



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología molecular y celular

Identificación de miRNAs circulantes como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de mama

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas.

Lic. Paula Lucía Farré

Directora de tesis: Dra. Adriana De Siervi

Consejera de Estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, Diciembre 2021

RESUMEN

“Identificación de miRNAs circulantes como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de mama”

El cáncer de mama (CaM) es el primero en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. El diagnóstico temprano (DT) puede mejorar la sobrevida de las pacientes. El objetivo de esta tesis fue identificar biomarcadores basados en microRNAs (miRNAs) para ser utilizados en el DT del CaM. Los miRNAs son moléculas de ARN que circulan en los fluidos corporales. Partiendo de modelos preclínicos, pudimos investigar acerca de la biología y mecanismo de acción de los miRNAs como reguladores maestros de la expresión de genes. Esto nos permitió desarrollar técnicas para la identificación y estudio de miRNAs. Más aun, enrolamos pacientes con CaM y voluntarias sanas (VS) en distintos hospitales. Mediante microarreglos y miRNA-seq se identificaron 11 miRNAs que se encontraban aumentados en plasma de pacientes con CaM respecto a VS. Esto se validó mediante RT-qPCR en 3 cohortes de pacientes: exploratoria (n=66), validatoria (n=173) y validatoria *in-sílico* (n= 2544). Finalmente, utilizando un modelo logístico se identificó una combinación de miRNAs que detecta el CaM con un 92% de sensibilidad. Esta herramienta generada en este trabajo de tesis podría ser utilizada en la clínica como método rutinario en el control anual de las pacientes disminuyendo la mortalidad por CaM.

Palabras clave: Cáncer de mama, biomarcadores, miRNAs, diagnóstico temprano

ABSTRACT

“Identification of circulating miRNAs as biomarkers for breast cancer diagnosis”

Breast cancer (BCa) is the first in incidence and mortality between women worldwide. Early diagnosis (ED) can improve BCa patients' survival. The aim of this thesis was to identify microRNAs (miRNAs) based biomarkers to be used in BCa ED. miRNAs are RNA molecules that circulate in body fluids. Starting from preclinical models, we have been able to investigate miRNAs biology and their mechanisms as gene expression master regulators. This allowed us to develop techniques for miRNAs study and identification. Moreover, we enrolled BCa patients and healthy donors (HD) in several hospitals. Through microarrays and miRNA-seq we identified 11 miRNAs that were up-regulated in plasma from BCa patients compared to HD. We validated these results using RT-qPCR in 3 different patients' cohorts: exploratory (n=66), validation (n=173) and in-sílico validation (n=2544). Finally, using a logistic regression model, we identified a miRNA combination that detects BCa with a 92% of sensitivity. The tool developed in this thesis could be used in clinics in annual routine check in women in order to diminish BCa mortality.

Key words: Breast cancer, biomarkers, miRNAs, early diagnosis

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis surge como resultado de varios años de mucho trabajo, compromiso, estudio y esfuerzo personal, pero también como resultado del trabajo en equipo y el apoyo incansable de mucha gente. Creo, sin lugar a dudas, que son tres pilares fundamentales en el desarrollo de un doctorado, por lo que en esta sección dedicaré estas palabras a quienes contribuyeron en esta gran etapa.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Adriana De Siervi, quien me sumó como parte de su equipo en el 2015, donde realicé mi tesis de licenciatura, y luego me recibió como becaria doctoral. A lo largo de todos estos años siempre estuvo presente, me dio espacios para poder planear experimentos, y también para escuchar ideas o plantear proyectos en conjunto, permitiéndome crecer tanto profesional como personalmente dentro del laboratorio, algo de lo que me encuentro muy agradecida. Sin duda Adriana es una directora que siempre buscó hacernos crecer y mejorar como científicos, pero también nos supo acompañar en lo personal, principalmente en un contexto adverso como fueron estos dos últimos años de doctorado, donde con la pandemia todo se hizo un poco más cuesta arriba.

En este sentido, mis compañeros y compañeras de laboratorio también fueron fundamentales en el desarrollo de este trabajo, con quienes compartí largas jornadas laborales entre mates, risas y cosas ricas de Puerto Dulce. Primero quisiera mencionar a Nico y Juli, con los que tuve el lujo de trabajar varios años, y cuyo apoyo y amistad traspasó el tiempo y los kilómetros de distancia. Estuvieron siempre para prestar una oreja, dar un abrazo y repensar la forma de trabajar cuando las cosas no daban, y también para reírnos e inventar canciones pegadizas.

No puedo dejar de mencionar a Cin, Rochi y Karen, cuyo apoyo especialmente durante la cuarentena fue fundamental, porque no solo son compañeras de laboratorio sino amigas, con quienes nos mandamos comida cuando no podíamos abrazarnos, compartimos almuerzos y meriendas cuando teníamos un ratito y con las que nos escribíamos cuando todo estaba complicado y no sabíamos de dónde más sacar energías para seguir avanzando. No puedo poner en palabras todo lo que me ayudaron, tanto adentro como afuera del labo. A Gina, por siempre estar presente, acompañando, ayudando en todo lo que pudiera, prestando una oreja y dando consejos que solo ella puede dar. Por los abrazos, la contención de madre y el empuje que siempre la caracteriza, haciendo malabares con el tiempo, pero siempre guardando un pedacito al que lo necesita.

A Pao y Fla, por estar siempre dispuestas a dar un consejo con los proyectos, a pensar ideas en conjunto y encaminarme en lo que fue mi desarrollo como científica, con toda la experiencia y años de formación en la investigación. Por último, agradecer el tiempo que compartimos juntos con Nico T, Lari, Juana y Pauli, que no fue mucho pero sí estuvo lleno de risas, mates y consejos.

Agradecimientos

A Cele, Pau, Lu, Mau, Angie, Euge, Gonza, Yami, Naty, Mati, con quienes compartí incontables charlas de pasillo y almuerzos, así como también consejos, congresos, salidas, palabras de aliento cuando algo no daba como uno esperaba y en especial mucho apoyo.

Quisiera agradecer también a la Dra. Claudia Lanari, al Dr. Ezequiel Lacunza y al Dr. Kevin Gardner, cuyo aporte en cuanto a reactivos, financiación y análisis de datos permitió el desarrollo de gran parte de este trabajo de tesis. A los médicos/as, técnicos/as, extraccionistas y enfermeras que hicieron posible el enrolamiento de pacientes, y la toma y recolección de muestras, sin los cuales no hubiese sido posible llevar adelante parte del trabajo, y a todas las mujeres que desinteresadamente se enrolaron en los protocolos de investigación, ya que fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto.

A mis profesores del CEECS, por compartir todo su conocimiento, por acompañar y formarnos como especialistas en estadística, por estar siempre dispuestos a solucionarnos dudas tanto de la carrera como personales. Y a mis compañeros del CEECS, en especial a Ale Vega, que se convirtió en una amiga y apoyo fundamental a lo largo de la carrera, y con quien sé que puedo contar incondicionalmente.

Este trabajo también contó con muchos actores fundamentales desde el plano emocional, cuyo apoyo fue indispensable a la hora de prestar una oreja, dar un abrazo y escuchar siempre que lo necesité.

En primer lugar, quiero mencionar a mi compañero y confidente hace casi 6 años Adri. Estoy convencida de que no podría haberlo logrado sin tu apoyo, sin tu compañía hasta cualquier hora de la noche viendo como seguía trabajando y sin tu amor incondicional. Por acompañarme y entenderme, por alegrarte conmigo, y por enojarnos juntos, por escucharme siempre, aún cuando no entendieras una palabra de lo que te estaba contando. Y a mí otra compañera, Clemen, que con su mirada hace del mundo uno mucho mejor. Los amo con todo mi corazón!

También quiero agradecer a mi familia, a mis hermanos Cari y Tin, por llenar de alegría mi vida desde que nacieron, por ser mis confidentes, mis amigos y cómplices, por alegrarse de todos mis logros y acompañarme en mis angustias, porque no importan los kilómetros que nos separen, siempre estuvieron a mi lado incondicionales. A mi mamá y mi papá, quienes dieron todo de sí para que nunca nos faltara nada, que nos enseñaron que lo más importante es el amor y la familia, y que el esfuerzo siempre tiene su recompensa. Quienes nos dieron la mejor vida del mundo, y a quienes nunca me va a alcanzar la vida para agradecerles todo lo que hicieron por nosotros. Y no puedo dejar de nombrar a los peludos de la casa, Jake y Pumbita, quienes me acompañaron largas madrugadas de trabajo, y que son la alegría de la casa. ¡Gracias Famlia, los amo hasta el infinito!

A mis abuelas, por ser siempre mis fans número uno, colgando los posters de los congresos cual trofeo en la pared, compartiendo mis logros y festejándolos conmigo, y sobre todo por siempre creer en mí, aun cuando sentía que no iba a poder lograrlo, ellas siempre estuvieron ahí para darme el empujoncito faltante y ayudarme a confiar en que todo iba a salir como siempre quise.

Agradecimientos

A mis tíos y primos, en especial mis tíos Silvia y Edu y mis primos Nico y Juan, por siempre prestar un oído, darme un abrazo, festejar juntos y decirme que todo iba a estar bien, que confiara en mí, y que tuviera paciencia cuando todo parecía complicado.

A mi familia extendida, mis suegros Silvia y Roberto, mis cuñadas/os Miju, Clau, Flopi, Juli y Leo por acompañarme todos estos años y siempre alentarme a dar lo mejor de mí. También a Maty y Gaby, por todo el tiempo compartido y por hacerme sentir desde el primer momento una más. A mis tíos y primos del corazón Iosi, Regi, Dani, Ari, Yayo, Marian, Gato, Lucky, Maga, Guille, Nancy, Maxi, Lucas, Diego, Rox, Lauri y Ova, porque siempre que me vieron se preocuparon por el avance de la tesis, por escuchar atentos cuales habían sido los nuevos descubrimientos, y por verme siempre con esos ojos de orgullo y felicidad, pero por sobre todas las cosas con mucho cariño y amor. También quiero agradecerle a Andrés, cuya contención a lo largo de los últimos años principalmente fue una pieza muy importante en mi crecimiento personal y emocional, y al cual le estaré eternamente agradecida.

A mis amigas Maru, Piru, Ailu y Mica, y a mis amigos Joaco y Julián, porque sin importar el tiempo que pase, los rumbos que tomemos y los kilómetros que nos separen, están incondicionalmente del otro lado siempre que los necesite. A Anto, cuyo apoyo y acompañamiento a lo largo de todos estos años me hizo sentir que nunca voy a estar sola, y que tengo a mi primera amiga siempre cerca. A mis amigos de la facu Darío, Gus, Andrés, Clari y Adri, por hacer del doctorado algo con lo que pudiéramos alegrarnos y sufrir en conjunto, ayudarnos y sobre todo alentar a que íbamos a lograrlo. A Juli C. y Juli G, porque su apoyo, amistad y acompañamiento todos estos años fue fundamental.

