



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE MIR-342-3P POR NEAT1 EN CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. SÁNCHEZ MARÍN DAVID

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/578/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **2 de mayo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **SÁNCHEZ MARÍN DAVID** con número de cuenta **312566090** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE miR-342-3p por NEAT1 EN CÁNCER DE MAMA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ELOY ANDRÉS PÉREZ YÉPEZ
Vocal: DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN
Vocal: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Vocal: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN
Secretario: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de junio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante la beca de maestría otorgada (Número de apoyo: 761334).

A mi tutora, la Dra. Alma Campos Parra, y a los miembros del comité tutor, la Dra. Vilma Maldonado Lagunas y el Dr. Carlos Pérez Plasencia.

Agradecimientos a título personal

A mis padres, David y Alina, y a mi hermana, por haberme forjado como la persona que soy; mis logros se los debo a ustedes, entre ellos, la presentación de este trabajo. Sin su apoyo incondicional en todos los ámbitos no hubiera podido alcanzar esta meta. Les estoy muy agradecido pues siempre están conmigo y me impulsan a perseguir lo que quiero.

A Sareni, por siempre escucharme y apoyarme. Por siempre estar para mí.

A la Dra. Alma, por ser mi tutora durante mis estudios, ayudarme a formar una carrera en la ciencia siempre incentivando mi dedicación a esta, así como brindarme de herramientas, enseñanzas y excelentes consejos que me han motivado a lograr mis metas profesionales. En especial, por permitirme colaborar con ella y Sam en el “Team Campos”, me siento muy orgulloso de trabajar con personas tan talentosas.

Al Dr. Carlos, por permitirme formar parte del grupo de investigación e incentivar la investigación científica.

A la Dra. Vilma, por sus aportaciones y estar siempre dispuesta a apoyarme.

A Sam, por ser el mejor sensei, por las buenas discusiones que hemos sostenido sobre biología molecular, y platicas en general en el lab, taller, tacos, etc. así como por ser un excelente amigo. Espero poder seguir colaborando contigo en muchos proyectos más y aprender de ti.

Al Dr. Jossimar, por sus enseñanzas, su coaching en ingeniería genética y buenos consejos, por permitirme colaborar con y aprender de él, por las buenas platicas, y su buena vibra y amistad.

Al Dr. Toño, por sus enseñanzas y tiempo brindado para mis dudas.

Al Dr. Eloy y Dr. Oliver, por sus consejos y aportaciones a mi formación de maestría.

Al equipo de Genómica, por ser un excelente grupo de investigación, por el buen ambiente que motiva a trabajar, y con quienes siempre puedo colaborar como profesionistas y contar como amigos; Lalo, Luis, Héctor, Carlos, Iza, Bere, Frida, Lili y Pablo.

Dedicatoria

A mis padres, David y Alina, mi hermana y mis abuelos, quienes me han dado todo su apoyo
y amor.

Índice

Índice de figuras	
Índice de tablas	
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Cáncer	3
Cáncer de mama	4
Clasificación histológica y molecular	5
Estrategias terapéuticas.....	6
RNAs no codificantes (ncRNAs)	7
microRNAs	7
Biogénesis y función	8
Papel biológico y perfiles de expresión de microRNAs.....	10
RNAs largos no codificantes.....	11
Estructura y función	12
Interacciones lncRNA-microRNA.....	14
<i>Crosstalk</i> de ncRNAs en cáncer.....	16
Minería de datos y predicción de interactomas.....	18
Antecedentes.....	21
Hipótesis	24
Objetivos.....	25
Metodología.....	26
Muestras de pacientes	26

Cultivo celular	26
Análisis de PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	26
Transfecciones y silenciamiento	27
Construcciones de los sitios de interacción NEAT1-miR-342-3p	28
Ensayo de formación de colonias	30
Predicción de la interacción de NEAT1 y RNAs.....	30
Predicción de blancos de miR-342-3p	30
Red lncRNA-microRNAs en cáncer de mama	31
Análisis estadísticos	31
Resultados	32
Potenciales esponjas de miR-342-3p	32
Expresión de NEAT1 y miR-342-3p cáncer de mama	34
La expresión de miR-342-3p fue mayor en las muestras de subtipo triple negativo	36
NEAT1 promueve la formación de colonias y el crecimiento celular en cáncer de	
mama	38
Genes blancos de miR-342-3p en cáncer de mama.....	40
Efecto del silenciamiento de NEAT1 sobre la disponibilidad de miR-342-3p	43
Interacción NEAT1 y miR-342-3p.....	45
NEAT1, potencial lncRNA blanco de miR-342-3p	46
NEAT1 establece una red de regulación con ncRNAs-RNAs en cáncer de mama	47
Discusión	51
Conclusiones	56
Perspectivas	57
Referencias bibliográficas	58

Índice de figuras

Figura 1. Hallmarks del cáncer.	3
Figura 2. Número de casos por tipo de cáncer estimado para México en 2020	4
Figura 3. Subtipos histológicos y moleculares de cáncer de mama..	6
Figura 4. Biogénesis de microRNAs.	9
Figura 5. Los microRNAs modulan múltiples genes, a su vez, diversos genes son regulados por múltiples microRNAs.	10
Figura 6. Clasificación de RNAs largos no codificantes acorde a su localización genómica.	11
Figura 7. Funciones de RNAs largos no codificantes..	12
Figura 8. Interacciones y mecanismos de regulación microRNA-lncRNA.	14
Figura 9. Mecanismos de regulación en los ejes lncRNA-microRNA-mRNA en cáncer..	17
Figura 10. Plásmido pMIR-REPORT utilizado para las construcciones del sitio de interacción NEAT1 y miR-342-3p.	28
Figura 11. Electroforesis de PCR en punto final.....	29
Figura 12. Validación por secuenciación tipo Sanger de la construcción del sitio 1 NEAT1-miR-342-3p en el plásmido p-MIR-Report.....	29
Figura 13. Correlación de la expresión de NEAT1 y miR-342-3p en muestras de pacientes de cáncer de mama del TCGA.	33
Figura 14. Expresión relativa de miR-342-3p y NEAT1 en muestras de pacientes de cáncer de mama.	36
Figura 15. Expresión relativa de miR-342-3p y las isoformas de NEAT1 MENépsilon y MENbeta en líneas celulares de cáncer de mama.....	38
Figura 16. El silenciamiento de NEAT1 disminuye el crecimiento celular en las células MDA-MB-231.	39
Figura 17. Correlación de la expresión de miR-342-3p y sus blancos: CYP51A1, DTBP1, KDM6B, TM4SF1, WDR77, y ZNF462.	41
Figura 18. Interactoma del eje NEAT1-miR-342-3p y sus blancos en cáncer de mama: KDM6B, CYP51A1, TM4SF1, ZNF462, DTNBP1 y WDR77.	42
Figura 19. Efecto del silenciamiento de NEAT1 sobre tres microRNAs.....	44
Figura 20. Ensayo de luciferasa.....	45
Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de miR-342-3p reduce 30 % la expresión de NEAT1.....	46
Figura 22. Interacciones significativas de NEAT1 por tipo de cáncer.	47
Figura 23. Interacciones significativas de NEAT1 con ceRNAs en cáncer de mama	48

Figura 24. Red de NEAT1 como esponja de microRNAs en cáncer de mama.....	49
Figura 25. Correlación de la expresión de microRNAs asociados a respuesta a tratamiento y NEAT1 con datos de TCGA y StarBase	50

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias de primers utilizadas en el estudio.....	27
Tabla 2. Valor de la correlación significativa entre la expresión de cinco lncRNAs y miR-342-3p.....	32
Tabla 3. Posibles sitios de interacción NEAT1-miR-342-3p.	34
Tabla 4. Datos clínicos de muestras de pacientes de cáncer de mama.....	35

Resumen

En cáncer de mama (CM), los ejes lncRNA-miRNA-mRNA regulan diversos eventos biológicos a través de la función de los lncRNAs como esponjas de microRNAs contribuyendo así al desarrollo del fenotipo tumoral. En cáncer de mama triple negativo, la subexpresión de miR-342-3p y la sobreexpresión del lncRNA NEAT1 se ha asociado con una pobre supervivencia de los pacientes, lo que sugiere una posible regulación entre ambos. En el presente trabajo, mediante un análisis en la base de datos ENCORI, encontramos nueve posibles sitios de interacción entre NEAT1-miR-342-3p, lo que sugirió una posible función de NEAT1 como una potencial esponja de miR-342-3p en CM. Para ello, primero se evaluó mediante qRT-PCR la expresión de NEAT1 y miR-342-3p en líneas celulares y en muestras de pacientes de CM. Los resultados mostraron una mayor expresión de NEAT1 y una menor expresión de miR-342-3p, sugiriendo una posible regulación entre ambos RNAs no codificantes (ARNnc). Para demostrarlo, se inhibió la expresión de NEAT1 mediante un RNA antisentido en la línea celular MDA-MB-231. Los resultados mostraron una disminución de la expresión del NEAT1 del 70% y una tendencia de aumento en la expresión de miR-342-3p, y los resultados de ensayos de gen reportero descartó una regulación de NEAT1 como esponja de miR-342-3p. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-342-3p disminuye la expresión de NEAT1, sugiriendo una regulación directa de miR-342-3p sobre NEAT1 como blanco o bien, indirectamente a través de otros blancos. Asimismo, para establecer el eje de lncRNA-miRNA-mRNA, se identificaron blancos de miR-342, entre los que destacan los oncogenes DTNBP1, TM4SF1, ZNF462, WDR77, CYP51A1 y KDM6B, con funciones en transcripción, migración, proliferación, metabolismo del colesterol y splicing. Finalmente, a través de predicciones *in silico* se identificó a NEAT1 como un potencial lncRNA regulador de microRNAs asociados a respuesta a tratamiento; miR-141-3p, miR-200c-3p, miR-200b-3p, miR-301a-3p y miR-361.3p.

Abstract

In breast cancer (BC), lncRNA-miRNA-mRNA axes regulate diverse biological events through the function of lncRNAs as microRNA sponges, thus contributing to the development of the tumor phenotype. In BC, subexpression of miR-342-3p and NEAT1 overexpression have been associated with poor patient survival, suggesting an interaction between them. In the present work, through an analysis in the ENCORI database, we found nine sites of interaction between NEAT1-miR-342-3p, so we analyzed NEAT1 as a potential miR-342-3p sponge in BC. We first evaluated by qRT-PCR the expression of NEAT1 and miR-342-3p in BC cell lines and patient samples. Results showed a higher expression of NEAT1 and a lower expression of miR-342-3p, suggesting a regulation between both non-coding RNAs (ncRNAs). To demonstrate this, NEAT1 expression was inhibited by an antisense RNA in MDA-MB-231. The results showed a 70% decrease in NEAT1 expression and a trend of increased miR-342-3p expression, and a reporter gene assay ruled out a sponge-like regulation of NEAT1 by miR-342-3p. However, overexpression of miR-342-3p decreases NEAT1 expression, suggesting a direct regulation of miR-342-3p on NEAT1 as a target or indirectly through other targets. To establish a lncRNA-miRNA-mRNA axis, bioinformatic analyses were performed to propose potential miR-342 targets such as DTNBP1, TM4SF1, ZNF462, WDR77, CYP51A1 and KDM6B oncogenes, implicated in cellular transcription, migration, proliferation, cholesterol metabolism and splicing. Finally, through in silico predictions, NEAT1 was identified as a potential lncRNA regulator of microRNAs associated with response to treatment; miR-141-3p, miR-200c-3p, miR-200b-3p, miR-301a-3p y miR-361-3p

Introducción

Cáncer

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades que se caracterizan por proliferar sin control y capacidad de invadir otros tejidos, formando masas de tejido llamadas tumores. Dichas masas tumorales adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas que favorecen la pérdida y ganancia de funciones, la dediferenciación y la aparición de características distintivas denominadas “*Hallmarks del cáncer*” (Figura 1) [1]. Como resultado se desregulan vías de señalización y procesos biológicos que conducen al desarrollo del fenotipo tumoral y el padecimiento crónico degenerativo en el paciente [2].

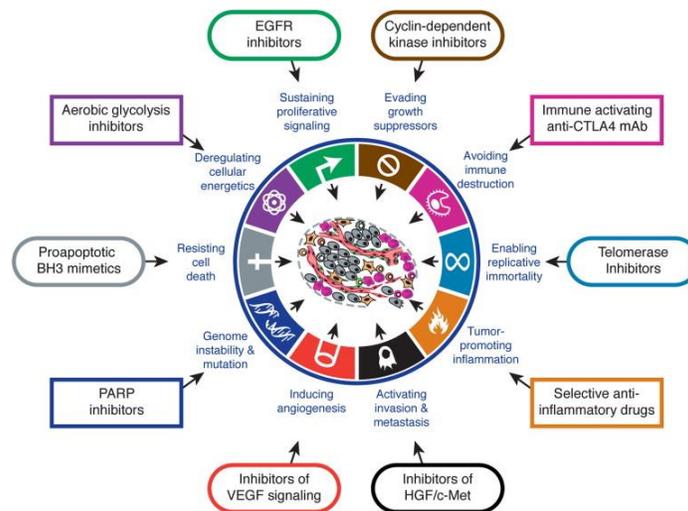


Figura 1. Hallmarks del cáncer. Tomado de Hanahan, D. et al. (2011) [1].

Actualmente, el cáncer es considerado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares [3]. Para el 2020 se estimaron 19.3 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes en

ambos sexos, independientemente de la region, sus factores socioeconómicos y su índice de desarrollo humano, por lo cual es un problema mayor de salud pública mundial. Los cinco tipos de cáncer con mayor prevalencia son; mama, próstata, pulmón, colorrectal y cervicouterino [3].

Cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en mujeres, en México y el mundo. En 2020 A nivel mundial, se estimaron 2,261,219 nuevos casos y 664,896 muertes por cáncer de mama, mientras que, en México, se reportaron 29,929 casos y 7931 fallecimientos [3] (Figura 2).

El 10 % de los casos es hereditario por mutaciones en los genes que participan en la reparación del daño a DNA como BRCA1, BRCA2, PTEN, CHEK2, ATM y PALB2. El resto de los casos se considera esporádico y se asocia al estilo de vida del paciente, obesidad, menopausia tardía, alcoholismo, entre otros [4].

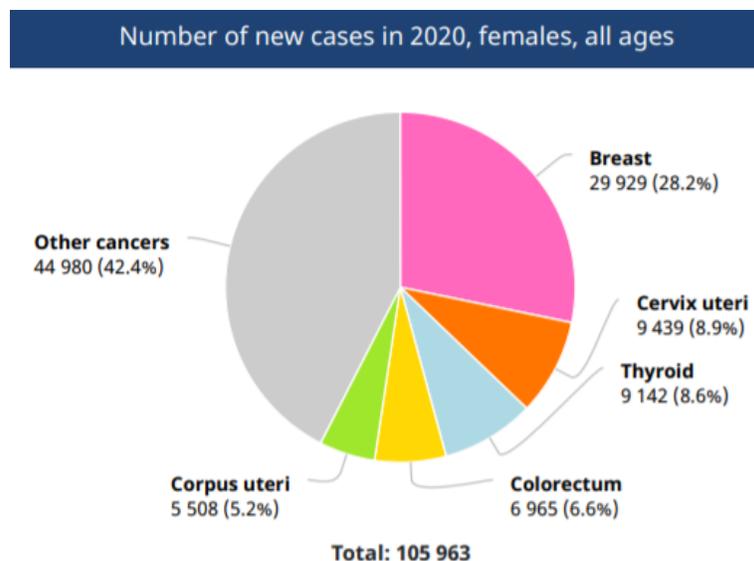


Figura 2. Número de casos por tipo de cáncer estimado para México en 2020. Tomado de Hyuna, S. et al. (2021) [3].

Clasificación histológica y molecular

El cáncer es una enfermedad altamente heterogénea involucrando factores intrínsecos como mutaciones en el ADN, marcas epigenéticas y cambios proteómicos, así como factores extrínsecos como el microambiente tumoral [4]. En el caso de cáncer de mama, la combinatoria de la evaluación histopatológica, la sobreexpresión de receptores de hormonas y perfiles de expresión genómicos y transcriptómicos ha permitido su clasificación en subtipos histológicos y moleculares que ayudan a definir la etapa (0-IV) y tratamiento del paciente [5].

De acuerdo con el tejido se puede desarrollar principalmente en el epitelio de los conductos galactóforos (carcinoma ductal) y lobulillos de las mamas (carcinoma lobular). A la vez puede ser *in situ* (tejido mamario o ganglios axilares) o invasivo (metástasis a tejidos distantes). El carcinoma ductal es el más prevalente en la población con 55 %, seguido del carcinoma lobular con 5-15 % de los casos [6] (Figura 3).

Respecto a los subtipos moleculares, se han definido cinco con base en la firma PAM50 de 58 genes. Estos son: Luminal A (ER-, PR-, HER2-), Luminal B (ER+), Luminal B (ER-), HER2 enriquecido (ER+, PR+, HER2+), y triple negativo (ER-, PR-, HER2-) [7] (Figura 3).

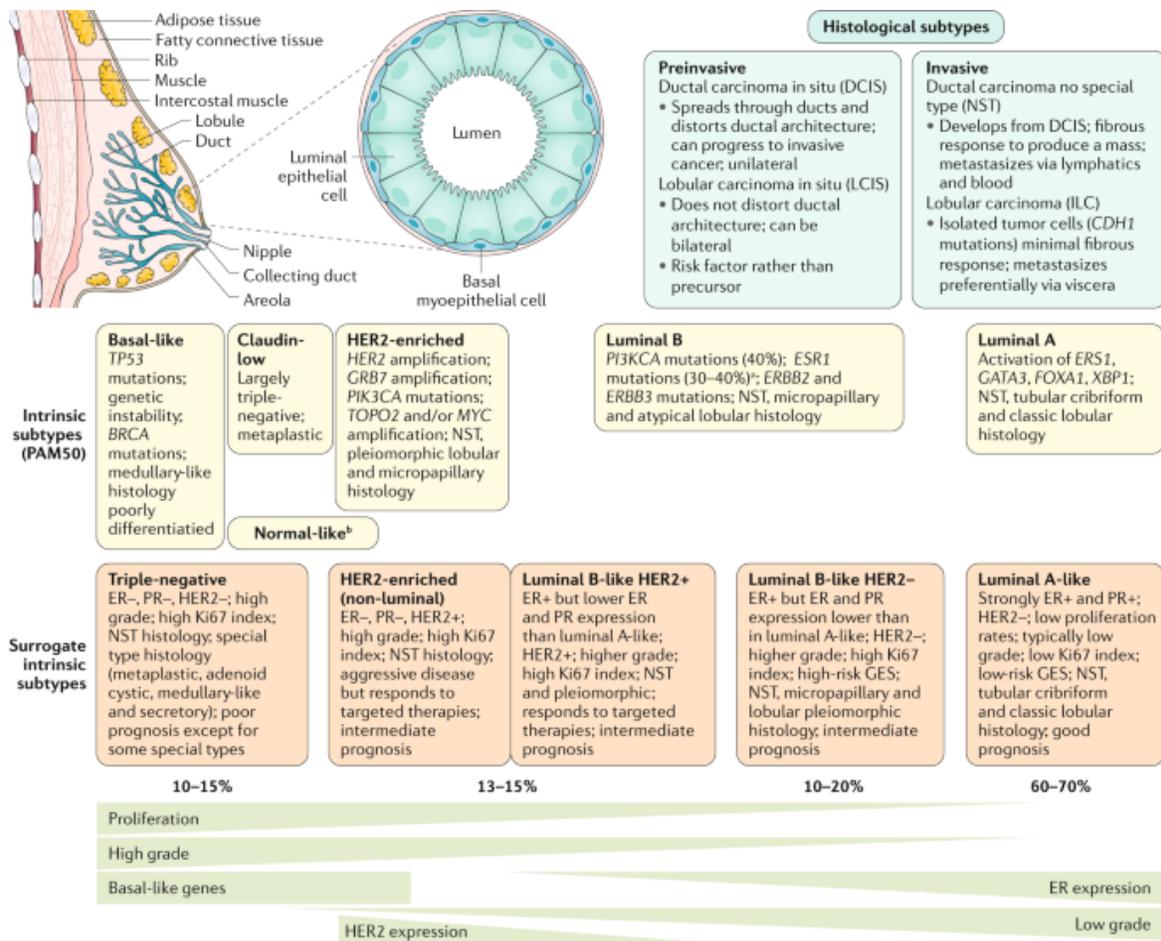


Figura 3. Subtipos histológicos y moleculares de cáncer de mama. Tomado de Harbeck, N. et al. (2019) [4].

Los subtipos luminales presentan mayor respuesta a la terapia y mejor pronóstico. Por el contrario, los subtipos triple negativo presentan la peor supervivencia en los pacientes, son más agresivos y correlacionan con un subtipo histológico más invasivo [8].

Estrategias terapéuticas

Los tumores que expresan los receptores de estrógeno (Er) y progesterona (PR) son tratados con inhibidores de los receptores como tamoxifeno o con inhibidores de aromatasas como letrozol; ambos impiden la conversión de andrógeno a estrógeno. En subtipos HER2 enriquecido se administra trastuzumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor HER2. La terapia para el triple negativo es quimioterapia, la cual consiste

en agentes alquilantes como docetaxel y paclitaxel. En pacientes con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se utilizan inhibidores de PARPS como olaparib y talazoparib [9]. Sin embargo, eventualmente los pacientes adquieren o presentan resistencia a estos tratamientos antes mencionados por mecanismos asociados a mutaciones en los receptores ESR1 y HER2, isoformas de CYP2D6, activación de la vía PI3K/AKT y glicoproteínas que actúan como bombas de fusión [10]. A lo anterior se le suma la falta de terapias blanco para el subtipo triple negativo y los efectos secundarios de la quimioterapia, por lo que la identificación de nuevos blancos terapéuticos y la investigación biomédica continúa siendo un gran reto. En recientes años se ha explorado como alternativas terapéuticas a las ciclinas CDK4/6, inhibidores tirosin cinasa (TKIs), inmunoterapia y RNAs no codificantes [11-14].

