB1, followed by a stable epigenetic mark, like promoter methylation, maintaining the repression of the target gene. As E-cadherin repression persist in time more than EMT transcription factors expression, it seems that E-cadherin is a better predictor of metastasis risk in breast cancer.

MicroRNAs are relevant modulators of metastasis through the regulation of EMT inducers, and its deregulation is a common feature in cancer tissues. In this study, we selected six microRNAs, miR-196a, miR-202, miR-210, miR-22, miR-331 and miR-34b-3p, downregulated in breast cancer tumors with expression of the EMT transcription factors SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST. We proved that five microRNAs act through their predicted 3'UTR targets to regulate gene expression in luciferase reporter assays: miR-196a as regulator of SNAIL and ZEB1, miR-22 as ZEB1regulator, miR-202 as TWIST regulator, miR-331 as SLUG regulator, and miR-210 as SNAIL regulator. All these microRNAs are novel for the mentioned transcription factors, suggesting new potential regulators of EMT in cancer.

Together with these results, miR-196a and miR-22 decreased endogenous ZEB1 levels in MDA-MB-231 cells, demonstrating for the first time that these two microRNAs are novel regulators of ZEB1 levels in cancer cells. In addition, miR-196a and miR-22 decreased migration, invasion and/or cell proliferation in MDA-MB-231 cells, as previously described [55-57]. These effects may be related to the decrease of ZEB1 level in MDA-MB-231 cells, since it was reported that this EMT inducer enhances migration and invasion in cancer cells [58]. An additional effect of microRNA miR-22 is the repression of SNAIL in gastric and bladder cancer cell lines [59,60], supporting the role of miR-22 as an inhibitor of EMT at least through two different targets. MiR-1271, used as a control microRNA, was selected in this study because of its ability to regulate ZEB1 and TWIST in pancreatic cancer [38]. In this study, we demonstrated for the first time that miR-1271 is also a regulator of ZEB1 in breast cancer cells. We suggest that, as for miR-196a and miR-22, the effects of miR-1271 in cell migration, invasion and proliferation may also be related to the decrease in ZEB1 levels. In conclusion miR-196a, miR-22 and miR-1271 are novel regulators for ZEB1 in breast cancer cells.

MicroRNAs miR-331 and miR-34b-3p has not been previously studied in breast cancer metastasis progression. We described that both microRNAs decrease invasion and migration of MDA-MB-231 cells, two crucial steps in metastasis development. MiR-331 has the same effect in lung cancer cell lines [61], so our results reinforce the role of this microRNA as a metastasis suppressor. In cervical cancer, miR-34b decreases cell migration without affecting invasion [62], suggesting that the regulation of these two metastatic traits is independent. MiR-331 reduced proliferation in colorectal cancer [63], and miR-34b-3p in lung and cervical cancer [62,64]. Neither microRNA reduced cell proliferation in our assays, suggesting that their tumor suppressor effect is tissue-dependent. Our experiments demonstrated for the first time that miR-

331 and miR-34b decreases the metastatic traits migration and invasion in a breast cancer cell line.

Other of our candidates is miR-210, a microRNA that has been principally studied under hypoxic conditions in cancer [65]. Our results revealed that miR-210 decreased invasion and migration of MDA-MB-231 cells, suggesting being a repressor of EMT. MiR-210 also decreased cell colony formation without affecting the potential of cell proliferation. We suggest that this microRNA could decrease the formation of colonies by a mechanism different from proliferation, such as apoptosis [66].

The relevance of CCR7 expression in the tumor cell membrane in lymph node metastasis [44,45,67] led us to evaluate the expression of this receptor in breast cancer tumors. As for EMT transcription factors, no association was found between CCR7 expression and the presence of lymph node metastasis, suggesting that CCR7 expression by itself cannot predict the occurrence of this type of metastasis in patients. In relation to microRNA in lymph node metastasis, few studies have described a differential expression in tumors with or without lymph node metastasis [30-33]. Only one study, describing Let-7a as a microRNA targeting CCR7, decreasing its expression in breast cancer cell lines, as well as proliferation, migration and invasion [68]. In this sense, this paper describes additional three microRNAs as potential regulators of CCR7 in breast cancer cells: mir-196a, mir-202 and mir-30a. We validated the two first microRNAs only in luciferase assays, and mir30a as a repressor of CCR7 expression in MDA-MB-231 cells, as well as inhibition of proliferation and invasion.

MiR-30a was among the 16 microRNAs decreased in our group of breast cancer tumors that shared: expression of EMT transcription factors, presence of lymph node metastasis, and high

CCR7 expression, suggesting that downregulation of miR-30a contribute to lymph node metastasis acting directly on CCR7. In this group of 16 microRNAs, miR-342-5p, miR-30-3p (the other strand of miR-30a), and miR-150-5p presented predicted target sites in CCR7 mRNA, suggesting that these microRNAs may be involved in the regulation of lymph node metastasis through CCR7.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks to M.E. Andrés and V. Torres for providing the cell lines for the study, P. Gajardo and L. Fernández for providing reagents and technical support, M.I. Gómez for helpful suggestions, C. Álvarez for critically reading the manuscript. This work was supported by CONICYT # 21151349.

REFERENCES

1. Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC *et al.* Lymph node micrometastases from breast carcinoma. *Cancer* 1997; **80**: 1188-1197.
2. Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *American J Sur* 2004; **188**: 49-61.
3. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL *et al.* Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; **52**: 1551-1557.
4. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG *et al.* An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **107**: 309-330.
5. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:442-454.
6. Meng F, Wu G. The rejuvenated scenario of epithelial–mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012; **31**: 455-467.
7. De Herreros AG, Peiró S, Nassour M, *et al.* Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; **15**: 135-147.
8. Ferrari-Amorotti G, Chiodoni C, Shen F *et al.* Suppression of invasion and metastasis of triple-negative breast cancer lines by pharmacological or genetic inhibition of slug activity. *Neoplasia* 2014; **16**: 1047-1058.
9. Tran HD, Luitel K, Kim M, *et al.* Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Res* 2014; **74**: 6330-6340.
10. Jin H, Yu Y, Zhang T, *et al.* Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2010; **126**: 2102-2111.
11. Xu Y, Lee DK, Feng Z, *et al.* Breast tumor cell-specific knockout of Twist1 inhibits cancer cell plasticity, dissemination, and lung metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 11494-11499.
12. Xu Y, Qin L, Sun T, *et al.* Twist1 promotes breast cancer invasion and metastasis by silencing Foxa1 expression. *Oncogene* 2017; **36**: 1157.
13. Yang J, Mani SA, Donaher JL, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; **117**: 927-939.

14. Van Marck VL, Bracke ME. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Human Cancer. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]; [Accesed December 15, 2019]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6362/>
15. Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, *et al.* Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 2011; **11**: 73.
16. Cao YW, Wan GX, Sun JP, *et al.* Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci* 2015; **31**: 70-76.
17. Ang L, Zheng L, Wang J, *et al.* Expression of and correlation between BCL6 and ZEB family members in patients with breast cancer. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 3985-3992. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5101>.
18. Qiao W, Jia Z, Liu H, *et al.* Prognostic and clinicopathological value of Twist expression in breast cancer: A meta-analysis. *PloS One* 2017; **12**: e0186191.
19. Kim SA, Inamura K, Yamauchi M, *et al.* Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 2016; **114**: 199.
20. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, *et al.* Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993; **53**: 1696-1701.
21. Xu, B., Zhou, M., Qiu, W., *et al.* CCR7 mediates human breast cancer cell invasion, migration by inducing epithelial–mesenchymal transition and suppressing apoptosis through AKT pathway. *Cancer Med* 2017; **6**: 1062-1071.
22. Zhang, J., Zhou, Y., & Yang, Y. CCR7 pathway induces epithelial–mesenchymal transition through up-regulation of Snail signaling in gastric cancer. *Medical Oncology* 2015; **32**: 17.
23. Zhou L, Liu F, Wang X, *et al.* The roles of microRNAs in the regulation of tumor metastasis. *Cell Biosci* 2015; **5**: 32.
24. Korpala M, Lee ES, Hu G, *et al.* The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14910-14914.
25. Perdigao-Henriques R, Petrocca F, Altschuler G, *et al.* miR-200 promotes the mesenchymal to epithelial transition by suppressing multiple members of the Zeb2 and Snail1 transcriptional repressor complexes. *Oncogene* 2016; **35**: 158.
26. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; **449**: 682-688.

27. Shell S, Park SM, Radjabi AR, *et al.* Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 11400-11405.
28. Zhu S, Wu H, Wu F, *et al.* MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; **18**: 350-359.
29. Kim J, Yao F, Xiao Z, *et al.* MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer Metastasis Rev* 2018; **7**: 5–15. doi:10.1007/s10555-017-9712-y
30. Avery-Kiejda KA, Braye SG, Mathe A, *et al.* Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2014; **14**: 51.
31. Rask L, Balslev E, Søkilde R, *et al.* Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status. *Cell Onc* 2014; **37**: 215-227.
32. Wang B, Li J, Sun M, *et al.* MiRNA expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features. *IUBMB Life* 2014; **66**: 371-377.
33. Chen X, Wang YW, Zhu WJ, *et al.* A 4-microRNA signature predicts lymph node metastasis and prognosis in breast cancer. *Hum Pathol* 2018; **76**: 122-132.
34. Wiener D, Gajardo-Meneses P, Ortega-Hernández V, *et al.* BRCA1 and BARD1 colocalize mainly in the cytoplasm of breast cancer tumors, and their isoforms show differential expression. *Breast Cancer Res Treat* 2015; **153**: 669-678.
35. Chang CW, Yu JC, Hsieh YH, *et al.* MicroRNA-30a increases tight junction protein expression to suppress the epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting Slug in breast cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 16462.
36. Kumarswamy R, Mudduluru G, Ceppi P, *et al.* MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2012; **130**: 2044-2053.
37. Xiao B, Shi X, Bai J. miR-30a regulates the proliferation and invasion of breast cancer cells by targeting Snail. *Oncol Lett* 2019; **17**: 406-413.
38. Liu H, Wang H, Liu X, *et al.* miR-1271 inhibits migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and TWIST1 in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; **472**: 346-352.
39. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Gen Dev* 2005; **15**: 87-96.
40. Gu J, Liu X, Li J, *et al.* MicroRNA-144 inhibits cell proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma by targeting CCNB1. *Cancer Cell Int* 2019; **19**: 15.

41. Liu Y, Zhu ST, Wang X, *et al.* MiR-200c regulates tumor growth and chemosensitivity to cisplatin in osteosarcoma by targeting AKT2. *Sci Rep* 2017, **7**: 13598.
42. Du HY, Liu B. MiR-1271 as a tumor suppressor in breast cancer proliferation and progression via targeting SPIN1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; **22**: 2697-2706.
43. Xiang XJ, Deng J, Liu YW, *et al.* MiR-1271 inhibits cell proliferation, invasion and EMT in gastric cancer by targeting FOXQ1. *Cell Physiol Biochem* 2015; **36**: 1382-1394.
44. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, *et al.* CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 5686-5693.
45. Li X, Sun S, Li N, *et al.* High expression of CCR7 predicts lymph node metastasis and good prognosis in triple negative breast cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017; **43**: 531-539.
46. Sanchez-Tillo E, Lazaro A, Torrent R, *et al.* ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 2010; **29**: 3490.
47. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, *et al.* The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 76.
48. Batlle E, Sancho E, Francí C, *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 84.
49. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, *et al.* DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; **24**: 2375.
50. Fu J, Qin L, He T, *et al.* The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res* 2011; **21**: 275.
51. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; **62**:1613-1618.
52. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003; **116**: 499-511.
53. Liu J, Sun X, Qin S, *et al.* CDH1 promoter methylation correlates with decreased gene expression and poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Lett* 2016; **11**: 2635-2643.

54. Fukagawa A, Ishii H, Miyazawa K, *et al.* δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med* 2015; **4**: 125-135.
55. Li Y, Zhang M, Chen H, *et al.* Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer Res* 2010; **70**: 7894-7904.
56. Zhang X, Li Y, Wang D, *et al.* miR-22 suppresses tumorigenesis and improves radiosensitivity of breast cancer cells by targeting Sirt1. *Biol Res* 2017; **50**: 27.
57. Zou Q, Tang Q, Pan Y, *et al.* MicroRNA-22 inhibits cell growth and metastasis in breast cancer via targeting of SIRT1. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 1009-1016.
58. Drake JM, Strohhahn G, Bair TB, *et al.* ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 2207-2217.
59. Xu M, Li J, Wang X, *et al.* MiR-22 suppresses epithelial–mesenchymal transition in bladder cancer by inhibiting Snail and MAPK1/Slug/vimentin feedback loop. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 209.
60. Zuo QF, Cao LY, Yu T, *et al.* MicroRNA-22 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting MMP14 and Snail. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e2000.
61. Li X, Zhu J, Liu Y, *et al.* MicroRNA-331-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition by targeting ErbB2 and VAV2 through the Rac1/PAK1/ β -catenin axis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci* 2019; **110**: 1883.
62. Córdova-Rivas S, Fraire-Soto I, Mercado-Casas Torres A, *et al.* 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 545.
63. Zhao D, Sui Y, Zheng X. MiR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2016; **35**: 1075-1082.
64. Mizuno K, Mataka H, Arai T, *et al.* The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J Hum Gen* 2017, **62**:671.
65. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, *et al.* MiRNA-210: a current overview. *Anticancer Res* 2017, **37**: 6511-6521.
66. Li Y, Yang C, Zhang L, *et al.* MicroRNA-210 induces endothelial cell apoptosis by directly targeting PDK1 in the setting of atherosclerosis. *Cell Mol Biol Lett* 2017; **22**: 3.

67. Pang MF, Georgoudaki AM, Lambut L, *et al.* TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* 2016; **35**: 748.
68. Kim SJ, Shin JY, Lee KD, *et al.* MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of CC chemokine receptor type 7. *Breast Cancer Res* 2012; **14**: R14.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Clinicopathological features of the 101 breast cancer tumors analyzed.

Table 2. Association between EMT transcription factors expression and clinicopathological features of the analyzed breast cancer tumors. Expression of SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST were analyzed in relation to clinicopathological features of the breast cancer tissues used in this study. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 1. Detection of EMT transcription factors and E-cadherin in breast cancer tissues as evidence of EMT. SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST expression was detected in breast cancer tissues by immunohistochemistry. The four analyzed transcription factors presented nuclear stain (A) Images at 40X. E-cadherin expression was assessed in normal breast and breast cancer tissues using immunofluorescence (B). Representative images for normal breast, tumors with high E-cadherin expression (T031) and low/absent E-cadherin expression (T010) are shown. Scale bar, 50 μm . (C) Expression of epithelial marker E-cadherin in tumors that express SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST. Only tumors with EMT transcription factors expression are graphed.

Figure 2. Selected microRNAs regulates SNAIL, SLUG, ZEB1 and TWIST 3'UTR. Candidate microRNAs were evaluated using luciferase reporter assay. pMIR-REPORT vector with the 3'UTR of SNAIL (A), SLUG (B), ZEB1 (C) or TWIST (D) was co-transfected with the selected microRNAs in HEK293T cells. miR-30a and miR-1271 were used as positive controls and a random sequence microRNA was used as negative control. pMIR-REPORT luciferase empty vector luciferase activity was equivalent to 100% in all experiments (data not shown). * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Figure 3. microRNAs miR-196a and miR-22 decreases ZEB1 levels in MDA-MB-231 cell line. MDA-MB-231 cell were transfected with selected microRNAs and changes in endogenous SNAIL (A), SLUG (B) and ZEB1 (C) levels were analyzed by Western Blotting. Three independent experiments were performed and quantified using ImageJ. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Figure 4. microRNAs decrease migration and invasion capacity of MDA-MB-231 cells. Selected microRNAs were transfected in MDA-MB-231 and changes in migration (A) and invasion (B) were assessed. Cells were stained with crystal violet and five regions of each insert were analyzed. Cells were counted using ImageJ. * $p<0.05$; **, $p<0.01$

Figure 5. MicroRNAs decreases proliferation of MDA-MB-231 cells. Selected microRNAs were transfected in MDA-MB-231 cells, and proliferation marker Ki67 was detected by immunofluorescence (A). Scale bar, 50 μm . Colony formation capacity of transfected cells was assessed after 10 days of cell growth (B). Cells were stained with crystal violet and colonies formed by more than 50 cells were counted under a microscope. * $p<0.05$; **, $p<0.01$

Figure 6. CCR7 is regulated by three novel microRNAs. CCR7 expression was detected in normal breast and breast cancer tissues by immunohistochemistry (A). H-Score was calculated for every tumor, considering membranous stain. Mean expression (H-Score=146) was used as cut-off to define high or low CCR7 expression. Images at 40X. (B) MicroRNAs miR-196a, miR-202 and miR-210 were co-transfected with pMIR-REPORT luciferase vector containing the 3'UTR of CCR7 to perform luciferase gene reporter assay in HEK293T cells. * $p<0.05$. (C) CCR7 endogenous levels were assessed in MDA-MB-231 cells after transfection of miR-30a by Western Blotting. * $p<0.05$. (D) A Venn diagram was used to relate microRNAs downregulated in breast tumors with expression of the analyzed EMT transcription factors

(white circle), with lymph node metastasis (light gray circle) and high CCR7 expression (dark gray circle). Of the studied microRNAs, miR-196a was decreased in tumors with EMT transcription factors expression and in tumors with lymph node metastasis, and miR-30a was decreased in the three analyzed groups.