Por último, quiero agradecer a todos los organismos que hicieron posible que esta tesis se pudiera llevar a cabo. Al IBYME, un instituto de excelencia, por brindarme todo lo necesario para realizar este trabajo. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA y sus docentes, por la educación académica pública y gratuita de excelencia que recibí a lo largo tantos años. También quiero agradecer al CONICET, al Instituto Nacional del Cáncer, la ANPCyT, la Fundación Williams y la Fundación René Baron por brindar el financiamiento necesario para realizar este trabajo de tesis y permitir mi formación como doctorando. Finalmente, quiero agradecer a quienes defienden y hacen posible la educación pública y gratuita, y quienes apoyan el desarrollo de la ciencia y la tecnología en este país, herramientas que permiten la inclusión y transformación social.

*A mis papás y hermanos, por ser mis pilares por siempre,
A mis abuelos, porque desde donde están también hicieron esto posible,
A mis abuelas, por confiar siempre en mí,
y a mis compañeros de vida (y cuarentena) Adri y Clemen*

ÍNDICE

PUBLICACIONES	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	6
Capítulo 1: El cáncer de mama	7
Características del cáncer de mama	8
Incidencia y mortalidad del cáncer de mama	11
Etiología del cáncer de mama	12
Factores de riesgo endógenos:.....	12
Factores de riesgo exógenos:	15
Diagnóstico del cáncer de mama	18
Diagnóstico del CaM mediante imágenes:	18
Diagnóstico del CaM mediante marcadores tumorales en circulación:	19
Diagnóstico del CaM mediante la toma de biopsias:	20
Kaiso y cáncer de mama.....	21
Capítulo 2: Biosíntesis de miRNAs, mecanismos generales de acción y biopsias líquidas	26
Biogénesis y mecanismos generales de acción.....	27
Desregulación de miRNAs en cáncer	29
MicroRNAs y cáncer de mama	30
Biopsias líquidas y el uso de miRNAs circulantes.....	31
Componentes principales de las biopsias líquidas	31
Usos y beneficios de las biopsias líquidas	34
El uso de miRNAs circulantes como biomarcadores	35
Antecedentes del laboratorio en investigación con miRNAs.....	37

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Capítulo 1: Líneas celulares, modelos <i>in vivo</i> e histología.....	43
Condiciones de crecimiento de las líneas celulares.....	44
Experimentos <i>in vivo</i>	44
Modelo murino de xenotransplantes de CaM con expresión modulada de Kaiso en ratones inmunosuprimidos	44
Modelo murino de alotransplantes de CaM en ratones inmunocompetentes ..	45
Histología.....	45
Tinción con hematoxilina-eosina.....	45
Capítulo 2: Métodos para el análisis de la expresión de mRNA y miRNAs.....	46
Aislamiento de ARN total y miRNAs.....	47
A partir de tejido.....	47
A partir de plasma (miRNAs circulantes).....	47
Análisis de la expresión de ARN mensajero (ARNm) por RT-qPCR	48
Análisis de la expresión de miRNAs por <i>Stem-loop</i> RT-qPCR.....	50
Diseño de los primers para la técnica de <i>stem-loop</i> RT-qPCR.....	50
<i>Stem-loop</i> RT-qPCR para miRNAs en tejido	51
<i>Stem-loop</i> RT-qPCR para miRNAs circulantes	54
Análisis estadístico y representación gráfica de los resultados.....	56
Capítulo 3: Muestras de pacientes, microarreglos de expresión de miRNAs y secuenciación y análisis bioinformáticos.....	58
Diseño del estudio y enrolamiento de individuos	59
Microarreglos de expresión de miRNAs (Affymetrix)	61
Secuenciación de miRNAs	61

Análisis bioinformático.....	62
Bases de datos públicas	62
Herramienta bioinformática TNMplot	64
Análisis de componentes principales (PCA)	64
Análisis de enriquecimiento de grupo de genes de muestra única (ssGSEA)	64
Análisis de enriquecimiento funcional	65
Matrices de correlación.....	65
Curvas de Kaplan-Meier	65
Desarrollo de modelos estadísticos	66
Selección del modelo.....	66
Análisis de datos y estadístico	66
RESULTADOS.....	68
Capítulo 1: El rol de hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p y su interacción con genes blanco en el CaM	69
Modelo murino utilizado.....	70
El CaM modula la expresión de diversos miRNAs en alotrasplantes de células 4T1 murinas y en tumores humanos	71
Los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p comparten diversos genes blanco en común.....	72
La expresión de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p se correlaciona negativamente con la expresión de sus genes blanco.....	74
Los genes blanco de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p se encuentran involucrados en vías relacionadas con el cáncer y el metabolismo	76
La expresión de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p se encuentra aumentada en subtipos de CaM más agresivos y son predictores de peor sobrevida	80

La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 se encuentra disminuida en subtipos más agresivos de CaM y podría ser utilizada como biomarcador pronóstico de sobrevida total y libre de recaída.....	82
La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 correlaciona negativamente con la expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p en CaM	85
La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 se encuentra disminuida en tejido tumoral y en metástasis de CaM	87
Capítulo 2: El rol de Kaiso y los miRNAs en el CaM y la autofagia secretoria	89
Modelo murino utilizado.....	90
La disminución de la expresión de Kaiso en xenotransplantes redujo el crecimiento tumoral y el desarrollo de macrometástasis	91
Kaiso modula la expresión de sus genes blanco y miRNAs relacionados en xenotranplantes murinos.....	92
La expresión de los miRNAs circulantes presentes en plasma de ratones inoculados con células de CaM con expresión disminuida o control de Kaiso se encuentra alterada	94
Antecedentes del rol de Kaiso en autofagia	95
La disminución de la expresión de Kaiso generó una acumulación de LC3A/B citoplasmática en xenotransplantes y en focos metastásicos murinos.....	97
Capítulo 3: Identificación de miRNAs circulantes para el diagnóstico del CaM	100
Métodos utilizados para la identificación de miRNAs candidatos.....	101
Validación de los miRNAs candidatos	106
Cohorte exploratoria	106
Cohorte validatoria	108
Cohorte validatoria externa <i>in silico</i>	110
Análisis de los miRNAs candidatos en muestras de pacientes	112
Expresión de los miRNAs comparando CaM y TNA.....	113

Expresión de los miRNAs comparando al CaM por subtipos y por estadios.....	114
Capítulo 4: Desarrollo, selección y comparación de modelos predictivos para el diagnóstico del CaM.....	118
Selección de un grupo de miRNAs para el diagnóstico del CaM	119
Técnicas de <i>machine learning</i> utilizadas en la selección de miRNAs	120
Modelos predictivos propuestos	123
Testeo del modelo propuesto en otros tipos de cáncer.....	127
DISCUSIÓN	130
El rol de hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p y su interacción con genes blanco en el CaM	131
El rol de Kaiso y los miRNAs en el CaM y la autofagia secretoria	135
Identificación de miRNAs circulantes para el diagnóstico del CaM.....	139
Desarrollo, selección y comparación de modelos predictivos para el diagnóstico del CaM	147
ANEXO.....	155
Capítulo 3 Materiales y Métodos	155
Capítulo 1 Resultados	158
Capítulo 3 Resultados	169
Capítulo 4 Resultados	198
REFERENCIAS	199

PUBLICACIONES

Los contenidos presentes en este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones y propiedad intelectual:

- Singhal SK, Byun JS, Park S, Yan T, Yancey R, Caban A, Hernandez SG, Hewitt SM, Boisvert H, Hennek S, Bobrow M, Ahmed MSU, White J, Yates C, Aukerman A, Vanguri R, Bareja R, Lenci R, **Farré PL**, De Siervi A, Nápoles AM, Vohra N, Gardner K. *“Kaiso (ZBTB33) subcellular partitioning functionally links LC3A/B, the tumor microenvironment, and breast cancer survival”*. Commun Biol. 2021 Feb 1;4(1):150. doi: 10.1038/s42003-021-01651-y. PMID: 33526872; PMCID: PMC7851134.
- **Farré PL**, Duca RB*, Massillo C*, Dalton GN, Graña KD, Gardner K, Lacunza E, De Siervi A. *“MiR-106b-5p: a master regulator of potential biomarkers for breast cancer aggressiveness and prognosis”*. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11135. doi:10.3390/ijms222011135
- **Patente en preparación acerca de un método para la detección del cáncer de mama. Autores: Paula Farré, Adriana De Siervi.**

Además, he participado en trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones de gran relevancia para mi desarrollo como doctorando:

- Massillo C*, Duca RB*, **Farré PL**, Gardner K, Lacunza E, De Siervi A. *“Hsa-miR-1-2/miR-133a-1 cluster expression silencing by DNA hypermethylation triggers oncogenes contributing to prostate cancer aggressiveness”*. En revisión.
- Duca RB*, Massillo C*, Dalton GN, **Farré PL**, Graña KD, Gardner K, De Siervi A. *“MiR-19b-3p and miR-101-3p as potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis”*. Am J Cancer Res. 2021 Jun 15;11(6):2802-2820. PMID: 34249429; PMCID: PMC8263646.
- Massillo C*, Duca RB*, Lacunza E, Dalton GN, **Farré PL**, Taha N, Piccioni F, Scalise GD, Gardner K, De Siervi A. *“Adipose tissue from metabolic syndrome mice induces an aberrant miRNA signature highly relevant in prostate cancer”*.

- development". Mol Oncol. 2020 Nov;14(11):2868-2883. doi: 10.1002/1878-0261.12788. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32875710; PMCID: PMC7607170.*
- Dalton GN, Massillo C, Scalise GD, Duca R, Porretti J, **Farré PL**, Gardner K, Paez A, Gueron G, De Luca P, De Siervi A. *"CTBP1 depletion on prostate tumors deregulates miRNA/mRNA expression and impairs cancer progression in metabolic syndrome mice". Cell Death Dis. 2019 Apr 1;10(4):299. doi: 10.1038/s41419-019-1535-z. PMID: 30931931; PMCID: PMC6443782.*
 - Massillo C, Dalton GN, Porretti J, Scalise GD, **Farré PL**, Piccioni F, Secchiari F, Pascual N, Clyne C, Gardner K, De Luca P, De Siervi A. *"CTBP1/CYP19A1/estradiol axis together with adipose tissue impacts over prostate cancer growth associated to metabolic syndrome". Int J Cancer. 2019 Mar 1;144(5):1115-1127. doi: 10.1002/ijc.31773. Epub 2018 Oct 9. PMID: 30152543.*
 - Porretti J, Dalton GN, Massillo C, Scalise GD, **Farré PL**, Elble R, Gerez EN, Accialini P, Cabanillas AM, Gardner K, De Luca P, De Siervi A. *"CLCA2 epigenetic regulation by CTBP1, HDACs, ZEB1, EP300 and miR-196b-5p impacts prostate cancer cell adhesion and EMT in metabolic syndrome disease". Int J Cancer. 2018 Aug 15;143(4):897-906. doi: 10.1002/ijc.31379. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29536528.*
 - **Farré PL**, Scalise GD, Duca RB, Dalton GN, Massillo C, Porretti J, Graña K, Gardner K, De Luca P, De Siervi A. *"CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis". Oncotarget. 2018 Feb 13;9(17):13848-13858. doi: 10.18632/oncotarget.24486. PMID: 29568399; PMCID: PMC5862620.*
 - Massillo C, Dalton GN, **Farré PL**, De Luca P, De Siervi A. *"Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer". Reproduction. 2017 Oct;154(4):R81-R97. doi: 10.1530/REP-17-0322. PMID: 28878093.*