RNAs no codificantes (ncRNAs)

Con la secuenciación del genoma humano se descubrió que solo el 2% del genoma se transcribe para RNAs que codifican para proteínas, mientras que el restante se consideró como materia oscura o DNA basura. Posteriormente, al desarrollarse las tecnologías de secuenciación de nueva generación, se encontró que el 75 % del DNA restante se transcribe en RNAs con funciones regulatorias [15]. La mayor parte está representada por RNA constitutivo; rRNAs y tRNAs, involucrados en la traducción. Y en menor abundancia, los pequeños RNAs (snoRNAs, snRNAs, piRNAs y microRNAs) y RNAs largos no codificantes (lncRNAs), con funciones en la modulación de la expresión génica, estabilidad y procesamiento de mRNA y traducción [16].

microRNAs

Son pequeñas moléculas de 22-23 nucleótidos cuya función es principalmente la regulación post transcripcional de genes blanco, que incluye a RNAs largos no codificantes, RNAs mensajeros y pseudogenes a través del proceso de silenciamiento de RNA (RNAi). Se diferencian de otros RNAs pequeños por tener una estructura característica de asa horquilla, un procesamiento dependiente de dos ribonucleasas y

su asociación a la familia de proteínas argonautas para formar un complejo ribo proteico llamado RISC [17].

Biogénesis y función

Los miRNAs se encuentran codificados en regiones intergénicas e intragénicas, a su vez pueden ubicarse en exones o intrones. Aproximadamente 50 % de los miRNAs se ubica en clústeres genómicos o unidades de transcripción policistronica que utilizan un promotor en común. Son transcritos, en su mayoría, por la polimerasa II, pero también por la polimerasa III [18].

Su biogénesis consiste en una secuencia de cambios en la estructura del microRNA en dos regiones celulares; núcleo y citoplasma. Al ser transcrito se genera la estructura primaria llamada primRNA que consiste en una secuencia de varias kilobases llamada primRNA con estructuras de asa horquilla flanqueadas por regiones monocatenarias. Posteriormente, DGCR8 reconoce dichas estructuras y posiciona a la endonucleasa Drosha 11 nucleótidos de la base de la horquilla para realizar una escisión que genera una nueva estructura llamada premiRNA con un tamaño aproximado de entre 60 y 70 pb (Figura 4) [19].

El premiRNA es exportado al citoplasma por EXP5 y RAS, reconocido en 14 nucleótidos del microRNA. Una vez exportado, la hidrólisis de GTP permite la liberación del RNA [20]. En el citoplasma, DICER interactúa con el extremo 5` fosforilado y un extremo sobresaliente u *overhang* en el 3` y realiza el segundo corte para escindir el asa horquilla, obteniendo un dúplex monocatenario de RNA. Este dúplex se une al complejo efector RISC conformado por DICER, TRBPT, PACT y proteínas de la familia Argonauta [167]. Sin embargo, para la unión del RNA, el dúplex es primero dissociado en dos cadenas, una de ellas llamada guía, la cual se asocia a RISC, y la pasajera que es degradada [168]. Lo que determina el destino de cada cadena es su estabilidad termodinámica, la menos estable en su extremo 5` es la cadena guía. No obstante, existen casos en que ambas cadenas se unen a RISC y son funcionales. A las cadenas o

brazos del RNA dúplex se les identifica como 5p y 3p dependiendo de su sentido (Figura 4) [18].

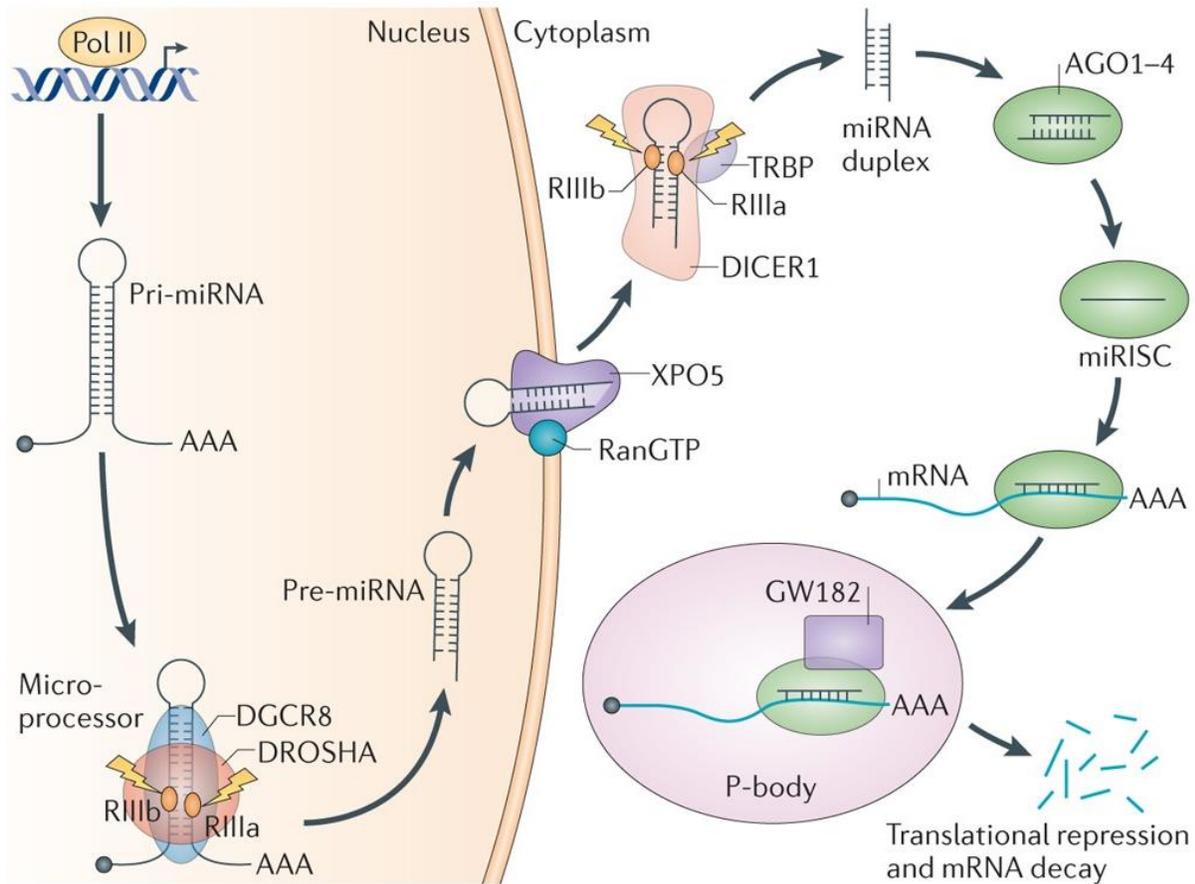


Figura 4. Biogénesis de microRNAs. Tomado de Kim, V. N. et al. (2009) [18].

El microRNA procesado se une a RISC, el cual sirve como guía del complejo a los RNAs blancos que regula mediante dos mecanismos; represión traduccional y degradación. El fundamento consiste en la complementariedad de bases que existe entre las moléculas blanco y el microRNA. Si la complementariedad es alta, el RNA es degradado, si es parcial, da lugar al estancamiento de los ribosomas o una disminución en la tasa de traducción [21]. Sin embargo, la complementariedad total solo se ha descrito en plantas, mientras que en metazoos la complementariedad es parcial en una región específica, pero variable llamada semilla. Dicha región semilla se ubica principalmente en la región 3' UTR. De manera canónica, comprende del segundo al octavo nucleótido en el extremo 5' del microRNA. Existen variaciones en el número de nucleótidos que abarca

y el nucleótido inicial, pudiendo ser hexámera (1-6, 2-7, 3-8), heptámetra (2-8, 1-7) y octámera (1-8) [22].

Papel biológico y perfiles de expresión de microRNAs

El silenciamiento génico que realizan los microRNAs es esencial para la regulación y homeostasis de la célula y su importancia radica en la “promiscuidad” sobre sus blancos, ya que al menos el 60 % de mRNAs son regulados por microRNAs en la region 3`UTR, sin considerar que existen sitios no canónicos de interacción en el ORF y 5`UTR, así como blancos con funciones regulatorias tales como los lncRNAs [22-25]. Más importante aún es el número de blancos que un solo microRNA tiene; se estima que un miRNA puede tener cientos de blancos en un mismo contexto celular, similar a un factor de transcripción que controla la expresión de múltiples genes [26]. A la vez, un RNA está sujeto a la regulación por múltiples miRNAs (Figura 5). En consecuencia, existe una compleja red de interacciones de la cual depende la regulación de casi todos los procesos celulares [26].

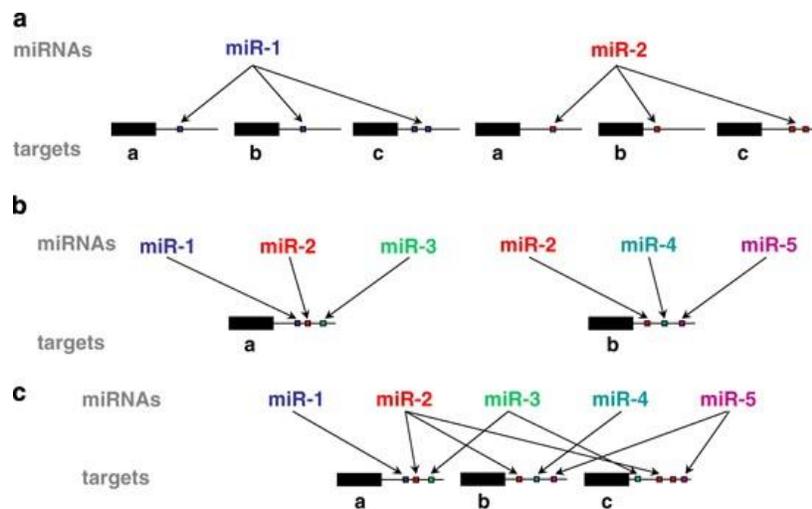


Figura 5. Los microRNAs modulan múltiples genes, a su vez, diversos genes son regulados por múltiples miRNAs. Tomado de Peter, M.E. (2010). [26].

Se ha descrito que la expresión de microRNAs varía y es específica de una etapa de desarrollo, tejido y tipo celular [27]. De igual manera, el número de copias es variable pudiendo haber miles de copias de un miRNA respecto a otro, así como el número de

interacciones, afectando su alcance funcional. Esto depende del contexto celular, por ejemplo, de la regulación de los transcritos y de su interacción con otras moléculas como lncRNAs [28].

RNAs largos no codificantes

Actualmente han sido anotados 127, 802 RNAs largos no codificantes humanos en la base de datos más completa de lncRNAs; LNCipedia. A pesar de su gran distribución en el genoma, solo una mínima parte ha sido caracterizada funcionalmente [29]. Los lncRNAs son RNAs de más de 200 pares de bases (pb) y pueden llegar a medir hasta 100 kb kilobases. Son transcritos por las polimerasas II y III. Se distinguen por no traducirse a proteína, pero si pueden tener modificaciones como m7G, cola de poli(A) y splicing [30].

Se han clasificado acorde a su localización en el genoma respecto a la ubicación de genes codificantes para proteínas (GCP). Estos son; enhancers o eRNAs, intrónicos, RNAs largos intergénicos o lincRNAs, asociados a promotores y antisentido o NATs (Figura 6) [31].

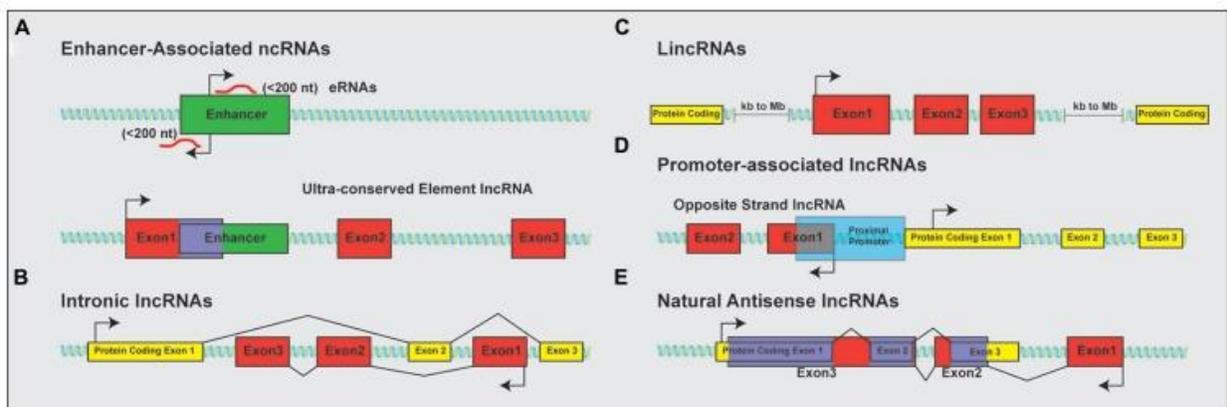


Figura 6. Clasificación de RNAs largos no codificantes acorde a su localización genómica. Tomado de [31].

Estructura y función

El RNA es una molécula muy flexible que forma estructuras secundarias y terciarias. En el caso particular de los lncRNAs, su estructura primaria o la secuencia lineal es muy poco conservada evolutivamente (menor al 80 %). Sin embargo, existe evidencia que, a pesar de la discrepancia entre la secuencia entre especies, se conservan motivos que dan origen a la misma estructura [30]. Tal es el caso de HOTAIR, un lncRNA exclusivo de mamíferos, con bajo porcentaje de homología ente humano y ratón pero que comparten entre 33 especies, pares de bases covariantes y estructuras de medio giro o *half-flips*. Ello permite mantener una estructura similar, especialmente en potenciales regiones de interacción con proteínas, sugiriendo una o varias funciones importantes. Asimismo, la alta variabilidad presente en las secuencias conlleva a la adquisición de nuevas funciones y mayor especialización [32].

La complejidad estructural de los RNAs largos no codificantes define su localización celular, estabilidad, interacción con otras moléculas y por consiguiente su versatilidad funcional, siendo que un lncRNA puede tener múltiples funciones [30]. Se les ha clasificado acorde a su función como *scaffold*, estructurales (arcRNAs), guías, *decoys*, moduladores de splicing, remodeladores de la cromatina, esponjas de microRNAs y RNAs de competencia endógenos (ceRNAs) (Figura 7) [32].

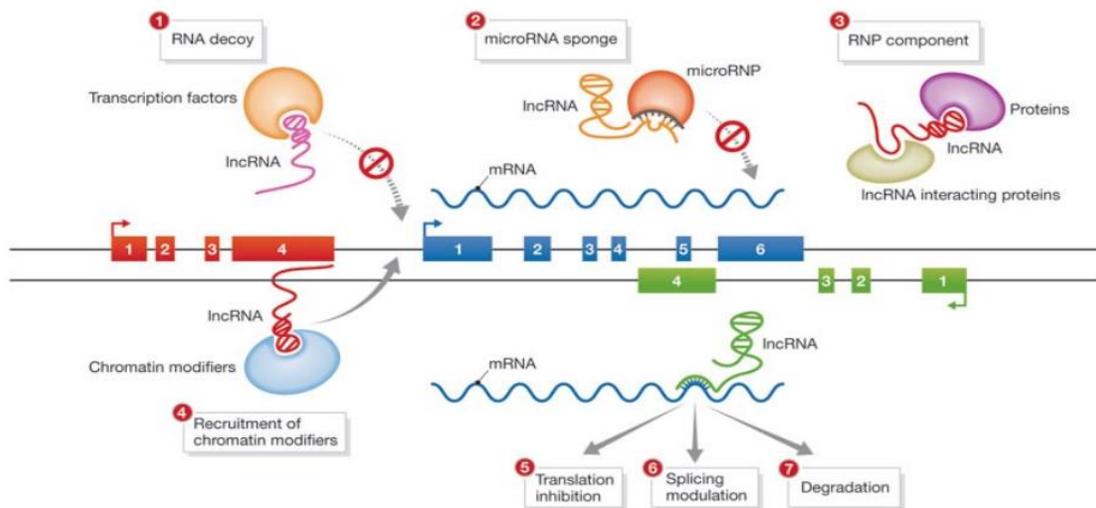


Figura 7. Funciones de RNAs largos no codificantes. Tomado de Clark, B.S. et al. (2014). [33].

A nivel genómico, los lncRNAs funcionan como guías que llevan complejos ribonucleoproteicos a sus blancos, actuando en *cis*, reclutando factores cotranscripcionales a promotores y enhancers.

Por ejemplo, el lncRNA CCAT1-l se localiza en un sitio super enhancer lo que le permite interactuar con CTCF y el sitio de transcripción de MYC, formando loops de cromatina y, en consecuencia, favorece la transcripción de MYC [34].

En trans, forman tripletes RNA:DNA:DNA o heterodúplex RNA-DNA, que permiten el reclutamiento de factores de transcripción, helicasas o remodeladores de la cromatina [169]. Por ejemplo, KHPS1 forma una triple hélice en el *enhancer* del oncogén SPHK1, evitando el silenciamiento por la unión del *insulator* al *enhancer* [35].

Los lncRNAs también son importantes moduladores epigenéticos al reclutar complejos remodeladores de la cromatina. Este mecanismo se da mediante la asociación de lncRNAs a complejos como PRC1, PRC2 [170]. Tal es el caso de XIST, el cual se une a PRC2, propiciando la metilación de H3K27me2/3, y, por consiguiente, el silenciamiento del cromosoma X para la compensación génica entre sexos [36].

En el núcleo, los arcRNAs o RNAs arquitectónicos sirven de estructura base de cuerpos nucleares como *speckles*, *paraspackles*, cuerpo de Cajal y el complejo polycomb, cuya función es ser sitios de biogénesis, maduración, almacenamiento y secuestro de RNAs. A esta clase pertenece el lncRNA NEAT1, componente principal de paraspackles [37].

Los lncRNAs son importantes reguladores del flujo de información a través de su función de *scaffold*, siendo plataformas para armar complejos proteicos con repercusiones significativas en la activación/represión de cascadas de señalización. Por ejemplo, la interacción de HOTAIR con β -catenina mantiene activa la vía de Wnt/ β -catenina en la línea celular HeLa aún en presencia del inhibidor ICRT14, contribuyendo a la resistencia a fármacos [38-39].

A nivel post transcripcional, lncRNAs como NEAT1, MALAT1, GOMAFY y SAF , interactúan con proteínas SR o del *core* del spliceosoma, modulando el splicing [40].

Las proteínas también están sujetas a regulación por lncRNAs. Actúan como *decoys* o represores de su actividad catalítica o modificadores de sitios alostéricos [171]. Tal es el caso de GAS5 al interactuar con el receptor de glucocorticoides, el cual imita el elemento de respuesta en el DNA evitando la activación de genes blanco [41]. Por el contrario, hay lncRNAs activadores como lnc-DC, el cual promueve la fosforilación y activación de STAT3 [42].

Interacciones lncRNA-microRNA

Los lncRNAs participan en complejas interacciones con otros ncRNAs, principalmente microRNAs. A través de estas interacciones, adquieren funciones regulatorias sobre los miRNAs. Por ejemplo, LOC554202 es precursor de miR-31 y el lncRNA miR222HG es cotranscrito con el clúster microRNAs 221/222. [43, 44]. Otros lncRNAs, interfieren en la regulación de la biogénesis de microRNAs, tal es el caso de CCAT2 que bloquea la maduración de miR-145 al inhibir el corte de DICER y la exportación al citoplasma [45].

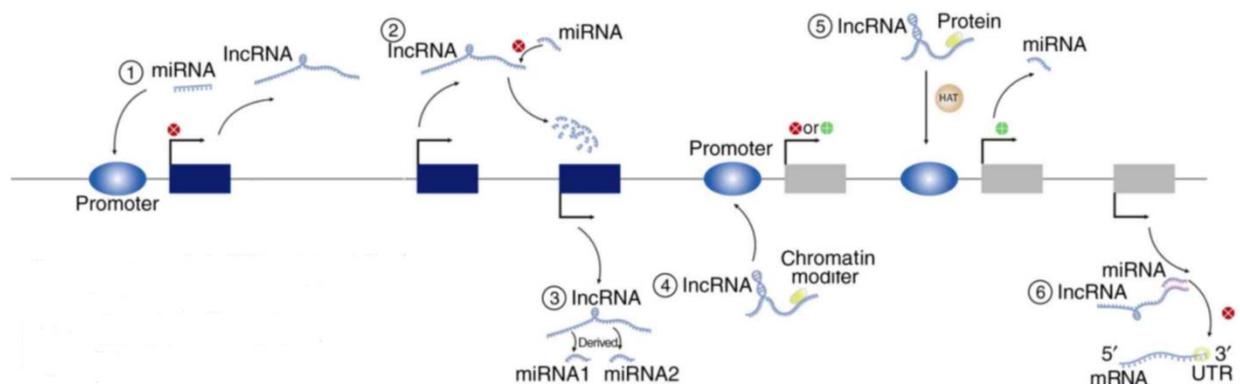


Figura 8. Interacciones y mecanismos de regulación microRNA-lncRNA. Tomado de Fernandes, C.R.J. et al. (2019) [46].

Entre las funciones más destacadas mediadas por interacciones de ncRNAs está la del efecto esponja, mediante la cual RNAs largos no codificantes secuestran a microRNAs e impiden el silenciamiento de mRNAs blancos [172]. Al igual que con los mRNAs, esta regulación está basada en la complementariedad de bases en una secuencia de 2 a 8 nucleótidos, conservada en el extremo 5` del microRNA, y los lncRNAs pueden ser circulares o lineales [46].