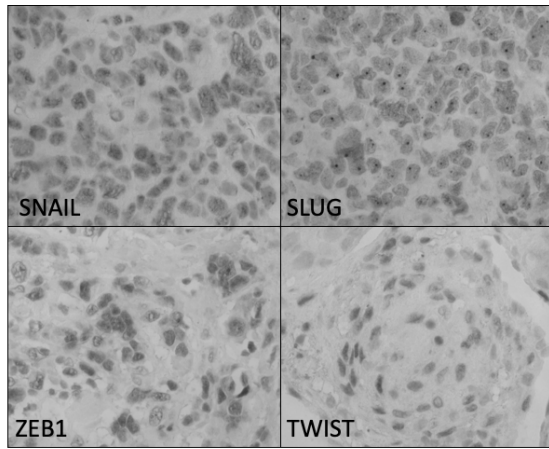
Feature	N	%
Primary Tumor (T)		
T1	25	24.8
T2	64	63.3
T3	9	8.9
T4	3	3.0
Regional Lymph Nodes (N)		
N0	46	45.5
N1	36	35.6
N2	13	12.9
N3	6	6.0
Differentiation		
Grade 1	18	17.8
Grade 2	34	33.7
Grade 3	31	30.7
Tumor type		
Invasive ductal carcinoma	82	81.2
In situ ductal carcinoma	2	2.0
Invasive lobular carcinoma	13	12.9
Medullary	1	1.0
Metaplastic	2	2.0
No information	1	1.0
Tumor subtype		
Luminal A	46	45.5
Luminal B	15	14.9
Luminal/HER2	16	15.8
HER2	4	4.0
Triple negative	18	17.8
Not classified	2	2.0

TABLE 1

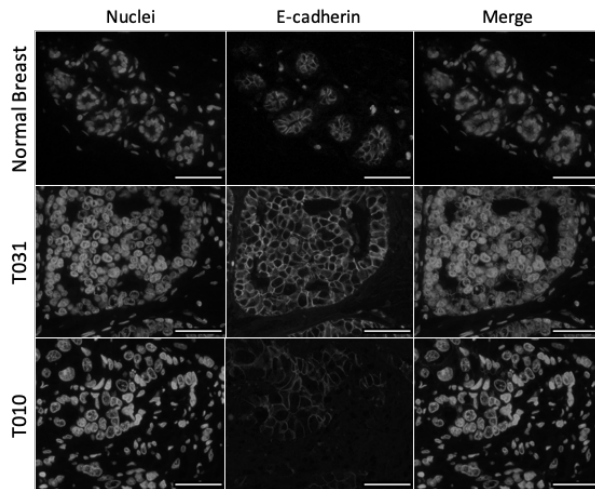
	SNAIL	p	SLUG	p	ZEB1	p	TWIST	p
Tumor size								
≥2cm (n=83)	18	0.7581	10	1.000	29	0.7898	6	*0.0241
<2cm (n=18)	3		2		7		5	
Lymph node metastasis								
Positive (n=54)	12	0.8077	4	0.2169	19	1.000	3	0.1071
Negative (n=47)	9		8		17		8	
Tumoral Grade								
Grade 1 (n=18)	4	0.4292	0	**0.0039	4	0.2058	2	0.869
Grade 2 (n=35)	4		2		10		3	
Grade 3 (n=31)	7		9		14		4	
Tumor Subtype								
Luminal A (n=46)	8	0.8104	4	0.4251	14	0.7785	4	0.3502
Luminal B (n=15)	2		1		7		0	
Lum/Her2 (n=16)	4		3		6		3	
Her2+ (n=4)	1		0		2		1	
TNBC (n=18)	5		4		7		3	
Estrogen Receptor Status								
ER+ (n=77)	14	0.3739	8	0.4571	27	0.6239	7	0.2558
ER- (n=22)	6		4		9		4	
E-cadherin								
High (n=16)	5	0.158	1	0.685	7	0.571	1	1.000
Low/absent (n=85)	14		11		29		10	

TABLE 2

A)



B)



C)

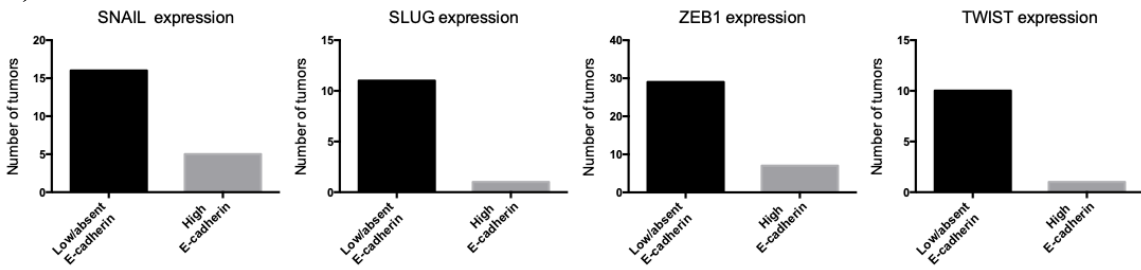


FIGURE 1

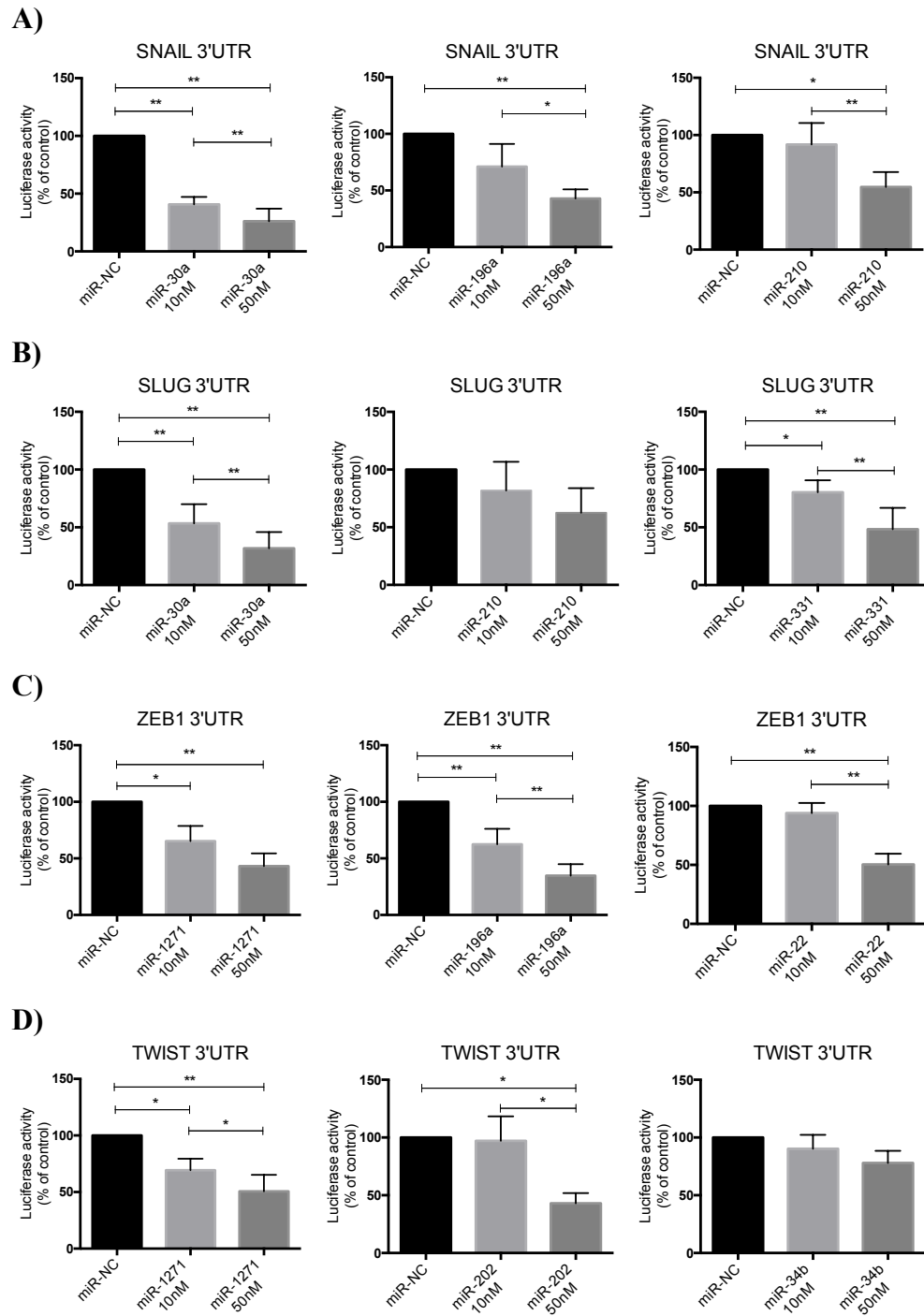
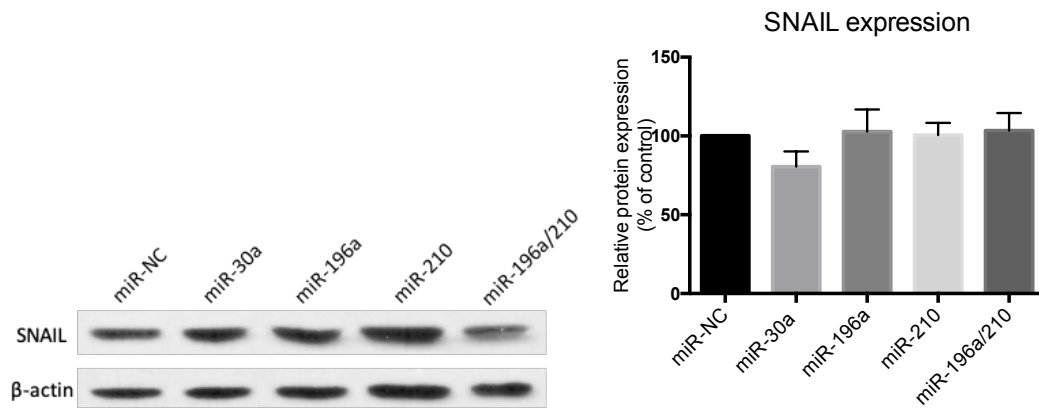
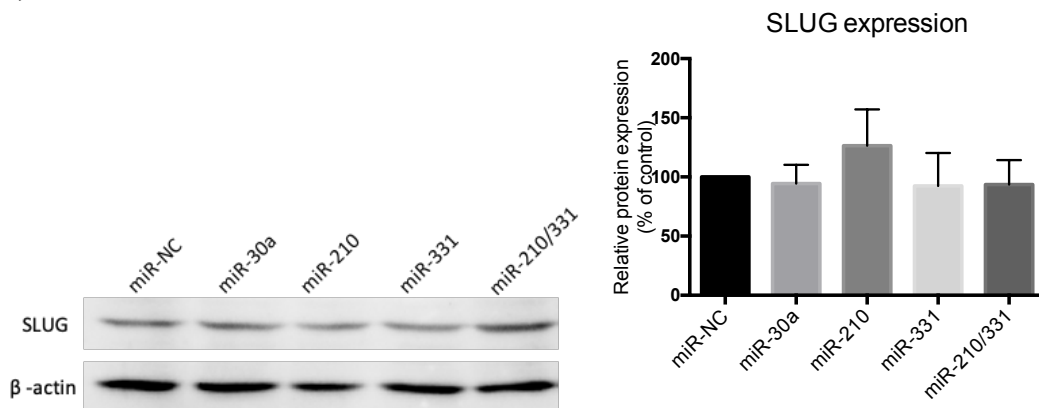
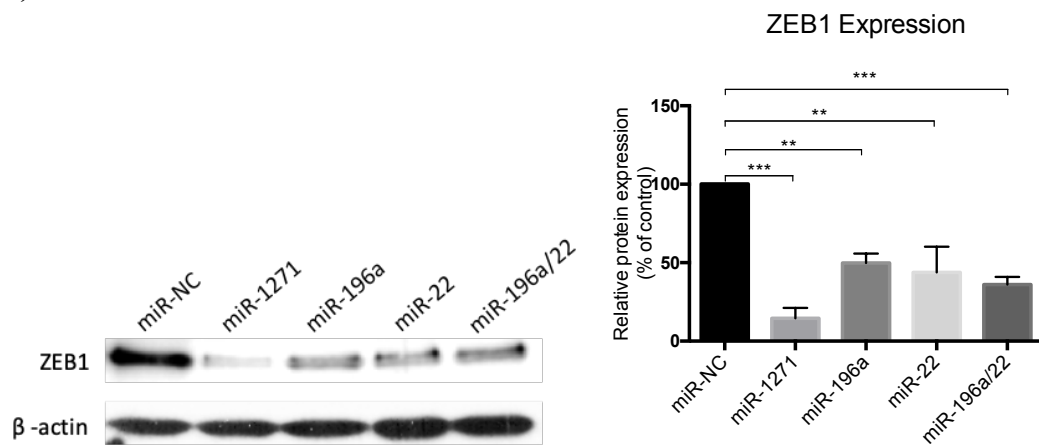
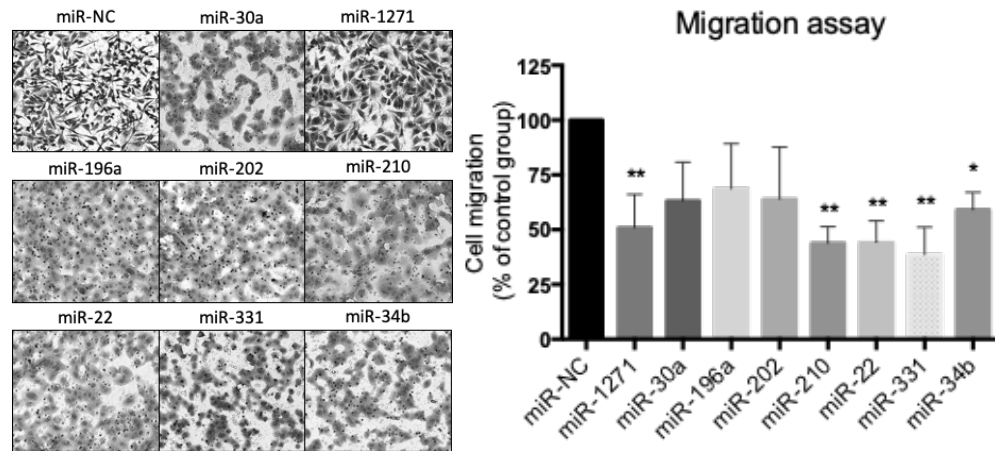


FIGURE 2

A)**B)****C)****FIGURE 3**

A)



B)

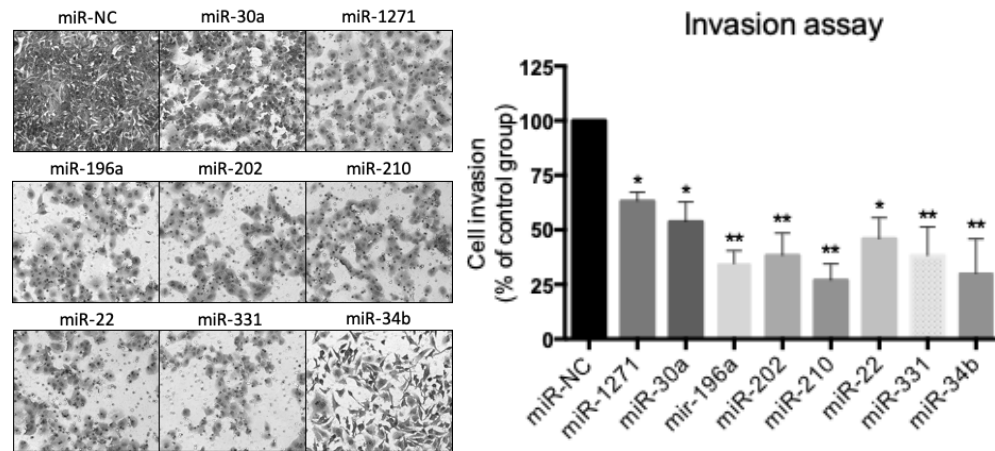
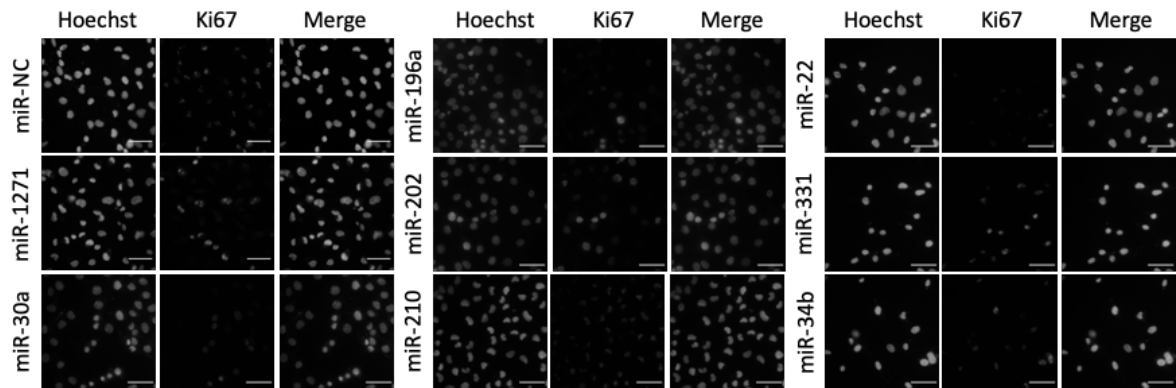
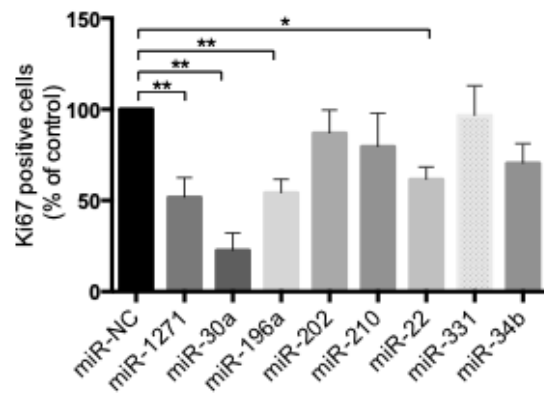