ABREVIATURAS

ACTB = Actina beta	CI = Consentimiento informado
ADN = Ácido desoxirribonucleico	C-MET = <i>Tyrosine-protein kinase Met</i>
ADNct = ADN tumoral circulante	C-MYC = <i>MYC Proto-Oncogene</i>
AGO = Argonauta	CQ = Cloroquina
AKT = Proteína quinasa B	CTBP1 = Proteína de unión al C-terminal 1
AMPK = Proteína quinasa adenosin 5'-monofosfato activada	CTBP2 = Proteína de unión al C-terminal 2
APAF1 = Factor de activación de la peptidasa apoptótica 1	CTC = Célula tumoral circulante
ARN = Ácido ribonucleico	DCIS = Carcinoma ductal <i>in-situ</i>
ARNm = ARN mensajero	DG = Dieta grasa
ATM =	DGCR8 = <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8/microprocessor subunit</i>
AUC = Área bajo la curva	DNMT1 = ADN metiltransferasa 1
BCL-2 = <i>B-cell lymphoma 2</i>	EA = Estadio avanzado
BMI = Índice de masa corporal	EGFR = Factores de crecimiento epidérmicos
BRCA1 = Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama 1	EMT = Transición epitelio-mesenquimal
BRCA2 = Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama 2	ER = Receptor de estrógeno
BTB = <i>Broad complex, Tramtrack and Bric à brac</i>	ERBB1 = Receptor de factor de crecimiento epidérmico
CA = Antígeno carcinogénico	ERK = <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
CaM = Cáncer de mama	ET = Estadio temprano
CCND1 = Ciclina D1	EZH2 = <i>Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
CDKN2A = Inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 2A	FOXA1 = <i>Forkhead Box A1</i>
cDNA = ADN copia	FRS2 = <i>Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2</i>
CEA = Antígeno carcinoembriogénico	GAB1 = <i>GRB2 Associated Binding Protein 1</i>
CHEK2 = <i>Checkpoint kinase 2</i>	GATA3 = <i>GATA Binding Protein 3</i>
	GM = Glándula mamaria

Abreviaturas

GMN = Glándula mamaria normal	oncomiRs = microRNAs oncocáncer
GNG12 = <i>G Protein Subunit Gamma 12</i>	OS = Sobrevida total
HBP1 = <i>HMG-Box Transcription Factor 1</i>	p53 = Proteína tumoral p53
HER2 = Receptor 2 de factor de crecimiento humano epidérmico	PABP = Proteína de unión a poliA
HIF1A = <i>Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha</i>	PAFAH1B1 = <i>Platelet Activating Factor Acetylhydrolase 1b Regulatory Subunit 1</i>
HMG = <i>Human High Mobility Group</i>	PALB2 = <i>Partner And Localizer of BRCA2</i>
IC = Intervalo de confianza	PCA = Análisis de componentes principales
Kb = Kilobases	PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
KBS = Sitio de unión a Kaiso	PE = Fosfatidiletanolamina
KEGG = <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>	PI3K = <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
LOOCV = <i>Leave-one-out cross-validation</i>	POZ-ZF = <i>Poxvirus and Zinc finger</i>
LPM = Lecturas por millón	PPP1R3B = <i>Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 3B</i>
MAP3K2 = <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2</i>	PR = Receptor de progesterona
MAPK = <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	PTEN = Homólogo de fosfatasa y tensina
MEF2A = <i>Myocyte Enhancer Factor 2A</i>	PUMA = <i>BCL2 Binding Component 3</i>
MEK = <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>	qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
miRNAs = microRNAs	RFS = Sobrevida libre de recaída
miRNA-seq = Secuenciación de miRNAs	RHO = Rodopsina
mTOR = <i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>	RISC = <i>RNA-induced silencing complex</i>
NADH = Nicotinamida adenina dinucleótido	RNAi = ARN de interferencia
NFkB = Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	ROCK = <i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase</i>
NSG = Nod scid gamma	RPS6KA3 = <i>Ribosomal Protein S6 Kinase A3</i>
NSG = <i>Next generation sequencing</i>	RT = Retrotranscripción
NST = <i>No special type</i>	SENP2 = <i>SUMO Specific Peptidase 2</i>
	SESN1 = <i>Sestrin 1</i>
	SFB = Suero fetal bobino

Abreviaturas

SM = Síndrome metabólico

ssGSEA = *single sample Gene Set Enrichment Analysis*

STAT3 = Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TGF β = Factor de crecimiento transformante

TGF β R = Receptor del factor de crecimiento transformante

TNA = Tejido normal adyacente

tsmiRs = microRNA supresor tumoral

UTR = Región no traducida

VC = Veces de cambio

VPN = Valor predictivo negativo

VPP = Valor predictivo positivo

VS = Voluntaria sana

XPO5 = Exportina 5

YY1 = *Yin Yang 1*

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1:

El cáncer de mama

Características del cáncer de mama

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactorial que consiste en el crecimiento anormal y descontrolado de células de un individuo, las cuales se dividen de manera desregulada y adquieren la capacidad de invadir tejidos próximos y/o distantes al lugar de origen. El proceso de tumorigénesis, el cual provoca la transformación de una célula normal a una maligna, se desarrolla en diversas etapas por medio de una acumulación de defectos en los circuitos regulatorios de las células, dando como resultado la proliferación descontrolada y la pérdida de la homeostasis celular. El estudio de los mecanismos que derivan en la transformación maligna y las características que comparten todos los tipos de cáncer que les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los años, y ha sido listado en el trabajo de Hanahan y Weinberg (Hanahan et al. 2011). Las principales características que han identificado fueron: autoabastecimiento y mantenimiento de señales proliferativas, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a la muerte celular programada, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y activación de procesos de invasión y metástasis, incluida la transición epitelio-mesenquimal (EMT).

El cáncer de mama (CaM) ocurre cuando las células de la glándula mamaria adquieren la capacidad de crecimiento descontrolado e invasión a nuevos tejidos. Cuando la enfermedad progresiona, tornándose más agresiva y diseminándose a otros tejidos, esta principalmente formará focos metastásicos en nódulos linfáticos o ganglios cercanos, y en diversos órganos como ser hueso, hígado, pulmón y cerebro (Bill and Christofori 2015).

La glándula mamaria se encuentra conformada por diversas células, como ser las que conforman el tejido graso, las productoras de leche que conformarán los lóbulos, y las que conformarán los conductos (Figura 1). El CaM será clasificado como *in situ* si se encuentra circunscripto a un lugar determinado, o invasivo si se encuentra invadiendo el tejido cercano. Dependiendo del lugar del que se origine, los carcinomas *in situ* serán clasificados histológicamente como ductales (si proviene de las células que forman el conducto) o lobulillares (si proviene de las células productoras de leche). Los carcinomas invasivos también tienen sub-clasificaciones histológicas, siendo los más frecuentes (40-

75% de todos los casos) los carcinomas ductales invasivos NST (por sus siglas en inglés No Special Type) (Vuong et al. 2014). Existen también otros tipos de carcinoma invasivos clasificados como especiales, que serán los lobulares, tubulares, mucinosos y metaplásicos, siendo estos mucho más raros de ser encontrados en la clínica.

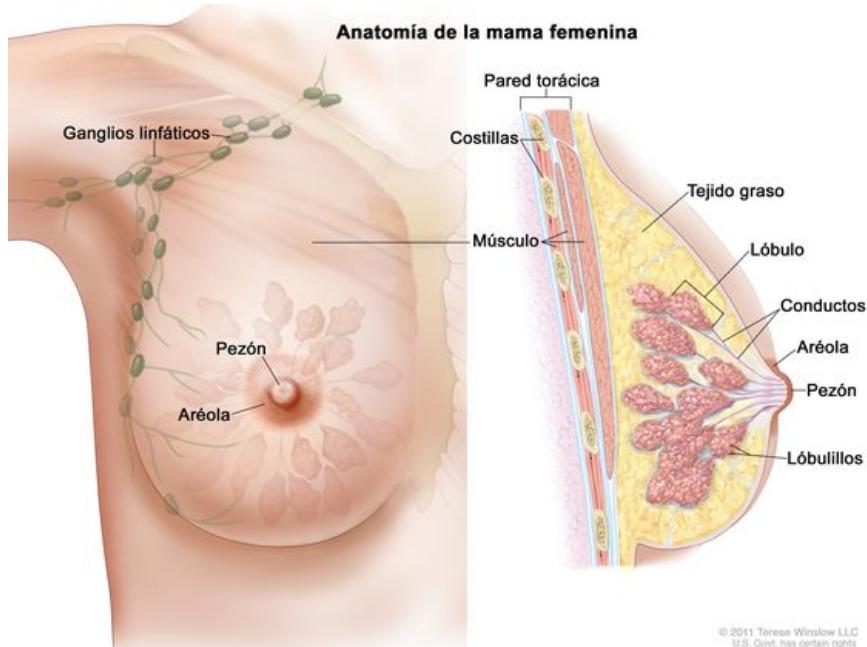


Figura 1: Esquema de la anatomía de la glándula mamaria femenina. Esquema de la ubicación y los órganos aledaños a la glándula mamaria y detalle de la misma. (Imagen extraída de <https://www.cancer.gov/>).

El CaM invasivo a su vez puede clasificarse principalmente según su grado histológico, según su subtipo molecular y su estadio, dado que es una enfermedad muy heterogénea y basándose en su sub-clasificación es que dependerán tanto el pronóstico del paciente, como los tratamientos posibles de ser utilizados. Respecto al grado histológico, éste se calcula en base al grado de diferenciación, al pleomorfismo nuclear y al índice mitótico, que indica la proliferación de las células. La combinación de estos tres parámetros dará como resultado lo que se conoce como grado de Nottingham, el cual puede tomar como valores 1, 2 o 3, siendo el primero el menor y yendo en aumento hacia el de mayor grado. Este parámetro es utilizado como un índice para evaluar el pronóstico de un paciente (Tsang and Tse 2020). Otra manera de clasificar al CaM es respecto a su estadio, el cual se calcula utilizando el TNM, por sus siglas en inglés T de tamaño tumoral, N de estatus de los nódulos o ganglios linfáticos y M por presencia de metástasis a distancia.