A partir de la descripción de interacciones de ncRNAs se planteó la hipótesis de ceRNAs, la cual postula la competencia entre RNAs (lncRNAs, pseudogenes y mRNAs) por sitios de interacción con microRNAs en común, llamados elementos de respuesta a microRNAs (MREs) [47]. El primer ceRNA descrito fue ciRS-7, un RNA circular con más de 70 MREs conservados para miR-7, que regula negativamente como esponja a miR-7 promoviendo la expresión de sus blancos [48].

Las interacciones lncRNA-microRNA suceden en dos direcciones; los ya mencionados lncRNAs como esponjas de microRNAs, y microRNAs como reguladores de lncRNAs. Los microRNAs absorbidos por lncRNAs, suelen tener complementariedad de bases perfecta. Por el contrario, cuando un microRNA regula a un lncRNA, es debido a las características estructurales del lncRNA (presencia de 3' y 5' UTR) y complementariedad parcial [49].

Además, así como un mRNA tiene varios sitios de interacción con microRNAs, un solo lncRNA también puede tener múltiples MREs. En consecuencia, entre más MREs tenga un lncRNA, más comunicación intermolecular y mayor es el alcance de la regulación génica [50]. Sin embargo, la presencia de sitios de unión a microRNAs, no garantiza una regulación con repercusión biológica. Esto es debido a que los mismos MREs no son iguales en todos los ceRNAs. Es decir, el largo no codificante que solo tiene sitios de interacción con un determinado microRNA, va a tener mayor probabilidad de regulación comparado con los que tienen varios sitios de unión a varios microRNAs, es decir, varios MREs. En este último caso, la regulación por un microRNA en específico puede ser preferencial frente a otro. Por ejemplo, BC032469 contiene MREs para miR-1207-5p y miR-1266, sin embargo, únicamente absorbe a miR-1207-5p [52]. Esto se verá favorecido si los MREs se encuentran en la región central o en la 3' UTR de un lncRNA [49].

Asimismo, las interacciones lncRNA-microRNA están sujetas a la distribución espaciotemporal. Por ejemplo, linc-RoR actúa como esponja de microRNAs por etapas durante la diferenciación de células troncales del desarrollo embrionario para después silenciarse y permitir la expresión de sus microRNAs blancos [53].

Crosstalk de ncRNAs en cáncer

Las interacciones entre lncRNAs-microRNA conforman ejes lncRNAs-microRNAs-mRNAs que modulan diversas funciones celulares. En cáncer, existen perfiles de expresión diferenciales, por lo que los ejes se ven alterados, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad, ya sea como oncogenes o supresores de tumores [54]. En el caso de los miRNAs, son divididos en oncomiRs y supresores de tumores (tsmicroRNAs) puesto que tienen como blancos genes supresores de tumores y oncogenes, respectivamente [55]. Por su parte, los lncRNAs que modulan oncomiRNAs se les clasifica como supresores de tumores, y oncogenes a los que regulan tsmicroRNAs. En ambas modalidades, los ncRNAs están involucrados en el desarrollo de hallmarks del cáncer a través de sus blancos [56] (Figura 9).

En cáncer de mama, los primeros microRNAs alterados que fueron descritos son miR-125b, miR-145, miR-21 y miR-155 y fueron correlacionados con sobrevida global, estadio de la enfermedad, receptores de hormonas e índice de proliferación [57]. A partir de entonces, se han descrito múltiples microRNAs asociados con el cáncer de mama. Por ejemplo, miR-497, miR-16 y miR-30c-2-3p, son tsmicroRNAs que controlan la progresión del ciclo celular a través de un blanco clave; la ciclina D1 [58-60]. MiRNAs supresores de tumores, subexpresados, como miR-424, miR-543, miR-204-5p, y miR-148a modulan la actividad de vías de señalización oncogénicas Hippo, MAPK/ERK, PI3K/AKT y Wnt/ β -catenina, respectivamente [61-64]. Como oncomiRNAs destacan miR-122, el cual favorece el metabolismo aberrante en las células tumorales y el miR-331 por su asociación a oncogenes, incluyendo el lncRNA HOTAIR [65, 66].

Respecto a los lncRNAs, se han reportado pocos con función de supresor de tumores en comparación con aquellos con función de oncogén. Algunos supresores de tumores son; EPB41L4A-AS2, EGOT, XIST, GAS5, ZFAS1 y MEG3 y sONE [67-69]. Con función oncogénica se ha reportado a LNMAT1 y lncGata6 al promover metástasis, a GACAT3 como oncogén que secuestra a miR-497, entre otros como; DANCR, HOTAIR, NEAT1 y HIF1A-AS2. Todos ellos promueven el fenotipo tumoral a través de su acción como esponjas de miRNAs, remodelación de la cromatina y como enhancers [70-76].

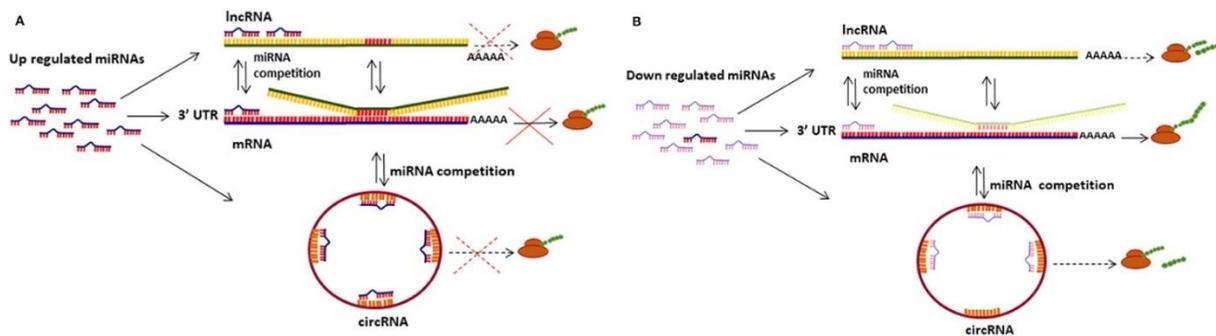


Figura 9. Mecanismos de regulación en los ejes lncRNA-microRNA-mRNA en cáncer. Tomado de Tornesello, L.M. et al. (2020) [56].

Además, se han descrito microRNAs y lncRNAs con papel dual de oncogén y supresor de tumor en diferentes tejidos o en el mismo. Un ejemplo de ellos es miR-181a que al actuar como supresor de tumores previene invasión y metástasis, induce muerte celular y favorece la sensibilidad a fármacos. Sin embargo, otros estudios sugieren que presenta un rol oncogénico mediante la activación de la vía TGF- β y cuyos genes blanco son supresores de tumores clave como PDCPD4 y ATM [77]. Por otra parte, MALAT1 es un lncRNA que ha sido reportado como oncogén en diversos tipos de cáncer [78]. Particularmente en cáncer de mama como oncogén, favorece la progresión y resistencia a doxorubicina mediante la regulación de miR-570-3p. Con respecto a su función como gen supresor de tumor, se une al factor de transcripción TEAD, reprimiendo la expresión de genes metastásicos, no obstante, en cáncer de mama y colorrectal se encuentra subexpresado. Esto indica que los lncRNAs pueden presentar un papel dual; tanto de oncogén como de supresor de tumor, lo cual está sujeto a la cohorte de pacientes y del contexto celular [79].

En cáncer de mama se han descrito microRNAs y lncRNAs específicos del subtipo molecular. Denkiewicz, M. (2019), reportó 44 miRNAs diferencialmente expresados en todos los subtipos moleculares comparados con muestras no tumorales. Asimismo, se detectaron 12, 14, 9, 5 microRNAs únicos y exclusivos para los subtipos Luminal A, Luminal B, HER2 y basal, respectivamente [80]. Respecto a los lncRNAs, se ha reportado que su expresión se asocia con cada subtipo molecular y a terapias. Por ejemplo; en la línea celular MCF7 cuyo subtipo molecular corresponde al luminal A, se ha reportado que ésta cambia su patrón de expresión de lncRNAs en respuesta a la terapia endocrina

(LINC01016, SIAH2-AS1 y SNHG3) [81, 82, 83]. En el subtipo Her2, un estudio de transcriptoma, mostro 371 lncRNAs diferencialmente expresados en pacientes que no respondían a trastuzumab, entre ellos cuatro han mostrado intervenir en mecanismos que favorecen la resistencia; SNHG15, UCA1, GAS5 y ATB [84]. En el subtipo triple negativo, datos del TCGA, mostraron al lncRNA lnc-DNAJC16 más sobreexpresado [85]. Otro estudio describió una firma lncRNAs/mRNAs (HIF1A-AS2 y AK124453) que sirvió para reclasificar a los pacientes dentro del subtipo triple negativo y resistentes a paclitaxel [86].

La expresión diferencial de ncRNAs en cáncer de mama, así como su correlación con características clínicas y moleculares de tumores ha derivado en la propuesta de potenciales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. Dentro de los miRNAs, la familia de let-7 destaca como potenciales miRNAs marcadores de diagnóstico en plasma de diferentes tipos de cáncer tales como: cáncer mama, próstata, colon, riñón (sobreexpresado), ovario y pulmón (subexpresado) [87]. Otros microRNAs circulantes que han mostrado alta especificidad (91 %) y sensibilidad (88 %) como marcadores de diagnóstico temprano en cáncer de mama son miR-195 y miR-155 [88].

Acerca de los lncRNAs, PCA3 ha sido aprobado para su uso clínico como biomarcador de diagnóstico temprano de cáncer de próstata y de manera auxiliar se utiliza a MALAT1 [89-91]. En cáncer de mama, H19 tiene alta sensibilidad y especificidad en muestras de plasma, promueve la activación de AKT y ERK, y actúa como ceRNA de let-7, demostrando su potencial como herramienta diagnóstico de esta enfermedad [92-94].

Minería de datos y predicción de interactomas

Debido a que la expresión de RNAs es dependiente del contexto celular, las interacciones que conforman también se ven alteradas, contribuyendo a la heterogeneidad del cáncer. El describirlas y validarlas es clave para entender los mecanismos y funciones celulares en las que participan, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, lo que representa nuevas oportunidades para proponer

biomarcadores y blancos terapéuticos, así como entender los mecanismos que conducen a la resistencia a fármacos [95].

Gracias los datos de RNA-seq y microarreglos es posible predecir interactomas de RNA. Para ello, se realiza un análisis de expresión diferencial de los RNAs (lncRNAs, microRNAs, mRNAs), se integran los datos y se busca una correlación entre la expresión. Posteriormente se realizan predicciones basadas en cuatro enfoques: 1) información de interacciones conocidas, 2) predicción de interacciones a partir de la integración de datos disponibles, 3) métodos de aprendizaje profundo y 4) la identificación de interacciones mediante el análisis de datos genómicos [96].

Con los datos existentes y algoritmos, se han realizado estudios como el de Che, J. en 2017, el cual propone interactomas específicos por subtipo molecular de cáncer de mama, en donde los ceRNAs desregulados correlacionan con características clínicas y moleculares de cada subtipo. Cabe destacar que cuatro genes de 29 presentes en hubs de ceRNAs clave en el interactoma, correspondían a genes de la firma PAM50, contribuyendo a la especificidad por subtipo. Los genes restantes podrían afectar las redes de interacción si compiten por sitios de unión a miRNAs que conforman los ejes de RNA. Además, cabe señalar que los *hubs* de ceRNAs estaban enriquecidos en genes supresores de tumores, los cuales se encontraron desregulados de manera general en todos los subtipos moleculares [97].

Olgun, Gu. en 2018 realizó un estudio de esponjas mediadas por lncRNAs en cáncer de mama y sus hallazgos reportan que, así como hay lncRNAs con función de esponjas compartidas entre subtipos moleculares, también hay lncRNAs esponjas específicas de cada subtipo [98]. Aunado a esto, analizaron la sobrevida de los pacientes y encontraron lncRNAs esponjas con valor pronóstico, sugiriendo que los análisis de interacciones aportan más información para detectar potenciales marcadores pronóstico que los análisis de genes individuales [98].

Al determinar interactomas de RNA es posible determinar RNAs con funciones biológicas que conduzcan al desarrollo de un proceso oncogénico en específico. Por ejemplo, se reportó una red de interacción implicada en metástasis, metabolismo y respuesta a

estrés en cáncer de mama que consiste en 104 mRNAs, 19 miRNAs y 16 lncRNAs. A partir de esta red, se identificaron 3 RNAs (miR-105-5p, BCAR1 y PANX2) como potenciales biomarcadores de supervivencia global [99].

De igual manera, el predecir interacciones de RNAs ha permitido identificar mecanismos asociados a la resistencia a fármacos. Por ejemplo, el lncRNA ATXN8OS está sobreexpresado en cáncer de mama y funciona como esponja de miR-16. Al secuestrarlo evita que el microRNA reprima a su blanco VASP, reduciendo así la respuesta a tamoxifeno [100]. Por otra parte, se han identificado redes de ceRNAs cuyos genes están involucrados en la respuesta a fármacos contra cáncer, tal es el caso de GAS5, un lncRNA, que al estar subexpresado, no depleta a los miRNAs responsables de la inhibición de RPL18, proteína asociada a la resistencia a quimioterapia [101, 102].

Antecedentes

Recientemente, un estudio reportó un perfil de microRNAs sobreexpresados y subexpresados en pacientes con cáncer de mama metastásico asociados a respuesta a tratamientos sistémicos [109]. De dicho perfil, destacó miR-342-3p dado que se encontró sobreexpresado en pacientes que presentaron respuesta al tratamiento y que presentaron mayor sobrevida global y se encontró subexpresado en pacientes que no respondieron y que presentaron peor sobrevida global [109].

En trabajos previos se ha reportado a miR-342-3p subexpresado en varios tipos de cáncer, incluyendo; colorrectal, nasofaríngeo, hepatocarcinoma, cérvix, osteosarcoma, y pulmón, entre otros. En dichos tejidos, actúa como supresor de tumores regulando a la baja el efecto Warburg a través de PI3K/AKT/GLUT, la actividad transcripcional de MYC, la hipermetilación del ADN, y procesos como apoptosis, proliferación, y migración, a través de blancos como FOX-Q1, IGF-1R, E2F1, FOXM1, y DNMT1 [103-108].

Estudios adicionales también han demostrado a miR-342-3p subexpresado en muestras de pacientes y líneas celulares de cáncer de mama, siendo el subtipo triple negativo donde se encuentra menos expresado. Con respecto a su función se ha demostrado que regula migración e invasión celular mediante CFL1, asimismo, altera los flujos de lactato y glucosa a través de MCT1 [110, 111]. También se ha reportado que está implicado en la disminución de la expresión de BRCA1 en pacientes con BRCA1 y BRCA2 sin mutaciones (BRCAx) en cáncer de mama ER(-) vía la modulación del factor de transcripción ID4 [112]. También se ha visto que se encuentra implicado en mecanismos de resistencia a tamoxifeno, posiblemente mediante la regulación de blancos implicados en evasión a apoptosis y progresión del ciclo celular [113]. Estos hallazgos indican que miR-342-3p, al estar subexpresado en diferentes tipos de cáncer, no puede ejercer su función de supresor de tumores. Una de las causas de este fenómeno es la regulación por ceRNAs, específicamente, esponjas de microRNAs. Por ejemplo, en cáncer colorrectal el lncRNA SCARNA2, absorbe a miR-342-3p,

promoviendo quimio resistencia a través de EGFR y BCL2 [114]. En cáncer de colon, LINC00659 secuestra a miR-342 y que este reprima a su blanco ANXA2, favoreciendo proliferación y migración [115]. En cáncer de páncreas, SNHG7 promueve la proliferación, migración e invasión a través de la expresión de ID4 regulada por miR-342 [116]. En hepatocarcinoma y osteosarcoma, los lncRNAs circulantes; circZNF609 y circ0004674 secuestran a miR-342, respectivamente, aumentando la proliferación celular, invasión y la activación de la vía Wnt/ β -catenina [117, 118].

Entre las causas por las cuales tsmicroRNAs están subexpresados, están las esponjas de microRNAs, tal es el caso de miR-342-3p [173]. Considerando que en cáncer de mama no se ha descrito el mecanismo de la regulación a la baja de miR-342-3p, los antecedentes sugieren que puede deberse a un lncRNA sobreexpresado que actúe como esponja para este microRNA.

Mediante una revisión de la literatura sobre RNAs largos no codificantes sobre expresados en cáncer de mama, encontramos que el lncRNA NEAT1 destaca por tener una correlación inversa a miR-342-3p, respecto a datos clínicos y moleculares de pacientes con cáncer de mama.

NEAT1 (*Nuclear paraspeckle assembly transcript 1*) ha sido reportado como oncogén con características de gen conductor por estar involucrado en la carcinogénesis y el progreso de la enfermedad, así como estar asociado a metástasis, tasa de recurrencia y sobrevida. En cáncer de mama, factores de transcripción como HIF2 y RUNX1 se unen al promotor de NEAT1 e inducen su expresión. Su función como esponja de microRNAs en varios tipos de cáncer es más amplia comprendiendo a let-7a, let-7e, miR-34a, miR-34c, miR-101, miR-106b, miR-107, miR-194, miR-204, miR-365 y miR-506 [119]. Asimismo, se encuentra sobreexpresado tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en muestras de pacientes, secuestra a miR-448 y modula la expresión de ZEB1 [120, 121].

Considerando los correlación entre la expresión de NEAT1 y miR-342-3p en cáncer de mama, es posible que haya una interacción de NEAT1 con miR-342-3p como esponja. Respecto a esto, NEAT1 tiene sitios de complementarios con posible interacción con

miR-342-3p, de los cuales uno ya fue validado funcionalmente y permite la regulación del lncRNA sobre el microRNA en células de macrófago contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis [122]. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si la expresión a la baja de miR-342 en pacientes que no responde a quimioterapia es debido a que es secuestrado por NEAT1 en cáncer de mama

Hipótesis

NEAT1 secuestra a miR-342-3p mediante el mecanismo de esponja favoreciendo la proliferación en cáncer de mama triple negativo.

Objetivos

Objetivo

Evaluar la regulación de miR-342-3p por NEAT1 como esponja en cáncer de mama.

Objetivos Particulares

1. Analizar la correlación de la expresión de NEAT1 y miR-342-3p con datos de TCGA.
2. Evaluar la expresión de miR342 y NEAT1 en líneas celulares y muestras de pacientes de cáncer de mama triple negativo.
3. Evaluar el efecto de la inhibición de NEAT1 sobre el rescate del nivel de miR-342-3p.
4. Evaluar la interacción de NEAT1 con miR-342-3p mediante ensayos de luciferasa.
5. Identificar blancos potenciales del eje NEAT1/ miR-342 en cáncer de mama de triple negativo

Muestras de pacientes

Las muestras de pacientes utilizadas en este estudio fueron colectadas del Instituto Nacional de Cancerología. Un total de 15 muestras fueron procesadas en parafina. La extracción de RNA se realizó con el RNeasy FFPE (Qiagen).

Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas fueron MCF7, BT20, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Las células se obtuvieron del ATCC y se cultivaron en medio DMEM/F-12 (ATCC) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning), 1% de penicilina / estreptomicina (Corning). Las condiciones de cultivo fueron 37 ° C, 5% de CO₂ y 90 % de humedad.

Análisis de PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Se extrajo RNA total utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). La pureza y concentración se detectaron en Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) usando 2 µl de muestra. La integridad se analizó mediante electroforesis de un gel de agarosa al 0.8 %. Se partió de 1 µg de RNA para retro transcripción de lncRNAs y mRNAs con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Respecto a los microRNAs, se partió de 100 ng para su retro transcripción con el kit Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Se realizó PCR en punto final para estandarizar las condiciones de reacción utilizando el kit Go Taq Green Master Mix (Promega). La PCR cuantitativa se realizó con el kit Luminaris HiGreen Master Mix (Thermo Scientific) para mRNAs y lncRNAs, y con el kit Taqman Small RNA Assays (Applied Biosystems) para microRNAs, en el equipo StepOnePlus

(Applied Biosystems). La cuantificación fue por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los genes constitutivos utilizados como control fueron GAPDH y RNU44. Las condiciones de reacción fueron: 95 ° C por 2 min, seguidos de 35 ciclos a 95 ° C por 3° s y 72 ° por 1 min. Las secuencias de los primers están enlistadas en la tabla 1. En el caso de miR-342-3p y RNU44 se utilizaron sondas Taqman de Thermo Scientific.

Gen	Primer Forward (5`-3`)	Primer Reverso (5`-3`)
GAPDH	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCT	TCACGCCACAGTTTCCCGGAG
NEAT1 Isoforma épsilon	GACCTCTCACCTACCCACCT	ATGCCCAAAGTAGACCTGCC
NEAT1 Isoforma beta	CAGAAGACCTTGAGGGCAGG	AGTGGCTAGACCTGACGCTA

Tabla 1. Secuencias de primers utilizadas en el estudio.

Transfecciones y silenciamiento

Las transfecciones se llevaron a cabo con Lipofectamina 3000 acorde al manual del kit (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Inc.). Para llevar a cabo el silenciamiento transitorio de NEAT1 se utilizó la secuencia antisentido modificada 2OMe/Ps mG*mC*mU*mG*mG*C*A*T*T*C*A*T*G*G*G*mC*mU*mC*m*mG que hibrida en la región 1473-1492 compartida por la dos isoformas descritas de NEAT1 [123]. El rango de concentraciones fue de 1, 10, 50, 100 y 200 nM. Para los ensayos de luciferasa se transfectó 2.5 µg/ml del plásmido con la construcción.

Construcciones de los sitios de interacción NEAT1-miR-342-3p

Para determinar la interacción entre NEAT1 y miR-342-3p se realizó un ensayo de gen reportero de luciferasa. Para ello, primero se realizaron construcciones utilizando el plásmido pMIR-REPORT (Ambion) (figura 10). Al plásmido se le ligo la secuencia del sitio 1 *wild type* y mutante de interacción de NEAT1 y miR-342-3p. Las secuencias fueron sintetizadas por IDT (Integrated DNA Technologies) con los sitios salientes de corte de las enzimas de restricción *SpeI* y *HindIII* (NIPPON Genetics) para su posterior ligación al plásmido digerido. Las construcciones fueron validadas mediante análisis de PCR y secuenciación Sanger (figura 11 y 12).