FIGURE 4

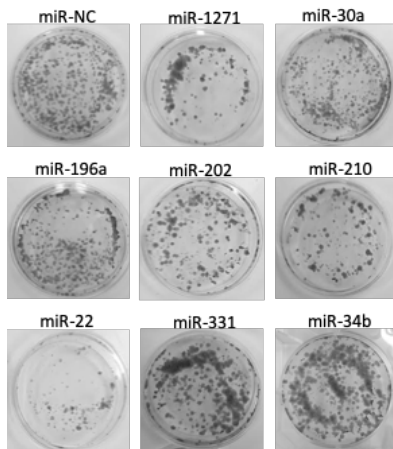
A)



Cell proliferation



B)



Colony formation capacity

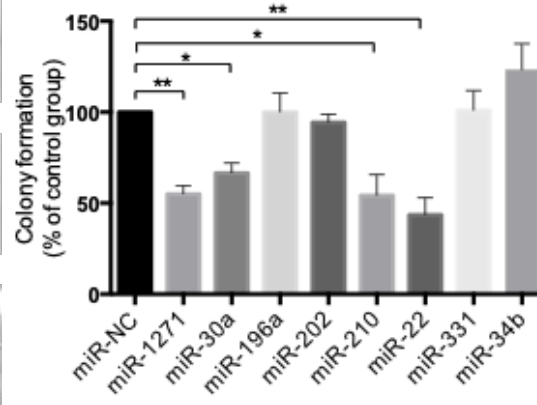
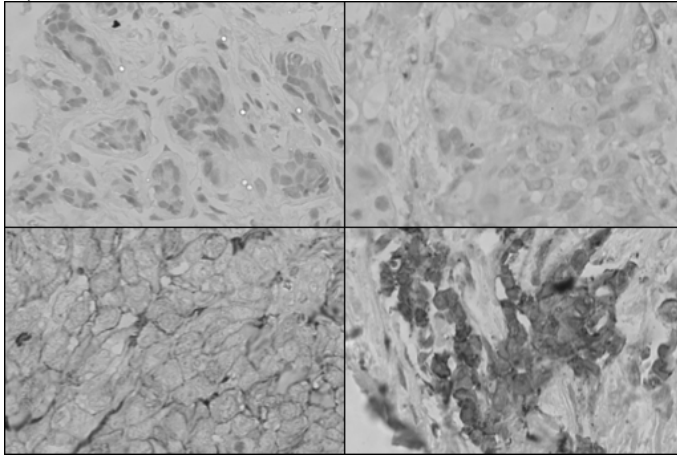
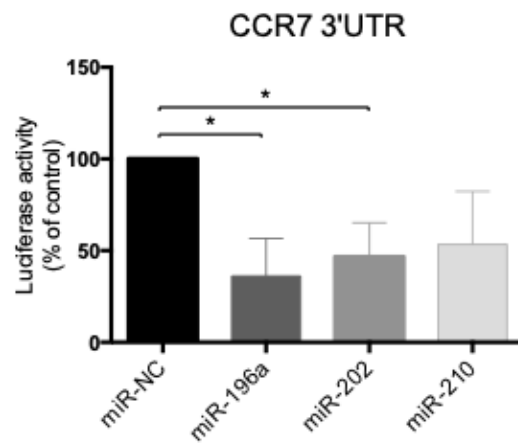


FIGURE 5

A)



B)



C)

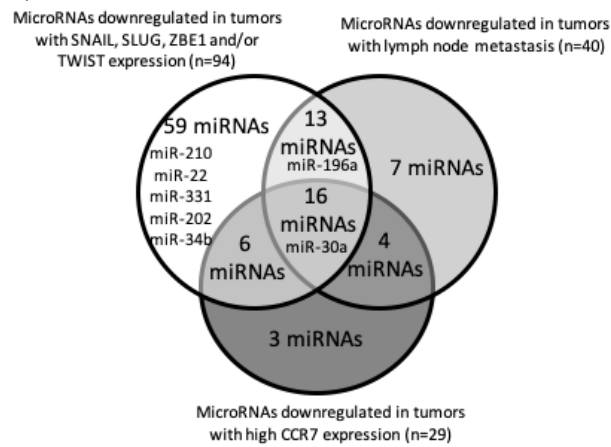


FIGURE 6

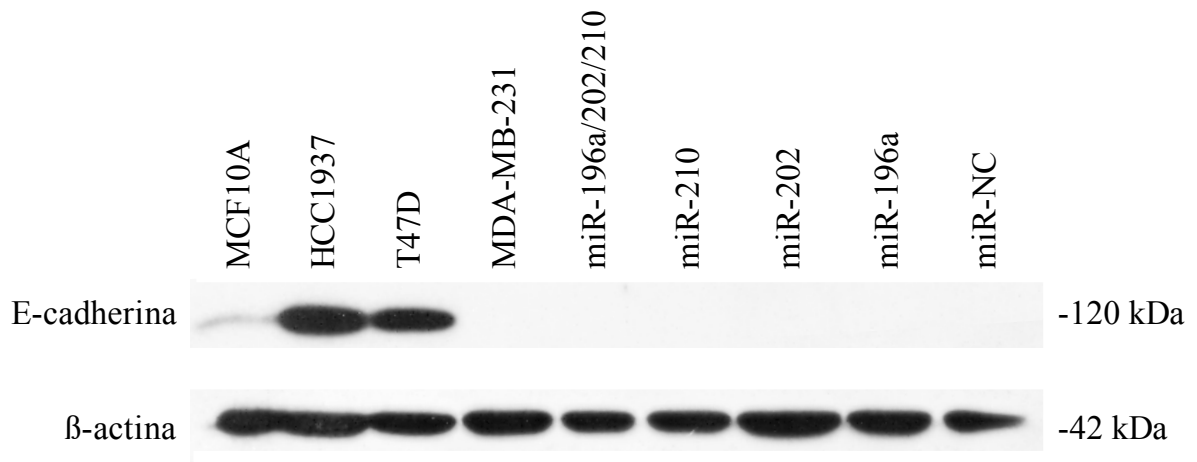
7. RESULTADOS ADICIONALES

En esta sección se describen resultados adicionales que no fueron incluidos en el manuscrito, pero que son relevantes para la discusión de esta tesis.

7.1. Expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231

En la figura 4 del manuscrito se demostró que los microRNAs evaluados disminuyen la migración y/o invasión celular MDA-MB-231 al ser transfectados. Con el fin de analizar una posible reversión del fenotipo mesenquimal en estas células se evaluó la expresión del marcador epitelial E-cadherina luego de la transfección con cada uno de los microRNAs. La figura 6A muestra la detección de E-cadherina a través de western blot en líneas celulares de cáncer de mama. Las líneas celulares MCF10A, HCC1937 y T47D fueron utilizadas como controles positivos de la expresión de E-cadherina (carriles 1 al 3). El carril número 4 corresponde a la línea celular MDA-MB-231, en donde se observa que ésta no presenta niveles detectables de E-cadherina, en relación a las otras líneas celulares evaluadas en este experimento. Lo mismo se observa en el carril 9, donde las células se encuentran transfectadas con el control negativo miR-NC. Esta falta de expresión de E-cadherina se repite en los carriles del 5 al 9, los cuales corresponden a la línea celular MDA-MB-231 transfectada con los microRNAs miR-210 (carril 6), miR-202 (carril 7), miR-196a (carril 8), y transfectada con los tres microRNAs de manera simultánea (carril 5). Este resultado se repite para todos los microRNAs evaluados en este estudio, demostrando que ninguno de los microRNAs seleccionados puede inducir la expresión de E-cadherina en esta línea celular.

A)



B)

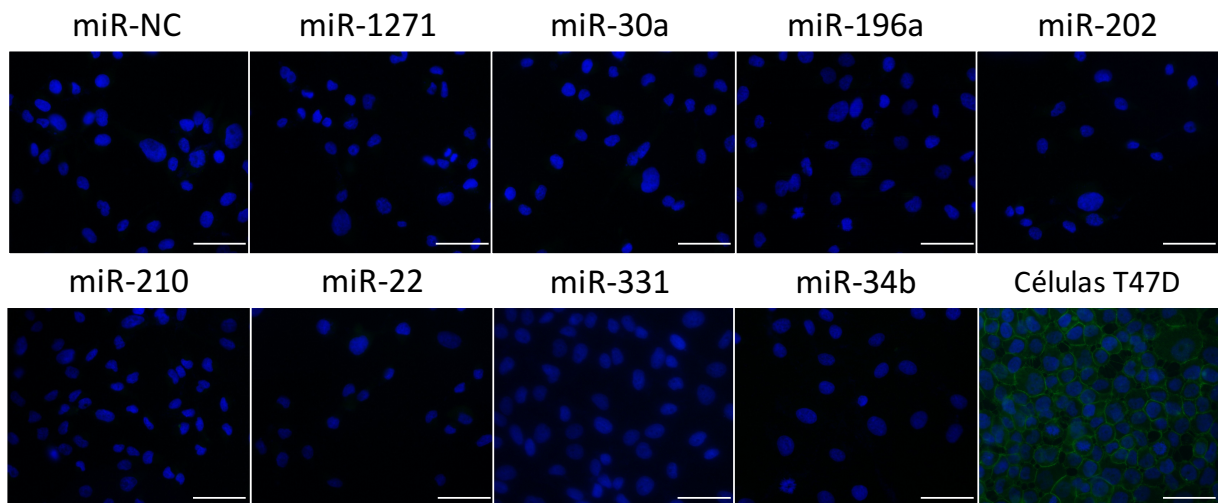


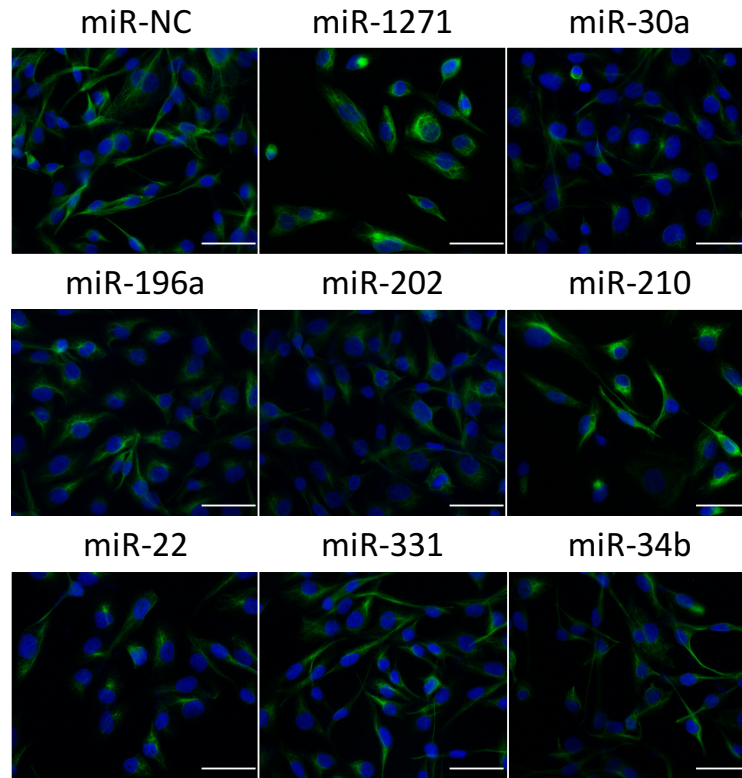
Figura 6. Detección de la expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231. (A) Mediante western blot se buscó detectar la expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231 (carriles 4-9) bajo distintas condiciones experimentales. Como control positivo, se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama MCF10A (carril 1), HCC1937 (carril 2) y T47D (carril 3). La expresión de E-cadherina no fue detectada en las células MDA-MB-231, a pesar de realizar exposiciones de la placa auto-radiográfica durante tiempos prolongados. (B) Mediante inmunofluorescencia se buscó detectar la expresión de E-cadherina (color verde) en las células MDA-MB-231 transfectadas con los distintos microRNAs seleccionados en este trabajo (recuadros 1-9). Como control positivo, se utilizó como la línea celular de cáncer de mama T47D (último recuadro), la cual presenta expresión de E-cadherina en la membrana celular. Se realizaron tres experimentos independientes para cada metodología. Barra de escala: 50 μ m.

De manera complementaria al western blot, se realizó una inmunofluorescencia en la línea celular MDA-MB-231 para detectar la presencia de E-cadherina (figura 6B). Como control positivo se utilizó nuevamente la línea celular T47D, la cual presenta marca para E-cadherina en la membrana celular (recuadro 9). La línea celular MDA-MB-231 transfectada con el microRNA miR-NC no presenta marca para E-cadherina (recuadro 1), correspondiendo con lo observado en el ensayo de western. En las células transfectadas con los microRNAs seleccionados en este estudio, tampoco fue posible detectar la expresión de E-cadherina (recuadros 2 al 8), respaldando los resultados del western.

7.2. Expresión de vimentina en las células MDA-MB-231

Complementado el análisis anterior, se determinó si la disminución en la migración e invasión de la línea celular MDA-MB-231 transfectada con cada uno de los microRNAs, se asocia a una reversión del fenotipo mesenquimal de las células, se evaluó la expresión de vimentina en las células MDA-MB-231 luego de ser transfectadas con microRNAs. La detección de vimentina se realizó mediante inmunofluorescencia luego de transfectar las células con los microRNAs seleccionados en este estudio. La figura 7A muestra imágenes representativas de cada condición experimental. La fluorescencia fue cuantificada y graficada para su posterior análisis (figura 7B). De los microRNAs transfectados, miR-30a, miR-202 y miR-22 provocaron una disminución significativa en los niveles de vimentina en las células MDA-MB-231, sugiriendo que estos microRNAs son capaces de revertir de manera parcial el fenotipo mesenquimal en esta línea celular. En contraste, la transfección de miR-1271, miR-196a, miR-210, miR-331 y miR-34b no generaron cambios detectables en la expresión de vimentina, sugiriendo que la disminución en la migración e invasión observada luego de transfectar estos microRNAs, no se

A.



B.

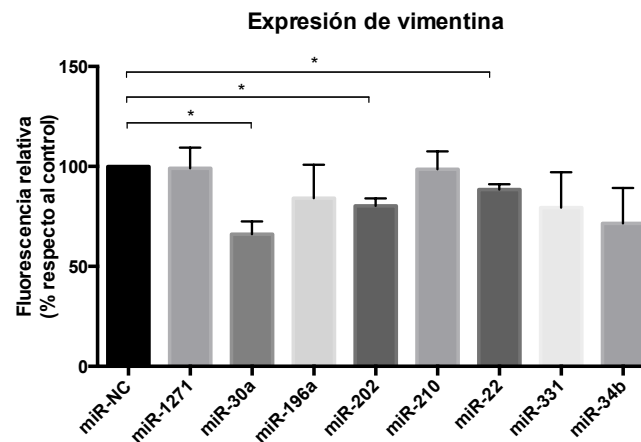


Figura 7. Detección de la expresión de vimentina en las células MDA-MB-231. Mediante inmunofluorescencia se buscó detectar la expresión de vimentina (color verde) en las células MDA-MB-231 transfectadas con los microRNAs seleccionados en este trabajo (A). Se realizaron tres experimentos independientes, los cuales fueron cuantificados y graficados (B). * $p < 0.05$. Barra de escala: 50 μ m.

encuentra relacionada a una reversión del fenotipo mesenquimal en esta línea celular.

7.3. Efecto de los microRNAs en estudio sobre la expresión de los factores de transcripción, a diferentes tiempos post-transfección de línea celular MDA-MB-231.

Se transfectaron las células MDA-MB-231 con los microRNAs miR-30a y miR-1271, seleccionados como controles positivos (Métodos 5.6.6). Luego de diferentes tiempos post-transfección, 48, 36, 24, 12, 8 y 4h, se preparó el extracto de proteínas y se analizó por western. La figura 8 muestra los resultados del western y la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a cada factor de transcripción.

Para el factor de transcripción SNAIL se observa que a tiempos largos de incubación, entre 36 y 48 h, no hay efecto de miR-30a (figura 8A) y que la máxima represión de SNAIL se obtuvo a las 4 h (65%), determinado éste como el tiempo para realizar los experimentos de western.