En función del tamaño tumoral, el cual se divide entre menor a 2 cm, entre 2 y 5 cm, mayor a 5 cm y si presenta compromiso de la piel de la mama, el tumor (T) se clasificará con valores entre 1 y 4. En función si presenta focos metastásicos de CaM en nódulos regionales, o a distancia, se clasificará al N con valores entre 0-3, y finalmente si presenta o no metástasis a distancia la M tendrá valores 0 o 1 (Tsang and Tse 2020). De la combinación de estos tres parámetros (T, N y M) es que saldrá el estadio, siendo 0 si el tumor se encuentra *in situ*, y luego tomando valores entre I y IV dependiendo del tamaño, nódulos tomados y presencia o no de metástasis. A su vez, el estadio I será subdividido en Ia y Ib, siendo tumores de menos de 2 cm y variando si tienen (b) o no (a) presencia de células tumorales en ganglios (Akram et al. 2017). El estadio II también se dividirá en IIa y IIb. El estadio IIa pertenece a tumores que pueden tener hasta 5 cm, y hay presencia de células tumorales en nódulos linfáticos axilares o en nódulos centinela, y el estadio IIb corresponde a tumores cuyo tamaño podría ser de más de 5 cm, pero no hay presencia de metástasis en nódulos linfáticos axilares (Akram et al. 2017). Respecto al estadio III, este se subdivide en a, b y c. El estadio IIIa corresponde a tumores de cualquier tamaño con presencia de células tumorales en 4 a 9 nódulos linfáticos axilares o ganglios centinela. El estadio IIIb corresponde a tumores de cualquier tamaño que hayan afectado la piel de la mama a simple vista, y con presencia de metástasis en hasta 9 ganglios axilares o centinela. Finalmente, el estadio IIIc corresponde a tumores de cualquier tamaño que se hayan diseminado a 10 o más ganglios axilares o centinela, y que a su vez hayan comprometido a ganglios por encima o debajo de la clavícula (Akram et al. 2017). Por último, el estadio más avanzado de la enfermedad es el correspondiente al IV, y corresponde a cualquier tamaño tumoral o número de nódulos linfáticos tomados, pero con presencia de metástasis a distancia, principalmente a pulmón, hueso, cerebro e hígado (Akram et al. 2017).

Respecto a la clasificación molecular del CaM, esta depende principalmente de la presencia o ausencia de tres receptores: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor 2 del factor de crecimiento humano epidérmico (HER2). La combinación presente en los tumores sumado al marcador de proliferación tumoral Ki67 darán como resultado uno de los cuatro subtipos principales del CaM: Luminal A, Luminal B, Her2 y triple negativo o basales. La clasificación molecular es muy importante

porque es la que establecerá las posibles terapias presentes para cada subtipo. Los CaM Luminales A representan aproximadamente entre el 40 al 50% de todos los carcinomas de mama invasivos, y son aquellos que poseen ER⁺ y PR⁺ con baja proliferación, por lo que suelen ser cánceres de bajo grado, con la mejor pronóstico entre todos los subtipos posibles (Tsang and Tse 2020). Estos CaM suelen ser tratados con terapias hormonales con muy buenos resultados. Luego, entre los cánceres Luminales B, estos son también ER⁺ y PR⁺, algunos pueden ser HER2⁺ pero poseen una mayor proliferación que los luminales A, por lo que tienen un peor pronóstico en comparación. Este tipo tumoral también suele ser tratado con terapias hormonales, pero suele ser combinado con quimioterapéuticos para tener mayor éxito (Tsang and Tse 2020). Continuando con el subtipo Her2, comprende aproximadamente el 15% de todos los CaM invasivos, y su característica principal es la presencia de HER2⁺, y ser ER⁻ y PR⁻. Estos tumores suelen ser de mayor grado, y más agresivos que los dos anteriores, pero poseen una terapia específica en la que utilizan anticuerpos anti-Her2, y suele ser exitosa (Tsang and Tse 2020). Finalmente, el último subtipo tumoral es el perteneciente a los tumores CaM triple negativos o basales, que, como su nombre lo indica, son ER⁻, PR⁻ y HER2⁻. Este subtipo corresponde al 10-15% de los tipos de CaM, son tumores de alto grado, con índices de proliferación altos, peor pronóstico y cuya recaída suele ocurrir en los 5 años consiguientes al diagnóstico (Tsang and Tse 2020). Al no poseer receptores, este subtipo tumoral no posee terapias específicas, por lo que el tratamiento en estos casos suele ser quimioterapéutico o con rayos principalmente.

Incidencia y mortalidad del cáncer de mama

El CaM es el primero en incidencia y mortalidad en mujeres (excluyendo los cánceres de piel no melanoma) a nivel mundial (Figura 2), representando el 24,2% de casos de cáncer totales en el mundo, y el 15% del total de muertes por cáncer en 2018 (Bray et al. 2018). En Argentina, esta tendencia se replica de la misma manera, siendo que el CaM es el primero en incidencia y mortalidad en mujeres en este país (Figura 2). Según los datos de Globocan 2020, en el año 2020, del total de nuevos casos de cáncer diagnosticados en mujeres, el 32,1% correspondió al CaM, y en la población total, estos representaron el 16,8% de nuevos casos y el 9,7% de muertes por cáncer.

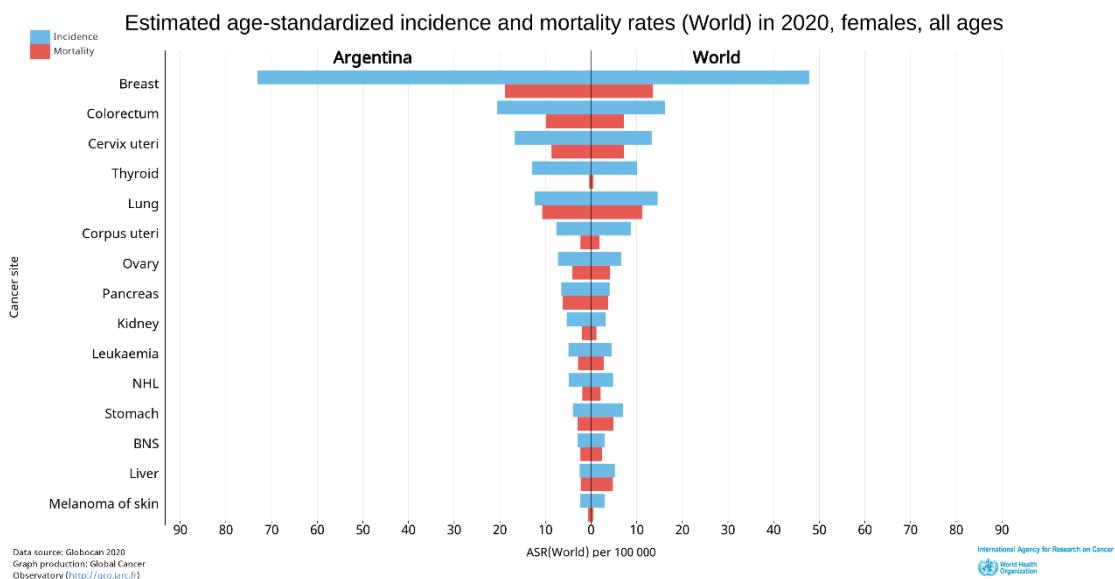


Figura 2: Tasas de incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer en mujeres en Argentina (panel izquierdo) y a nivel mundial (panel derecho). Imagen obtenida de la web del proyecto GLOBOCAN 2020.

Etiología del cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente, el cáncer es una enfermedad multifactorial, por lo que existen varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar CaM. Estos factores de riesgo pueden dividirse principalmente en exógenos o que corresponden al estilo de vida (dieta, hábitos, exposición a radiación y hormonas) y endógenos (edad, género, factores étnicos, historia familiar y personal, genética y factores hormonales). A continuación, se discutirán brevemente los mismos.

Factores de riesgo endógenos:

- ✓ **Condición de ser mujer:** El hecho de ser biológicamente mujer aumenta el riesgo de contraer CaM respecto a los hombres (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016).
- ✓ **Edad:** A medida que aumenta la edad de los individuos, la incidencia del CaM es mayor, siendo que la mayoría de los casos de CaM diagnosticados ocurren alrededor de los 55 años (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016; Libson and Lippman 2014).
- ✓ **Edad de la menarca:** Diversos estudios demostraron que mujeres cuyas menarcas sucedieron tempranamente, tienen mayor riesgo de desarrollar CaM

a lo largo de su vida (Rojas and Stuckey 2016). En particular, mujeres cuyas menarcas fueron alrededor de los 16 años tienen entre 50 y 60% menos riesgo de CaM respecto a mujeres cuya menarca fue alrededor de los 12 años (Rojas and Stuckey 2016; Libson and Lippman 2014).

- ✓ **Edad de la menopausia:** Al igual que en el caso de una menarca en edades tempranas, una menopausia luego de los 55 años también aumenta el riesgo de padecer CaM, debido a una larga exposición a estrógenos y progesterona (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016). En particular, el hecho de empezar la menopausia alrededor de los 42 años reduce riesgo de desarrollar CaM en un 35% aproximadamente (Libson and Lippman 2014).
- ✓ **Edad del primer embarazo a término:** El hecho de haber llevado a cabo embarazos disminuye el riesgo en un 3% aproximadamente por cada embarazo en mujeres pre menopáusicas, y aumenta a un 12% en el caso de mujeres post menopáusicas (Rojas and Stuckey 2016). En particular, si el primer embarazo a término si fue alrededor de los 18 años, las mujeres tienen un 30-40% menos chances de desarrollar CaM respecto a mujeres que no hayan tenido embarazos a término (Libson and Lippman 2014).
- ✓ **Afecciones benignas previas en las mamas:** Aquellas mujeres que previamente hayan tenido patologías benignas en las mamas tienen mayor riesgo de desarrollar CaM. En particular, el riesgo del CaM y las patologías previas se relaciona con el tipo de lesión que se haya presentado, a saber: mujeres con lesiones no proliferativas como fibrosis, quistes leves, hiperplasia, adenosis o necrosis grasa tienen bajo riesgo de desarrollar CaM, continuando con mujeres que hayan tenido lesiones proliferativas sin anomalías celulares como hiperplasia ductal, fibroadenoma, adenosis esclerosante o cicatrices radiales tienen un riesgo intermedio de desarrollar CaM, y finalmente mujeres que hayan tenido lesiones proliferativas con anomalías celulares como hiperplasia ductal atípica, hiperplasia lobulillar atípica o carcinoma lobulillar *in situ* presentan 4 a 5 veces más chances de desarrollar CaM (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016).