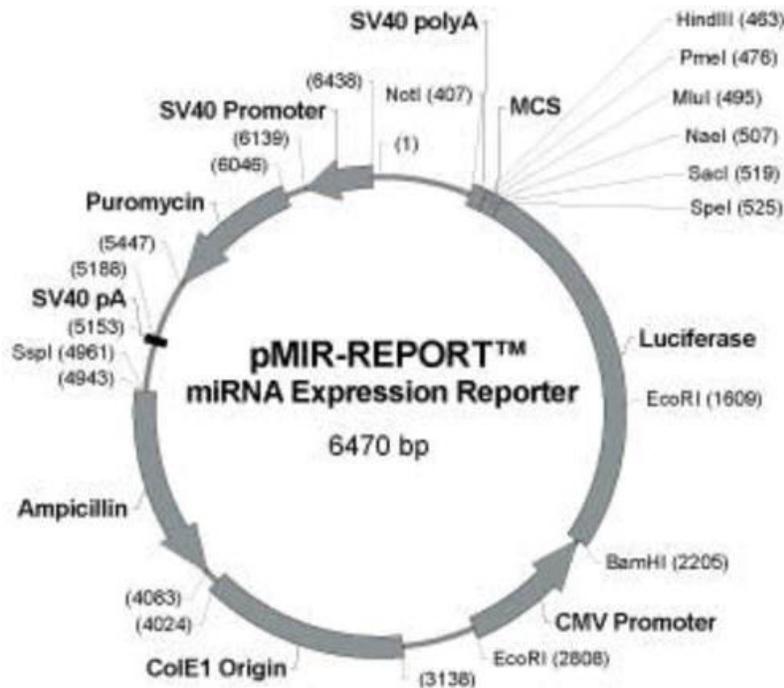


Figura 10. Plásmido pMIR-REPORT. Utilizado para las construcciones del sitio de interacción NEAT1 y miR-342-3p (Ambion) el cual se clonó en el sitio múltiple de clonación entre los sitios para las enzimas de restricción; *HindIII* (463) y *SpeI* (525).

Ensayo de luciferasa

Para los ensayos de luciferasa se transfectó 2.5 µg/ml del plásmido con la construcción y 50 nM del mimic de miR-342-3p (Applied biosystems). La actividad de sistema dual reportero de luciferasa fue detectada 24 horas post transfección. El equipo utilizado fue un luminómetro GloMax 96 Microplate de Promega. Los datos de luminiscencia de luciferasa fueron normalizados con la actividad de Renilla para cada pozo transfectado. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de formación de colonias

Se cultivo la línea celular MDA-MB-231 y se sembraron en placa de 6 pozos con 200 células por pozo, seguidos de incubación por 14 días. Las colonias fueron fijadas con paraformaldehído al 15 % y teñidas con cristal violeta al 10 %. El número de colonias fue contado manualmente. El experimento se realizó tres veces de manera independiente.

Predicción de la interacción de NEAT1 y RNAs

Mediante la herramienta SPONGEdb (<https://github.com/biomedbigdata/SPONGE-web-R>) se predijo la red de regulación de ceRNAs con los que NEAT1 puede interactuar. La predicción está basada en los datos de cáncer de mama disponibles en TCGA y se realizó a través de un paquete de R llamado SPONGE, el cual infiere valores de p que limitan la tasa de falsos positivos y evitan correlaciones espurias [124].

Predicción de blancos de miR-342-3p

Se predijeron potenciales genes blanco de miR-342-3p desregulados en cáncer de mama. Para ello se utilizó el paquete de R miRNAtap, el cual integra herramientas de predicción de blancos de microRNAs disponibles en línea como miranda y TargetScan

[125-127]. Posteriormente, se realizó un análisis de correlación en R entre la expresión de miR-342-3p y los cinco mRNAs con mayor posibilidad de interactuar .

Red lncRNA-microRNAs en cáncer de mama

A partir de la base de datos LncACTdb 2.0 (<http://www.bio-bigdata.net/LncACTdb/>) se identificaron el número de interacciones de NEAT1 con otros RNAs (lncRNAs, miRNAs, y mRNAs). Con dichos datos, se realizaron tres gráficas para representar: 1) Numero de interacciones de NEAT1 con RNAs en diferentes tipos de cáncer, 2) Interactoma de NEAT1-mRNAs y lncRNAs, 3) Interactoma de NEAT1-microRNAs.

Análisis estadísticos

Para realizar los análisis de los datos de qRT-PCT se utilizó GraphPad Prism 7. Las barras de error indican desviación estándar. Los datos de expresión se analizaron por prueba de T-student, ANOVA de una sola vía y Tukey (como prueba complementaria). Los asteriscos muestran los siguientes niveles de significancia estadística: *=p<.05, **=p.01, ***=p<.001.

Resultados

Potenciales esponjas de miR-342-3p

Nuestro primer objetivo consistió en identificar potenciales lncRNAs que actúen como esponjas de miR-342-3p. Para ello, se buscaron lncRNAs con sitios de interacción para miR-342-3p en StarBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>). Se eligieron los cinco lncRNAs con mayor número de sitios de interacción y que tuvieran validez con experimentos de clip (clipExpNumb) en donde las moléculas de interés se detectan del extracto de inmunoprecipitación de argonauta (tabla 2). Posteriormente, a partir de datos de TCGA, se analizó la correlación de la expresión de dichos lncRNAs con la de miR-342-3p en pacientes con cáncer de mama en R.

LncRNA	pVal	R	miRNA
SNHG7	0.13988874	0.04582831	hsa_miR_342_3p
SNHG20	0.13992309	-0.04582435	hsa_miR_342_3p
NEAT1	6.66E-15	0.2384313	hsa_miR_342_3p
OIP5-AS1	3.83E-06	0.1427808	hsa_miR_342_3p
KCNQ1OT1	0.48017091	-0.02192728	hsa_miR_342_3p

Tabla 2. Valor de la correlación significativa entre la expresión de cinco lncRNAs y miR-342-3p. Primera columna muestra los lncRNAs, segunda columna muestra el valor de p, tercera columna muestra el valor de la correlación positiva o negativa, y la cuarta columna muestra el microRNA con el cual se predijo la interacción.

De los cinco lncRNAs seleccionados como potenciales esponjas de miR-342-3p, NEAT1 fue el que mayor correlación presentó con respecto a la expresión de miR-342-3p (figura 13), sugiriendo una posible regulación entre ambos. Además, fue el que mayor número de sitios posibles de interacción presentó; nueve (tabla 3).

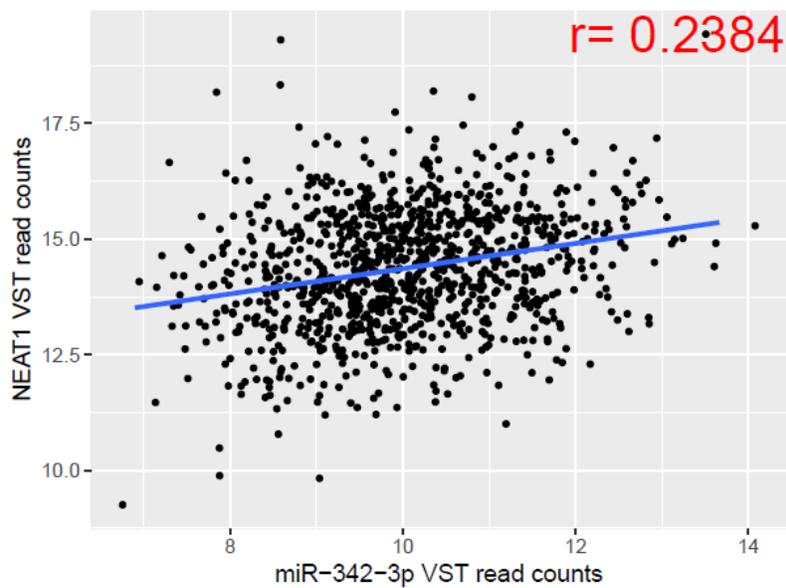


Figura 13. Correlación de la expresión de NEAT1 y miR-342-3p. Datos obtenidos del TCGA correspondientes a 1102 muestras de pacientes de cáncer de mama. $R = 0.2384$

Sitio	clipExpNum	Secuencia	Isoforma
1	22	uggagucccuggcCAGUGUGAGu	Épsilon y beta
2	27	cauuccuaaAUCUGUGUGUGAGa	Épsilon y beta
3	12	agaggcugugcaaagGUGUGAGc	Beta
4	9	guGGAUCUGUGUUUGUGUGAGg	Beta
5	10	cagccaucauaguggGUGUGAGg	Beta
6	14	caugccagGAGCUCAGGUGUGAGc	Beta
7	1	aguGUUGGGAUUACAGGUGUGAGc	Beta
8	9	gcugcacagucgaggGUGUGAGg	Beta
9	11	ugaGGGGAGAUGGACGUGUGAGg	Beta

Tabla 3. Posibles sitios de interacción NEAT1-miR-342-3p. En la primera columna se muestra el número que se asignó a cada sitio. La segunda columna muestra el número de experimentos clip en donde ambas moléculas (lncRNA y el miRNA) se encontraron en la inmunoprecipitación de argonauta. La tercera columna muestra la secuencia de cada sitio de NEAT1 con la cual el microRNA puede interactuar, y la cuarta columna, la isoforma de NEAT1 en la cual se encuentra el potencial sitio de interacción.

Expresión de NEAT1 y miR-342-3p cáncer de mama

Una vez elegido a NEAT1 como el lncRNA candidato con mayor posibilidad de interacción con el miR-342-3p a partir de soporte bioinformático y los antecedentes, se procedió a analizar la expresión de ambos en muestras de pacientes mexicanas, en un panel de líneas celulares. Respecto a las muestras de pacientes mexicanas, en total fueron 14. Todas corresponden al subtipo histológico más incidente en la población mexicana; carcinoma ductal invasivo [128, 129]. Todas, también, desarrollaron metástasis y solo tres pacientes presentaron respuesta completa al tratamiento sistémico. Respecto al subtipo molecular, la mayoría de las muestras correspondió al subtipo luminal (64%) y el restante al triple negativo, lo cual coincide con la estadística nacional que reporta que este es el subtipo más frecuente [128, 130] (tabla 4).

Subtipo molecular	Histopatología	Metástasis	Respuesta
Luminal A	CDI	Si	No
Luminal A	CDI	Si	No
Luminal A	CPI CDI	Si	No
Luminal A	CDI	Si	No
Luminal B	CIP	Si	Parcial
Luminal B	CDI	Si	Parcial
Luminal B	CDI	Si	No
Luminal B	CDI	Si	No
Luminal B	CDI	Si	No
TN	CDI	Si	Si
TN	CDI	Si	Si
TN	CDI	Si	No
TN	CDI	Si	No
TN	CDI	Si	Si

Tabla 4. Datos clínicos de muestras de pacientes de cáncer de mama. Los datos incluyen el subtipo molecular, la clasificación histopatológica, así como el desarrollo de metástasis y la respuesta a tratamiento (cisplatino y terapia hormonal).

La expresión de miR-342-3p fue mayor en las muestras de subtipo triple negativo

Nuestros resultados mostraron que la expresión de miR-342-3p fue mayor en las pacientes que respondieron al tratamiento sistémico. Esto coincide con lo reportado previamente, donde detectaron que la sobreexpresión miR-342-3p se asocia con la respuesta al tratamiento sistémico. A este respecto, en nuestros resultados, tres de las cinco muestras de pacientes que respondieron al tratamiento, correspondieron al subtipo triple negativo, bajo este contexto, es posible pensar que a ello se atribuya una mayor expresión de miR-342-3p en este subtipo molecular. Respecto a NEAT1, los resultados mostraron que éste lncRNA presentó mayor expresión en el subtipo triple negativo. No obstante, los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas en la expresión, tanto de miR-342-3p (figura 14A) como de NEAT1 (figura 14B) entre los subtipos moleculares.

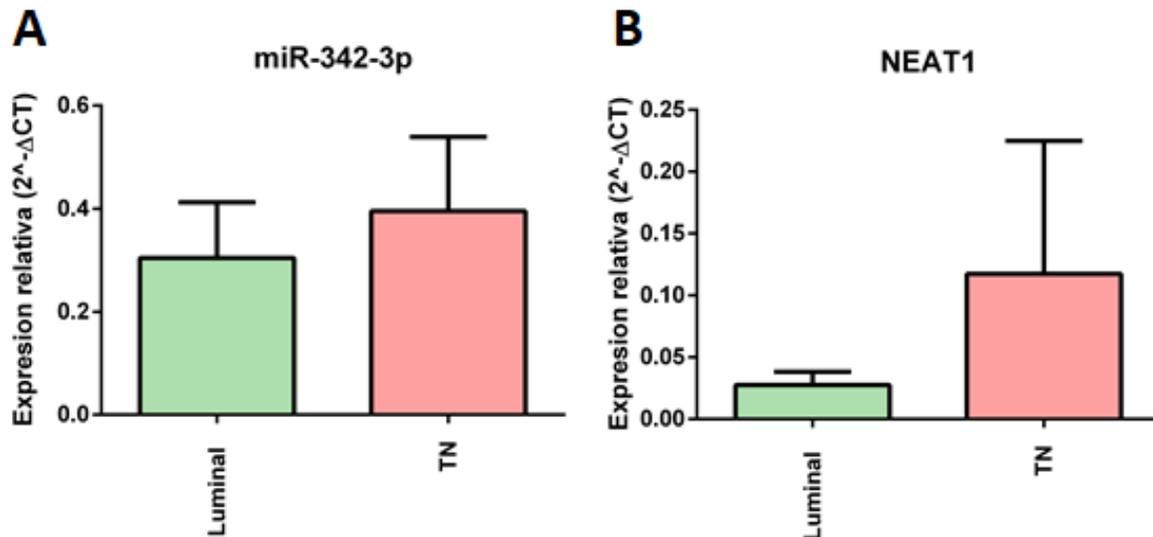


Figura 14. Expresión relativa de A) miR-342-3p y B) NEAT1 en muestras de pacientes de cáncer de mama. Luminal n= 9 muestras y triple negativo (TN) n= 5 muestras.

Posteriormente se procedió a determinar la expresión de miR-342-3p y NEAT1 en cuatro líneas celulares de cáncer de mama, de las cuales tres corresponden al subtipo triple negativo (BT20, MDA-MB-231, MDA-MB-468) y una al luminal (MCF7). En el caso de miR-342-3p, observamos que su expresión fue menor en los subtipos triple negativo en comparación con el luminal, con diferencias estadísticamente significativas (figura 15A). Con respecto a la expresión NEAT1, cabe mencionar que este lncRNA presenta dos isoformas, una de 3756 pb denominada MENépsilon y otra de 22743 pb denominada MENbeta, la diferencia entre ambas radica en la longitud de la 3' UTR. [131]. Asimismo, de acuerdo con StarBase, NEAT1 tiene 9 sitios de interacción con miR-342-3p, de los cuales dos son compartidos por ambas isoformas y los siete restantes son exclusivos de MENbeta. De acuerdo con esto, se cuantificó la expresión de ambas isoformas en las líneas celulares de cáncer de mama. El resultado mostró que las dos isoformas, MENbeta y MENépsilon, se encuentran expresadas en las cuatro líneas celulares sin haber diferencia significativa entre estas, siendo menor la expresión de NEAT1 beta comparado con NEAT1 épsilon en todas las líneas celulares de cáncer de mama (figura 15B y 15C).

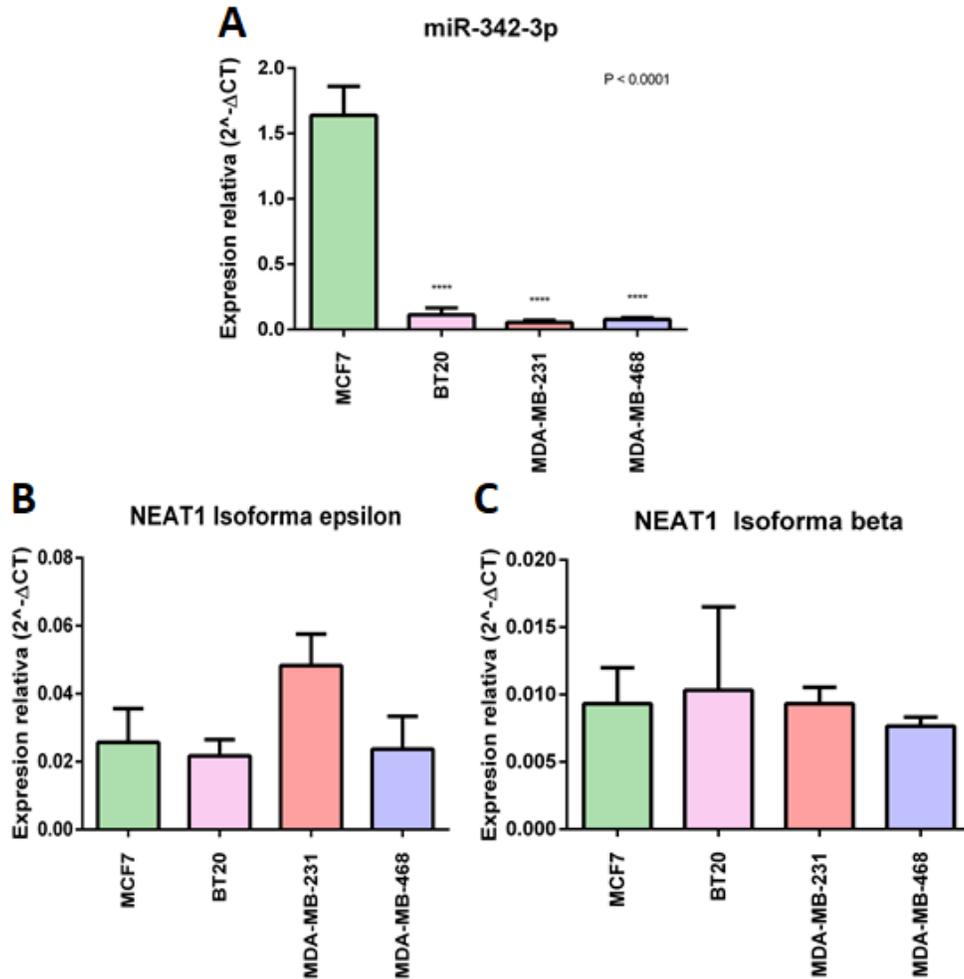


Figura 15. Expresión relativa de A) miR-342-3p y las isoformas de NEAT1 B) MENépsilon y C) MENbeta en líneas celulares de cáncer de mama. Se realizaron a partir de tres extracciones de RNA independientes. La expresión diferencial de miR-342-3p en el panel de líneas celulares fue estadísticamente significativa $P < 0.0001$. La expresión de ambas isoformas de NEAT1 no mostró diferencias significativas entre el panel de líneas celulares.

NEAT1 promueve la formación de colonias y el crecimiento celular en cáncer de mama

Una vez validado que miR-342-3p y NEAT1 están expresados en líneas celulares de cáncer de mama procedimos a evaluar si NEAT1 tiene un efecto oncogénico. Para ello, se realizó un ensayo de formación de colonias tras el silenciamiento de NEAT1 con una

secuencia antisentido previamente validada, durante 24 horas [123]. Los resultados mostraron una reducción del 70 % en la formación de colonias respecto a los grupos control (basal y lipofectamina), sugiriendo que NEAT1 participa en la proliferación celular de células de cáncer de mama contribuyendo al desarrollo de la neoplasia (figura 16).