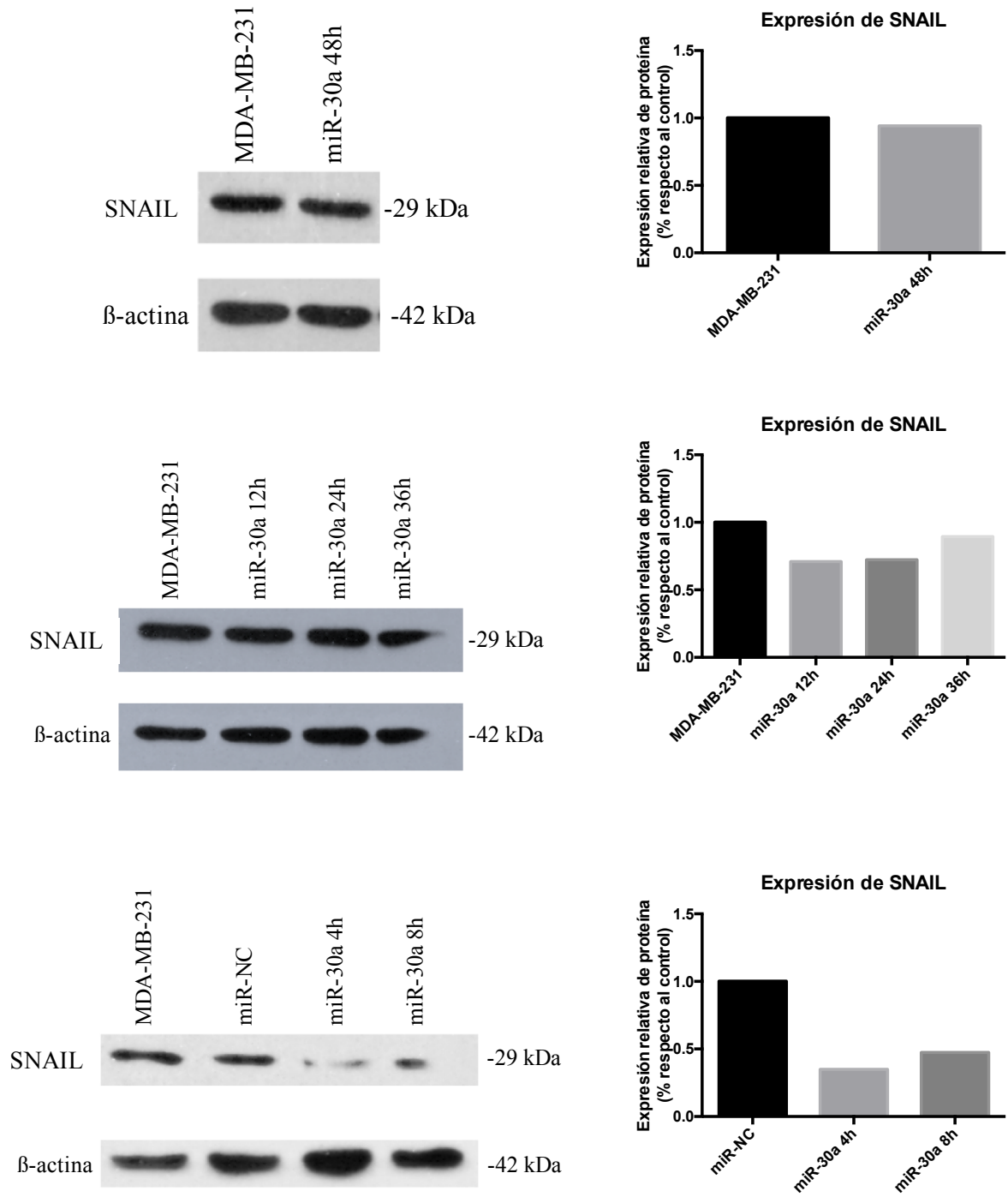
Como se observa en la figura 3 del manuscrito, ninguno de los microRNAs transfectados tuvo un efecto sobre los niveles endógenos de SNAIL.

Para el factor de transcripción SLUG, se observa algo similar que para SNAIL, donde a las 48h post-transfección no hay efecto de miR-30a (figura 8B). La máxima represión de SLUG se observó a las 12 y 4 h, sin embargo, se eligió 4 h post-transfección para realizar los experimentos. Como se observa en la figura 3 del manuscrito, ninguno de los microRNAs transfectados tuvo un efecto sobre los niveles endógenos de SLUG.

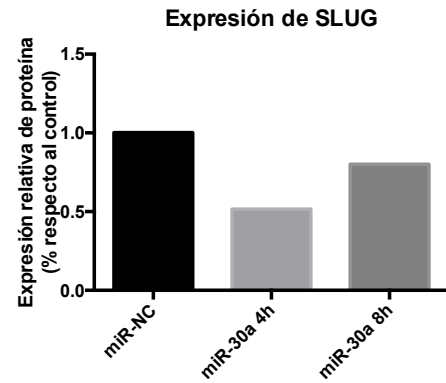
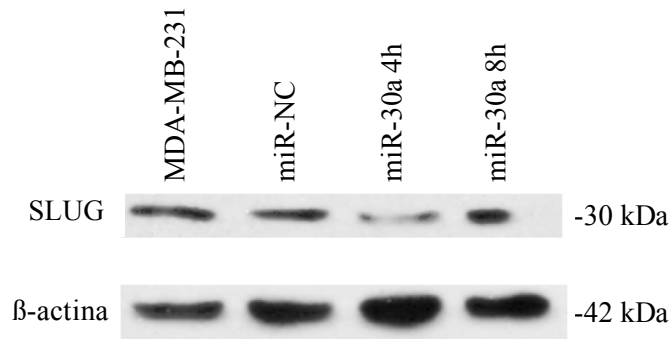
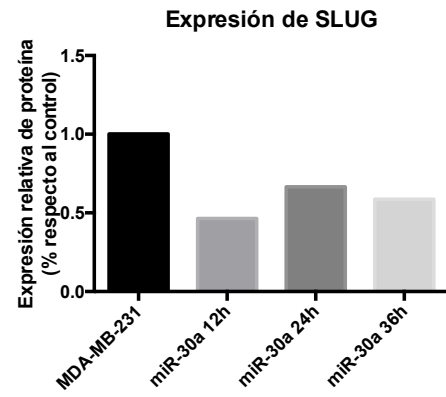
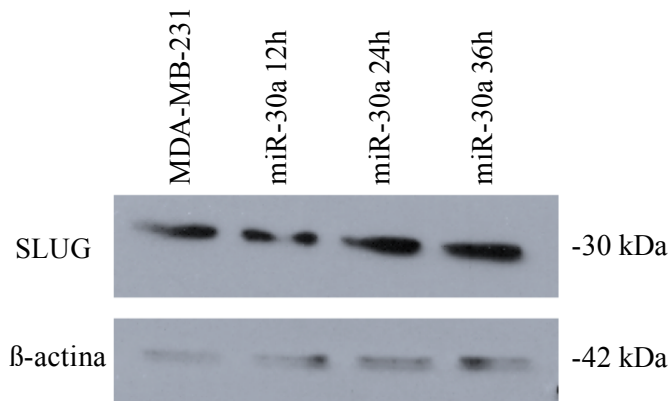
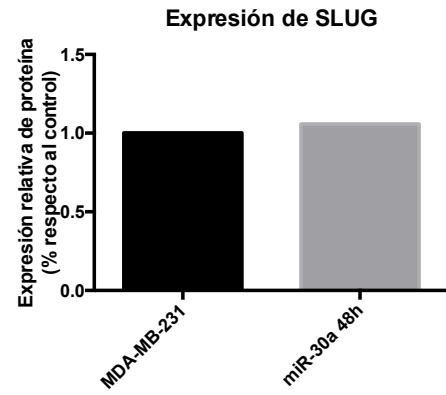
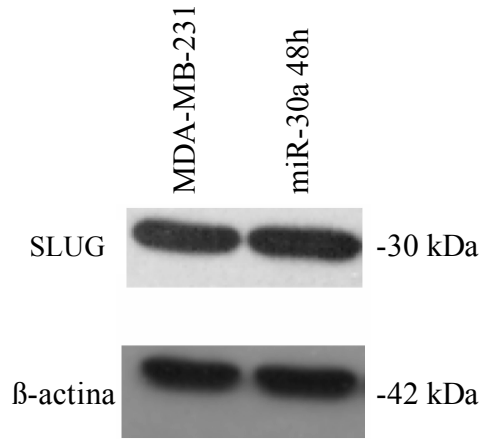
El factor de transcripción ZEB1 fue evaluado a las 48, 8 y 4 h, siendo las 48 h el tiempo de represión máximo para este factor de transcripción. Los tres microRNAs evaluados para ZEB1 tuvieron efecto sobre su expresión, siendo los únicos que demostraron tener efecto sobre su mRNA blanco predicho.

El factor de transcripción TWIST nunca pudo ser detectado en la línea celular MDA-MB-231, ya sea sin transfectar o transfectada con los microRNAs seleccionados para este factor de transcripción.

Con este experimento se puede demostrar que los tiempos de transfección son relevantes y distintos para cada factor de transcripción, ya que estaría relacionado con la vida media de cada proteína.

A.

B.



C.

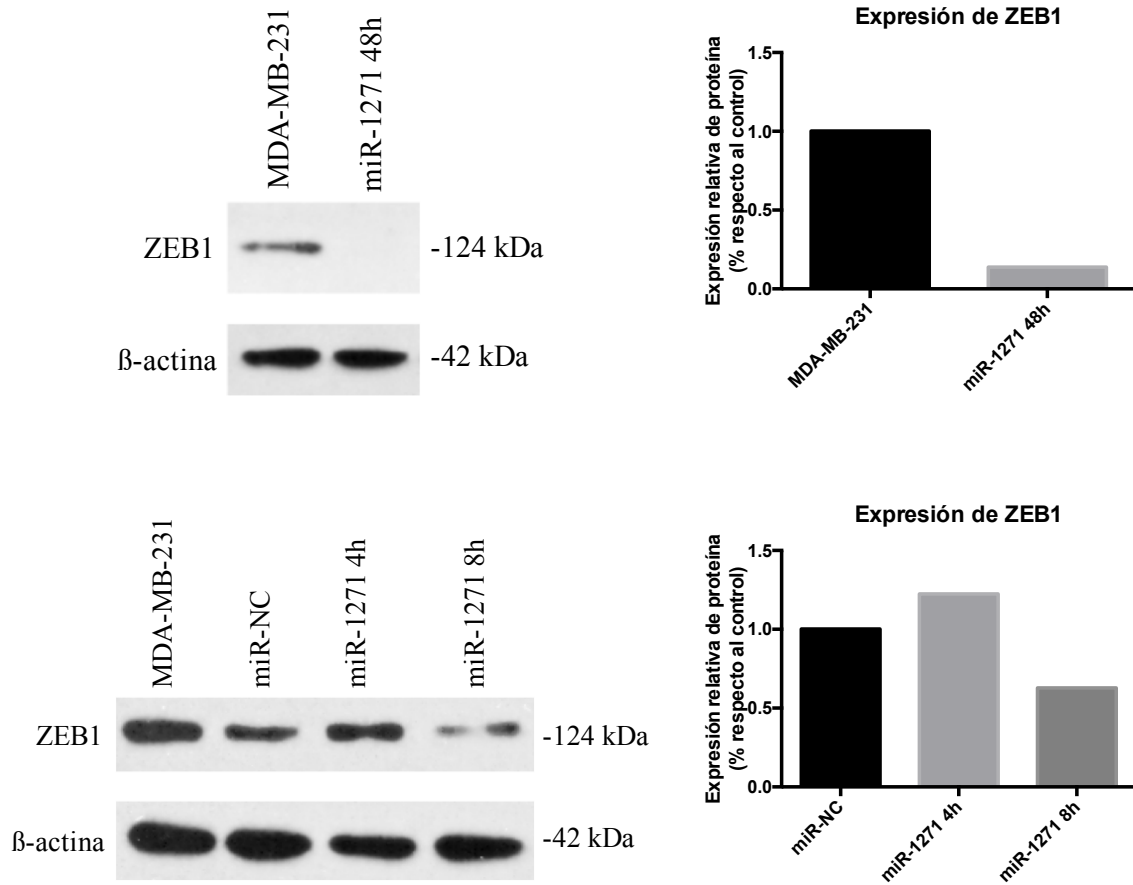


Figura 8. Determinación del tiempo de transfección para los microRNAs en estudio. Se determinó el tiempo de transfección óptimo para cada factor de transcripción utilizando los microRNAs control positivo (miR-30a y miR-1271). Los niveles de proteína fueron medidos a las 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h post-transfección para SNAIL(A) y SLUG (B), y a las 4, 8 y 48 h para ZEB1 (C). Cada experimento fue realizado una vez. Los resultados fueron cuantificados y graficados.

8. DISCUSIÓN

La transición epitelio-mesénquima (EMT) ha sido propuesta como el principal mecanismo mediante el cual las células tumorales adquieren la habilidad de soltarse del tumor primario y migrar hacia los nodos linfáticos o hacia órganos distantes y hacer una metástasis. Entre los principales inductores de EMT se encuentran los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST (De Herreros y cols, 2010; Meng y cols, 2012; Thiery y cols, 2002). Por otro lado, los microRNAs también han sido descritos como importantes reguladores de la metástasis en diversos estudios (Zhou y cols, 2015). Debido a estas razones, nosotros estudiamos la participación de microRNAs que regulen la expresión de los factores de transcripción que inducen EMT en el proceso de metástasis.

8.1. Expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima en tumores primarios de cáncer de mama

En este trabajo, evaluamos la expresión de los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST en tumores de cáncer de mama. Hasta la fecha, no tenemos conocimiento sobre trabajos que describan la expresión de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST a nivel de proteína en un mismo grupo de tumores, ya que muchos de los trabajos publicados se basan en el estudio del mRNA de estos factores de transcripción. En nuestro grupo de tumores, encontramos expresión de los cuatro factores de transcripción, ya sea de manera individual o en combinaciones de 2, 3 o 4 factores de transcripción, sugiriendo que, en los tumores de pacientes, estos factores de transcripción actuarían en conjunto para inducir la metástasis.

En la tabla 2 del manuscrito se resume el análisis de asociación entre la expresión de los factores de transcripción y las diversas características clinicopatológicas de los tumores, y también con la expresión de E-cadherina. Sólo se encontró asociación entre la expresión de SLUG y el grado tumoral, y entre TWIST y el tamaño tumoral.

SNAIL es uno de los principales promotores de la transición epitelio-mesénquima, cuya expresión en el tumor primario ha sido asociada a la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cercanos al tumor primario (Cao y cols, 2015; Chang y cols, 2018, Geradts y cols, 2011; Muenst y cols, 2013; Soini y cols, 2011). En nuestro grupo de tumores, SNAIL fue detectado en un 20,8% de las muestras analizadas, porcentaje similar al descrito por otros autores (Geradts y cols, 2011; Muenst y cols, 2013), sin embargo, no encontramos asociación entre su expresión y la presencia de metástasis a linfonodo. A pesar de esta falta de asociación, el 66,6% de las muestras con marca para SNAIL presenta metástasis a linfonodo (14/21), reflejando la importancia de este factor de transcripción en este proceso.

SNAIL es un represor directo de la expresión del marcador epitelial E-cadherina (Batlle y cols, 2000; Peinado y cols, 2004). En los tumores analizados, la expresión de SNAIL no presenta asociación con la pérdida de expresión de E-cadherina, principalmente porque un gran número de tumores con pérdida de E-cadherina no presenta expresión de SNAIL. A pesar de esto, el 76,19% de las muestras con expresión de SNAIL presenta expresión baja/ausente de E-cadherina, reflejando el rol inhibitorio de SNAIL sobre la expresión de este marcador epitelial.

La expresión del factor de transcripción SLUG en tumores de mama también se encuentra asociada a la presencia de metástasis en nodos linfáticos (Cao y cols 2015). En nuestras muestras, detectamos expresión de SLUG en 12 de los 101 tumores analizados (11,8%), porcentaje inferior a lo descrito por otros autores (Li y cols, 2014; Cao y cols 2015; Grzegorzolka

y cols 2015). Al igual que lo observado para SNAIL, no encontramos asociación entre la expresión de SLUG y la presencia de metástasis en nodos linfáticos. En este caso el porcentaje de tumores con expresión de SLUG y presencia de metástasis en linfonodos es de 41,6%, inferior a lo observado para SNAIL (66,6%). Esta observación puede deberse a diferencias en el éxito para hacer metástasis que presentan las células con expresión de SNAIL y SLUG. En modelos animales se ha descrito que las células de cáncer de mama que expresan SNAIL tienen un mayor éxito en formar metástasis detectables en comparación a las células con expresión de SLUG (Ye y cols, 2015), lo cual explicaría lo observado en nuestros tumores. En nuestras muestras, encontramos asociación entre la expresión de SLUG y el grado tumoral (tabla 2, manuscrito), concordando con publicaciones previas (Cao y cols, 2015), siendo ésta la única característica clínicopatológica que se asocia a la expresión de este factor de transcripción.

Al igual que su homólogo SNAIL, SLUG reprime la expresión de E-cadherina uniéndose a su promotor, aunque con menor afinidad (Bolós y cols, 2016; Hajra y cols, 2002), sin embargo, en nuestras muestras, no encontramos asociación entre la expresión de SLUG y la pérdida de E-cadherina (tabla 2, manuscrito). A pesar de esto, observamos que 11 de los 12 tumores que presentan expresión de SLUG son tumores que presentan expresión baja/ausente de E-cadherina, lo cual reflejaría el rol inhibidor de SLUG sobre esta proteína de adhesión celular, y en la mantención del fenotipo asociado a la transición epitelio-mesénquima en cáncer.

ZEB1 es el factor de transcripción más frecuentemente expresado en nuestras muestras, siendo detectado en el 35,6% de los tumores analizados. Son pocos los trabajos que analizan la expresión de ZEB1 a nivel de proteína en cáncer de mama, existiendo además gran variabilidad en los porcentajes de expresión descritos (desde 0-60%, Ang y cols, 2017; Geradts y cols, 2011; Soini y cols, 2011). A pesar de que la expresión de ZEB1 en el tumor primario ha sido descrita

como asociada a la presencia de metástasis a linfonodo en los pacientes con cáncer de mama (Ang y cols, 2017), nosotros no encontramos esta asociación, ni tampoco asociación con otras características clínicopatológicas de los tumores. Esta variabilidad encontrada en la expresión de ZEB1 en tumores de mama puede deberse a una expresión transitoria de este factor de transcripción, la cual sería suficiente para inducir los cambios moleculares necesarios para el proceso de EMT.