- ✓ **Mamas densas:** Aquellas mujeres que poseen mamas con mayor porcentaje fibroso y glandular que adiposo se considera que poseen mamas densas. Esto dificulta el diagnóstico temprano dado que la sensibilidad de técnicas como la mamografía son menores en estos casos, porque dan imágenes opacas similares a las que daría un tumor, lo que dificulta la detección de tumores en etapas tempranas (Libson and Lippman 2014).
- ✓ **Etnia:** Se ha visto que mujeres blancas tienen mayor incidencia de CaM, seguido de mujeres de descendencia afroamericana y por último de descendencia hispánica. Sin embargo, se ha visto que, en el caso de las mujeres afroamericanas, el diagnóstico del CaM sucede en estadios más avanzados de la enfermedad, presentan tumores más desdiferenciados y tienen menor sobrevida a 5 años (Libson and Lippman 2014).
- ✓ **Antecedentes familiares de CaM:** Si bien 8 de cada 10 mujeres con CaM no poseen antecedentes familiares de CaM, el tener familiares de primer grado (madre, hermana o hija) que hayan desarrollado CaM aumenta el riesgo personal de desarrollarlo. Si se tiene un familiar de primer grado que haya tenido CaM, el riesgo de desarrollarlo será el doble, mientras que el tener dos familiares aumenta el riesgo tres veces (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016). A su vez, si un familiar de primer grado tuvo cáncer de ovario, esto también aumenta el riesgo de desarrollar CaM (Libson and Lippman 2014).
- ✓ **Antecedentes personales de CaM:** Mujeres que ya hayan desarrollado CaM en algún momento de su vida tendrán mayor riesgo de desarrollar un nuevo tumor tanto en la misma mama como en la otra. Este riesgo será mayor todavía en mujeres jóvenes que hayan desarrollado la enfermedad (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016).
- ✓ **Predisposición genética:** Entre el 5 y el 10% de los CaM son del tipo hereditario, y hay ciertos genes que tienen una relación muy importante con el desarrollo de CaM. En particular, aquellos individuos que presentan mutaciones en BRCA1 tiene un 80% de probabilidades de desarrollar CaM (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016), suelen ser del tipo triple negativo y ser diagnosticados en edades tempranas (Rojas and Stuckey 2016), mientras que aquellos

individuos con BRCA2 mutado tienen 45% de probabilidades de desarrollar CaM, suelen ser de tipo luminal y de grados altos (Rojas and Stuckey 2016). Hay ciertas poblaciones que tienen una alta prevalencia en estas mutaciones, conocidas como mutaciones fundadoras, y están presentes en poblaciones belgas, holandesas y suecas (Rojas and Stuckey 2016). El poseer solo una copia del gen mutado ya aumenta la probabilidad de desarrollar CaM, en particular en edades más tempranas o desarrollar tumores en ambas mamas (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016). A su vez, existen otros genes que de presentar mutaciones también aumentarán el riesgo de desarrollar CaM como ser p53, CHEK2, PTEN, ATM, E-cadherina, STK11 y PALB2 (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016).

- ✓ **Lactancia:** Aquellas mujeres que hayan amamantado tienen menor riesgo de desarrollar CaM triple negativo, siendo que por cada año de haber amamantado, el riesgo disminuye un 4% (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016; Rojas and Stuckey 2016). Esto se cree es debido a la disminución en la exposición a estrógenos por la ausencia de ciclos menstruales (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016; Rojas and Stuckey 2016).

Factores de riesgo exógenos:

- ✓ **Uso de anticonceptivos orales:** Hace muchos años, se hicieron estudios que sugirieron que el uso de anticonceptivos orales aumentaba el riesgo de desarrollar CaM, pero que el mismo se revertía al tiempo de abandonar su uso (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016). En particular, estos estudios se realizaron en poblaciones que consumían distintos tipos de combinaciones de anticonceptivos, los cuales no se tuvieron en cuenta a la hora de hacer los análisis pertinentes. Luego, en otro estudio se observó que no se encontró asociación entre el desarrollo de CaM y el consumo de anticonceptivos orales en mujeres entre 35 y 44 años (Rojas and Stuckey 2016). Al día de la fecha, el mecanismo mediante el cual el uso de anticonceptivos orales podría afectar al desarrollo del CaM no se ha dilucidado, si bien se sabe que los estrógenos promueven el crecimiento celular al unirse a su respectivo receptor (Rojas and Stuckey 2016). Se ha propuesto que aquellas mujeres que utilizan anticonceptivos orales

también se realizan exámenes mamarios de forma regular, motivo por el cual podría haber una mayor cantidad de diagnósticos de CaM en este grupo en particular (Rojas and Stuckey 2016).

- ✓ **Terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas:** La terapia hormonal con estrógeno o combinando estrógenos y progesterona suele utilizarse para aliviar los síntomas causados por la menopausia, a la vez que ayuda a prevenir la osteoporosis (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016). Se ha encontrado que aquellas mujeres que han estado expuestas a la combinación de estrógenos y progesterona por alrededor de 6 a 7 años por lo menos tienen el doble de probabilidades de desarrollar CaM (Libson and Lippman 2014). Esto puede deberse nuevamente a una exposición más prolongada a los estrógenos.
- ✓ **Consumo de alcohol:** A lo largo de los años se ha analizado la relación entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar CaM. En particular, se ha visto que mujeres que consumen entre 35 y 44 gramos al día de alcohol tienen un 32% de probabilidades de desarrollar CaM, y aquellas que consumen 45 gramos al día, una probabilidad de 46% de desarrollar CaM (Rojas and Stuckey 2016). Proporcionalmente, se calcula que un consumo de 10 gramos al día aumenta entre 7 y 9% la probabilidad de desarrollar CaM (Rojas and Stuckey 2016; Libson and Lippman 2014). El rol que podría tener el alcohol en la carcinogénesis podría incluir procesos tanto de formación como de estimulación del CaM (Rojas and Stuckey 2016). Por otro lado, hay diversos carcinógenos como el acetaldehído, benceno y N-nitrosodimetilamina que pueden encontrarse en bebidas alcohólicas o producirse mediante el metabolismo del alcohol (Rojas and Stuckey 2016). Finalmente, el alcohol puede alterar los niveles hormonales aumentando los estrógenos en circulación, inhibir la función inmune, aumentar la proliferación celular, inhibir el mecanismo de reparación del ADN y promover la invasión y migración celular (Rojas and Stuckey 2016).
- ✓ **Exposición a radiación en edades tempranas:** Aquellas personas que hayan recibido radiación en el pecho en edades tempranas tienen entre 7 y 17 veces más chances de desarrollar CaM (Rojas and Stuckey 2016). Por ejemplo, aquellas

mujeres que recibieron por lo menos 50 Gy en el pecho debido a un linfoma de Hodgkin antes de los 25 años tendrán, a los 55 años, un 29% más de probabilidades de desarrollar CaM (Rojas and Stuckey 2016). En esta línea, se ha disminuido la radiación con los años en estos casos en particular (de 50 a 20-30 Gy) para disminuir la incidencia de CaM en esta población particular (Rojas and Stuckey 2016). Por otro lado, el riesgo de desarrollar CaM debido a haber recibido radiación es inversamente proporcional a la edad en la que se recibió, principalmente si esto sucedió alrededor de la pubertad, donde el tejido mamario se encuentra proliferando rápidamente (Rojas and Stuckey 2016).

- ✓ **Sedentarismo:** Existen estudios que sugieren que la realización de actividad física de manera regular disminuye el riesgo de desarrollar CaM. En particular, mujeres que comenzaron a realizar ejercicio de manera regular redujeron la probabilidad de desarrollar CaM en un 14%, y esta probabilidad es aún menor cuantas más horas de actividad se realicen (Rojas and Stuckey 2016). Se cree que la asociación entre la actividad física y el menor riesgo de CaM es debido a que la actividad física reduce el tejido adiposo, lo que lleva a una disminución del estrógeno producido por este tejido, y reduce a su vez los niveles de insulina circulantes, en conjunto con otros factores de crecimiento (Rojas and Stuckey 2016).
- ✓ **Sobrepeso, obesidad y síndrome metabólico:** Se ha visto que mujeres con alto índice de masa corporal (BMI) o con sobrepeso tienen mayor riesgo de desarrollar CaM (Krishnamurthy, Soundara, and Ramshankar 2016; Bhandari et al. 2014), y es mayor aún en mujeres post-menopáusicas (Agnoli et al. 2015). Una posible explicación a esta observación es que, dado que el tejido adiposo es un órgano productor de estrógenos, esto desencadenaría en un aumento de la exposición de las mujeres a los mismos, aumentando el riesgo de desarrollo de CaM. Por otro lado, la obesidad o el sobrepeso en mujeres suele estar asociado a mayores niveles de insulina, el cual es un factor de crecimiento para diversos tejidos y tiene un rol importante en la tumorigénesis, por lo que lo convierte en un factor de riesgo en el desarrollo del CaM (Ligibel and Strickler 2013). Finalmente, las personas obesas también suelen presentar altos niveles de

leptina (hormona con actividad mitogénica y anti-apoptótica) y bajos niveles de adiponectina (hormona con actividad anti-mitogénica y pro-apoptótica), por lo que el tejido adiposo en el microambiente tumoral podría promover la carcinogénesis, invasión, metástasis y progresión tumoral (Ligibel and Strickler 2013; Protani, Coory, and Martin 2010; Iyengar, Hudis, and Dannenberg 2013; Goodwin 2015). Otros trabajos, incluyendo algunos de nuestro grupo, han demostrado que el síndrome metabólico también favorece el desarrollo tumoral de mama (Farré et al. 2018; De Luca et al. 2016; Esposito et al. 2013b; 2013a).

Diagnóstico del cáncer de mama

El diagnóstico del CaM suele comenzar en la consulta médica de control. A partir de exámenes físicos, el médico puede palpar anormalidades en las mamas o ganglios axilares que pueden ser de alarma de la posible presencia de un tumor mamario. A su vez, el autoexamen mamario también suele ser de mucha utilidad en cuanto al diagnóstico del CaM, y también permite la identificación de posibles bultos, úlceras o la denominada “piel de naranja” presentes en las mamas que también suelen ser alarmas para continuar con análisis de rutina para confirmar o rechazar la presencia de CaM.

Entre los posibles estudios que se suelen hacer de *screening* o tamizaje para el CaM, se encuentran principalmente el uso de ecografías mamarias, mamografías y resonancias magnéticas nucleares. También suelen usarse la identificación de marcadores tumorales en sangre. Finalmente, el diagnóstico se concluye con la toma de una biopsia, que confirmará o rechazará el diagnóstico de CaM, y que se puede realizar de diversas maneras (Akram et al. 2017). La comparación de los métodos de diagnóstico será abordada nuevamente en la discusión.

Diagnóstico del CaM mediante imágenes:

- ✓ **Mamografía:** Es una técnica que utiliza rayos X para formar la imagen de la mama. Es el *gold standard* utilizado en la clínica para la detección temprana del CaM, ayudando a encontrar bultos principalmente en mamas densas, si bien en estos casos la sensibilidad de la técnica es menor, y puede dar tanto falsos positivos como falsos negativos. En cuanto a la aplicabilidad de la técnica, suele ser muy útil dado que la imagen puede ser fácilmente guardada y compartida a otros especialistas en mamografía para consultar por segundas opiniones

(Akram et al. 2017). La mayor desventaja de esta técnica no es la técnica en sí, sino el acceso a la misma, principalmente en países sin salud pública gratuita y con bajos recursos (Akram et al. 2017), por lo que se deberían implementar políticas de salud para garantizar el acceso a las mamografías a toda la población.