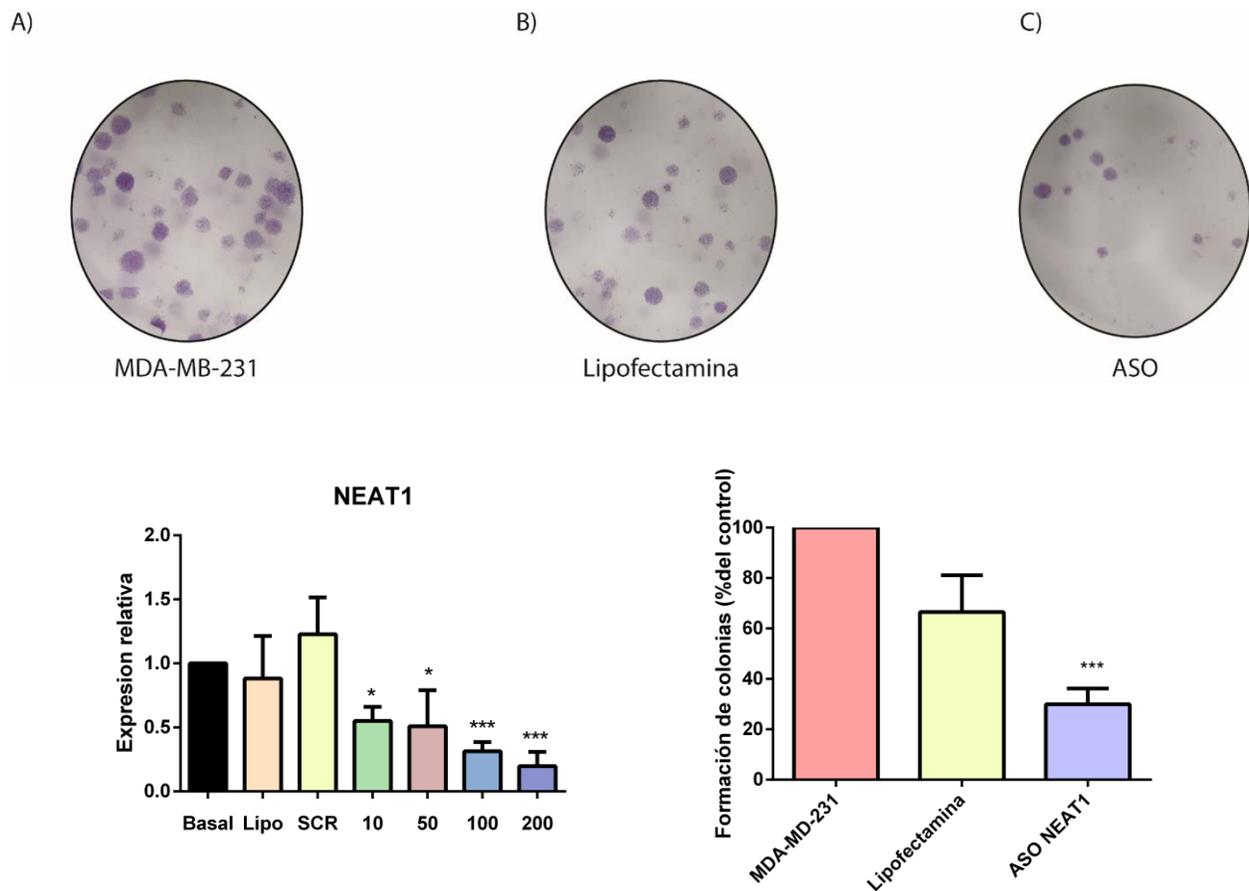


Figura 16. El silenciamiento de NEAT1 disminuye el crecimiento celular en las células MDA-MB-231. El ensayo de formación de colonias se realizó con tres grupos experimentales con tres repeticiones independientes: células basales o sin tratamiento, tratadas con lipofectamina y transfectadas con una secuencia antisentido de NEAT1 para su silenciamiento. La primera figura muestra el ensayo de formación de colonias en placas de 6 pozos (9.6 cm²), en donde se observa una disminución de las colonias formadas respecto a los controles. La gráfica izquierda muestra la expresión de NEAT1 disminuida tras su silenciamiento con una secuencia antisentido a cuatro concentraciones (10 nM, 50 nM, 100 nM y 200 nM), siendo la de 200 nM la que mostró mayor reducción respecto al control (70 %). La gráfica derecha muestra la representación gráfica del ensayo de formación de colonias.

Genes blancos de miR-342-3p en cáncer de mama

Considerando que las esponjas de microRNAs contribuyen a un proceso biológico a través de la regulación de genes blanco, es de nuestro interés describir cuales son estos en el eje NEAT1-miR-342-3p. Para ello, se predijeron blancos de miR-342-3p que no hayan sido descritos. Primero, se realizó un análisis de expresión diferencial de mRNAs en cáncer de mama, y posteriormente mediante miRNetap, un paquete de R que integra cinco algoritmos de predicción de blancos de microRNAs, se buscaron potenciales blancos con sitios de interacción con miR-342-3p. En la figura 18 se muestra el interactoma, donde se observa a NEAT1 como esponja de miR-342-3p regulando positivamente potenciales genes blanco del miR-342-3p; KDM6B, CYP51A1, TM4SF1, ZNF462, DTNBP1 y WDR77. Posteriormente se realizó un análisis de correlación en R con datos de pacientes de cáncer de mama del TCGA de la expresión de los blancos de miR-342-3p, de los cuales TM4SF1 presentó una correlación negativa significativa (figura 17D). Finalmente, se realizó un análisis de predicción de interacciones proteínas-proteínas para conocer los procesos biológicos que puedan estar sujetos a regulación del nuevo eje NEAT1-miR-342-3p vía sus mRNAs blancos (figura 18).

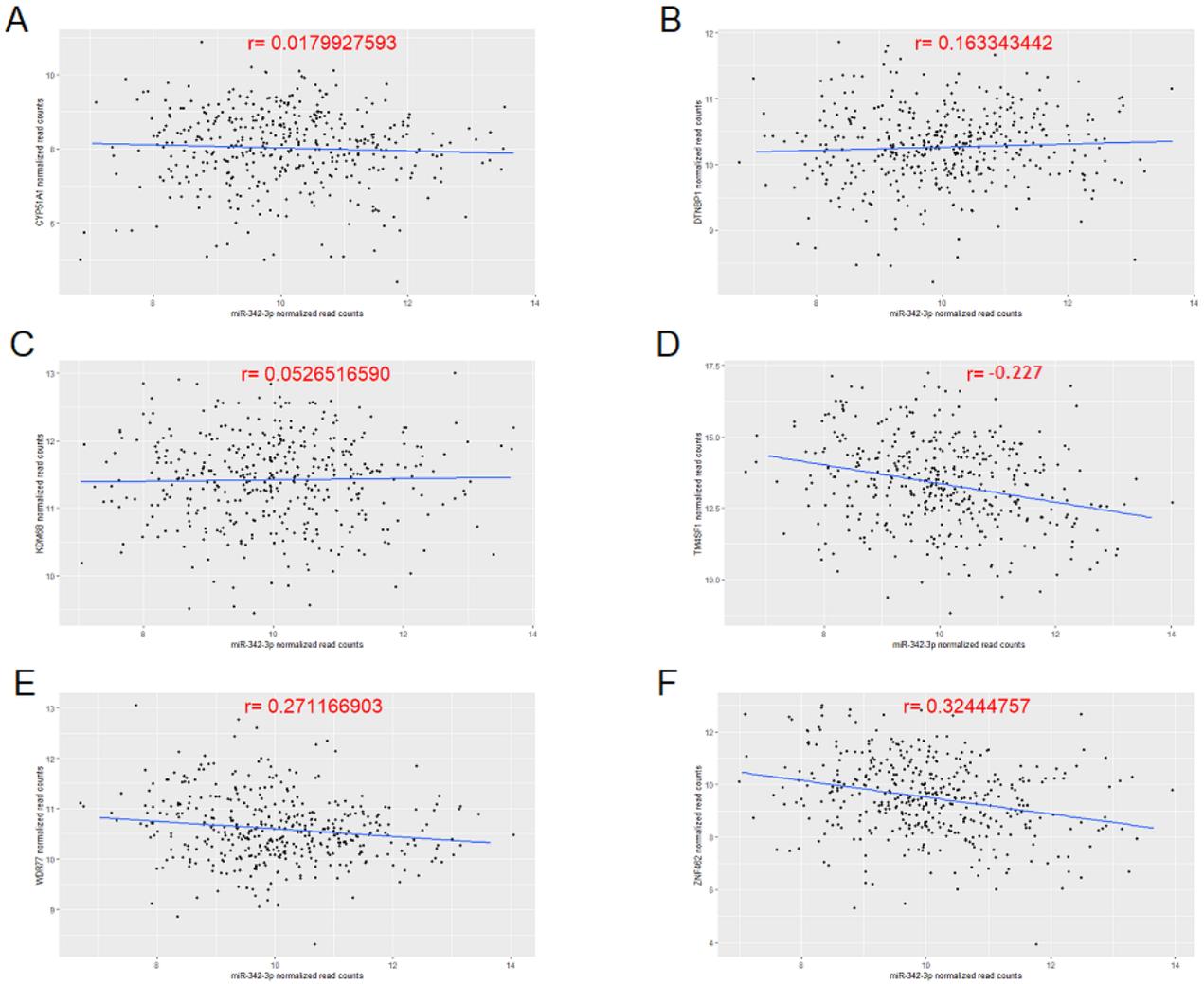


Figura 17. Correlación de la expresión de miR-342-3p y sus blancos. A) CYP51A1 B) DTBP1 C) KDM6B D) TM4SF1 E) WDR77 F) ZNF462. Se muestran las correlaciones entre las expresiones de miR-342-3p y sus potenciales blancos siendo significativas aquellas con valor de $r > 0.2$ (D, E y F).

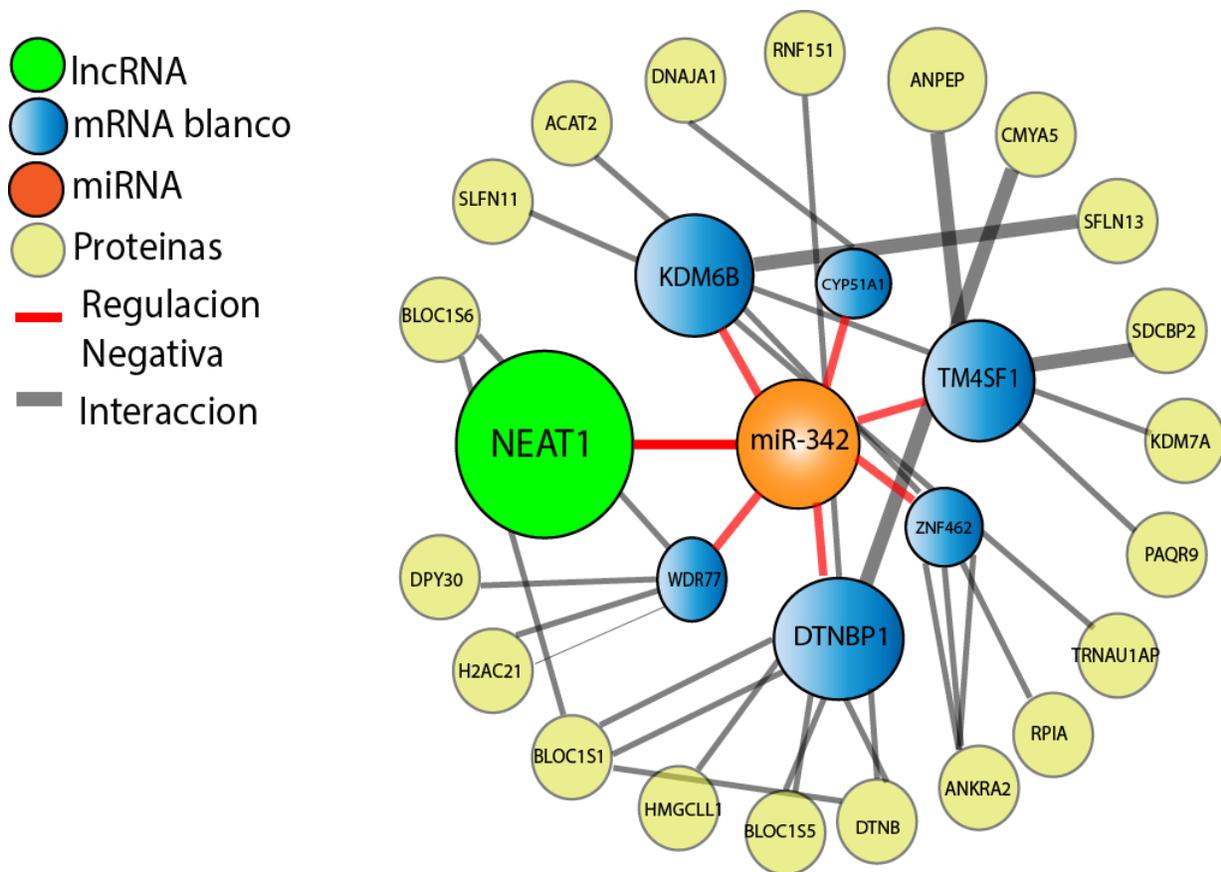


Figura 18. Interactoma del eje NEAT1-miR-342-3p y sus blancos en cáncer de mama: KDM6B, CYP51A1, TM4SF1, ZNF462, DTNBP1 y WDR77. En azul se muestran los blancos de regulación post transcripcional del eje miR-34-23p (naranja), a la vez regulados por un largo no codificante (NEAT1 en verde). Los blancos fueron seleccionados con el paquete de R miRnatap. En amarillo se muestran las proteínas con las cuales pueden interactuar los blancos de miR-342-3p, y por consiguiente verse afectadas bajo el eje de regulación de NEAT1. La predicción de las interacciones proteína-proteína fueron mediante un análisis de enriquecimiento de redes funcional (STRING).

Efecto del silenciamiento de NEAT1 sobre la disponibilidad de miR-342-3p

Una vez observado el efecto oncogénico de NEAT1 sobre la proliferación celular, se propuso investigar si este es a través de una función como esponja sobre el supresor de tumores miR-342-3p. Para ello se procedió a silenciar NEAT1 en la línea celular MDA-MB-231, posteriormente se determinó la disponibilidad de miR-342-3p a las 24 horas post transfección, esperando que estos se encontrarán en aumento al estar silenciada su esponja NEAT1. Los resultados del silenciamiento de NEAT1 mostraron que este se llevó a cabo de manera eficiente, siendo las concentraciones de 100 y 200 nM las más significativas, con una disminución del 70 % de NEAT1 respecto a los controles (figura 19A). En cuanto a miR-342-3p, se observó un aumento en su disponibilidad respecto a los controles, sin haber diferencias estadísticamente significativas. Esto nos hizo pensar que probablemente NEAT1 no secuestra a miR-342-3p (figura 19B). No obstante, la interacción sí puede ocurrir. Con el objetivo de apoyar esta idea, se evaluó la expresión de miR-3128 y miR-125a-5p bajo el silenciamiento de NEAT1. miR-3128 no tiene sitios de interacción potenciales ni validados con NEAT1, y el miR-125a-5p, el cual ha sido demostrado ser blanco de NEAT1 en cardiomiocitos [132]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se esperaba que el silenciamiento de NEAT1 no generara cambios en de miR-3128 al no interactuar con NEAT1. Mientras que el silenciamiento de NEAT1, sí generara cambios en miR-125a-5p, al ser blanco de NEAT1. No obstante, los resultados mostraron que al silenciar a NEAT1 la disponibilidad de miR-3128 no mostró cambios, como era de esperarse (figura 19C). Sin embargo, la expresión de miR-125-5p no se vio aumentada como esperábamos, posiblemente a tratarse de un contexto celular distinto al de los cardiomiocitos donde se ha descrito la regulación NEAT1/miR-125-5p (figura 19D).

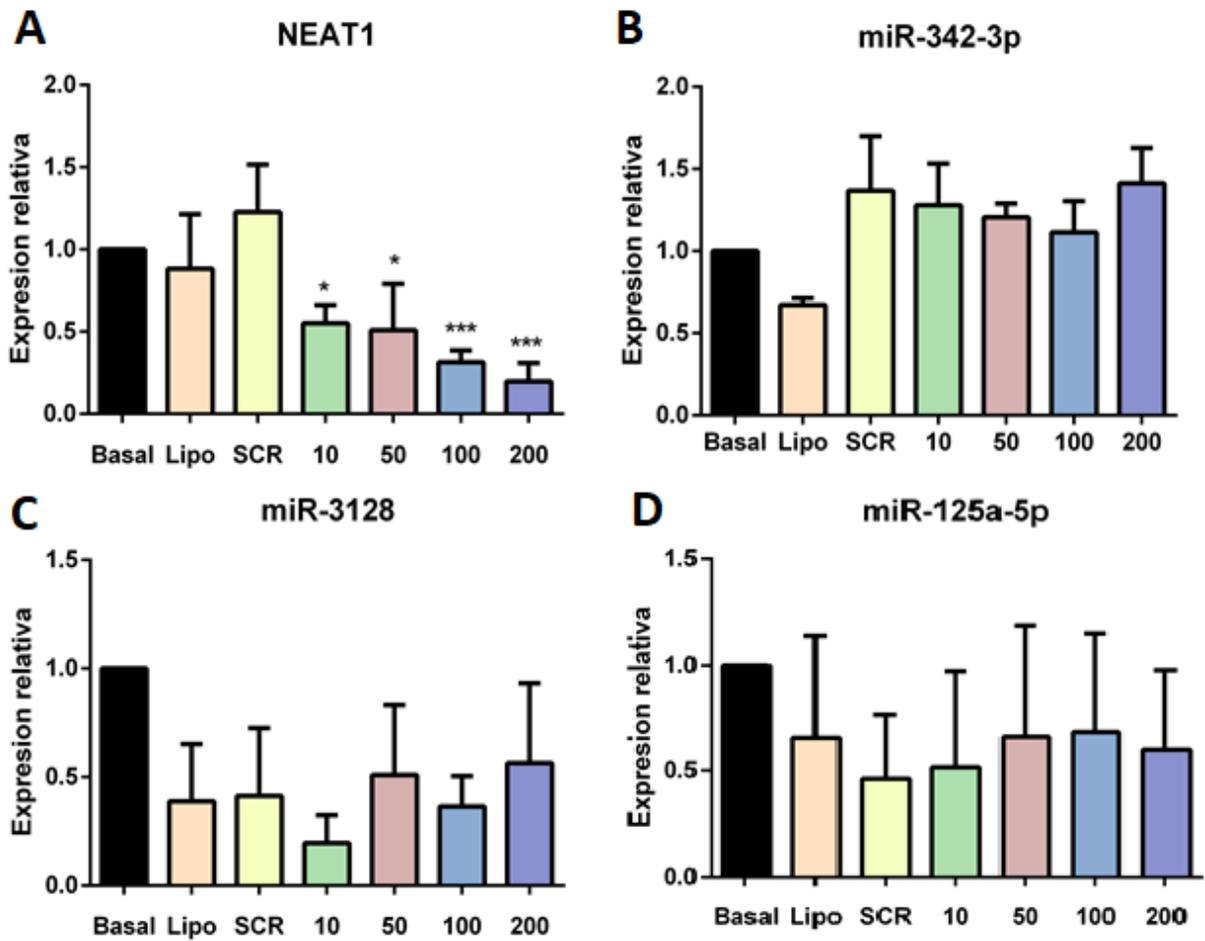


Figura 19. Efecto del silenciamiento de NEAT1 sobre tres microRNAs. A) Silenciamiento de NEAT1. B) Expresión de miR-342-3p con tendencia a la alta. C) Expresión de miR-3128 D) Expresión de miR-125a-5p. Se observo un incremento en la disponibilidad de miR-342-3p tras el silenciamiento de NEAT1 sin ser estadísticamente significativo.

ç

Interacción NEAT1 y miR-342-3p

Con el fin de conocer si existe una interacción entre NEAT1 y miR-342-3p en cáncer de mama, se evaluó la interacción del sitio uno de los nueve posibles sitios de interacción (tabla 3). Este se escogió basado en que es el sitio con mayor número de experimentos clip con argonauta con los cuales StarBase soporta la predicción. Además de que este sitio se caracteriza por estar presente en las dos isoformas de NEAT1 (épsilon y beta) en la región 1473-1492. Los resultados mostraron que no hay cambios en la actividad de luciferasa respecto a los controles (miR-1 y *scrambled*) tras la transfección del mimic de miR-342-3p en el plásmido con la secuencia WT y MUT (figura 20). Con esto, concluimos que NEAT1 no es blanco de miR-342-3p en cáncer de mama a través del sitio 1.

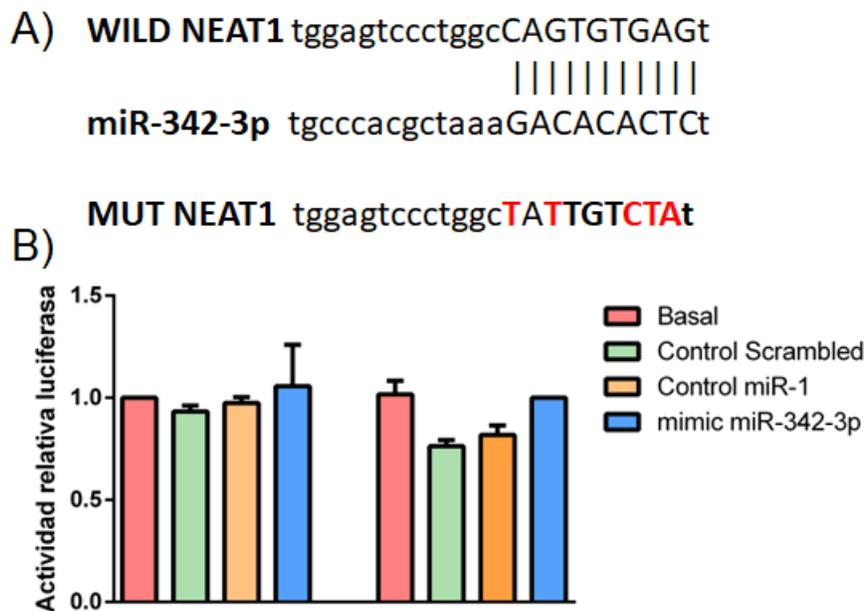


Figura 20. Ensayo de luciferasa en células HeLa por triplicado experimental A) Sitio de interacción de miR-342-3p con la secuencia de NEAT1. **B)** Actividad de luciferasa de NEAT1-WT y NEAT1-MUT con y sin la transfección del mimic de miR-342-3p. Se utilizaron cuatro grupos experimentales: Basal o sin tratamiento, una secuencia scrambled (invitrogen), mimic de miR-1 y mimic de miR-342-3p. Los cuatro grupos fueron transfectados con Renilla y la construcción de sitio *wild type* o mutante (izquierda y derecha, respectivamente).

NEAT1, potencial lncRNA blanco de miR-342-3p

Los resultados anteriores mostraron que NEAT1 no actúa como esponja de miR-342-3p en cáncer de mama, sin embargo, no descarta una interacción de otro tipo, por ejemplo, una regulación negativa de NEAT1 por miR-342-3p. Para explorar esta hipótesis, se evaluó el efecto en la expresión de NEAT1 tras la transfección del mimic de miR-342-3p. Con ello, se esperaba que si miR-342-3p puede regular negativamente a NEAT1, los niveles de expresión del lncRNA disminuyera con la sobreexpresión exógena del microRNA. El resultado mostro una disminución del 30 % de NEAT1 con la sobreexpresión de miR-342-3p en comparación con los controles, lo cual sugiere una regulación indirecta de miR-342-3p sobre NEAT1 a través de los blancos del primero, o bien, que miR-342-3p puede tener como blanco a NEAT1 a través de otro sitio no evaluado (tabla 3) (figura 21).