En modelos celulares de cáncer de mama, se ha descrito que SNAIL tiene la capacidad de unirse al promotor de ZEB1 y activar su expresión (Ye y cols, 2015). Interesantemente, un tercio de los tumores con expresión de ZEB1 presenta también expresión de SNAIL (n=12), siendo los dos factores de transcripción más frecuentemente co-expresados en nuestros tumores. Esto sugiere que, en el tumor, SNAIL induce la expresión de ZEB1, y que en los tumores donde no hay co-expresión, SNAIL ya dejó de expresarse.

ZEB1 actúa como represor transcripcional de E-cadherina, uniéndose a su promotor y reclutando remodeladores de cromatina para inhibir su expresión (Eger y cols, 2005; Sánchez-Tillo y cols, 2010). En nuestras muestras no encontramos asociación entre la expresión de ZEB1 y E-cadherina, sin embargo, observamos que el 80,5% de los tumores con expresión de ZEB1 presentan pérdida de este marcador epitelial. Junto con esto, los tumores que presentan el mayor puntaje-H para ZEB1 son principalmente tumores con E-cadherina baja/ausente, reflejando el rol inhibitor de ZEB1 en su expresión.

La participación de TWIST en la metástasis fue descrita inicialmente en líneas celulares de cáncer de mama, demostrando que su sobre-expresión induce la pérdida de E-cadherina y promueve el aumento de vimentina (Yang y cols, 2004). En nuestras muestras, encontramos expresión de TWIST en sólo 11 tumores (10,9%), sin encontrar asociación con la pérdida de

expresión de E-cadherina. Si bien este porcentaje es bajo, este no es el primer trabajo en describir un bajo porcentaje de tumores de mama con expresión de TWIST a nivel de proteína (Soini y cols, 2011). De manera contraria a lo observado para los otros factores de transcripción analizados en este estudio, la mayoría de los tumores con expresión de TWIST son tumores sin metástasis a linfonodo (8/11 tumores). Tampoco encontramos asociación entre ambas variables. Si encontramos asociación entre la expresión de TWIST y el tamaño del tumor primario. Esta asociación se ha descrito en varios trabajos, como recogen Qiao y cols, (2017) en su meta-análisis, sin embargo, TWIST no estaría involucrado directa o indirectamente en la proliferación celular (Yang y cols, 2004), sugiriendo que ambos eventos serían independientes en el tumor. Como mencionamos anteriormente, la expresión de TWIST y de E-cadherina no presentaron asociación en nuestras muestras, sin embargo, 10 de los 11 tumores con expresión de TWIST presentan pérdida de expresión de E-cadherina. Esta tendencia, observada para los 4 factores de transcripción incluidos en este estudio, sería reflejo del rol represor de estos factores de transcripción sobre E-cadherina.

En nuestro grupo de tumores, ninguno de los factores de transcripción analizados presentó asociación con la presencia de metástasis a linfonodo. Esto fue explorado en tumores que expresan uno, dos, tres o cuatro de los factores de transcripción estudiados. Además, tampoco se encontró asociación con el subtipo tumoral o el estado de ER. A pesar de esta falta de asociación, la expresión de los factores de transcripción que inducen EMT se encuentra relacionada a la pérdida de expresión de E-cadherina en un 79,2 % de los tumores con expresión de estos factores (42/53). La expresión de los factores de transcripción que promueven la transición epitelio-mesénquima es un evento temprano en el desarrollo de la metástasis, induciendo cambios moleculares persistentes en las células tumorales, que finalmente llevarán

al desarrollo de un tumor secundario, como la pérdida de E-cadherina (Thiery y cols, 2002). Debido a que estos tres eventos deben ocurrir de manera secuencial, nosotros no esperaríamos encontrar una co-ocurrencia de éstos en un mismo paciente. Debido a esta razón, la falta de asociación entre la expresión de los factores de transcripción que promueven EMT y la pérdida de E-cadherina o la ocurrencia de metástasis, no descarta el hecho de que esté ocurriendo la transición epitelio-mesénquima en los tumores de cáncer de mama. Experimentos en modelos animales demuestran que la expresión transitoria de SNAIL es necesaria para incrementar el número de metástasis en ratones, pero su expresión continua lleva a una disminución en el número de metástasis formadas (Tran y cols, 2014). En relación a esto, nosotros proponemos que un escenario similar debe estar ocurriendo en los tumores humanos, existiendo una expresión temporal de los factores de transcripción que inducen la transición epitelio-mesénquima. Esta proposición es concordante con el hecho de que el 81,5% (44/54) de los tumores con metástasis a linfonodo presentan pérdida de expresión de E-cadherina, y solo el 37% (20/54) mantienen la expresión de los factores de transcripción que inducen EMT.

Como mencionamos anteriormente, SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST inhiben la expresión de E-cadherina a través del reclutamiento de remodeladores de cromatina al promotor de E-cadherina. Junto con esto, la metilación del promotor de E-cadherina es un evento frecuente en cáncer de mama (Liu y cols, 2016), y la DNA metil-transferasa 1 (DNMT1) es reclutada por ZEB1 al promotor de E-cadherina en cáncer de mama (Fukagawa y cols, 2015). Esta evidencia respalda la idea de una expresión transitoria del factor de transcripción ZEB1 y de su unión al promotor de E-cadherina, seguido de una marca epigenética estable, como metilación del promotor, manteniendo la represión de sus genes blanco. Debido a que la represión de E-cadherina persiste

en los tumores por más tiempo que la expresión de los factores de transcripción, pareciera ser que E-cadherina es un mejor predictor del riesgo de metástasis en cáncer de mama.

8.2. La pérdida de expresión de microRNAs en cáncer contribuye al desarrollo de la metástasis

Los microRNAs son importantes moduladores del desarrollo de la metástasis a través de la regulación de inductores de EMT, y la desregulación en su expresión es una característica común en distintos tipos de cáncer. En esta tesis identificamos microRNAs que se encuentran disminuidos en los tumores que presentan expresión de los factores de transcripción que promueven EMT, con el fin de encontrar nuevos microRNAs que regulen su expresión. En los tumores con expresión de SNAIL, SLUG, ZEB1 o TWIST, identificamos 94 microRNAs se encuentran disminuidos, en comparación a los tumores sin expresión de ellos. Se ha descrito que estos factores de transcripción son capaces de disminuir la expresión de microRNAs a través de la unión a su promotor, como es el caso de ZEB1 y miR-200 o SNAIL y miR-192/194 (Burk y cols, 2008; Przygodzka y cols, 2019), sugiriendo que en este grupo de microRNAs existen tanto microRNAs blancos de regulación de estos factores de transcripción, como microRNAs reguladores de la expresión de estos factores. En este grupo de 94 microRNAs realizamos un análisis in silico para identificar microRNAs que fueran potenciales reguladores de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST. A partir de este análisis, seleccionamos seis microRNAs para validar experimentalmente: miR-196a, miR-202, miR-210, miR-22, miR-34b, y miR-331. Junto con estos microRNAs, añadimos a miR-30a y miR-1271 como controles positivos en nuestro estudio, ya que se encuentran descritos como reguladores de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST (Chang y cols, 2016; Liu y cols, 2016; Xiao y cols, 2019). De los seis microRNAs seleccionados

para su validación, cinco demostraron ser reguladores de sus blancos predichos *in silico* a través de su región 3'UTR en ensayos de gen reportero luciferasa: miR-196a para SNAIL y ZEB1, miR-210 para SNAIL, miR-202 para TWIST, miR-22 para ZEB1 y miR-331 para SLUG (figura 2, manuscrito). Todos estos microRNAs son nuevos reguladores de estos factores de transcripción, sugiriendo ser potenciales moduladores de EMT.

MiR-196a es un microRNA cuya expresión encontramos disminuida en los tumores que presentan expresión de los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST, en comparación a los tumores sin expresión de estos factores de transcripción. Junto con esto, miR-196a también se encuentra sub-expresado en los tumores que presentan metástasis a linfonodo, sugiriendo que su pérdida sería relevante en este proceso. El análisis *in silico* sugirió a miR-196a como regulador de la expresión de SNAIL y ZEB1 a través de su región 3'UTR. Esta predicción la confirmamos a través de los ensayos de gen reportero, donde miR-196a fue capaz de actuar a través de la región 3'UTR de SNAIL y ZEB1, sugiriendo que este microRNA es un potencial inhibidor de EMT en cáncer (figura 2, manuscrito). Si bien ambas regiones 3'UTR fueron sensibles a la transfección de miR-196a, los niveles de represión alcanzados en los ensayos de gen reportero fueron mayores a través de la región 3'UTR de ZEB1. Este resultado es interesante debido a que la región 3'UTR de ZEB1 cuenta con sitio único predicho para la unión de miR-196a, a diferencia de los tres sitios de unión predichos en la región 3'UTR de SNAIL (tabla 4, métodos). Si bien nosotros no validamos la funcionalidad de cada uno de los sitios de unión, esta observación indicaría que el hecho de existir múltiples sitios de unión para un mismo microRNA en su mRNA blanco no es indicador de una mayor represión por el microRNA (Werfel y cols, 2017).

El efecto de miR-196a sobre la metástasis en cáncer de mama ha sido previamente estudiado en cultivo celular. Se ha descrito que la sobre-expresión de miR-196a en la línea celular MDA-MB-231 tiene efectos anti-metastásicos al disminuir la migración e invasión celular (Li y cols, 2010). En nuestros experimentos, miR-196a también disminuyó la capacidad de invadir de la línea celular MDA-MB-231, apoyando los resultados publicados, sin embargo, la migración celular no se vio afectada de manera significativa en nuestros experimentos (figura 4, manuscrito). El análisis de marcadores de EMT indicó que la transfección de miR-196a no es suficiente para revertir la expresión de vimentina e inducir la expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231 (figura 6 y 7, resultados adicionales). Tomando en cuenta este resultado, junto con el bajo efecto de miR-196a sobre la migración celular, nuestros resultados sugieren que la sobre-expresión de miR-196a revierte de manera parcial el fenotipo mesenquimal de esta línea celular.

El efecto de miR-196a sobre la proliferación celular en cáncer de mama no ha sido descrito hasta la fecha. En nuestros experimentos, observamos que la transfección de miR-196a en las células MDA-MB-231 disminuye la proliferación celular, medida por la expresión de Ki67, en aproximadamente un 50% (figura 5, manuscrito). Esto indica que miR-196a actuaría como un microRNA supresor tumoral en cáncer de mama, de manera opuesta a lo descrito en otros tipos de cáncer (Hou y cols, 2014; Jin y cols, 2016). A pesar de esta reducción en el potencial proliferativo de las células, la formación de colonias no se vio afectada frente a la transfección de miR-196a, indicando que la disminución del potencial proliferativo observado no es suficiente para disminuir su capacidad clonogénica, y que otros factores deben estar actuando para contrarrestar este efecto.

La transfección de miR-196a en las células MDA-MB-231 redujo los niveles endógenos de ZEB1 en aproximadamente un 50%, confirmando a ZEB1 como un nuevo blanco de regulación por miR-196a en cáncer de mama. Este resultado demuestra también que la disminución en la invasión de la línea celular MDA-MB-231 estaría asociada a la disminución de la expresión de ZEB1, tal como lo describe la literatura (Drake y cols, 2009). En fibroblastos normales, se ha demostrado que TGF- β , inductor de la expresión de ZEB1, produce una disminución de la expresión de miR-196a (Honda y cols, 2012; Joseph y cols, 2014). Dado el efecto que encontramos de miR-196a sobre ZEB1, podemos sugerir que el silenciamiento de miR-196a, en respuesta a TGF- β , es un mecanismo necesario para asegurar la expresión de ZEB1 en cáncer. Contrario a lo que observamos con ZEB1, los niveles endógenos de SNAIL no se vieron afectados al transfectar miR-196a en las células MDA-MB-231, a pesar de que los ensayos de gen reportero lo confirmaron como un blanco de regulación de este microRNA. Esto indica que en este modelo celular SNAIL no sería blanco de miR-196a, sin embargo, no podemos descartar que miR-196a regule los niveles de SNAIL en el tejido tumoral. La discordancia de este resultado con los ensayos de gen reportero puede deberse, entre otros factores, a 1) las diferencias en la accesibilidad del complejo represor miRISC a sus sitios de unión debido al plegamiento del mRNA de SNAIL (Kertesz y cols, 2007), 2) que la afinidad predicha *in silico* del microRNA por su blanco no es suficiente para generar su reconocimiento en condiciones fisiológicas, o 3) que miR-196a estaría privilegiando su unión a otros mRNA blanco. Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, nuestros resultados sugieren que la pérdida de expresión de miR-196a en los tumores de mama favorece la expresión de ZEB1, contribuyendo a la formación de metástasis a linfonodo a través de un aumento en la invasión y proliferación

celular. Esto se podría comprobar complementando los estudios realizados en cultivo celular con estudios en modelos animales.

El microRNA miR-202 es un microRNA cuya función en cáncer de mama ha sido pobremente explorada. Durante el desarrollo de esta tesis, se publicó el primer trabajo donde se describe a miR-202 como un microRNA anti metastásico en cáncer de mama (Gao y cols, 2018). Aquí, se demuestra que miR-202 disminuye la migración e invasión de la línea celular MDA-MB-231 de manera similar a nuestros resultados. Junto con el efecto anti-metastásico de miR-202 descrito en el trabajo de Gao y cols, se describe la disminución de la proliferación celular en aproximadamente 25%. En nuestros experimentos miR-202 no tuvo efecto sobre la proliferación celular medida a través de la expresión de Ki67 (figura 5A, manuscrito). Sin embargo, nuestros resultados se encuentran respaldados por los ensayos de formación de colonias, donde miR-202 no tuvo efecto (figura 5B, manuscrito). Esta discrepancia con los resultados previamente publicados podría explicarse en la metodología. El ensayo utilizado por Gao y cols, llamado ensayo MTT, es un ensayo colorimétrico que detecta la formación de un colorante de manera proporcional al número de células. Es decir, no mide proliferación celular, sino que mide de manera indirecta la cantidad de células presentes en la placa de cultivo a través de su actividad metabólica, excluyendo otros factores como la apoptosis. En células de osteosarcoma y cáncer de próstata, miR-202 tiene un rol pro-apoptótico (Sun y cols, 2014; Zhang y cols, 2018), sugiriendo que el aumento en la muerte celular podría estar influyendo en los resultados descritos por Gao y cols.

Utilizando las líneas celulares T47D y MCF7, Xu y cols (2019) reafirmó recientemente el efecto anti-metastásico de miR-202 en cáncer de mama, lo que indica que su efecto no se restringe a modelos celulares de cáncer de mama con fenotipo triple negativo. En este trabajo se demuestra

además que los niveles de la metaloproteasa MMP2 disminuyen ante la transfección de miR-202, reafirmando el efecto de este microRNA en la invasión celular. La transfección de miR-202 genera cambios en la expresión de los marcadores de transición epitelio-mesénquima E-cadherina y N-cadherina en las líneas celulares T47D y MCF7. Si bien nosotros no analizamos el marcador mesenquimal N-cadherina, si observamos una disminución en la expresión de vimentina al transfectar miR-202 en la línea celular MDA-MB-231 (figura 7, resultados adicionales), sugiriendo que en nuestro modelo celular miR-202 también puede revertir la expresión de marcadores mesenquimales. Por el otro lado, no detectamos expresión de E-cadherina en las células MDA-MB-231 en respuesta a miR-202 (figura 6, resultados adicionales), contrario a lo descrito en las líneas T47D y MCF7. Esto refleja una condición celular diferente en relación al proceso de EMT en estos tipos celulares. A este respecto la línea celular MDA-MB 231 es un modelo para estudiar metástasis. En este mismo ámbito, en l líneas celulares de cáncer de piel se ha descrito que el silenciamiento de SNAIL a través de siRNAs revierte la expresión de marcadores mesenquimales, sin inducir la expresión de E-cadherina, por lo que nuestros resultados no serían extraños (Olmeda y cols, 2007). Esta falta de expresión de E-cadherina puede deberse a que su promotor se encuentra metilado en las células MDA-MB-231 (Paz y cols, 2003), sugiriendo que miR-202 no es capaz de revertir esta marca epigenética. En resumen, miR-202 produce una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima en la línea celular MDA-MB-231.

En nuestras muestras, miR-202 se encuentra disminuido en tumores con expresión de los factores de transcripción SNAIL y TWIST. Seleccionamos a miR-202 como microRNA de interés debido a que fue predicho *in silico* como regulador de TWIST, lo cual confirmamos a través de los ensayos de gen reportero (figura 2, manuscrito). En concordancia con este

resultado, recientemente ha sido demostrado que miR-202 disminuye los niveles de TWIST en las líneas celulares de cáncer de mama T47D y MCF7 (Xu y cols, 2019), sin embargo, en nuestro modelo celular la proteína TWIST no fue detectada. Debido a esto, no pudimos confirmar el efecto de miR-202 sobre la expresión de TWIST en la línea celular MDA-MB-231, pero si reafirmamos su rol como un microRNA anti metastásico (figura 4, manuscrito). Tomando en cuenta nuestros resultados, podemos sugerir que la pérdida de expresión de miR-202 en el tejido de cáncer de mama favorecería la expresión de TWIST en las células, y el desarrollo de metástasis a través de un incremento en la invasión celular.