- ✓ **Ecografía mamaria:** Es una técnica que utiliza ondas sonoras para formar imágenes del interior de la mama y que es utilizada para detectar tumores y anomalías en el tejido mamario. En el caso de mujeres con mamas densas, suele utilizarse complementaria a la mamografía, dado que estos tipos de mamas suelen arrojar muchos falsos positivos (Akram et al. 2017). No existen estudios randomizados que hayan estudiado el impacto de la ecografía mamaria en la disminución en las muertes por CaM, pero si se sabe que este tipo de estudio permite buscar tumores que no hayan sido identificados por la mamografía (Akram et al. 2017). La ventaja que posee el uso de ecografías mamarias es que muestra el tamaño y posición del tumor, si es de tipo sólido o si posee líquido en su interior, y se complementa con la toma de la biopsia para confirmar el diagnóstico (Akram et al. 2017). En particular es una técnica de diagnóstico del CaM muy utilizada en mujeres más jóvenes, a las que todavía no es recomendable realizar mamografías de control.
- ✓ **Resonancia magnética nuclear:** Es una técnica que utiliza un campo magnético, en conjunto con ondas de radio que permite generar imágenes detalladas de las estructuras de las mamas. Si bien la mamografía es la técnica más utilizada en el diagnóstico temprano del CaM, hay casos particulares donde se recomienda el uso de la resonancia magnética nuclear como método diagnóstico, principalmente en pacientes con mamas densas, o mujeres con alta probabilidad de desarrollar CaM como aquellas que poseen mutaciones en BRCA1 o BRCA2, dado que es una técnica más sensible que la mamografía y permite distinguir con más nitidez entre masas sólidas o con presencia de líquido como podrían ser quistes (Akram et al. 2017). Como desventaja suele ser una técnica más cara, y suele tardar más tiempo en realizarse que las mencionadas anteriormente.

Diagnóstico del CaM mediante marcadores tumorales en circulación:

Existen distintos marcadores tumorales que se han encontrado en los distintos estadios del desarrollo del CaM, tratamiento, diagnóstico y tamizaje (Akram et al. 2017). Estos marcadores presentes en suero pueden ser fácilmente identificados, y se ha visto que tienen un rol importante en diversos tipos tumorales. Se ha estudiado que existe cierta correlación entre la presencia de estos marcadores tumorales y la clínico-patología del tumor (X. Li et al. 2018). El uso de estos marcadores es de mucha utilidad cuando no se disponen de muestras de tejido tumoral, dado que estos marcadores pueden aportar información de mucha utilidad sobre el fenotipo del CaM en estadios tempranos (X. Li et al. 2018). En la actualidad se miden alrededor de 13 marcadores tumorales, que han demostrado distintos usos en la clínica, principalmente como marcadores pronóstico. Los más utilizados son el antígeno carcinoembriogénico (CAE), el antígeno cancerígeno 125 (CA 125) y el 15-3 (CA 15-3).

Diagnóstico del CaM mediante la toma de biopsias:

- ✓ **Aspirado de aguja fina:** Consiste en la toma de muestra de un área determinada de la mama utilizando una aguja fina y tomando una pequeña muestra por aspiración, pudiendo ser la toma dirigida o no mediante una ecografía que ayuda a determinar la localización tanto de la aguja como del bulto identificado (Akram et al. 2017). Se utiliza anestesia local, en la región donde será insertada la aguja.
- ✓ **Biopsia de aguja gruesa:** En este caso, se utiliza una aguja de mayor grosor que en el caso anterior, y se toma una muestra de una porción mayor de tejido del área determinada previamente. También se utiliza anestesia local, para disminuir el dolor que pudiera presentar la paciente. Esta técnica puede ser guiada mediante el uso de ecógrafos, mamógrafos o resonadores magnéticos (Akram et al. 2017).
- ✓ **Biopsia estereotáctica asistida por aspirado:** En este tipo de biopsias, se colectarán distintas porciones de tejido dentro de un área determinada, utilizando solo una aguja gruesa y valiéndose de la utilización de la aspiración para la escisión de la muestra. Esta técnica también se realiza utilizando anestesia local, y puede ser guiada por ecógrafos, mamógrafos o resonadores magnéticos (Akram et al. 2017).

- ✓ **Biopsia quirúrgica:** Este tipo de biopsia se utiliza cuando la porción de tejido es pequeña para utilizar otro tipo de técnicas o si se han realizado otros tipos de biopsias que arrojaron resultados inconclusos. Previo a la realización de la biopsia, se coloca un cable-guía para localizar el tejido anormal con ayuda de un ecógrafo, mamógrafo o resonador magnético, bajo anestesia local. Luego, la toma de la biopsia se realiza bajo anestesia total, donde se colecta el tejido anormal junto con el cable-guía (Akram et al. 2017).

Kaiso y cáncer de mama

Kaiso (ZBTB33) es un factor de transcripción del tipo POZ-ZF que fue descubierto asociado a la proteína p120 catenina, la cual es responsable de regular la estabilidad de E-cadherina (Pierre et al. 2019). Luego, se vio que distintos miembros de la familia de los factores de transcripción POZ-ZF tenían un rol en el cáncer, por lo que se hipotetizó que Kaiso podría entonces también tener un rol en el mismo (Pierre et al. 2019). Inicialmente se vio que estudios en *Xenopus* sobre el rol de Kaiso mostraron que esta proteína antagoniza la vía de Wnt, observándose por primera vez un posible rol de Kaiso en el cáncer (Pierre et al. 2019). Luego de diversos años de estudio de Kaiso, se pudo ver que su rol suele ser contexto-dependiente, y que parece ser muy importante en algunos procesos relacionados con el cáncer (Pierre et al. 2019).

En cuanto a su estructura, Kaiso posee un dominio de unión a proteínas BTB/POZ (por sus siglas en inglés *Broad complex, Tramtrack and Bric à brac/Poxvirus and Zinc finger*) amino-terminal, y un dominio de tipo *Zinc finger* carboxi-terminal, que le permite la unión con el ADN, detalladas en la Figura 3 (Pierre et al. 2019). Kaiso posee también diversos sitios serina/treonina posibles de ser fosforilados.

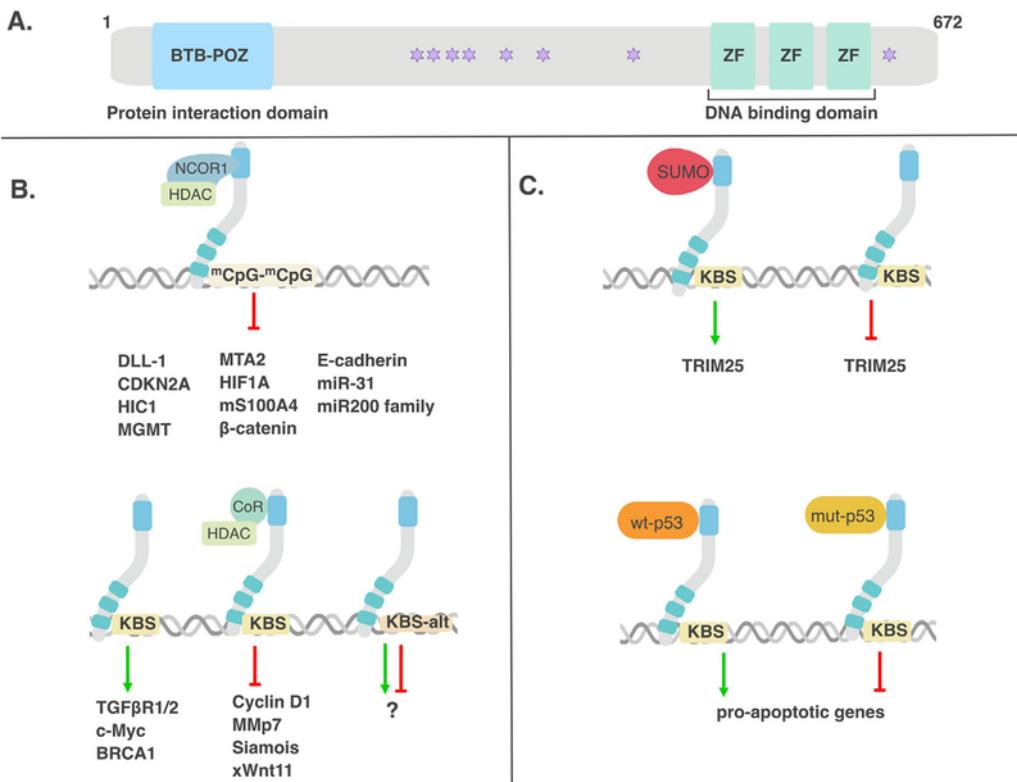


Figura 3: Estructura de Kaiso y sus posibles roles como factor de transcripción. (A) Kaiso posee dos sitios clave que le permiten, por un lado, interaccionar con proteínas (BTB-POZ) y por otro un dominio de unión al ADN de tipo Zinc Finger (ZF). (B) Kaiso presenta principalmente dos secuencias de unión al ADN, se puede unir a islas CpG metiladas (panel superior) o a secuencias consenso de Kaiso (KBS), y dependiendo de la proteína a la que se una, es que podrá actuar como activador o represor de la transcripción. (C) Kaiso puede presentar modificaciones post-traduccionales como la sumoilación (panel superior) o puede unirse a proteínas tanto *wild-type* como mutadas (panel inferior), lo cual determinará el rol de Kaiso como activador o represor de la transcripción. (Pierre et al, 2019)

Kaiso se une principalmente a tres sitios de ADN, donde puede funcionar como activador o represor de la transcripción, dependiendo su contexto: se puede unir a un sitio de unión a Kaiso (KBS) con una secuencia determinada TCCTGCNA siendo N cualquier nucleótido, se puede unir a islas CpG metiladas, o a secuencias TCTCGCGAGA metiladas o no principalmente, pero al día de la fecha no se ha podido determinar por cuál secuencia presenta mayor afinidad (Pierre et al. 2019).

Se ha observado que Kaiso se une principalmente a zonas de ADN que están siendo transcripcionalmente activas, y que al interaccionar con p120 catenina con su zona de unión al ADN, Kaiso pierde su función transcripcional, dando como resultado la represión de genes blanco que poseen secuencias KBS en sus promotores (Pierre et al.

2019). Entre sus genes target identificados se encuentran E-cadherina, Wnt 11, HIF1A, CDKN2A, miR-31 y la familia del miR-200.

En la literatura, se ha encontrado que Kaiso puede funcionar tanto como activador o como represor transcripcional, dependiendo el contexto en el que se encuentra, el tipo celular y las proteínas/secuencia a las que se une, si bien parecería que principalmente funcionaría como activador. Por ejemplo, se ha visto que, si Kaiso interactúa con p53 *wild-type*, esto activa la transcripción de genes pro-apoptóticos, mientras que, si interactúa con p53 mutado, potencialmente reprimiría la transcripción de estos genes (Figura 3). A su vez, Kaiso puede presentar modificaciones post-traduccionales, como sumoilaciones, que también modificarán su capacidad de activar/reprimir la transcripción (Figura 3).

Finalmente, se ha visto que Kaiso puede mediar procesos claves en la tumorigénesis, tales como invasión, metástasis, apoptosis, proliferación celular, inestabilidad genómica e inflamación (Figura 4). Esto lo convierte en una proteína muy interesante para estudiar, dado que se la ha visto implicada en diversos tipos tumorales como ser de colon, próstata, pulmón, mama, ovario y leucemia mieloide crónica. En particular en mama, se ha encontrado que Kaiso podría tener un rol importante en la agresividad del CaM, en particular en el subtipo triple negativo. En la literatura se ha encontrado en pacientes que tumores de mama de alto grado y con mayor actividad mitótica tenían mayores niveles de Kaiso nuclear en comparación con tumores de grados bajos (Vermeulen et al. 2012). También se encontraron altos niveles de Kaiso nuclear en tumores más agresivos como triple negativos y Her2 respecto a tumores de tipo luminal, y que aproximadamente el 70% de aquellos CaM que presentan BRCA1 mutado tenían altos niveles de Kaiso nuclear (Vermeulen et al. 2012).