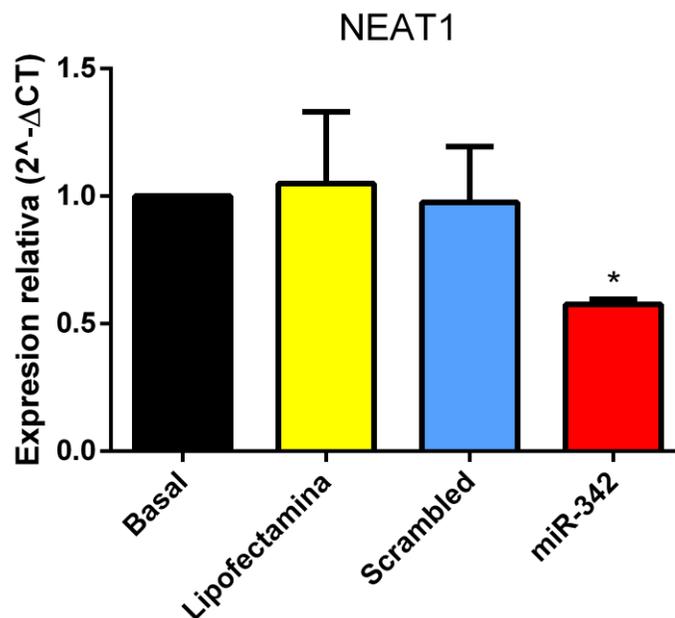


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de miR-342-3p reduce 30 % la expresión de NEAT1. Se realizaron tres experimentos independientes en la línea células MDA-MB-231. Se utilizaron cuatro grupos experimentales: células basales, lipofectamina, scrambled y el mimic de miR-342-3p.

NEAT1 establece una red de regulación con ncRNAs-RNAs en cáncer de mama

Cabe señalar que los lncRNAs además de funcionar como esponjas de miRNAs, también tienen la capacidad de interactuar con otros RNAs. En ese sentido, con el objetivo de entender el papel de NEAT1 en cáncer de mama, se predijeron el número de interacciones posibles con otros RNAs, con los que puede competir por sitios en común por microRNAs. Para ello, partiendo de datos de 22 tipos de cáncer en la base de datos pan-cáncer, los resultados mostraron que, en el cáncer de mama, próstata, pulmón, testicular, pulmonar, riñón, cabeza y cuello y vejiga son los tipos de cáncer con mayor número de interacciones posibles entre NEAT1 y ceRNAs. De los cuales destaca el cáncer de mama, ya que de acuerdo con nuestro análisis presentó el mayor número de potenciales interacciones, 522 (figura 22). Este dato, además de sugerir una compleja red de regulación encabezada por NEAT1, también sugiere su relevante papel en este tipo de cáncer. Dentro de las 522 potenciales interacciones de NEAT1 con ceRNAs, 12 de ellos muestran significancia estadística ($p \leq 0.05$) (figura 23).

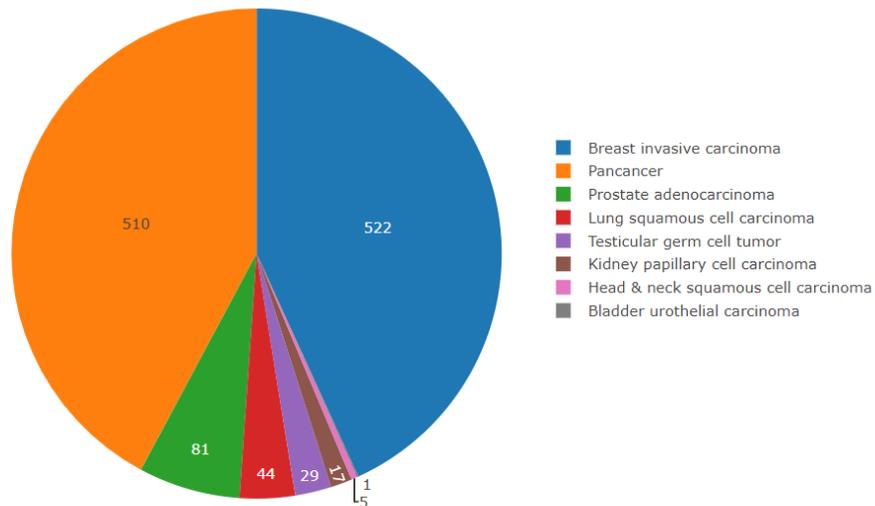


Figura 22. Interacciones significativas de NEAT1 por tipo de cáncer. En la gráfica se muestra el número de interacciones que NEAT1 tiene por tipo de cáncer con microRNAs, mRNAs y lncRNAs, siendo el cáncer de mama el que mayor número presenta (522), seguido de próstata (81) y pulmón (44).

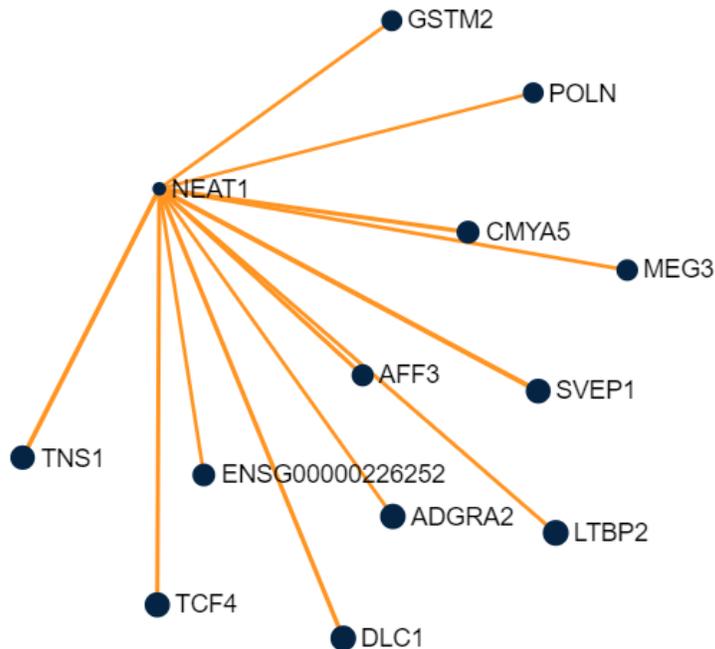


Figura 23. Interacciones significativas de NEAT1 con ceRNAs en cáncer de mama. Valor de $P \leq 0.05$. Se muestran los RNAs con los cuales se predice una interacción con NEAT1 en cáncer de mama. mRNAs: GSTM2, POLN, CMYA5, SVEP1, LTBP2, ADGRAD2, DLC1, TCF4, y TNS1. LncRNAs: MEG3 y ENSG00000226252.

De los tipos de RNAs con los que NEAT1 puede interactuar en cáncer de mama, 87 de ellos son microRNAs, de los cuales únicamente ocho (miR-548, miR-129-5p, miR-218-5p, miR-448, miR-146b-5p, miR-141-3p, miR-548a-3p, miR-211, miR-101, y miR-138-5p) han sido validados funcionalmente (figura 24). Interesantemente, se identificó que, del panel de microRNAs asociados a respuesta a tratamiento antes mencionados [109], NEAT1 tiene sitios de interacción con otros cinco microRNAs además de miR-342-3p. Estos son: miR-141-3p, miR-200c-3p, miR-200b-3p, miR-361-3p y miR-301a-3p. Respecto a su expresión, con los datos de TCGA de cáncer de mama disponibles en PanCancer y StarBase, se determinó correlación negativa entre la expresión de miR-200c-3p, miR-301a-3p, miR-141-3p y miR-200b-3p con NEAT1, mientras que la correlación de la expresión de miR-361-a3p con NEAT1 resulto positiva. De estos microRNAs, miR-301a-3p destaca por tener una correlación negativa significativa ($r=-0.026$, respectivamente) (figura 25).

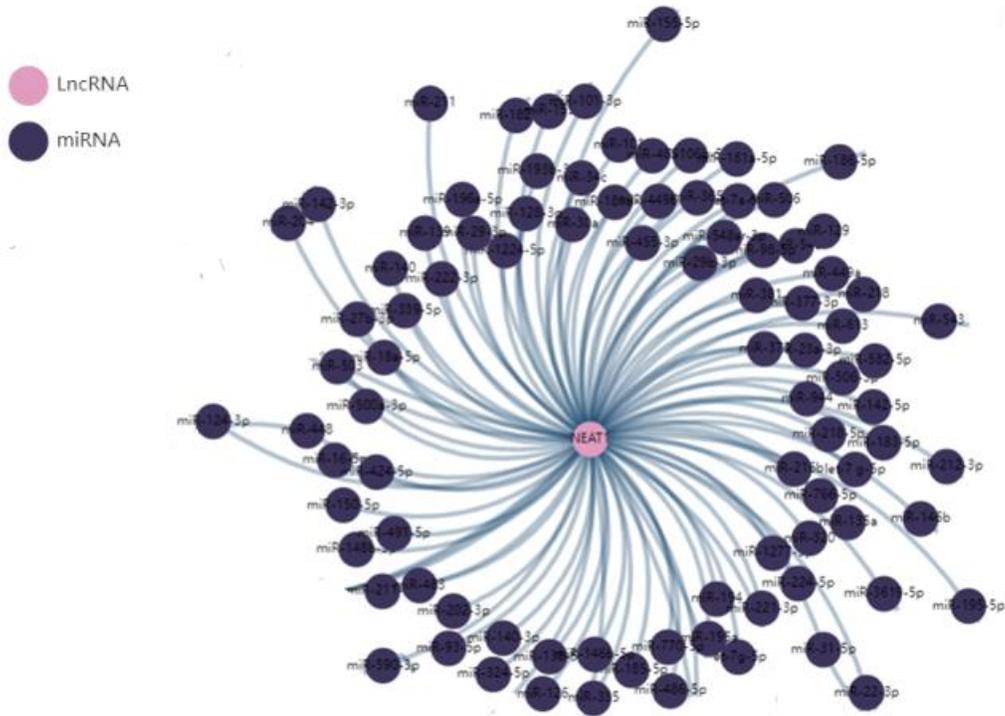


Figura 24. Red de NEAT1 como esponja de microRNAs en cáncer de mama. Se muestra red de interacción de NEAT1 con microRNAs en cáncer de mama de los cuales únicamente se ha validado una interacción funcional con ocho: miR-548, miR-129-5p, miR-218-5p, miR-448, miR-146b-5p, miR-141-3p, miR-548ar-3p, miR-211, miR-101, y miR-138-5p .

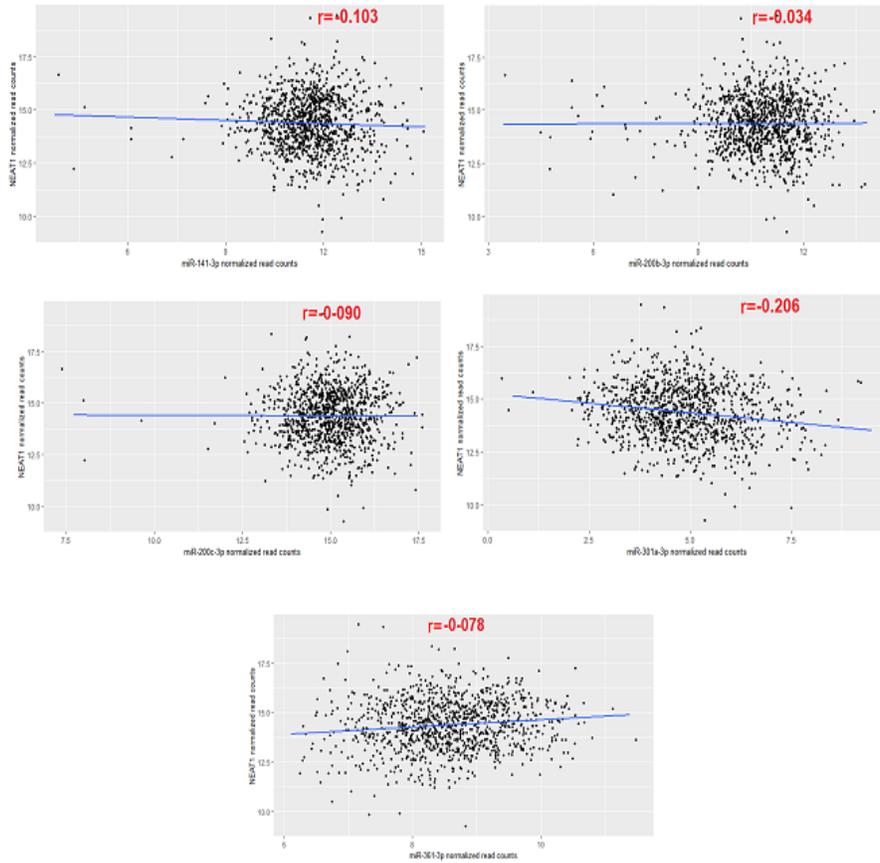


Figura 25. Correlación de la expresión de microRNAs asociados a respuesta a tratamiento y NEAT1 con datos de TCGA y StarBase. A) miR-200c-3p, b) miR-301a-3p, c) miR-141-3p, d) miR-200b-3p y e) miR-361a-3p. $r = >0.2$ significativa para miR-301a-3p.

Discusión

El cáncer se caracteriza por ser altamente heterogéneo, entre tipos y a nivel intratumoral [133]. Esta heterogeneidad engloba a los RNAs no codificantes, que modulan casi todos los procesos celulares a través de redes de interacción que conforman. En cáncer de mama, se han descrito perfiles de expresión de lncRNAs y microRNAs que caracterizan la heterogeneidad molecular [134, 135]. Por consiguiente, las interacciones que conforman están sujetas a ser específicas del contexto celular [136]. Con ello pueden participar de manera distinta repercutiendo de manera significativa en los hallmarks del cáncer y procesos que conducen a la resistencia a fármacos. Además, la especificidad de su expresión y las interacciones formadas abren oportunidades para proponerlos como biomarcadores y blancos terapéuticos [137].

En el presente estudio se propuso evaluar una posible red de interacción que contribuyera al fenotipo tumoral de cáncer de mama. La red propuesta está basada en la función de esponjas de lncRNAs conformada por el lncRNA NEAT1 y miR-342-3p, ambos con antecedentes de oncogén y supresor de tumores, respectivamente, en varios tipos de cáncer [109, 110, 111, 119].

Al predecir redes formadas por esponjas de RNAs, se busca que haya una correlación entre la expresión de ambas, por lo que se cuantificó la expresión de los RNAs. Los datos de expresión de miR-342-3p y de NEAT1 en las líneas celulares coinciden con los reportados previamente, confirmando una correlación negativa entre la expresión de NEAT1 y miR-342-3p en cáncer de mama [111, 119]. En el caso particular de NEAT1, la expresión de la isoforma épsilon es mayor en los subtipos triple negativo y luminal en comparación con la isoforma beta, la cual está más expresada en el subtipo HER2, datos que coinciden con los de este estudio al haber encontrado a NEAT1 MENbeta menos expresado que NEAT1 MENépsilon [133].

Las muestras de pacientes mostraron a miR-342-3p mayormente expresado en muestras correspondientes al subtipo triple negativo, a diferencia de lo esperado, ya que se ha reportado a miR-342-3p mayormente expresado en los subtipos luminales y HER2. Sin embargo, en nuestros resultados el 60 % de las muestras de pacientes triple

negativo correspondieron a pacientes con respuesta a tratamiento sistémico, es por esto por lo que atribuimos que miR-342-3p se encuentra sobreexpresado en este subtipo, puesto que es un miRNA asociado a respuesta a quimioterapia [109]. Aunque, es necesario analizar una cohorte de pacientes mexicanas más extensa para observar si los datos son replicables. Respecto a NEAT1, nuestros resultados mostraron una mayor expresión del lncRNA en pacientes triple negativo, igual a lo reportado de datos de muestras de sangre, lo cual está asociado a características del subtipo triple negativo como baja supervivencia de los pacientes, quimioresistencia y fenotipo de células madre o *stemness* [121].

Se ha reportado que NEAT1 tienen un papel como oncogén en cáncer, a este respecto en este trabajo se evaluó su contribución en cáncer de mama. Para ello, se realizó un ensayo de formación de colonias silenciando a NEAT1. Los resultados mostraron que su silenciamiento disminuyó la proliferación celular, similar a lo obtenido por Shin, V.Y. (2019) [121].

NEAT1 presenta 9 potenciales sitios de interacción con miR-342. Con el fin de determinar si NEAT1 es capaz de regular a miR-342-3p, se procedió a silenciar a NEAT1, esperando el aumento de miR-342-3p, refiriéndose a su disponibilidad. Los resultados mostraron solo una tendencia a la alta del microRNA. No obstante, observamos un nulo efecto sobre los microRNAs usados como control positivo y negativo (miR-125a-5p y miR-3128, respectivamente). Posteriormente, el ensayo de luciferasa demostró que NEAT1 no tiene como blanco a miR-342-3p a través de uno de los sitios (1). Sin embargo, se encontró una potencial interacción de miR-342-3p y NEAT1 en la cual se plantea que miR-342-3p tiene como blanco de regulación negativa a NEAT1, ya sea a través de otros sitios o por una regulación indirecta a través de los blancos del microRNA. Este hallazgo abre la posibilidad de estudiar a miR-342-3p y NEAT1 en otro contexto celular en el cual el microRNA este sobreexpresado y regule a la baja el oncogén NEAT1 pero que en un contexto como el cáncer de mama triple negativo, se pierda la regulación. Lo anterior está basado en el hecho que la interacción sí sucede en otro contexto celular, como lo describió previamente Wang, L. (2019) en células de macrófago THP-1 [122]. Es decir, la dependencia del contexto celular está sujeta

a varios factores. Por ejemplo; una esponja de microRNAs tiene múltiples microRNAs blancos en un solo contexto celular por lo que de acuerdo con la hipótesis de RNAs de competencia endógenos, microRNAs con mayor abundancia pueden saturar a un lncRNA, evitando así que los miRNAs con menor expresión no sean secuestrados. En el caso de NEAT1, se le ha identificado en cáncer de mama como esponja de los ejes miR-410-3p/CCND1, miR-448/ZEB1, miR-124/STAT3, miR21-RRM2 [139, 120, 140, 141]. Además, se ha descrito que un solo lncRNA forma interacciones con otros RNAs como mRNAs. A pesar de ello, a la fecha, únicamente se ha validado la interacción de NEAT1 con ELF3. Sin embargo, en el presente trabajo, logramos predecir que NEAT1 establece 522 posibles interacciones con otros RNAs en cáncer de mama, y es este tipo de cáncer en el que mayor número de interacciones posibles presenta NEAT1 (figura 9). Algunos de estos RNAs destacan por su papel como oncogenes y supresor de tumores en cáncer de mama. Como oncogenes son los siguientes: POLN que es una polimerasa susceptible de error que esta sobre expresada en cáncer de mama. SVEP1, el cual se encuentra regulado positivamente por estrógeno, AFF3 que esta sobreexpresado en muestras de cáncer de mama y está asociado a la activación de la vía de WNT, ADGRA2 el cual es un enhancer del receptor WNT7 promoviendo la activación de la vía de WNT [142-145]. Como supresores de tumores destacan; MEG3 que es un lncRNA que reprime la vía de PI3K/AKT, NF-KB-p53 y el proceso de EMT, DLC1, y TNS1 al estar subexpresado aumenta la motilidad celular [146-149].

Respecto a los microRNAs, en este trabajo determinamos bioinformáticamente que NEAT1 tiene la posibilidad de interactuar con 87 de ellos en cáncer de mama, de los cuales, solo ocho han sido validados funcionalmente (miR-548, miR-129-5p, miR-218-5p, miR-448, miR-146b-5p, miR-141-3p, miR-548ar-3p, miR-211, miR-101, y miR-138-5p). A este respecto, es importante mencionar que la interacción con estos microRNAs puede saturar a NEAT1 afectando la interacción de NEAT1 con miR-342-3p [150]. Asimismo, también hay que considerar que miR-342-3p puede estar sujeto a regulación de otros lncRNAs que actúen como esponja de este. Al predecir otros potenciales lncRNAs con función de esponja de miR-342-3p, los resultados mostraron que uno de ellos puede ser SNHG7, el cual se ha reportado que secuestra a miR-342-3p promoviendo

la proliferación en cáncer de mama [151]. Otro fue. SNHG20, el cual secuestra a miR-342-3p en adenocarcinoma de pulmón inhibiendo apoptosis y promoviendo proliferación e invasión [152]. OIP5-AS1 actúa como esponja de miR-342-3p en cáncer de páncreas alterando la vía AKT/ERK [153].

Es de suma importancia también recalcar que las interacciones entre RNAs pueden ser dependientes de un estímulo específico, por ejemplo, la resistencia a fármacos. En el caso de NEAT1 y miR-342-3p, ambos tienen antecedentes en resistencia a quimioterapia. Por ejemplo, las células triple negativo sensibles a tratamiento con paclitaxel y doxorubicina tienen una mayor expresión de miR-342-3p [154], mientras que NEAT1 subexpresado ha mostrado inducir sensibilidad a quimioterapia [121]. Por lo que, si hay menos lncRNA, habría más miR-342-3p y por ende mayor actividad de supresor de tumores y/o mayor sensibilidad a quimioterapia. De tal manera, que esta regulación puede ser dependiente de un contexto celular en quimioresistencia.

Otro de los factores que puede contribuir a que no haya una regulación como esponja a pesar de haber sitios de interacción entre dos moléculas es la presencia de polimorfismos (SNPs) en la región semilla que comparten NEAT1 y miR-342-3p. Tal es el caso de miR-186, un microRNA que presenta polimorfismos en cáncer de mama, ocasionando la pérdida de complementariedad e interacción [155, 156].