En nuestros tumores encontramos que la expresión de miR-210 se encuentra disminuida en tumores con expresión de los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST, y fue predicho *in silico* como regulador de SNAIL, SLUG y TWIST. La regulación de TWIST por miR-210 fue validada por Yoshino y cols (2017) en cáncer de células renales, apoyando nuestra predicción. En nuestro trabajo, los ensayos de gen reportero indicaron que la región 3'UTR de SNAIL es susceptible a ser regulada por miR-210, no así la de SLUG a pesar de contar con tres sitios de unión predichos para miR-210 (Tabla 5). Esto sugiere que estos sitios de unión para miR-210 en la región 3'UTR de SLUG no son funcionales. A pesar de confirmar a SNAIL como blanco de miR-210 en los ensayos de gen reportero, la transfección de miR-210 en las células MDA-MB-231 no generó cambios en los niveles endógenos de SNAIL, indicando que en este modelo celular miR-210 no regula la expresión de SNAIL. Contrario a esto, los niveles de SLUG tendieron al alza, aunque este aumento no presenta diferencia estadísticamente significativa con el microRNA control negativo.

MiR-210 es un microRNA que ha sido estudiado principalmente en condiciones de hipoxia (Bavelloni y cols, 2015; Dang y Myers, 2015). En cáncer de mama, se ha demostrado que la

hipoxia induce la expresión de miR-210 en la línea celular MCF7, promoviendo la tumorigenicidad en esta línea celular (Tang y cols, 2018). En nuestros experimentos, demostramos que la transfección de miR-210 en las células MDA-MB-231 disminuye la migración y la invasión celular, proponiendo a miR-210 como un microRNA anti-metastásico bajo condiciones normóxicas. De la mano con esto, miR-210 también disminuyó la formación de colonias en las células transfectadas, sin afectar la proliferación celular. Nosotros sugerimos que miR-210 estaría afectando la formación de colonias mediante otro mecanismo, como el aumento de la apoptosis (Li y cols, 2017). Tomando en cuenta los resultados de nuestros experimentos en cultivo celular, podemos sugerir que la pérdida de expresión de miR-210 en los tumores de mama contribuye al desarrollo de la metástasis a través del aumento de la migración y la invasión celular. Por otra parte, la proliferación celular también estaría favorecida por la pérdida de miR-210.

El microRNA miR-22 ha sido descrito como un oncomir y también como un supresor tumoral, y se encuentra sub-expresado en distintos tipos de cáncer, incluido cáncer de mama (Wang y cols, 2017). En nuestros tumores, encontramos que miR-22 se encuentra disminuido en tumores con expresión de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST, y mediante análisis in silico lo encontramos predicho como regulador de SNAIL y ZEB1. La regulación de SNAIL por miR-22 se encuentra validada en cáncer gástrico y de vejiga, respaldando nuestro análisis (Zuo y cols, 2015; Xu y cols, 2018). Nuestros ensayos de gen reportero validan a miR-22 como regulador de ZEB1, sugiriendo que el rol anti-metastásico de este microRNA estaría potenciado por la represión de ZEB1 en cáncer, y que ZEB1 sería blanco de regulación por miR-22 a través de un sitio único de unión en su región 3'UTR.

El efecto de miR-22 en metástasis de cáncer de mama ha sido poco estudiado, siendo el mRNA de SIRT1 su principal blanco descrito, y demostrando su capacidad de disminuir la migración, invasión y proliferación celular en las células MCF7 (Zou y cols, 2017; Zhang y cols, 2017). En nuestros experimentos, miR-22 disminuye tanto la migración como la invasión de la línea celular MDA-MB-231, coincidiendo con lo previamente descrito. En cáncer de vejiga, miR-22 reprime la expresión de metaloproteasas (Zuo y cols, 2015), sugiriendo que en cáncer de mama, miR-22 inhibe la invasión celular a través de la represión de estas enzimas. En la línea celular MDA-MB-231, la disminución que observamos en la movilidad celular va acompañada de una baja en la expresión del marcador mesenquimal vimentina, de manera similar a lo que ocurre en cáncer de vejiga (Xu y cols, 2018), indicando que miR-22 es capaz de revertir las características mesenquimales de la línea celular MDA-MB-231. Sin embargo, nuevamente observamos que la transfección del microRNA evaluado no generó cambios en la expresión de E-cadherina, indicando que la reversión de la transición epitelio-mesénquima en nuestro modelo celular es parcial.

Está descrito que miR-22 disminuye la proliferación celular a través del bloqueo del ciclo celular, y que induce de la apoptosis en modelos celulares de cáncer de mama (Xu y cols, 2011; Zhang y cols, 2017). Nuestros resultados en los ensayos de formación de colonias y detección de Ki 67 van en línea con lo descrito. Está descrito que en la línea celular MDA-MB-231, miR-22 promueve la apoptosis Zhang y cols (2017). Mediante el análisis de la expresión de Ki67, nosotros comprobamos que miR-22 reduce también el potencial proliferativo de las células, lo que se traduce en un menor número de colonias en los ensayos clonogénicos. Este doble efecto de miR-22 sobre la proliferación y la apoptosis podría explicar por qué miR-22 es el microRNA que más disminuye la formación de colonias en nuestros experimentos.

Junto con disminuir las características metastásicas y proliferativas de la línea celular MDA-MB-231, la transfección de miR-22 disminuyó los niveles endógenos de ZEB1 en aproximadamente un 50%, tal como observamos con miR-196a (figura 3, manuscrito). De esta manera respaldamos nuestros resultados del ensayo de gen reportero, confirmando que ZEB1 es un nuevo blanco de regulación de miR-22 en cáncer de mama. Interesantemente, la co-transfección de miR-22 y miR-196a, ambos demostrados como reguladores de ZEB1 en este trabajo, no generó una disminución significativamente mayor a la generada por cada microRNA de manera independiente, sugiriendo que ambos microRNAs competirían por la unión a la región 3'UTR de ZEB1, en vez de actuar cooperativamente. Tomando en cuenta nuestros resultados en cultivo celular, sugerimos que la disminución en la expresión de miR-22 en el tejido de cáncer de mama favorece el crecimiento tumoral y el desarrollo de la metástasis a través de la expresión del factor de transcripción ZEB1.

miR-331 es un microRNA que ha sido poco estudiado en cáncer de mama, contando con solo tres publicaciones en la literatura. Ninguno de estos trabajos evalúa la participación de miR-331 en la metástasis, por lo que esta tesis sería el primero hasta el momento en evaluar el efecto de este microRNA en un modelo metastásico de cáncer de mama. La primera publicación describe a miR-331 como regulador directo de la expresión de HER2 en líneas celulares con fenotipo HER2+ (Leivonen y cols, 2014). El segundo trabajo describe a miR-331 como sobre-expresado en tumores malignos versus tumores benignos de mama (Papadopoulus y cols, 2018). El tercer trabajo, y más reciente, estudia la expresión de miR-331 en tumores con fenotipo luminal A, describiéndolo como sobre-expresado en el suero de pacientes con cáncer en comparación a muestras control, y específicamente aumentado en muestras de pacientes con metástasis distante (McAnena y cols, 2019). De manera contraria a lo descrito en mama, en cáncer de próstata y de

pulmón miR-331 se encuentra disminuido en el tejido tumoral (Epis y cols, 2009; Li y cols, 2019), indicando que su expresión varía dependiendo del tipo de cáncer. En nuestro grupo de tumores, encontramos a miR-331 disminuido en los tumores con expresión de SLUG, y predicho *in silico* como su regulador a través de un sitio en la región 3'UTR de este factor de transcripción. A través del ensayo de gen reportero luciferasa confirmamos esta predicción, indicando que miR-331 regularía la expresión de SLUG a través de su región 3'UTR, y por lo tanto sería un microRNA inhibidor de EMT. En nuestros experimentos observamos que la transfección de miR-331 en la línea celular MDA-MB-231 disminuye la migración e invasión celular, al igual que lo descrito en cáncer de pulmón (Li y cols, 2019). De esta manera demostramos por primera vez que el microRNA miR-331 inhibe la migración y la invasión en cáncer de mama. A pesar de observar una disminución en el comportamiento metastásico de las células MDA-MB-231, la expresión de vimentina y E-cadherina no se alteraron en respuesta a la transfección de miR-331, contrario a lo descrito por Li y cols (2019), indicando que este microRNA no es capaz de alterar la expresión de estas proteínas en cáncer de mama. En relación a la capacidad de miR-331 de regular la proliferación, hay evidencia contradictoria dependiendo del tipo de cáncer estudiado. En líneas celulares de carcinoma hepatocelular, miR-331 promueve la proliferación celular, mientras que en cáncer colorrectal inhibe la proliferación y promueve la apoptosis (Chang y cols, 2014; Zhao y cols, 2016). En nuestros experimentos, observamos que al transfectar miR-331 en las células MDA-MB-231, la proliferación no se ve alterada, al igual que la formación de colonias (figura 5, manuscrito). De esta manera, demostramos que miR-331 disminuye las capacidades metastásicas de la línea celular MDA-MB-231 sin alterar la proliferación celular.

La transfección de miR-331 en la línea celular MDA-MB-231 no alteró los niveles endógenos de SLUG, indicando que miR-331 no es capaz de regular la expresión de este factor de transcripción en este modelo celular. Sin embargo, al estar validado como blanco de regulación por nuestros ensayos de gen reportero, no podemos descartar a miR-331 como regulador de SLUG en los tumores de mama. De esta forma, el efecto anti-metastásico que observamos para miR-331 en la línea celular MDA-MB-231 podría estar dado por otro blanco no evaluado en este trabajo. Al igual que lo descrito por McAnena y cols (2019), en nuestros tumores no encontramos a miR-331 como diferencialmente expresado en relación a la presencia de metástasis en linfonodos.

El microRNA miR-34b pertenece a la familia miR-34, la cual se encuentra conformada por miR-34a, miR-34b y miR-34c, y sus respectivas hebras 5p y 3p (Hermeking, 2010). En cáncer de mama, la hebra 5p de miR-34b se encuentra estudiada, pero nada se sabe del efecto de la hebra 3p en la progresión tumoral y desarrollo de la metástasis, lo cual se extiende a otros tipos de cáncer. En este estudio, nos enfocamos en miR-34b-3p, el cual encontramos disminuido en los tumores con expresión de TWIST. Al realizar el análisis *in silico*, ambas plataformas de predicción utilizadas sugieren a miR-34b como regulador de TWIST, a través de un sitio de unión en la región 3'UTR. Sin embargo, los ensayos de gen reportero demostraron que miR-34b no es capaz de interactuar con la región 3'UTR de TWIST para regular la actividad luciferasa, descartándolo como regulador directo de su expresión. Este resultado es interesante debido a que miR-34a, miembro de su familia con el cual presenta gran similitud de secuencia, está descrito como regulador de TWIST en cáncer de mama (Imani y cols, 2017). A pesar de este resultado negativo, evaluamos la participación de miR-34b en el comportamiento metastásico de la línea celular MDA-MB-231, para determinar cómo la pérdida de expresión de

este microRNA contribuye a la formación de metástasis en cáncer de mama. La transfección de miR-34b en la línea celular MDA-MB-231 logró disminuir la migración, y en mayor medida la invasión celular, demostrando que miR-34b-3p actúa como un microRNA anti-metastático en cáncer de mama. En cáncer cervical miR-34b sólo afecta la migración celular, sin modificar la invasión (Córdova-Rivas y cols, 2019), lo que sugiere que la regulación de estas características metastásicas sería tejido-dependiente. En la literatura, no encontramos estudios sobre la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima asociada a miR-34b. De todas maneras, nuestros experimentos muestran que la expresión de vimentina y E-cadherina no se alteran en respuesta a miR-34b, indicando que la expresión de este microRNA no es suficiente para revertir el fenotipo mesenquimal de las células MDA-MB-231.

El análisis de expresión del marcador de proliferación Ki67 en células transfectadas con miR-34b indica que este microRNA no afecta la proliferación celular en cáncer de mama, de manera contraria a lo descrito en cáncer cervical y de pulmón (Mizuno y cols, 2017; Córdova-Rivas y cols, 2019). Junto con esto, al no verse alterada la formación de colonias en las células transfectadas con mir-34b, sugerimos que este microRNA no induce apoptosis en nuestro modelo celular, a diferencia de lo descrito en líneas celulares de cáncer de pulmón (Feng y cols, 2019). Estos resultados demuestran que en cáncer de mama miR-34b disminuye el potencial metastático de las células sin alterar el crecimiento tumoral, al igual que lo observado para miR-331.

Como mencionamos anteriormente, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, no detectamos la expresión de TWIST en la línea celular MDA-MB-231, por lo tanto, no pudimos evaluar el efecto de miR-34b sobre los niveles de este factor de transcripción. Teniendo en cuenta los resultados del ensayo de gen reportero luciferasa, nuestros datos

sugieren que, en los tumores primarios de cáncer de mama, la disminución de la expresión de miR-34b favorece la migración e invasión celular, por un mecanismo independiente de TWIST. El microRNA miR-1271 fue seleccionado en este trabajo como control positivo, debido a su rol como regulador de ZEB1 y TWIST en cáncer pancreático (Liu y cols, 2016). A diferencia de los otros microRNAs incluidos en este estudio, no encontramos a miR-1271 sub-expresado en los tumores analizados, aunque su expresión se ha descrito como disminuida en cáncer de mama (Du y Liu, 2018). Mediante los ensayos de gen reportero luciferasa, comprobamos que miR-1271 regula la expresión de ZEB1 y TWIST directamente mediante su región 3'UTR, de manera concordante con lo descrito (Liu y cols, 2016).

Poco se sabe del efecto de miR-1271 en cáncer de mama, y de su contribución al desarrollo de metástasis. En nuestros experimentos, observamos que la transfección de miR-1271 inhibe la migración, invasión y proliferación de la línea celular MDA-MB-231, al igual que lo descrito por Du y Liu (2018) en la línea celular MCF-7. Estos resultados indican que miR-1271 actúa como un inhibidor de la metástasis y el crecimiento tumoral en cáncer de mama, de manera independiente del subtipo tumoral.

Un trabajo recientemente publicado evalúa el efecto de miR-1271 en la línea celular MDA-MB-231, entre otras líneas de cáncer de mama, describiendo a SLUG como blanco directo de regulación por este microRNA (Liu y cols, 2019). En este trabajo, los autores describen a miR-1271 como un inhibidor de la invasión celular, respaldando nuestros resultados, sin embargo, nosotros no detectamos los cambios en la expresión de E-cadherina y vimentina descritos en esta publicación. Si coincidimos en el rol supresor tumoral de miR-1271 descrito por los autores y demostrado en nuestro trabajo mediante los ensayos de formación de colonias y expresión de

Ki67 (figura 5, manuscrito), y en el trabajo de Liu mediante crecimiento tumoral en animales inyectados con las células en estudio.

A pesar de que seleccionamos a miR-1271 por estar descrito como regulador de la expresión de ZEB1, esta regulación no había sido validada previamente en cáncer de mama. Mediante western blot, demostramos por primera vez que miR-1271 también puede disminuir los niveles de ZEB1 en la línea celular MDA-MB-231 (figura 3, manuscrito), lo cual contribuye a comprender el mecanismo de acción de este microRNA en cáncer de mama. Estos resultados sugieren que una disminución en la expresión de miR-1271 en tumores de mama favorece la expresión de ZEB1 y SLUG, promoviendo la migración, invasión y proliferación celular.

El microRNA miR-30a ha sido descrito como sub-expresado en muestras de cáncer de mama en comparación a tejido normal (Zhang y cols, 2014). En nuestras muestras, miR-30a converge como sub-expresado en los tumores con expresión de SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST, y también se encuentra sub-expresado en tumores con metástasis a linfonodo. En este estudio lo seleccionamos como control positivo ya que ha sido descrito como regulador de la expresión de SNAIL y SLUG. En cáncer de mama, la transfección transitoria de miR-30a en la línea celular SK-BR-3 reduce los niveles endógenos de SNAIL (Xiao y cols, 2019), y su transfección estable produce lo mismo con SLUG en las células MDA-MB-231 (Chang y cols, 2016). En nuestros experimentos en la línea celular MDA-MB-231 no pudimos replicar esta regulación, a pesar de que nuestros ensayos de gen reportero confirman a miR-30a como regulador de SNAIL y SLUG. En el caso de SNAIL, la discrepancia en los resultados podría estar dada por las diferencias en los modelos celulares de mama utilizados. La línea celular SK-BR-3 representa al subtipo de tumores HER2+, mientras que la línea celular MDA-MB-231 representa a los tumores triple negativo. Esto sugiere que el contexto celular influye en los resultados obtenidos. En el caso de

SLUG, sugerimos que la transfección transitoria de miR-30a en la línea celular MDA-MB-231 no es suficiente para disminuir los niveles de este factor de transcripción. Un dato relevante es que esta línea celular tiene mutación en un alelo del gen P53, y por lo tanto expresa una proteína mutante dominante (Hui y cols, 2006). Se ha demostrado que la expresión de mutantes de P53 interfiere con la ubiquitinación de SLUG a través de MDM2 y su degradación, alargando su vida media y estabilizando su expresión en líneas celulares de cáncer (Wang y cols, 2009). Esto sugiere que la ventana de tiempo en la cual realizamos nuestros experimentos no es suficiente para observar una disminución en los niveles de SLUG en la línea celular MDA-MB-231. Teniendo en cuenta estos antecedentes, no podemos descartar a miR-30a como regulador de SLUG en la línea celular MDA-MB-231.