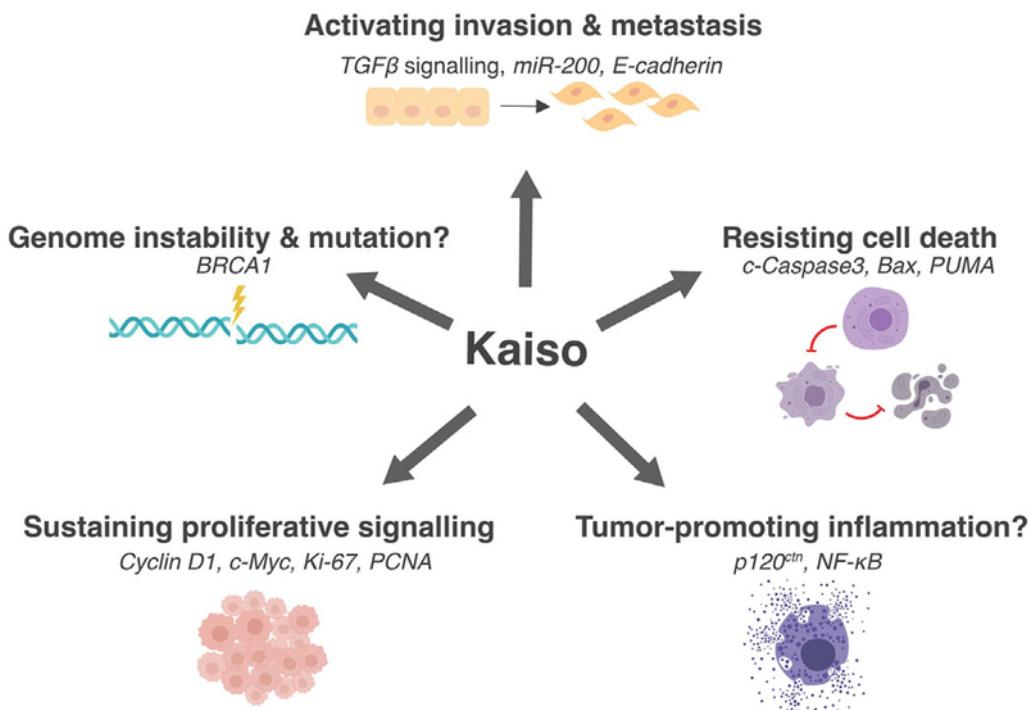


Figura 4: Procesos clave involucrados en la tumorigénesis regulados por Kaiso. Se ha encontrado que Kaiso modula diversos genes que se encuentran involucrados en procesos clave de la tumorigénesis como la activación de la invasión y metástasis, la inestabilidad genómica, el mantenimiento de señales proliferativas, la inflamación circundante al tumor y la resistencia a la muerte celular. (Pierre et al, 2019)

En otros estudios, se encontró que altos niveles de Kaiso en el núcleo correlacionaron positivamente con invasión local, metástasis en ganglios linfáticos y peor sobrevida en pacientes con carcinoma ductal, y que líneas celulares de CaM metastásico presentaron mayores niveles de Kaiso nuclear respecto a líneas no metastásicas, quienes presentaron mayores niveles de Kaiso citoplasmático (Jones et al. 2014). Por otro lado, el silenciamiento de Kaiso en líneas de CaM metastásicas disminuyó la migración celular, mientras que el aumento en la expresión de Kaiso en líneas no metastásicas aumentó la migración e invasión celular, resultados que proponen a Kaiso como un regulador de la EMT (Jones et al. 2014).

Se encontró también que Kaiso se encuentra involucrado en la vía de señalización de TGFβ, dado que una disminución en Kaiso disminuyó esta vía de señalización. También se encontró que Kaiso tiene la posibilidad de unirse a la secuencia KBS presente en los promotores de los genes TGFβR1 y TGFβR2, y que existe un *feedback* positivo entre Kaiso y la vía de TGFβ (B. I. Bassey-Archipong et al. 2016).

En modelos *in-vivo*, la disminución de la expresión de Kaiso a nivel tumoral redujo la expresión de marcadores de proliferación como Ki67 y PUMA, a la vez que demoró el crecimiento tumoral, y aumentó la apoptosis (Blessing I. Bassey-Archibong et al. 2017). Los mecanismos mediante los cuales Kaiso podría modular la apoptosis fueron ampliamente descriptos; por un lado, se encontró que Kaiso activa al gen pro-apoptótico APAF1, mediante la unión a p35 *wild-type* y activando el promotor de APAF1 (Koh et al. 2015). Finalmente, también se vio que Kaiso promueve la apoptosis del CaM mediante la represión del receptor glucocorticoide de manera metilación dependiente (L. Zhou et al. 2016).

En este trabajo de tesis doctoral se focalizará en el estudio del rol de Kaiso en la regulación de miRNAs en modelos animales de CaM y sus implicancias en la autofagia.

Capítulo 2:

Biosíntesis de miRNAs, mecanismos

generales de acción y biopsias líquidas

Biogénesis y mecanismos generales de acción

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas de ARN no codificante de entre 19 y 25 nucleótidos que tienen la capacidad de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional tanto en condiciones de homeostasis como en condiciones patológicas. Si bien los miRNAs han sido muy conservados a lo largo de la evolución, esta sección estará centrada en la biogénesis y mecanismos de acción canónicos de los miRNAs en animales.

Alrededor del 30% de los miRNAs se encuentran codificados en intrones o exones de genes que codifican para proteínas, mientras que la mayoría son transcriptos de genes específicos de miRNAs. Los mismos pueden estar codificados como genes individuales o en grupos (denominados *clusters*), los cuales se transcriben en conjunto generando transcriptos policistrónicos que luego serán procesados para dar miRNAs maduros de manera individual (Ha and Kim 2014). En la actualidad, se cree que los miRNAs podrían regular aproximadamente al 60% de los genes que codifican para proteínas, mayoritariamente disminuyendo la expresión de los mismos.

En cuanto a su biogénesis (Figura 5), la misma comienza con la síntesis de un transcripto largo (de 1 kb aproximadamente) denominado pri-miRNA, el cual se transcribe por la RNA polimerasa II. El pri-miRNA luego será procesado en el núcleo por Drosha (una RNAsa III) la cual lo clivará generando fragmentos de entre 70-100 nucleótidos aproximadamente denominados pre-miRNAs. Estos se encuentran plegados sobre sí mismos formando una estructura característica en forma de horquilla o *harpin*. Los pre-miRNAs son luego exportados al citoplasma mediante la exportina 5 (XPO5), donde serán procesados hasta llegar a un ARN doble cadena de aproximadamente 22 bases que será cargado en las proteínas AGO. Finalmente, se selecciona una de las dos hebras de miRNA maduro (de allí su terminación 5p o 3p), que pasará a formar parte del complejo silenciador inducido por ARN (RISC por sus siglas en inglés). Dentro del complejo RISC, los miRNAs maduros podrán cumplir su función en la regulación génica uniéndose a los ARN mensajeros (ARNm), lo cual concluirá en la inhibición de la traducción o el corte y posterior degradación del ARNm dependiendo de diversos factores (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015; Hammond 2015; Bhaskaran and Mohan 2014). En particular, el reconocimiento canónico de los miRNAs por su ARNm blanco

depende principalmente del apareamiento parcial entre la secuencia semilla del miRNA (ubicada a 2-8 nt desde el extremo 5') y la región 3'UTR del ARNm. Generalmente, el mecanismo principal de acción de los miRNAs consiste en un apareamiento parcial, el cual induce el reclutamiento de factores que bloquearán la interacción entre las proteínas del complejo iniciador y de unión a la poliA (PABP), lo cual imposibilita la circularización del ARNm y el reciclado de ribosomas, a la vez que inducen la desestabilización del ARNm por degradación de la cola de poliA. Otro mecanismo menos común de los miRNAs es el apareamiento (cuasi) perfecto entre estos y el ARNm blanco, el cual inducirá el clivado y degradación del ARNm mediada por el complejo RISC (Eichhorn et al. 2014). Finalmente, diversos estudios han demostrado que los miRNAs son capaces también de unirse al extremo 5' UTR de los ARNm (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015), y que a su vez podrían actuar como activadores de la transcripción del ARNm blanco (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015; Bhaskaran and Mohan 2014). Esta versatilidad en la unión entre los miRNAs y el ARNm blanco es lo que permite que un mismo miRNA regule diversos genes, a la vez que también un gen puede ser blanco de diversos miRNAs a la vez, generando una red regulatoria muy compleja (Daugaard and Hansen 2017).