Como se mencionó anteriormente, las interacciones RNA son tejido específicas, por lo que existe la posibilidad de que la regulación NEAT1-miR-342-3p suceda en un subtipo molecular de cáncer de mama no evaluado en este trabajo. Considerando, que la isoforma de NEAT1 MENbeta es la que mayor número de posibles sitios de interacción tiene con miR-342-3p y que esta se expresa mayormente en el subtipo HER2, es posible que la regulación sea específica de este subtipo [157].

Independientemente de la regulación de NEAT1 sobre miR-342-3p, este último es un microRNA con un papel importante de supresor de tumores en diferentes tipos de cáncer por lo que los blancos que pueda regular en cáncer de mama son de interés para el estudio de los mecanismos post transcripcionales que contribuyen a la

enfermedad. Los seis potenciales blancos tienen antecedentes de ser oncogenes y correlacionar con la expresión de miR-342-3p. De ellos, TM4SF1, está descrito como oncogén en cáncer colorrectal, ovario y mama en los cuales promueve la actividad de la vía PI3K/AKT/mTOR y Wnt/ β catenina [158-160]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos de regulación y a través de los cuales ejerce su función en cáncer, por lo que al tener sitios de interacción con miR-342-3p y correlacionar su expresión en cáncer de mama, lo hace un blanco interesante de estudio. Por otra parte, WDR77, forma un complejo de splicing que favorece la proliferación y migración a través de los genes que regula, en cáncer de mama [161]. KDM6B está sobreexpresado en el subtipo luminal y asociado a una baja sobrevida en los pacientes. CYP51A1 es una enzima que participa en la biogénesis del colesterol, siendo blanco de terapias dirigidas a disminuir la producción de colesterol en cáncer de mama [162]. DTNBP1, estimula la actividad cinasa de PI3K contribuyendo al desarrollo de cáncer de páncreas [163]. En el caso de cáncer de mama solo se ha descrito estar sobreexpresado [164]. Respecto a ZNF462, pertenece a una familia de proteínas con dedos de Zinc tipo C2H2 con posible actividad transcripcional, el cual se ha mostrado estar frecuentemente mutado (> 1%) y con metilación aberrante en cáncer de mama [165, 166].

Finalmente, NEAT1, tiene un efecto oncogénico como se demostró con el ensayo de formación de colonias, y la potencial interacción que puede tener como esponja sobre microRNAs asociados a tratamiento, plantea de su estudio una oportunidad para entender los mecanismos que subyacen su asociación a una baja sobrevida en los pacientes y fenotipos más agresivos de cáncer de mama.

Conclusiones

- NEAT1 está expresado en líneas celulares de cáncer de mama y tiene 522 potenciales interacciones con otros RNAs.
- miR-342-3p está subexpresado en líneas de cáncer de mama celulares triple negativo.
- Se identificaron los oncogenes TM4SF1, WDR77 y ZNF462, como potenciales blanco de miR-342-3p, en cáncer de mama.
- El silenciamiento de NEAT1 no tiene un impacto sobre un aumento en la disponibilidad de miR-342-3p.
- La interacción de NEAT1 y miR-342-3p no está mediada por el sitio 1.
- La evidencia no descarta una interacción a través de otro sitio
- miR-342-3p, al estar sobreexpresado, puede regular negativamente a NEAT1 como su blanco post transcripcional.
- NEAT1 puede regular a miR-200c-3p, miR-301a-3p, miR-141-3p, miR-200b-3p y miR-361a-3p, microRNAs implicados en la respuesta a quimioterapia en cáncer de mama mediante el mecanismo de esponja.

Perspectivas

- Evaluar a NEAT1 como blanco de miR-342-3p y sus posibles implicaciones en cáncer de mama.
- Evaluar a SNHG7 y SNHG20 como esponjas de miR-342-3p en cáncer de mama.
- Evaluar funcionalmente los blancos de miR-342-3p, particularmente TM4SF1, WDR77 y ZNF462, por su papel en cáncer y correlación significativa con la expresión de miR-342-3p.
- Determinar la interacción de miRNAs asociados a respuesta a tratamiento (miR-141, miR-200b, miR-200c, miR-361 y miR-301 con NEAT1.

Referencias bibliográficas

- [1] Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5), 646-674.
- [2] National Cancer Institute. (2019). Understanding Cancer. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. Consultado el 21/11/21. <https://www.cáncer.gov/about-cáncer/understanding/what-is-cáncer>.
- [3] Hyuna, S., Ferlay, J. Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cáncer J Clin*, 71 (3), 209-249.
- [4] Harbeck, N, Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnat, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. and Cardoso, F. (2019). Breast Cáncer. *Nat Rev Dis Primers*. 5 (1), 66.
- [5] Xiaofang, D. Ting, L., Zhonghu, B., Yankun, Y., Xiuxia, L., Jinling, Z. and Bozhi, S. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cáncer Res*. 5 (10), 2929-2943.
- [6] Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 8, 23-31.
- [7] Hennigs, A., Riedel, F., Gondos, A., Sinn, P., Schirmacher, P., Marmé, F., Jäger, D., Hans-Ulrich, K., Stieber, A., Lindel, K., Debus, J., Golatta, M., Schütz, F., Sohn, C., Heil, J., and Schneeweiss. (2016). Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer*. 16:734
- [8] National Comprehensive Cancer Network. (2021). *Breast cancer (version 8.2021)*. Consultado el 21/11/21 en <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1419>.

- [9] National Comprehensive Cancer Network. (2021). *Breast cancer (version 8.2021)*. Consultado el 21/11/21 en <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1419>.
- [10] Waks, G.A. and Winer, P.E. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*. 321 (3), 288-300.
- [11] Shah, M., Nunes, R.M. and Stearns, V. (2018). CDK4/6 Inhibitors: Game Changers in the Management of Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer? *Oncology (Williston Park)*. 32 (5), 216-222.
- [12] Yang, X., Wu, D. and Yuan, S. (2020). Tyrosine kinase inhibitors in the combinatory therapy of HER2 positive breast cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 19, 1533033820962140.
- [13] Li, Y., Miao, W., He, D., Wang, S., Lou, J., Jiang, Y. and Wang, S. (2021). Recent progress on immunotherapy for Breast Cancer: Tumor microenvironment, nanotechnology and more. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, (680315).
- [14] Wang, W., Han, C., Sun, Y., Chen, T., and Chen, Y. (2019). Noncoding RNAs in cancer therapy resistance and targeted drug development. *Journal of Hematology & Oncology*. 12 (55).
- [15] Palazzo, F.A. and Lee, S.E. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.* 6 (2).
- [16] Djebali, S., Davis, C., Merkel, A. *et al.* (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 489, 101-108.
- [17] Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116 (2), 281-297.
- [18] Kim, V. N., Han, J. and Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10 (2), 126-139.
- [19] Lin, S., and Gregory, I.R. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cáncer*. 15, 321-333.
- [20] Wu, K., He, J., Pu, W. and Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 16 (2), 120-126.

- [21] Gu, S., and Kay, M. A. (2010). How do miRNAs mediate translational repression? *Silence*, 1 (1), 11.
- [22] Seok, H., Ham, J., Jang, E. S. and Chi, S. W. (2016). MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions. *Molecules and Cells*. 39 (5), 375-381.
- [23] Zhang, F. and Wang, D. (2017). The pattern of microRNA binding site distribution. *Genes (Basel)*. 8 (11), 296.
- [24] Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z. & Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, 15 Suppl 7 (Suppl 7), S4.
- [25] Leucci, E., Patella, F., Waage, J., Holmstrom, Lindow, M., Porse, B., Kauppinen, S., and Lund, H.A. (2013). microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci Rep*. 3, 2535.
- [26] Peter, M.E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*. 29, 2161-2164.
- [27] Guo, Z., Maki, M., Ding, R., Yang, Y., Zhang, B. and Xiong, L. (2014). Genome-wide survey of tissue specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Sci Rep*. 4, 5150.
- [28] Plotnikova, O., Baranova, A. and Skoblov, M. (2019). Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA Interactome. *Front. Genet*. 10, 933.
- [29] Volders, P., Anckaert, J., Verheggen, K., Nuytens, J., Martens, L., Mestdagh, P. and Vandesompele, J. (2019). LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*. 43, D-174-80.
- [30] Jarroux, J. Morillon, A. and Pinskaya, M. (2017). History, discovery, and classification of lncRNAs. *Adv Exp Med Biol*. 1008, 1-46.
- [31] Clark, B.S. and Blackshaw, S. (2014). Long non-coding RNA-dependent transcriptional regulation in neuronal development and disease. *Front Genet*. 6 (5), 164.
- [32] Somarowthu, S., Legiewicz, M., Chillon, I., Marcia, M., Liu, F. and Pyle, A.M. (2015). HOTAIR forms an intricate and modular secondary structure. *Mol Cell*. 58 (2), 353-61.

- [33] Hu, W. Alvarez-Dominguez, R.J. and Lodish, F.H. (2012). Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Rep.* 13, 971-983.
- [34] Xian, J.F., Yin, Q.F., Chen, T., Zhang, Y., Zhang, X.O, Wu, Z., Zhang, S., Wang, H.B., Ge, J., Lu, X., Yang, L. and Chen L.L. (2014). Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus. *Cell Research.* 24, 513-531.
- [35] Giwojna, B.A., Igielska, P.A., and Grummt, I. (2019). lncRNA KHPS1 activates a poised enhancer by triplex-dependent recruitment of epigenomic regulators. *Cell Rep.* 26 (11), 2904-2915.
- [36] Bousard, A. Raposo, A.C., Zyllicz, J.J., Picard, C., Borges, P.V., Qi, Y., Gil., C., Syx, K., Chang, H.Y., Heard, E. and da Rocha T.S. The role of Xist-mediated Polycomb recruitment in the initiation of x-chromosome inactivation.
- [37] Chujo, T., Yamazaki, T. and Hirose, T. (2016). Architectural (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochim Biophys Acta.* 1859 (1), 139.
- [38] Wang, C.K. and Chang, H.Y. (2012). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 43 (6), 904-914.
- [39] Trujano, C.S., Cantú de León, D., Delgado, W., I., Coronel, H.J., Millan, C.O., Herandez, S.D., Lopez, C.C., Plasencia, P.C. (2021). Inhibition of Wnt Catenin Signaling by ICRT14 drug depends of post-transcriptional regulation by HOTAIR in human cervical cancer HeLa cells. *Front. Oncol.* 11, 729228.
- [40] Romeros, B.N., Florencia, L.M, Benhamed, M., Ariel, F. and Crespi, M. (2018). Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 46 (5), 2169-2184.
- [41] Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., Chrousos, G.P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation- associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal.* 3:ra8.
- [42] Wang, P. Xue, Y. Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., Jiang, Z., Xu, J., Liu, Q. and Cao, X. (2014). The STAT3-Binding Long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science.* 344, 6181.

- [43] Augoff, K., McCue, B., Plow, F.E., and Alaoui, S.K. (2012). MiR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer*. 11, 5.
- [44] Sun, T., Du, S.Y., Armenia, J. Qu, F., Fan, J., Wang, X., Fei T., Komura, K., Liu, X.S., Lee, M.G, and, Kantoff, P.W. (2018). Expression of lncRNA *MIR222HG* co-transcribed from the *miR-221/222* gene promoter facilitates the development of castration-resistant prostate cancer. *Oncogenesis*. 7, 30.
- [45] Yu, Y., Nangia-Makker, P., Farhana, L., and Majumdar, P.N.A. (2017). A novel mechanism of lncRNA and miRNA interaction: CCAT2 regulates miR-145 expression by suppressing its maturation process in colon cancer cells. *Mol Cáncer*. 16, 155.
- [46] Fernandes, C.R.J., Acuña, M.S., Aoki, I.J., Floeter-Winter, L.M., Muxel, M.S. (2019). Long Non-coding RNAs in the regulation of gene expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA*. 5(1):17.
- [47] Salmena, L., Poliseno, L. Tay, Y., Kats, L., and Pandolfi, P.P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*. 146 (3): 353-8.
- [48] Zheng, X.B., Zhang, M., Xu, Q.M. (2017). Detection and characterization of ciRS-7: a potential promoter of the development of cáncer. *Neoplasma*. 64 (3): 321-328.
- [49] Majoros, H.W., Ohler, W. (2007). Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics*. 7(8):152.
- [50] Ergun, S. and Oztuzcu, S. (2015). Oncocers: ceRNA-mediated cross-talk by sponging miRNAs in oncogenic pathways. *Tumour Biol*. 36(5):3129-36.
- [51] Jalali, S., Bhartiya, D., Lalwani, K.M, Sivasubbu, S., Scaria, V. (2013). Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions. *PLoS One*. 8(2): e53823.
- [52] Lu, M.H., Tang, B., Zeng, S., Hu, C.J., ie, R., Wu, Y.Y., Wang, S.M., He, F.T., Yang, S.M. (2016). Long noncoding RNA BC032469, a novel competing

- endogenous RNA, upregulates TERT expression by sponging miR-1207-5p and promotes proliferation in gastric cancer. *Oncogene*. 35(27):3524-34.
- [53] Wang, Y., Xu, Z., Jiang, J., Xu, C., Kang, J., Xiao, L., Wu, M., Xiong, J., Guo, X., Liu, H. (2013). Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal. *Dev Cell*. 25(1):69-80.
- [54] Zhang, B., Pan, X., Cobb, P.G., Anderson, A.T. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 302(1):1-12.
- [55] Guzel, E., Okyay, M.T., Yalcinkaya, B., Karacaoglu, S., Gocmen, M., Akcakuyu, H.M. (2020). Tumor suppressor and oncogenic role of long non-coding RNAs in cancer. *North Clin Istanb*. 7(1): 81-86.
- [56] Tornesello, L.M., Faraonio, R., Buonaguro, L., Annunziata, C., Starita, N., Cerasuolo, A., Pezzuto, F., Tornesello, L.A., Buonaguro, F.M. 2020. The role of microRNAs, long non-coding RNAs, and circular RNAs in cervical cancer. *Front Oncol*. 10:150.
- [57] V lorio, M., Ferracin, M., Liu, C., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, A.N., Querzoli, P., Negrini, M., Croce, M.C. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 65(16):7065-70.
- [58] Luo, Q., Li, X., Gao, Y., Long, Y., Chen, L., Huang, Y., Fang, L. (2013). MiRNA-497 regulates cell growth and invasion by targeting cyclin E1 in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 13:95.
- [59] Guo, X., Connick, M.C., Vanderhoof, J., Ishak, M.A., Hartley, R.S. (2015). MicroRNA-16 modulates HuR regulation of cyclin E1 in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci*. 16: 7112-7132.
- [60] Shukla, K., Sharma, A.K., Ward, A., Will, R., Hielscher, T., Balwierz, A., Wiemann, S. (2015). MicroRNA-30c-2-3p negatively regulates NF- κ B signaling and cell cycle progression through downregulation of TRADD and CCNE1 in breast cancer. *Mol. Oncol*. 9:1106-1119.

- [61] Xie, D., Song, H., Wu, T., Li, D., Hua, K., Xu, H., Fang, L. (2018). MicroRNA-424 serves an anti-oncogenic role by targeting cyclin-dependent kinase 1 in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 40: 3416-3426.
- [62] Chen, P., Xu, W., Luo, Y., Zhang, Y., He, Y., Yang, S., Yuan, Z. (2017). MicroRNA 543 suppresses breast cancer cell proliferation, blocks cell cycle, and induces cell apoptosis via direct targeting of ERK/MAPK. *Oncotargets Ther.* 10: 1423-1431.
- [63] Hong, B.S., Ryu, H.S., Kim, N., Kim, J., Lee, E., Moon, H., Moon, H.G. (2019). Tumor suppressor microRNA-204-5p regulates growth, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer. *Cáncer Res.* 79:1520-1534.
- [64] Jiang, Q., He, M., Ma, M.T., Wu, H.Z., Yu, Z.J., Guan, S., Wei, M.J. (2015). MicroRNA-148a inhibits breast cancer migration and invasion by directly targeting WNT-1. *Oncol. Rep.* 35: 1425-1432.
- [65] Fong, M.Y., Zhou, W., Liu L., Alontaga, A.Y., Chandra, M., Ashby, J., Wang, S.E. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 17:183-194.
- [66] McAnena, P., Tanriverdi, K., Curran C., Gilligan, K., Freedman, J.E., Brown, J., Kerin, M.J. (2019). Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal a from metastatic breast cancer. *BMC Cáncer.* 19:436.
- [67] Pang, B., Wang, Q., Ning, S., Wu, J., Zhang, X., Chen, Y., Xu, S. (2019). Landscape of tumor suppressor long noncoding RNAs in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 39:79.
- [68] Zhang, T., Hu, H., Yan, G., Wu, T., Liu, S., Chen, W., Ning, Y., Lu, Z. (2019). Long non-coding RNA and breast cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 18: 1533033819843889.
- [69] Youness, R.A., Hafez, H.F., Khallaf, E., Assal, A.R., Motaal, A.A, Gad, Z.M. (2019). The long noncoding RNA sONE represses triple-negative breast cancer aggressiveness through inducing the expression of miR-34a, miR-15a, miR-16, and let-7a. *J Cell Physiol.* 234 (11): 20286-20297.

- [70] Chen, C., He, W., Huang, J. Wang, B., Li, H., Cai, Q., Su, F., Bi, J., Liu, H., Zhang, B., Jiang, N. Zhong, G., Zhao, Y., Dong, W., Lin, T. (2018). LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. *Nat Commun.* 9(1):3826.
- [71] Jung, Y-S., Kim, J-M., Park, J-II. (2019). LncGata6-controlled stemness in regeneration and cancer. *Noncoding RNA Investig.* 3(4).
- [72] Zhong, H., Yang, J., Zhang, B., Wang, X., Pei, L., Zhang, L., Lin, Z., Wang, Y., Wang, C. (2018). LncRNA GACAT3 predicts poor prognosis and promotes cell proliferation in breast cancer through regulation of miR-497/CCND2. 22(4): 787-797.
- [73] Tang, J., Zhong, G., Zhang, H., Yu, B., Wei, F., Luo, L., Kang, Y., Wu, J., Jiang, J., Li, Y., Wu, S., Jia, J., Li, Y., Wu, S., Jia, Y., Liang, X., Bi, A. (2018). LncRNA *DANCR* upregulates PI3K/AKT signaling through activating serine phosphorylation of RXRA. *Cell Death Dis.* 9, 1167.
- [74] Wang, Y., Gong, G., Xu, J., Zhang, Y., Wu, S., Wang, S. (2020). Long noncoding RNA HOTAIR promotes breast cancer development by targeting ZEB1 via sponging miR-601. *Cancer Cell Int.* 20, 320.
- [75] Jiang, X., Zhou, Y., Sun, A.J., Xue, J.L. (2018). NEAT1 contributes to breast cancer progression through modulating miR-448 and ZEB1. *J Cell Physiol.* 233(11):8558-8566.
- [76] Liu, Y., Zhang, Y., Chen, C., Li, Y. (2021). lncRNA HIF1A-AS2: A potential oncogene in human cancers (Review). *Biomedical Reports.* 15, 85.
- [77] Yang, C., Tabatabaei, S.N., Ruan, X., Hardy, P. (2017). The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 44: 843-856.
- [78] Chen, Q., Zhu, C., Yingying, J. (2020). The oncogenic and tumor suppressive functions of the long noncoding RNA MALAT1: An emerging controversy. *Front. Genet.* 11, 93.
- [79] Yue, X., Wu, W-Y., Dong, M., Guo, M. (2020). LncRNA MALAT1 promotes breast cancer progression and doxorubicin resistance via regulating miR-570-3p. *Biomedical Journal.* 2.

- [80] Denkiewicz, M., Saha, I., Rakshit, S., Sarkar, J.P., Plewczynski, D. (2019). Identification of Breast Cancer Subtype Specific MicroRNAs Using Survival Analysis to Find Their Role in Transcriptomic Regulation. *Front Genet.* 10:1382.
- [81] Zhang, S., Wang, J., Ghoshal, T., Wilkins, D., Mo, Y-Y., Chen, Y., Zhou, Y. (2018). lncRNA gene signatures for prediction of breast cancer intrinsic subtypes and prognosis. *Genes (Basel).* 9(2):65-79.
- [82] Jonsson, P., Coarfa, C., Mesmar, F., Raz, T., Rajapakshe, K., Thompson, J.F., Gunaratne, P.H., Williams, C. (2015). Single-molecule sequencing reveals estrogen-regulated clinically relevant lncRNAs in breast cancer. *Mol Endocrinol.* 29(11):1634-1645.
- [83] Xu, S., Kong, D., Chen, Q., Ping, Y., Pang, D. (2017). Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer. *Mol Cáncer.* 16(1):129.
- [84] Merry, C.R, McMahon, S., Forrest, M.E., Bartels, C.F., Saiakhova, A., Bartel, C.A., Scacheri, P.C., Thompson, C.L., Jackson, M.W., Harris, L.N., Khalil, A.M. (2016). Transcriptome-wide identification of mRNAs and lincRNAs associated with trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer. *Oncotarget.* 7(33): 53230-53244.
- [85] Jiang, Y.Z., Liu, Y.R., Xu, X.E., Jin, X., Hu, X., Yu, K-D., Shao, Z-M. (2016). Transcriptome analysis of triple negative breast cancer reveals an integrated mRNA-lncRNA signature with predictive and prognostic value. *Cancer Res.* 76(8): 2105-2114.
- [86] Koduru, S.V., Tiwari, A.K., Leberfinger, A., Hazard, S.W., Kawasawa, I., Mahajan, M., Ravnic, D. (2017). A comprehensive NGS data analysis of differentially regulated miRNAs, piRNAs, lncRNAs and sn/snoRNAs in triple negative breast cancer. *J Cáncer.* 8(4): 578-596.
- [87] Chirshhev, E., Oberg, K. C., Ioffe, Y. J., & Unternaehrer, J. J. (2019). Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. *Clinical and translational medicine.* 8(1), 24.
- [88] Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K.A., Kassem, M., Zaher, W., Alfayez, M., Aldahmash, A., Alajez, N.M. (2019). Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* 8(9): e3045.