De todas maneras, miR-30a demostró comportarse como un microRNA supresor tumoral y anti-metastásico en nuestro modelo celular, disminuyendo la invasión celular, la formación de colonias, y el potencial proliferativo de las células, lo que va en línea descrito en la literatura (Zhang y cols, 2014). Al igual que miR-202 y miR-22, miR-30a demostró ser capaz de disminuir la expresión del marcador mesenquimal vimentina en las células transfectadas, sin afectar la falta de expresión de E-cadherina en las células, lo que sugiere que miR-30a también puede revertir parcialmente EMT en nuestro modelo celular. Todos estos efectos observados estarían dados por la regulación de miR-30a sobre otros blancos distintos de SNAIL y SLUG.

Nuestros resultados sugieren que la disminución de la expresión de miR-30a en el tejido tumoral favorece la formación de metástasis a linfonodo a través del aumento de la invasión celular. Junto con esto, el crecimiento del tumor también se vería favorecido, ya que demostramos que miR-30a inhibe la proliferación celular. Si bien no pudimos demostrar la regulación de SNAIL y/o SLUG por miR-30a en nuestro modelo celular a pesar de demostrar su efecto en los ensayos

de gen reportero, no podemos descartar que en el tejido tumoral miR-30a esté regulando la expresión de estos dos factores de transcripción.

8.3. Relación entre los microRNAs evaluados y la metástasis a linfonodo

Todos los microRNAs evaluados en este estudio demostraron comportarse como microRNAs anti-metastásicos ya sea regulando la migración, la invasión celular o ambas características. Junto con esto, miR-1271, miR-30a, miR-196a y miR-22 también demostraron inhibir la proliferación celular, indicando que la pérdida de expresión de estos microRNAs no sólo contribuye al desarrollo de la metástasis, sino que también al crecimiento del tumor primario. Al profundizar en la relación de los microRNAs estudiados con la metástasis a linfonodo, encontramos a CCR7 como potencial blanco de miR-196a, miR-202 y miR-210, predicción que fue validada para miR-196a y miR-202 a través de los ensayos de gen reportero. Estos resultados sugieren que ambos microRNAs no solo inhibirían las características metastásicas descritas en este trabajo, sino que también la migración dirigida de las células tumorales hacia los ganglios linfáticos a través de la represión de CCR7. Interesantemente, miR-196a se encuentra sub-expresado en los tumores de pacientes con metástasis en los linfonodos, lo cual reafirma nuestra propuesta. Si bien la transfección de miR-196a y miR-202 no disminuyó los niveles endógenos de CCR7 en la línea celular MDA-MB-231, los resultados positivos obtenidos en los ensayos luciferasa nos apoyan la hipótesis de que estos microRNAs sean reguladores de CCR7 en el tejido tumoral.

Está descrito en la literatura que, en cáncer de mama, CCR7 es inducido por TGF- β , generando la migración de las células tumorales hacia los ganglios linfáticos en modelos animales (Pang y cols, 2016). Como mencionamos anteriormente, TGF- β también es capaz de inhibir la expresión

de miR-196a, lo que nos lleva a pensar en la relación de estos efectos. Tal como sugerimos para ZEB1, el silenciamiento de miR-196a por TGF- β podría funcionar como un mecanismo que asegure la expresión de CCR7 en las células, lo que sería interesante de evaluar en cáncer.

Fuera de toda predicción, encontramos que miR-30a disminuye los niveles endógenos de CCR7 en la línea celular MDA-MB-231, lo cual va de la mano con el rol anti-metastásico de miR-30a. Este microRNA no posee sitio de unión predicho en el mRNA de CCR7, sugiriendo que esta regulación es indirecta. Actualmente en la literatura se encuentran descritos 3 microRNAs como reguladores de la expresión de CCR7: let-7a, descrito en líneas celulares de cáncer de mama (Kim y cols, 2012), y miR-155 y miR-21, descritos en células dendríticas (Al Akoum y cols, 2015; Wang y cols, 2016). Nosotros sumamos miR-30a a esta lista, proponiéndolo como un regulador indirecto de la expresión de CCR7.

En nuestros tumores, miR-30a se encuentra en un grupo de 16 microRNAs que comparten: 1) expresión de los factores de transcripción que promueven la transición epitelio-mesénquima, 2) presencia de metástasis en ganglios linfáticos, y 3) expresión de CCR7 sobre la media. Estos hechos sugieren que la pérdida de expresión de miR-30a en cáncer de mama contribuye al desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos a través de CCR7. Al someter este grupo de 16 microRNAs a un análisis *in silico*, encontramos que otros tres microRNAs (miR-342-5p, miR-30a-3p y miR-150-5p) presentan sitios de unión predichos en el mRNA de CCR7, sugiriendo que estos microRNAs también podrían estar involucrados en el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos a través de la regulación de CCR7.

8.4. MicroRNAs como biomarcadores y blanco de terapia contra la metástasis

En nuestros tumores, miR-30a y miR-196a están sub-expresados en tumores que presentan metástasis a linfonodo, sugiriendo que la pérdida de expresión de estos microRNAs en el tumor contribuye al desarrollo de la metástasis en los linfonodos a través de la expresión de CCR7. A pesar de que otros autores han descrito previamente microRNAs diferencialmente expresados en relación a la presencia de metástasis en nodos linfáticos, nuestro trabajo es el primero en profundizar en el mecanismo mediante el cual estos microRNAs contribuyen a su desarrollo. Ninguno de estos trabajos previos ha descrito a miR-196a o miR-30a como diferencialmente expresados según la presencia de metástasis a linfonodo. Al comparar nuestros resultados con la literatura, encontramos coincidencia en 16 de los 27 microRNAs publicados por Avery-Kiejda y cols (2014) como diferencialmente expresados según la presencia de metástasis a linfonodo. Sin embargo, solamente dos de ellos, miR-210 y miR-29c coinciden con nuestro estudio como microRNAs sobre-expresado y sub-expresado, respectivamente, en tumores con metástasis a linfonodo. La discrepancia en la expresión de los otros 14 microRNAs podría estar dada por el grupo de tumores utilizados, ya que Avery-Kiejda utiliza exclusivamente tumores con fenotipo triple negativo (ER-/PR-/HER2-), lo que sugiere que la pérdida de expresión de estos microRNAs podría estar asociada al fenotipo tumoral. En el trabajo de Rask y cols (2014) se describen 17 microRNAs diferencialmente expresados según la presencia de metástasis a linfonodo, donde la sobre-expresión de miR-21 en tumores con metástasis a linfonodo coincide con nuestros resultados. Con el trabajo de Wang y cols (2014), sólo encontramos coincidencia con un microRNA, encontrándose miR-29c sub-expresado en tumores con metástasis a linfonodo en ambos grupos de estudio, mientras que con el trabajo de Chen y cols (2018) no encontramos coincidencias en los resultados. La falta de convergencia en los resultados

publicados indica que es necesario ampliar estos estudios, con el fin de identificar microRNAs que sirvan como marcadores de metástasis en la población. De esta forma, se podría mejorar el pronóstico de los pacientes a través de la detección temprana del potencial metastásico de los tumores.

En este trabajo, identificamos microRNAs que se encuentran sub-expresados en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama, y que inhiben las características metastásicas de un modelo celular de cáncer de mama. Debido a que la alteración de la expresión de microRNAs contribuye al desarrollo de metástasis, la identificación de microRNAs que regulen este proceso permitiría avanzar en terapias que permitan frenar la diseminación del tumor primario, y mejorar el pronóstico de los pacientes. Una de las dificultades en el uso de microRNAs como tratamiento contra el cáncer es la liberación específica de estas moléculas en el lugar donde se encuentra el tumor. Mediante el uso de nanopartículas, algunos trabajos dan una respuesta a esta dificultad, haciendo de los microRNAs una terapia promisorio. En modelos animales de cáncer de mama, se han utilizado nanopartículas para inhibir específicamente la sobre-expresión del microRNA pro-metastásico miR-10b en tumores primarios de mama en ratones, y disminuir de esta forma la presencia de metástasis en los linfonodos de estos animales (Yigit y cols, 2013). Las modificaciones presentes en las nanopartículas permiten que éstas se acumulen específicamente en el tumor primario, y mediante el uso de sondas anti-sentido, se inhibe el efecto de miR-10b. En linfoma se ha aplicado el mismo método, inhibiendo el microRNA pro-metastásico miR-155 (Babar y cols, 2012), sugiriendo que esta técnica puede ser utilizada en distintos tipos de cáncer. La misma estrategia se ha utilizado para re-expresar microRNAs cuya expresión se ha perdido en las células tumorales. El microRNA supresor tumoral miR-34a ha sido exitosamente re-expresado en células tumorales de mama y próstata mediante el uso de nanopartículas,

disminuyendo el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis en modelos animales (Deng y cols, 2014; Gaur y cols, 2015), ampliando las posibilidades para el uso de microRNAs como tratamiento contra el cáncer. Tomando en cuenta nuestros resultados, por ejemplo, el aumento específico de miR-22 en el tumor primario inhibiría el comportamiento metastásico de las células tumorales a través de la represión de ZEB1, y el crecimiento tumoral mediante la disminución de la proliferación celular. De esta manera, se podría disminuir la formación de metástasis en los pacientes, mejorando su pronóstico de vida.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir lo siguiente:

1. Los microRNAs evaluados en este estudio actúan como inhibidores de la metástasis regulando negativamente la migración e invasión celular en cáncer de mama. La pérdida de expresión de estos microRNAs en el tumor primario contribuiría al desarrollo de metástasis mediante el aumento del comportamiento metastásico de las células tumorales.
2. Los microRNAs miR-1271, miR-30a, miR-196a, miR-210 y miR-22 actúan como microRNAs supresores tumorales, inhibiendo la proliferación celular en un modelo celular de cáncer de mama.
3. Los microRNAs miR-1271, miR-196a y miR-22 regulan la expresión de ZEB1 en un modelo celular de cáncer de mama a través de su región 3'UTR. La pérdida de expresión de estos microRNAs en el tumor primario contribuiría a la expresión de ZEB1 en el tumor.
4. El microRNA miR-30a inhibe la expresión de CCR7 de manera indirecta en cáncer de mama. Su desregulación en cáncer contribuiría a la metástasis a linfonodo mediante la expresión de CCR7 en el tejido tumoral.

8. ANEXOS

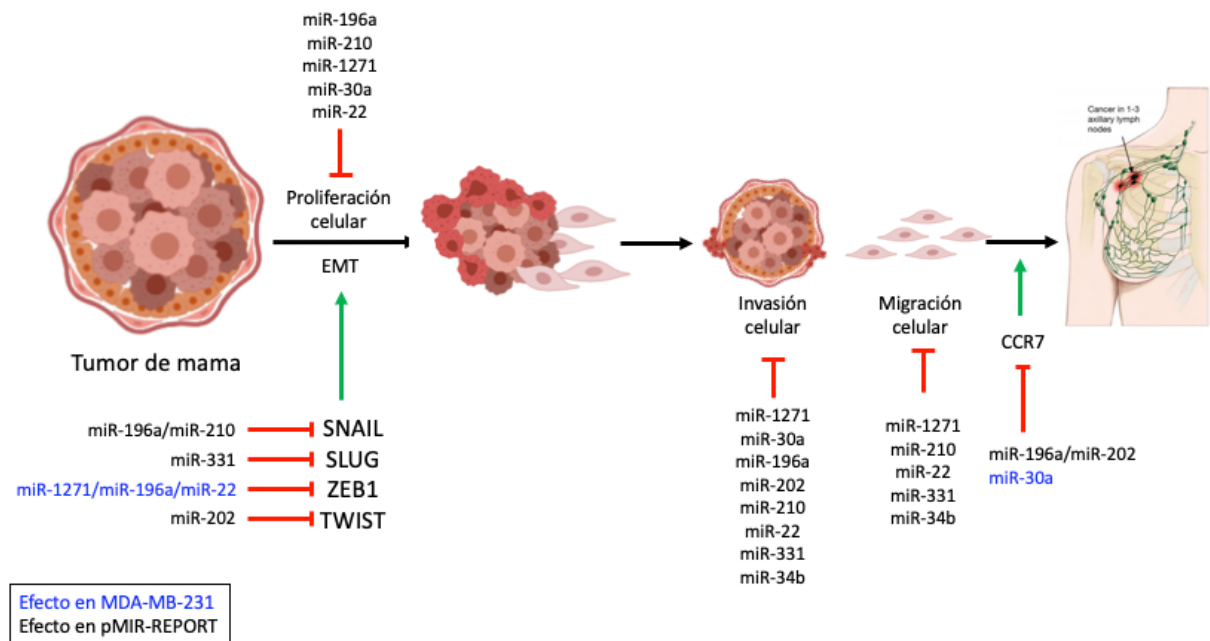


Figura 9. Esquema representativo del efecto de los microRNAs estudiados en distintas etapas de la progresión tumoral.

Tabla 6. Características de los 101 tumores utilizados en el estudio. N.C: no clasificado, S.I: sin información.

ID Tumor	Tamaño (cm)	Grado tumoral	Linfonodo	Subtipo tumoral	SNAIL (H-score)	SLUG (H-score)	ZEB1 (H-score)	TWIST (H-score)	E-cadherina (%)	CCR7 (H-score)
T_001	3.6	3	Negativo	Luminal B	0	0	110	0	96.7	156.7
T_002	2.8	-	Negativo	Triple negativo	40	0	100	0	0.0	102
T_003	2.5	3	Positivo	Luminal A	0	0	30	0	45.5	112
T_004	0.9	3	Negativo	HER2+	0	0	60	60	13.8	130
T_005	1.7	2	Negativo	Luminal A	0	0	40	0	19.5	20
T_006	3.2	2	Negativo	Luminal B	0	0	0	0	81.0	220
T_007	6	-	Positivo	Triple negativo	0	0	0	0	0.0	3
T_008	6.5	1	Positivo	N.C	70	0	0	0	4.4	23.3
T_009	1.5	3	Negativo	Triple negativo	0	55	0	0	66.6	152
T_010	3.5	3	Negativo	Luminal A	0	35	30	0	0.0	10
T_011	4	3	Positivo	Triple negativo	0	0	0	0	0.0	95
T_012	2	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	21.8	92.5
T_013	5	3	Negativo	Luminal B	90	70	0	0	19.1	215
T_014	3	3	Positivo	Luminal B	0	0	30	0	41.6	38
T_015	8.5	3	Positivo	Triple negativo	50	0	0	0	66.7	80
T_016	2	1	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	63.4	0
T_017	2.5	2	Positivo	Luminal A	50	0	60	80	3.3	167
T_018	3.5	1	Positivo	Luminal A	10	0	45	0	89.2	85
T_019	3	3	Positivo	Triple negativo	40	0	70	40	1.6	185
T_020	5.5	1	Positivo	Luminal A	30	0	20	0	99.0	188.3
T_021	1.8	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	60	98.1	66.7
T_022	1.4	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	0.0	120
T_023	6	2	Negativo	Triple negativo	0	0	0	0	0.0	0
T_024	3.5	2	Positivo	Luminal A	0	0	60	0	84.1	180
T_026	1.7	2	Positivo	Triple negativo	0	0	75	0	76.5	10
T_027	1.5	1	Negativo	Luminal B	0	0	40	0	75.9	98
T_028	7	-	Positivo	Luminal /HER2	35	0	80	0	0.0	150
T_030	3	2	Positivo	Luminal A	0	30	0	0	97.2	181.7
T_031	1.7	2	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	91.9	125
T_032	4	3	Positivo	Luminal B	0	0	0	0	18.6	216.7
T_033	7	1	Positivo	Luminal B	0	0	0	0	21.0	162.5
T_034	3.8	-	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	0.0	137.5
T_035	2.5	-	Positivo	Luminal B	0	0	30	0	1.1	276.7
T_036	2.5	3	Negativo	Luminal/HER2	190	50	60	30	13.2	68.3
T_037	2.8	2	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	48.0	140
T_038	3.5	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	53.4	300

T_043	2.5	2	Negativo	HER2+	0	0	0	0	90.1	193.3
T_044	2.1	3	Positivo	Triple negativo	130	80	80	0	43.4	193.3
T_045	4.5	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	4.3	235
T_046	3	3	Negativo	Triple negativo	0	0	0	0	68.4	188.3
T_047	2	1	Negativo	Luminal A	0	0	150	60	68.4	230
T_048	5.5	3	Positivo	Luminal B	0	0	0	0	24.4	83.3
T_049	2	-	Positivo	Luminal A	0	0	210	0	62.7	257.5
T_050	1.4	2	Positivo	Luminal A	0	0	210	0	13.7	246.7
T_051	5.8	2	Negativo	Luminal/HER2	0	0	180	0	24.5	265
T_052	3	3	Negativo	Triple negativo	0	0	0	0	0.0	161.7
T_053	2.2	2	Positivo	Luminal/HER2	0	0	0	0	2.2	178.3
T_055	2.5	2	Negativo	Triple negativo	0	0	0	0	0.5	131.7
T_056	2.2	1	Positivo	Luminal/HER2	0	0	0	0	0.0	215
T_058	2.5	1	Negativo	Luminal A	80	0	0	0	23.1	188.3
T_059	3.2	3	Positivo	Luminal A	0	0	270	0	83.3	200
T_060	2.2	2	Positivo	Luminal A	50	0	0	0	93.8	183.3
T_061	3	3	Negativo	Luminal/HER2	0	0	0	0	1.1	146.7
T_062	2.1	3	Positivo	Luminal A	0	0	190	0	30.8	20
T_063	1.6	1	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	1.6	128.3
T_064	2	-	Negativo	Triple negativo	60	40	10	30	46.2	151.7
T_065	2.5	-	Positivo	Luminal A	95	0	0	0	0.0	165
T_067	2.2	3	Positivo	Luminal/HER2	0	60	100	0	19.4	200
T_068	4.2	1	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	24.5	226.7
T_069	1.8	2	Negativo	Luminal/HER2	60	0	20	210	48.6	206.7
T_070	1.5	2	Positivo	Luminal A	0	30	0	0	21.2	233.3
T_072	3.5	-	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	0.0	140
T_094	1.5	3	Positivo	Luminal A	10	0	0	0	20.7	190
T_095	9	-	Negativo	Triple negativo	0	0	60	80	55.0	128.3
T_096	2.5	3	Positivo	Luminal/HER2	0	0	60	0	60.0	235
T_097	2	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	15.8	190
T_098	2	1	Positivo	N.C	0	0	0	0	65.0	190
T_099	2	2	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	0.0	170
T_100	2.8	2	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	24.9	215
T_101	1.5	1	Negativo	Luminal A	0	0	0	20	46.3	90
T_102	2.1	1	Negativo	Triple negativo	0	0	0	0	23.6	210
T_103	1.6	1	Positivo	Luminal B	0	0	0	0	0.0	58.3
T_104	4.1	3	Negativo	Luminal/HER2	0	20	0	0	0.0	121.7
T_106	2.5	-	Positivo	Luminal A	60	0	0	0	0.0	110