- [89] Xu, Y.H., Deng, J.L., Wang, G., Zhu, Y.S. (2019). Long non-coding RNAs in prostate cancer: Functional roles and clinical implications. *Cancer Lett.* 464:37-55.
- [90] Groskopf, J., Aubin, S.M., Deras, I.L., Blasé, A., Bodrug, S., Clark, C., Brentano, S., Mathis, J., Pham, J., Meyer, T., Cass, M., Hodge, P., Macairan, M.L., Marks, L.S. (2006). Rittenhouse H. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 52(6):1089-95.
- [91] Chen Y, Xiao Z, Hu M, Luo X, Cui Z. Diagnostic efficacy of long non-coding RNA MALAT-1 in human cancers: a meta-analysis study. *Oncotarget.* 8(60):102291-102300.
- [92] Zhang, K., Luo, Z., Zhang, Y., Zhang, L., Wu, L., Liu, L., Yang, J., Song, X., Liu, J. (2016). Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cáncer Biomark.* 17(2):187-94.
- [93] Zhan, H., Tu, S., Zhang, F., Shao, A., Lin, J. (2020). MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in c-Met-Regulated Cancers. *Front Cell Dev Biol.* 8:145.
- [94] Peng, F., Li, T.T., Wang, K.L., Xiao, G.Q., Wang, J.H., Zhao, H.D., Kang, Z.J., Fan, W.J., Zhu, L.L., Li, M., Cui, B., Zheng, F.M., Wang, H.J., Lam, E.W., Wang, B., Xu, J., Liu, Q. (2017). H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death Dis.* 19;8(1): e2569.
- [95] Abdollahzadeh, R., Daraei, A., Mansoori, Y., Sepahvand, M., Amoli, M.M., Tavakkoly-Bazzaz, J. (2019). Competing endogenous RNA (ceRNA) cross talk and language in ceRNA regulatory networks: A new look at hallmarks of breast cancer. *J Cell Physiol.* 234(7):10080-10100.
- [96] Rincón-Riveros, A., Morales, D., Rodríguez, J.A., Villegas, V.E., López-Kleine, L. (2021). Bioinformatic Tools for the Analysis and Prediction of ncRNA Interactions. *Int J Mol Sci.* 22(21):11397.
- [97] Chen, J., Xu, J., Li, Y., Zhang, J., Chen, H., Lu, J., Wang, Z., Zhao, X., Xu, K., Li, Y., Li, X., Zhang, Y. (2017). Competing endogenous RNA network

- analysis identifies critical genes among the different breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 8(6):10171-10184.
- [98] Olgun, G., Sahin, O., Tastan, O. (2018). Discovering lncRNA mediated sponge interactions in breast cancer molecular subtypes. *BMC Genomics*. 19(1):650.
- [99] Qian, D., Zheng, Q., Wu, D., Ye, B., Qian, Y., Zhou, T., Qiu, J., Meng, X. (2021). Integrated Analysis of ceRNA Network Reveals Prognostic and Metastasis Associated Biomarkers in Breast Cancer. *Front Oncol*. 11:670138.
- [100] Zhang, H., Zhang, J., Dong, L., Ma, R. (2020). LncRNA ATXN8OS enhances tamoxifen resistance in breast cancer. *Open Med (Wars)*. 16(1):68-80.
- [101] Liu, B., Zhou, X., Wu, D., Zhang, X., Shen, X., Mi, K., Qu, Z., Jiang, Y., Shang, D. (2021). Comprehensive characterization of a drug-resistance-related ceRNA network across 15 anti-cancer drug categories. *Mol Ther Nucleic Acids*. 24:11-24.
- [102] Liu, H., Wang, S., Zhou, S., Meng, Q., Ma, X., Song, X., Wang, L., Jiang, W. (2019). Drug Resistance-Related Competing Interactions of lncRNA and mRNA across 19 Cancer Types. *Mol Ther Nucleic Acids*. 16:442-451.
- [103] Wang, H., Wu, J., Meng, X., Ying, X., Zuo, Y., Liu, R., Pan, Z., Kang, T., Huang, W. (2011). MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis*. 32(7):1033-42.
- [104] Cui, Z., Zhao, Y. (2019). microRNA-342-3p targets FOXQ1 to suppress the aggressive phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cáncer* 19, 104.
- [105] Liu, W., Kang, L., Han, J., Wang, Y., Shen, C., Yan, Z., Tai, Y., Zhao, C. (2018). miR-342-3p suppresses hepatocellular carcinoma proliferation through inhibition of IGF-1R-mediated Warburg effect. *Onco Targets Ther*. 11:1643-1653.
- [106] Li, X.R., Chu, H.J., Lv, T., Wang, L., Kong, S.F., Dai, S.Z. (2014). miR-342-3p suppresses proliferation, migration, and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer. *FEBS Lett*. 588(17):3298-307.
- [107] Zhang, S., Liu, L., Lv, Z., Li, Q., Gong, W., Wu, H. (2017). MicroRNA-342-3p Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion of Osteosarcoma Cells by Targeting Astrocyte-Elevated Gene-1 (AEG-1). *Oncol Res*. 25(9):1505-1515.

- [108] Tai, M.C., Kajino, T., Nakatochi, M., Arima, C., Shimada, Y., Suzuki, M., Miyoshi, H., Yatabe, Y., Yanagisawa, K., Takahashi, T. (2015). miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis*. 36 (12):1464-73.
- [109] Martinez-Gutierrez, A.D., Catalán, O.M., Vázquez-Romo, R., Porras, R.F.I., Alvarado-Miranda, A., Lara Medina, F., Bargallo-Rocha, J.E., Orozco, M.L.T., Cantú De León, D., Herrera, L.A., López-Camarillo, C., Pérez-Plasencia, C., Campos-Parra, A.D. (2019). miRNA profile obtained by next-generation sequencing in metastatic breast cancer patients is able to predict the response to systemic treatments. *Int J Mol Med*. 44(4):1267-1280.
- [110] Liu, C., Xing, H., Luo, X., Wang, Y. (2020). MicroRNA-342 targets Cofilin 1 to suppress the growth, migration, and invasion of human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys*. 15 (687): 108385.
- [111] Romero-Cordoba, S.L., Rodríguez-Cuevas, S., Bautista-Pina, V., Maffuz-Aziz, A., D'Ippolito, E., Cosentino, G., Baroni, S., Iorio, M.V., Hidalgo-Miranda, A. (2018). Loss of function of miR-342-3p results in MCT1 over-expression and contributes to oncogenic metabolic reprogramming in triple negative breast cancer. *Sci Rep*. 16;8(1):12252.
- [112] Crippa, E., Lusa, L., De Cecco, L., Marchesi, E., Calin, G.A., Radice, P., Manoukian, S., Peissel, B., Daidone, M.G., Gariboldi, M., Pierotti, M.A. (2014). miR-342 regulates BRCA1 expression through modulation of ID4 in breast cancer. *PLoS One*. 9(1): e87039.
- [113] Cittelly, D.M., Das, P.M., Spoelstra, N.S. Edgerton, S.M., Richer, J.K., Thor, A.D., Jones, F.E. (2010). Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors. *Mol Cancer*. 9, 317.
- [114] Zhang, P.F., Wu, J., Wu, Y., Huang, W., Liu, M., Dong, Z.R., Xu, B.Y., Jin, Y., Wang, F., Zhang, X.M. (2019). The lncRNA SCARNA2 mediates colorectal cancer chemoresistance through a conserved microRNA-342-3p target sequence. *J Cell Physiol*. 234(7):10157-10165.

- [115] Zhou, L., Li, J., Tang, Y., Yang, M. (2021). Exosomal LncRNA LINC00659 transferred from cancer-associated fibroblasts promotes colorectal cancer cell progression via miR-342-3p/ANXA2 axis. *J Transl Med.* 19(1):8.
- [116] Cheng, D., Fan, J., Ma, Y., Zhou, Y., Qin, K., Shi, M., Yang, J. (2019). LncRNA SNHG7 promotes pancreatic cancer proliferation through ID4 by sponging miR-342-3p. *Cell Biosci.* 9:28.
- [117] Liao, X., Zhan, W., Tian, B., Luo, Y., Gu, F., Li, R. (2020). Circular RNA ZNF609 Promoted Hepatocellular Carcinoma Progression by Upregulating PAP2C Expression via Sponging miR-342-3p. *Onco Targets Ther.* 13:7773-7783.
- [118] Bai, Y., Li, Y., Bai, J., Zhang, Y. (2021). Hsa_circ_0004674 promotes osteosarcoma doxorubicin resistance by regulating the miR-342-3p/FBN1 axis. *J Orthop Surg Res* 16(1):510.
- [119] Dong, P., Xiong, Y., Yue, J., Hanley, S., Kobayashi, N., Todo, Y., & Watari, H. (2018). Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors. *Frontiers in genetics*, 9, 471.
- [120] Jiang, X., Zhou, Y., Sun, A.J., Xue, J.L. (2018). NEAT1 contributes to breast cancer progression through modulating miR-448 and ZEB1. *J Cell Physiol.* 233(11):8558-8566.
- [121] Shin, V.Y., Chen, J., Cheuk, I.W., Siu, M.T., Ho, C.W., Wang, X., Jinn, H., Kwang, A. (2019). Long non-coding RNA NEAT1 confers oncogenic role in triple-negative breast cancer through modulating chemoresistance and cancer stemness. *Cell Death Dis.* 10(4):270.
- [122] Wang, L., Xia, J.W., Ke, Z.P., Zhang, B.H. (2019). Blockade of NEAT1 represses inflammation response and lipid uptake via modulating miR-342-3p in human macrophages THP-1 cells. *J Cell Physiol.* 234(4):5319-5326.
- [123] Lennox, K.A., Behlke, M.A. (2016). Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 44(2):863-77.
- [124] Tomczak, K., Czerwińska, P., Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp. Oncol.* 19: A68-A77

- [125] Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J., Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4:e05005.
- [126] Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 11 (8), R90.
- [127] Pajak, M.; Simpson, T.I. miRNAtap:miRNAtap:miRNA Targets—Aggregated Predictions. Disponible en línea en : <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/miRNAtap.html>.
- [128] Maffuz-Aziz, A., Labastida-Almendaro, S., Espejo-Fonseca, A., Rodríguez-Cuevas, S. (2017). Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cir Cir.* 85:201-207.
- [129] C.I. Li, D.J. Uribe, J.R. Daling. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer.*, 93: 1046.
- [130] C.A. Parise, K.R. Bauer, M.M. Brown, V. Caggiano. (2009). Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J.* 15: 593-598.
- [131] Knutsen, E., Harris, A.L., Perander, M. (2021). Expression and functions of long non-coding RNA NEAT1 and isoforms in breast cancer. *Br J Cáncer*
- [132] Yan, H., Liang, H., Liu, L., Chen, D., Zhang, Q. (2019). Long noncoding RNA NEAT1 sponges miR-125a-5p to suppress cardiomyocyte apoptosis via BCL2L12. *Mol Med Rep.* 19(5):4468-4474.
- [133] Park, Y., Lim, S., Nam, J.W., Kim, S. (2016). Measuring intratumor heterogeneity by network entropy using RNA-seq data. *Sci Rep.* 24; 6: 37767.
- [134] Zhao, Z., Guo, Y., Liu, Y., Sun, L., Chen, B., Wang, C., Chen, T., Wang, Y., Li, Y., Dong, Q., Ai, L., Wang, R., Gu, Y., Li, X. (2021). Individualized lncRNA differential expression profile reveals heterogeneity of breast cancer. *Oncogene.* 40(27):4604-4614.
- [135] Raychaudhuri, M., Schuster, T., Buchner, T., Malinowsky, K., Bronger, H., Schwarz-Boeger, U., Höfler, H., Avril, S. (2012). Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. *J Mol Diagn.* 14(4):376-84.

- [136] Cava, C., Armaos, A., Lang, B., Tartaglia, G.G., Castiglioni, I. (2022). Identification of long non-coding RNAs and RNA binding proteins in breast cancer subtypes. *Sci Rep.* 13;12(1):693.
- [137] Smallegan MJ, Rinn J. (2019). Linking long noncoding RNA to drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116(44):21963-21965.
- [138] Knutsen, E., Harris, A.L., Perander, M. (2021). Expression and functions of long non-coding RNA NEAT1 and isoforms in breast cancer. *Br J Cáncer.*
- [139] Liu, X., Yao, W., Xiong, H., Li, Q., Li, Y. (2020). LncRNA NEAT1 accelerates breast cancer progression through regulating miR-410-3p/ CCND1 axis. *Cáncer Biomark.* 29(2):277-290
- [140] Pang, Y., Wu, J., Li, X., Wang, C., Wang, M., Liu, J., Yang, G. NEAT1/miR-124/STAT3 feedback loop promotes breast cancer progression. (2019). *Int J Oncol.* 55(3):745-754.
- [141] Quan D, Chen K, Zhang J, Guan Y, Yang D, Wu H, Wu S, Lv L. (2020). Identification of lncRNA NEAT1/miR-21/RRM2 axis as a novel biomarker in breast cancer. *J Cell Physiol.* 235(4):3372-3381.
- [142] Lemée, F., Bergoglio, V., Fernandez-Vidal, A., Machado-Silva, A., Pillaire, M.J., Bieth, A., Gentil, C., Baker, L., Martin, A.L., Leduc, C., Lam, E., Magdeleine, E., Filleron, T., Oumouhou, N., Kaina, B., Seki, M., Grimal, F., Lacroix-Triki, M., Thompson, A., Roché, H., Bourdon, J.C., Wood, R.D., Hoffmann, J.S., Cazaux, C. (2010). DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(30):13390-5.
- [143] Shur, I., Zemer-Tov. E., Socher, R., Benayahu, D. (2007). SVEP1 expression is regulated in estrogen-dependent manner. *J Cell Physiol.* 210(3):732-9.
- [144] To, M.D., Faseruk, S.A., Gokgoz, N., Pinnaduwege, D., Done, S.J., Andrulis, I.L. (2005). LAF-4 is aberrantly expressed in human breast cancer. *Int J Cancer.* 115(4):568-74.
- [145] Zhou, Y., Nathans, J. (2014). Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical wnt signaling. *Dev Cell.* 31(2):248-56.

- [146] Zhu, M., Wang, X., Gu, Y., Wang, F., Li, L., Qiu, X. (2019). MEG3 overexpression inhibits the tumorigenesis of breast cancer by downregulating miR-21 through the PI3K/Akt pathway. *Arch Biochem Biophys.* 661:22-30.
- [147] Zhang, Y., Wu, J., Jing, H., Huang, G., Sun, Z., Xu, S. (2019). Long noncoding RNA MEG3 inhibits breast cancer growth via upregulating endoplasmic reticulum stress and activating NF- κ B and p53. *J Cell Biochem.* 120(4):6789-6797.
- [148] Shimizu, T. (1988). Enzymes functional in the syntheses of leukotrienes and related compounds. *Int J Biochem.* 20(7):661-6.
- [149] Chang, K.C, Diermeier, S.D., Yu, A.T., Brine, L.D., Russo, S., Bhatia, S., Alsudani, H., Kostroff, K, Bhuiya, T., Brogi, E., Pappin, D.J., Bennett, C.F., Rigo, F., Spector, D.L. (2020). MaTAR25 lncRNA regulates the Tensin1 gene to impact breast cancer progression. *Nat Commun.* 11(1):6438.
- [150] Ala, U., Karreth, F.A., Bosia, C., Pagnani, A., Taulli, R., Léopold, V., Tay, Y., Provero, P., Zecchina, R., Pandolfi, P.P. (2013). Integrated transcriptional and competitive endogenous RNA networks are cross-regulated in permissive molecular environments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30;110(18):7154-9.
- [151] Cheng, D., Fan, J., Ma, Y., Zhou, Y., Qin, K., Shi, M., Yang, J. (2019). LncRNA SNHG7 promotes pancreatic cancer proliferation through ID4 by sponging miR-342-3p. *Cell Biosci.* 9:28.
- [152] Wang, X., Gu, G., Zhu, H., Lu, S., Abuduwaili, K., Liu, C. (2020). LncRNA SNHG20 promoted proliferation, invasion and inhibited cell apoptosis of lung adenocarcinoma via sponging miR-342 and upregulating DDX49. *Thorac Cáncer.* 11(12):3510-3520.
- [153] Meng, X., Ma, J., Wang, B., Wu, X., Liu, Z. (2020). Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes pancreatic cancer cell growth through sponging miR-342-3p via AKT/ERK signaling pathway. *J Physiol Biochem.* 76(2):301-315.
- [154] Ma, T., Zhang, J., Wu, J., Tang, J. (2014). [Effect of miR-342-3p on chemotherapy sensitivity in triple-negative breast cancer]. *Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban.* 39(5):488-95.

- [155] Chen, K., Song, F., Calin, G.A., Wei, Q., Hao, X., Zhang, W. (2008). Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis*. 29(7):1306-11.
- [156] Fougner, S.L., Borota, O.C., Berg, J.P., Hald, J.K., Ramm-Petersen, J., Bollerslev, J. (2008). The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 68(3):458-65.
- [157] Knutsen, E., Lellahi, S.M., Aure, M.R., Nord, S., Fismen, S., Larsen, K.B., Gabriel, M.T., Hedberg, A., Bjørklund, S. S; Oslo Breast Cancer Research Consortium (OSBREAC), Bofin, A.M., Mælandsmo, G.M., Sørli, T., Mortensen, E.S., Perander, M. (2020). The expression of the long NEAT1_2 isoform is associated with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancers. *Sci Rep*. 10(1):1277.
- [158] Tang, Q., Chen, J., Di, Z., Yuan, W., Zhou, Z., Liu, Z., Han, S., Liu, Y., Ying, G., Shu, X., Di, M. (2020). TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/ β -catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer. *J Exp Clin Cáncer Res*. 39(1):232.
- [159] Gao, C., Yao, H., Liu, H., Feng, Y., Yang, Z. (2019). TM4SF1 is a potential target for anti-invasion and metastasis in ovarian cancer. *BMC Cáncer*. 19(1):237.
- [160] Sun, Y., Xu, Y., Xu, J., Lu, D., Wang, J. (2015). Role of TM4SF1 in regulating breast cancer cell migration and apoptosis through PI3K/AKT/mTOR pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(8):9081-8.
- [161] Rengasamy, M., Zhang, F., Vashisht, A., Song, W.M., Aguilo, F., Sun, Y., Li, S., Zhang, W., Zhang, B., Wohlschlegel, J.A., Walsh, M.J. (2017). The PRMT5/WDR77 complex regulates alternative splicing through ZNF326 in breast cancer. *Nucleic Acids Res*. 45(19):11106-11120.
- [162] Hargrove, T.Y., Friggeri, L., Wawrzak, Z., Sivakumaran, S., Yazlovitskaya, E.M., Hiebert, S.W., Guengerich, F.P., Waterman, M.R., Lepesheva, G.I. (2016). Human sterol 14 α -demethylase as a target for anticancer chemotherapy: towards structure-aided drug design. *J Lipid Res*. 57(8):1552-63.
- [163] Fang, C., Guo, X., Lv, X., Yin, R., Lv, X., Wang, F., Zhao, J., Bai, Q., Yao, X., Chen, Y. (2017). Dysbindin promotes progression of pancreatic ductal adenocarcinoma via direct activation of PI3K. *J Mol Cell Biol*. 9(6):504-515.

- [164] Puttipanyalears, C., Denariyakoon, S., Angsuwatcharakon, P., Aksornkitti, V., Vongsaisuwan, M., Asayut, S., Thanasitthichai, S., Kongruttanachok, N., Aporntewan, C., Mutirangura, A. (2021). Quantitative STAU2 measurement in lymphocytes for breast cancer risk assessment. *Sci Rep.* 11(1):915.
- [165] Encinas, G., Sabelnykova, V.Y., de Lyra, E.C., Hirata, Katayama. M.L., Maistro, S., de Vasconcellos Valle, P.W.M., de Lima Pereira, G.F., Rodrigues, L.M., de Menezes Pacheco Serio, P.A., de Gouvêa, A.C.R.C., Geyer, F.C., Basso, R.A., Pasini, F.S., Del Pilar Esteves Diz, M., Brentani, M.M., Guedes Sampaio Góes, J.C., Chammas, R., Boutros, P.C., Koike, Folgueira, M.AA. (2018). Somatic mutations in early onset luminal breast cancer. *Oncotarget.* 9(32):22460-22479.
- [166] Schultz, D.J., Krishna, A., Vittitow, S.L., Alizadeh-Rad, N., Muluhngwi, P., Rouchka, E.C., Klinge, C.M. (2018). Transcriptomic response of breast cancer cells to anacardic acid. *Sci Rep.* 8(1):8063. Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L., Doudna, J.A. (2013).
- [167] Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 41(13):6568-76.
- [168] Medley, J.C., Panzade, G., Zinovyeva, A.Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 12(3):e1627
- [169] Li, Y., Syed, J., Sugiyama, H. (2016). RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs. *Cell Chem Biol.* 17;23(11):1325-1333.
- [170] Davidovich, C., Cech, T.R. (2015). The recruitment of chromatin modifiers by long noncoding RNAs: lessons from PRC2. *RNA.* 21(12):2007-22.
- [171] Maass, P.G., Luft, F.C., Bähring, S. (2014). Long non-coding RNA in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 92(4):337-46.
- [172] López-Urrutia, E., Bustamante, Montes. L.P., Ladrón de Guevara, Cervantes. D., Pérez-Plasencia, C., Campos-Parra, A.D. (2019). Crosstalk Between Long Non-coding RNAs, Micro-RNAs and mRNAs: Deciphering Molecular Mechanisms of Master Regulators in Cancer. *Front Oncol.* 9:669.
- [173] Gao, Q., Wang, Y. (2021). LncRNA FTX Regulates Angiogenesis Through miR-342-3p/SPI1 Axis in Stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 17:3617-3625.