T_108	2.1	2	Negativo	Luminal A	0	0	60	0	51.0	195
T_109	2.4	2	Positivo	Triple negativo	0	0	0	0	45.0	0
T_110	3	3	Positivo	Luminal /HER2	0	0	0	0	19.7	122.5
T_111	2.7	-	Negativo	Luminal/HER2	0	0	0	0	0.0	187.5
T_112	2.5	3	Positivo	HER2+	0	0	0	0	59.5	270
T_113	2.5	-	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	0.0	270
T_114	2.4	3	Negativo	Luminal A	0	20	0	0	32.4	243.3
T_115	4	3	Positivo	Triple negativo	0	50	240	0	12.5	136.7
T_116	3	1	Negativo	Luminal B	0	0	0	0	88.7	0
T_117	2.4	3	Negativo	Triple negativo	0	0	0	0	16.7	170
T_118	2.2	2	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	75.0	75
T_119	3.5	-	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	0.0	210
T_120	4.2	-	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	4.1	55
T_121	2.6	1	Negativo	Luminal A	0	0	0	0	46.1	150
T_122	1.8	2	Negativo	Luminal/HER2	0	0	0	0	77.7	160
T_123	2.5	2	Negativo	Luminal B	0	0	0	0	21.5	0
T_124	2	2	Positivo	Luminal/HER2	0	0	0	0	73.4	235
T_125	3.5	2	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	90.7	160
T_126	3.2	3	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	6.6	55
T_127	>2	-	Negativo	Luminal/HER2	35	0	0	0	83.8	155
T_128	>2	S.I	Negativo	Luminal B	0	0	75	0	52.4	133.3
T_129	1.6	2	Positivo	Luminal B	60	0	80	0	96.1	153
T_130	3	2	Negativo	Luminal B	0	0	50	0	88.8	155
T_131	2	-	Negativo	Luminal A	0	0	60	0	0.0	60
T_132	1.7	3	Positivo	Luminal/HER2	0	0	0	35	13.4	95
T_133	3.5	1	Positivo	Luminal A	0	0	0	0	15.0	170
T_134	2.4	3	Positivo	HER2+	40	0	35	0	73.8	177.5

9. REFERENCIAS

Ang L, Zheng L, Wang J, *et al.* Expression of and correlation between BCL6 and ZEB family members in patients with breast cancer. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 3985-3992. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5101>.

Ansieau S, Bastid J, Doreau A, *et al.* Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008; **14**: 79-89.

Agarwal V, Bell GW, Nam JW, *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *elife* 2015; **4**: e05005.

Al Akoum C, Akl I, Rouas R, *et al.* "NFAT-1, Sp-1, Sp-3, and miR-21: New regulators of chemokine C receptor 7 expression in mature human dendritic cells." *Hum Immunol* 2015; **76**: 307-317.

Avery-Kiejda KA, Braye SG, Mathe A, *et al.* Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2014; **14**: 51.

Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, *et al.* Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2012; **109**: E1695-E1704.

Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, *et al.* MiRNA-210: a current overview. *Anticancer Res* 2017; **37**: 6511-6521.

Batlle E, Sancho E, Francí C, *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 84.

Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003; **116**: 499-511.

Burk U, Schubert J, Wellner U, *et al.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* 2008; **9**: 582-589.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 76.

Cao YW, Wan GX, Sun JP, *et al.* Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci* 2015; **31**: 70-76.

- Castilla MÁ, Díaz-Martín J, Sarrió D, *et al.* MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes. *PloS one* 2012; **7**.
- Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; **331**: 1559-1564.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 563-572.
- Chang RM, Yang H, Fang F, *et al.* MicroRNA-331-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase. *Hepatology* 2014; **60**: 1251-1263.
- Chang CW, Yu JC, Hsieh YH, *et al.* MicroRNA-30a increases tight junction protein expression to suppress the epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting Slug in breast cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 16462.
- Chang HY, Tseng YK, Chen YC, *et al.* "High snail expression predicts a poor prognosis in breast invasive ductal carcinoma patients with HER2/EGFR-positive subtypes." *Surg Oncol* 2018; **27**: 314-320.
- Chen X, Wang YW, Zhu WJ, *et al.* A 4-microRNA signature predicts lymph node metastasis and prognosis in breast cancer. *Hum Pathol* 2018; **76**: 122-132.
- Córdova-Rivas S, Fraire-Soto I, Mercado-Casas Torres A, *et al.* 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 545.
- Dang K, Myers KA. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 6353-6372.
- De Herreros AG, Peiró S, Nassour M, *et al.* Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; **15**: 135-147.
- Deng X, Cao M, Zhang J, *et al.* Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. *Biomaterials* 2014; **35**: 4333-4344.
- Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC *et al.* Lymph node micrometastases from breast carcinoma. *Cancer* 1997; **80**: 1188-1197.
- Drake JM, Strohschein G, Bair TB, *et al.* ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 2207-2217.
- Du HY, Liu B. MiR-1271 as a tumor suppressor in breast cancer proliferation and progression via targeting SPIN1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; **22**: 2697-2706.

- Eger A, Aigner K, Sonderegger S, *et al.* DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; **24**: 2375.
- Epis MR, Giles KM, Barker A, *et al.* miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem* 2009; **284**: 24696-24704.
- Feng H, Ge F, Du L, *et al.* MiR-34b-3p represses cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in non-small-cell lung cancer (NSCLC) by targeting CDK4. *J Cell Mol Med* 2019; **23**: 5282-5291.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 453-458.
- Fisher B, Bauer M, Wickerham DL *et al.* Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; **52**: 1551-1557.
- Fukagawa A, Ishii H, Miyazawa K, *et al.* δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med* 2015; **4**: 125-135.
- Gao S, Cao C, Dai Q, *et al.* miR-202 acts as a potential tumor suppressor in breast cancer. *Oncol Lett* 2018; **16**: 1155-1162.
- Gaur S, Wen Y, Song JH, *et al.* Chitosan nanoparticle-mediated delivery of miRNA-34a decreases prostate tumor growth in the bone and its expression induces non-canonical autophagy. *Oncotarget* 2015; **6**: 29161.
- Geradts J, De Herreros AG, Su Z, *et al.* Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum Pathol* 2011; **42**: 1125-1131.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 593-601.
- Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **8**: 657.
- Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, *et al.* Expression of EMT markers SLUG and TWIST in breast cancer. *Anticancer Res* 2015; **35**: 3961-3968.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J. *et al.* Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 66 (2019)
- Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 1613-1618.
- Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 193-199.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman Vj, *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007; **8**: R76.

Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, *et al.* Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol* 1997; **150**: 483.

Honda N, Jinnin M, Kajihara I, *et al.* TGF- β -mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts. *J Immunol* 2012; **188**: 3323-3331.

Hong F, Breitling R, McEntee CW, *et al.* RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 2006; **22**: 2825-2827.

Hou T, Ou J, Zhao X, *et al.* MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27 Kip1. *Br J Cancer* 2014; **110**: 1260-1268.

Huang RYJ, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2012; **125**: 4417-4422.

Hui L, Zheng Y, Yan Y, *et al.* Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* 2006; **25**: 7305-7310.

Imani S, Wei C, Cheng J, *et al.* MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* 2017; **8**: 21362.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; **65**: 7065-7070.

Jin C, Zhang Y, Li J. Upregulation of MiR-196a promotes cell proliferation by downregulating p27 kip1 in laryngeal cancer. *Biol Res* 2016; **49**: 40.

Joseph JV, Conory S, Tomar T, *et al.* TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1443-e1443.

Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 639-651.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1420-1428.

Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *American J Sur* 2004; **188**: 49-61.

- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, *et al.* The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 2007; **39**: 1278-1284.
- Kim SJ, Shin JY, Lee KD, *et al.* MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of CC chemokine receptor type 7. *Breast Cancer Res* 2012; **14**: R14.
- Korpälä M, Lee ES, Hu G, *et al.* The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14910-14914.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 178.
- Leivonen SK, Salhberg KK, Mäkelä R, *et al.* High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. *Mol Oncol* 2014; **8**: 93-104.
- Li Y, Zhang M, Chen H, *et al.* Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer Res* 2010; **70**: 7894-7904.
- Li X, Roslan S, Johnstone CN, *et al.* MiR-200 can repress breast cancer metastasis through ZEB1-independent but moesin-dependent pathways. *Oncogene* 2014; **33**: 4077-4088.
- Li Y, Yang C, Zhang L, *et al.* MicroRNA-210 induces endothelial cell apoptosis by directly targeting PDK1 in the setting of atherosclerosis. *Cell Mol Biol Lett* 2017; **22**: 3.
- Li X, Zhu J, Liu Y, *et al.* MicroRNA-331-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition by targeting ErbB2 and VAV2 through the Rac1/PAK1/β-catenin axis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci* 2019; **110**: 1883.
- Liu T, Zhang X, Shang M, *et al.* Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer. *J Surg Oncol* 2013; **107**: 188-194.
- Liu H, Wang H, Liu X, *et al.* miR-1271 inhibits migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and TWIST1 in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; **472**: 346-352.
- Liu J, Sun X, Qin S, *et al.* CDH1 promoter methylation correlates with decreased gene expression and poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Lett* 2016; **11**: 2635-2643.
- Liu BW, Yu ZH, Chen AX, *et al.* Estrogen receptor-α-miR-1271-SNAI2 feedback loop regulates transforming growth factor-β-induced breast cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; **38**: 109.

- Lo HW, Hsu SC, Xia W, *et al.* Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 2007; **67**: 9066-9076.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; **449**: 682-688.
- McAnena P, Tanriverdi K, Curran C, *et al.* Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal a from metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2019; **19**: 436.
- Meng F, Wu G. The rejuvenated scenario of epithelial–mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012; **31**: 455-467.
- Miranda KC, Huynh T, Tay Y, *et al.* A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; **126**: 1203-1217.
- Mishan MA, Ahmadiankia N, Bahrami AR. CXCR4 and CCR7: Two eligible targets in targeted cancer therapy. *Cell Biol Int* 2016; **40**: 955-967.
- Mizuno K, Mataka H, Arai T, *et al.* The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J Hum Gen* 2017, **62**:671.
- Muenst S, Däster S, Obermann EC, *et al.* Nuclear expression of snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer. *Dis Markers* 2013; **35**: 337-344.
- Müller A, Homey B, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; **410**: 50-56.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 274-284.
- Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, *et al.* SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 11721-11731.
- Papadopoulos EI, Papachristopoulou G, Ardavanis A, *et al.* A comprehensive clinicopathological evaluation of the differential expression of microRNA-331 in breast tumors and its diagnostic significance. *Clin Biochem* 2018; **60**: 24-32.
- Pang MF, Georgoudaki AM, Lambut L, *et al.* TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* 2016; **35**: 748.
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, *et al.* A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; **63**: 1114-1121.

Peinado H, Ballestar E, Esteller M, et al. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1) /HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 306-319.

Perdigao-Henriques R, Petrocca F, Altschuler G, et al. miR-200 promotes the mesenchymal to epithelial transition by suppressing multiple members of the Zeb2 and Snail1 transcriptional repressor complexes. *Oncogene* 2016; **35**: 158.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**: 747-752.

Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; **12**: R68.

Przygodzka P, Papiewska-Pająk I, Bogusz-Koziarska H, et al. Regulation of miRNAs by Snail during epithelial-to-mesenchymal transition in HT29 colon cancer cells. *Sci Rep* 2019; **9**: 1-11.

Qiao W, Jia Z, Liu H, et al. Prognostic and clinicopathological value of Twist expression in breast cancer: A meta-analysis. *PloS One* 2017; **12**: e0186191.

Rask L, Balslev E, Søkilde R, et al. Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status. *Cell Onc* 2014; **37**: 215-227.

Sanchez-Tillo E, Lazaro A, Torrent R, et al. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 2010; **29**: 3490-3500.

Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; **68**: 989-997.

Shargh SA, Sakizli M, Khalaj V, et al. Downregulation of E-cadherin expression in breast cancer by promoter hypermethylation and its relation with progression and prognosis of tumor. *Med Oncol* 2014; **31**: 250.

Shell S, Park SM, Radjabi AR, et al. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 11400-11405.

Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG et al. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **107**: 309-330.

Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, et al. Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 2011; **11**: 73.

Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 10869-10874.

- Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, *et al.* A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2006; **131**: 830-840.
- Sun Z, Zhang T, Hong H, *et al.* miR-202 suppresses proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by downregulating Gli2. *Mol Cell Biochem* 2014; **397**: 277-283.
- Tang T, Yang Z, Zhu Q, *et al.* Up-regulation of miR-210 induced by a hypoxic microenvironment promotes breast cancer stem cell metastasis, proliferation, and self-renewal by targeting E-cadherin. *FASEB J* 2018; **32**: 6965-6981.
- Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; **451**: 147-152.
- Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:442-454.
- Tran HD, Luitel K, Kim M, *et al.* Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Res* 2014; **74**: 6330-6340.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; **10**: 789-799.
- Wang SP, Wang WL, Chang YL, *et al.* p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 694-704.
- Wang B, Li J, Sun M, *et al.* MiRNA expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features. *IUBMB Life* 2014; **66**: 371-377.
- Wang, Junfeng, *et al.* "microRNA-155 deficiency impairs dendritic cell function in breast cancer." *Oncoimmunology* 2016; **5**: e1232223.
- Wang J, Li Y, Ding M, *et al.* Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer. *Int J Oncol* 2017, **50**: 345-355.
- Weigelt B, Peterse JL, Van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev cancer* 2005; **5**: 591-602.
- Werfel S, Leierseder S, Ruprecht B, *et al.* Preferential microRNA targeting revealed by in vivo competitive binding and differential Argonaute immunoprecipitation. *Nucleic acids Res* 2017; **45**: 10218-10228.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, *et al.* Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; **121**: 727-735.
- Wu ZQ, Li XY, Hu CY, *et al.* Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial–mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci* 2012; **109**: 16654-16659.

Xiao B, Shi X, Bai J. miR-30a regulates the proliferation and invasion of breast cancer cells by targeting Snail. *Oncol Lett* 2019; **17**: 406-413.

Xu D, Takeshita F, Hino Y, *et al.* miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; **193**: 409-424.

Xu B, Zhou M, Qiu W, *et al.* CCR7 mediates human breast cancer cell invasion, migration by inducing epithelial–mesenchymal transition and suppressing apoptosis through AKT pathway. *Cancer Med* 2017; **6**: 1062-1071.

Xu M, Li J, Wang X, *et al.* MiR-22 suppresses epithelial–mesenchymal transition in bladder cancer by inhibiting Snail and MAPK1/Slug/vimentin feedback loop. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 209.

Xu F, Li H, Hu C. MiR-202 inhibits cell proliferation, invasion, and migration in breast cancer by targeting ROCK1 gene. *J Cell Biochem* 2019; **120**: 16008-16018.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; **117**: 927-939.

Yigit MV, Ghost SK, Kumar M, *et al.* Context-dependent differences in miR-10b breast oncogenesis can be targeted for the prevention and arrest of lymph node metastasis. *Oncogene* 2013; **32**: 1530-1538.

Ye X, Tam WL, Shibue T, *et al.* Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 2015; **525**: 256-260.

Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, *et al.* microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; **8**: 20881.

Zhang N, Wang X, Huo Q, *et al.* MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. *Oncogene* 2014; **33**: 3119-3128.

Zhang, J., Zhou, Y., & Yang, Y. CCR7 pathway induces epithelial–mesenchymal transition through up-regulation of Snail signaling in gastric cancer. *Medical Oncology* 2015; **32**: 17.

Zhang X, Li Y, Wang D, *et al.* miR-22 suppresses tumorigenesis and improves radiosensitivity of breast cancer cells by targeting Sirt1. *Biol Res* 2017; **50**: 27.

Zhang S, Cai J, Xie W, *et al.* miR-202 suppresses prostate cancer growth and metastasis by targeting PIK3CA. *Exp Ther Med* 2018; **16**: 1499-1504.

Zhao D, Sui Y, Zheng X. MiR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2016; **35**: 1075-1082.

Zhou L, Liu F, Wang X, *et al.* The roles of microRNAs in the regulation of tumor metastasis. *Cell Biosci* 2015; **5**: 32.

Zhu S, Wu H, Wu F, *et al.* MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; **18**: 350-359.

Zou Q, Tang Q, Pan Y, *et al.* MicroRNA-22 inhibits cell growth and metastasis in breast cancer via targeting of SIRT1. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 1009-1016.

Zuo QF, Cao LY, Yu T, *et al.* MicroRNA-22 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting MMP14 and Snail. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e2000.