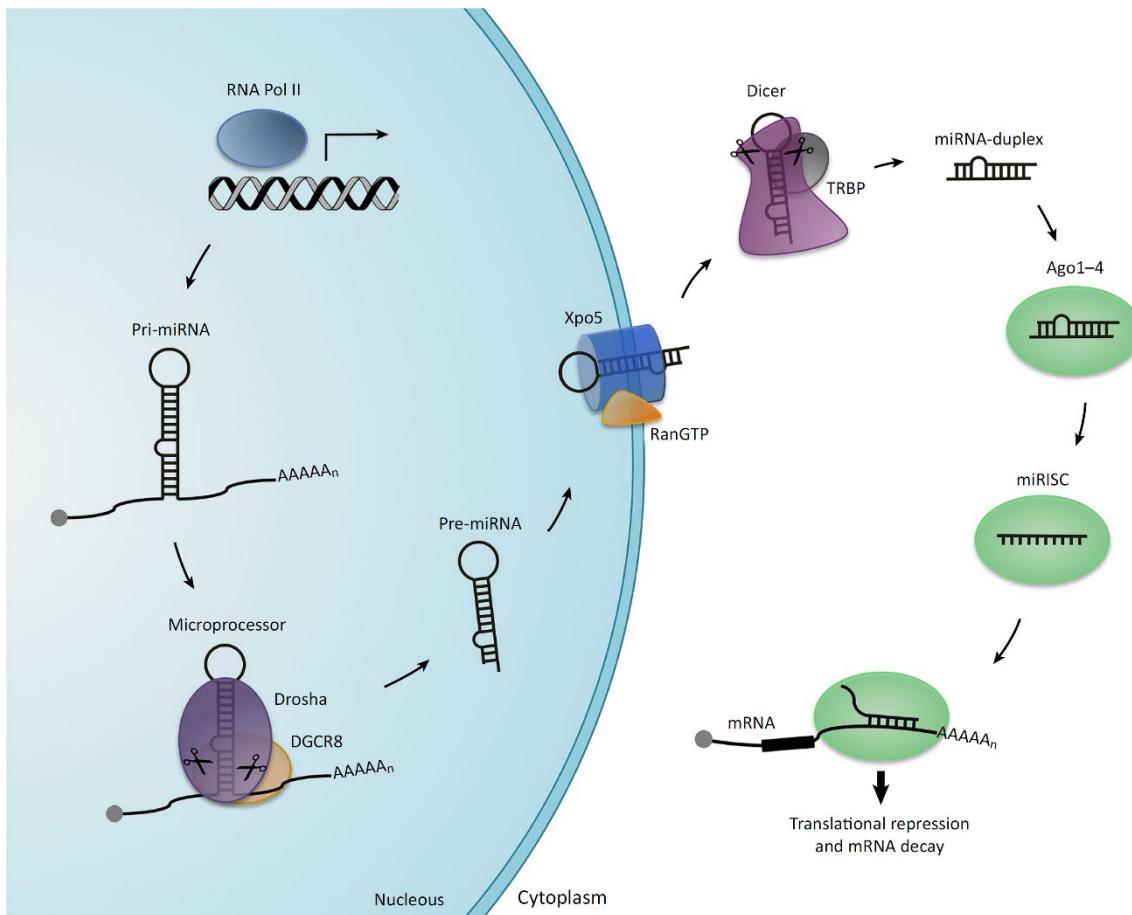


Figura 5: Biogénesis de los miRNAs. La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo con la síntesis de un pri-miRNA mediante la RNA polimerasa II. Estos transcriptos de más de 1 Kb conteniendo un CAP en el extremo 5' y una cola de poliA en el extremo 3', son procesados en fragmentos de 70 nt por el complejo microprocesador, formado por DROSHA, una RNasa de tipo III, y DGCR8, una proteína de unión al ARN. Este procesamiento da lugar a la formación de los pre-miRNAs, los cuales son exportados al citoplasma por XPO5. En este compartimento, los pre-miRNAs son procesados por otra RNasa de tipo III, DICER, que cliva el loop terminal de la horquilla generando fragmentos doble cadena de 19 a 25 nt. Estos fragmentos son reconocidos por proteínas de la familia Argonauta (AGO1 a 4), las cuales seleccionan la hebra que dará como resultado el miRNA maduro que funcionará como guía del complejo RISC principalmente al extremo 3'-UTR de los ARNm blanco. Abreviaturas: DGCR8, DiGeorge syndrome critical region gene 8/microprocessor subunit; RISC, RNA-induced silencing complex; Pol II, polimerasa II; UTR, región no traducible; TRBP, transactivation-responsive RNA-binding protein. (Iben Daugaard et al, 2017).

Desregulación de miRNAs en cáncer

Así como la desregulación en la expresión génica producto de la inestabilidad genómica permite a las células tumorales adquirir características que favorecen el crecimiento y la progresión tumoral, los miRNAs también se pueden encontrar desregulados en el cáncer, dado que se trata de genes no codificantes que tienen un rol en el

mantenimiento de la homeostasis celular. Los mecanismos moleculares mediante los cuales la expresión de miRNAs se ve alterada son similares a los que desencadenan la desregulación de genes que codifican para proteínas, siendo principalmente aquellos que incluyen mutaciones cromosómicas, cambios en el número de copias de genes de miRNAs, amplificaciones, delecciones o translocaciones (Peng and Croce 2016). También pueden darse cambios en el control de la transcripción, por lo que la expresión de miRNAs también se verá afectada por factores de transcripción característicos en la tumorigénesis tales como C-MYC y p53, entre otros. Los genes que codifican para los miRNAs también pueden sufrir cambios epigenéticos, como hipermetilación de promotores, lo que disminuye su expresión (Peng and Croce 2016). Finalmente, la expresión de los miRNAs puede verse también alterada por presentar defectos en las enzimas involucradas en su biogénesis. Particularmente, se ha encontrado que niveles elevados de expresión de DROSHA y DICER funcionan como factor pronóstico positivo en ciertos tipos de cáncer mientras que una baja expresión de DICER correlaciona significativamente con una menor sobrevida de los pacientes (Peng and Croce 2016).

MicroRNAs y cáncer de mama

En la literatura se ha encontrado que los miRNAs tienen un rol relevante en el desarrollo del CaM. En particular, se ha visto que se encuentran involucrados en la carcinogénesis, proliferación celular, apoptosis, inducción de EMT, migración e invasión celular, metástasis y la resistencia a drogas quimioterapéuticas, entre otros procesos (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015). A su vez, también se ha encontrado que los miRNAs se expresan diferencialmente según los subtipos moleculares del CaM y, más aún, que el perfil de expresión de miRNAs permite distinguir entre tumores más y menos agresivos (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015).

Dependiendo el ARNm blanco de los miRNAs y la función biológica que posean, los miRNAs suelen clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, se encuentran los miRNAs comúnmente llamados oncomiRs, que son aquellos cuyo aumento promueve el desarrollo del cáncer, dado que inhiben la expresión de genes supresores tumorales. Por otro lado, se encuentran los miRNAs supresores de tumores, llamados tsmiRs, que son aquellos que inhiben la tumorigénesis y los procesos asociados al inhibir oncogenes. La amplificación o sobreexpresión de los oncomiRs combinada con la delección o mutación

de los tsmiRs favorecerán por lo tanto el desarrollo del cáncer (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015; Hammond 2015).

En particular en el CaM se han identificado numerosos tsmiRs y oncomiRs, críticos en la iniciación tumoral, metástasis y la quimiorresistencia (Takahashi, Miyazaki, and Ochiya 2015; Hammond 2015). A lo largo del presente trabajo se discutirá el rol de los diversos miRNAs estudiados tanto en el CaM como en distintos tipos de cáncer.

Biopsias líquidas y el uso de miRNAs circulantes

Como se ha mencionado anteriormente, en la clínica la confirmación del diagnóstico de CaM se realiza mediante la toma de una biopsia estándar, la cual conlleva una intervención, el uso de anestesias y la recuperación post-quirúrgica del paciente. Por otro lado, el tiempo entre la toma de la biopsia y el resultado del análisis suele ser largo, dado a la complejidad de las técnicas histológicas (Pesapane et al. 2020). La principal limitación de las biopsias estándares es que la muestra colectada permite observar la característica del tumor en el momento de la toma, en un sector particular del tumor, lo cual en el caso del CaM, que es una enfermedad heterogénea, puede ser un problema (Tay and Tan 2021). Otro inconveniente es en el caso que el tumor se encuentre localizado en un sector de difícil acceso, o cuando el paciente no está en condiciones físicas de poder atravesar una intervención quirúrgica como es la toma de la biopsia (Tay and Tan 2021).

En los últimos años surgieron las biopsias líquidas como nuevas estrategias diagnósticas, que intentan resolver al menos en parte estos inconvenientes. Se ha estudiado que pacientes con cáncer presentan en fluidos corporales diversos componentes como ácidos nucleicos: ADN circulante, fragmentos de ARN no codificante y codificante, los cuales se liberan continuamente a partir de tumores tanto primarios como secundarios o producto de apoptosis o necrosis. Asimismo, se pueden encontrar en circulación exosomas, plaquetas educadas por tumores e incluso podrían presentar células tumorales circulantes (CTC) intactas. Por lo tanto, la biopsia líquida consiste en la detección y el análisis de estos componentes en circulación, principalmente en sangre, de pacientes con cáncer (Poulet, Massias, and Taly 2019).

Componentes principales de las biopsias líquidas

- ✓ **Células tumorales circulantes (CTC):** Las CTCs son células que se desprendieron del tumor primario o de lesiones metastásicas, que tienen la capacidad de circular en el torrente sanguíneo entre 1 y 2,4 horas (Poulet, Massias, and Taly 2019). Las mismas pueden ser aisladas de la sangre de los pacientes como células únicas o como *clusters* de células, si bien su abundancia suele ser baja. La limitación principal del uso de CTCs en la clínica se refiere a los métodos de “captura” de CTCs eficientes para su aislamiento. Esta limitación se funda en la heterogeneidad fenotípica y de tamaño de las CTCs, así como también a la dilución de CTCs en el torrente sanguíneo que impone la necesidad de la toma de un gran volumen de sangre para el aislamiento. Actualmente, ha sido aprobada por la FDA una tecnología para la detección de CTCs: CellSearch® (Veridex). Este método ha sido utilizado para la detección temprana del CaM, el pronóstico de cáncer colorectal no-metastásico, el diagnóstico del cáncer de próstata localizado y el cáncer de pulmón de células no-pequeñas. Las CTCs pueden ser utilizadas para el desarrollo de xenotrasplantes derivados de las mismas, establecer nuevas líneas celulares o incluso permitir estudios funcionales incluyendo el testeo de terapias (Poulet, Massias, and Taly 2019). Asimismo, en CaM se ha visto que la detección de por lo menos una CTC en pequeños volúmenes de sangre correlaciona con un peor pronóstico, y que pacientes con presencia de CTCs al momento del diagnóstico tienen 2 veces más chances de morir de CaM respecto a aquellas pacientes donde no se encontraron CTCs al momento del diagnóstico (Banys-Paluchowski, Krawczyk, and Fehm 2020).
- ✓ **Plaquetas educadas por tumores:** Estos componentes tienen un rol central en la respuesta local y sistémica al crecimiento tumoral. En particular, los tumores podrían alterar el perfil transcripcional de estas plaquetas. Esto lo podrían llevar a cabo liberando ARNm al torrente sanguíneo, donde es captado por las plaquetas, donde a su vez se podrían llevar a cabo eventos de *splicing* adicionales mediados por señales tumorales, estromales e inmunes que estén en el microambiente tumoral (Poulet, Massias, and Taly 2019). Las plaquetas también pueden captar proteínas asociadas al tumor. En conjunto la interacción entre las

células tumorales y este tipo especial de plaquetas podrían ser un aspecto importante en el diagnóstico y el monitoreo de la evolución de los tumores (Poulet, Massias, and Taly 2019).

- ✓ **ADN circulante:** El ADN circulante se encuentra tanto en individuos sanos como enfermos, y puede ser encontrado en altos niveles como respuesta a traumas, infarto de miocardio, o en condiciones autoinmunes. A su vez, también está el ADN circulante tumoral (ADNct), que es aquel derivado de células tumorales producto de apoptosis o necrosis de las mismas, y que ha sido propuesto como un biomarcador tumoral. El ADNct se encuentra altamente fragmentado en el torrente sanguíneo y tiene una vida media de alrededor de 114 minutos, característica atractiva para la monitorear la evolución en tiempo real del cáncer (Poulet, Massias, and Taly 2019). A su vez, se ha encontrado que cambios en los niveles de ADNct circulante fueron encontrados asociados a diversos procesos patogénicos, y que altos niveles de ADNct en circulación suelen ser detectados en cánceres en estadios avanzados en comparación con aquellos que se encuentran circunscriptos a un lugar particular. El ADNct se puede encontrar en otros fluidos biológicos tales como orina, fluido cerebroespinal, saliva y fluido pleural (Poulet, Massias, and Taly 2019). El desafío en la detección de los ADNct es principalmente conseguir niveles de sensibilidad y especificidad lo suficientemente altos como para poder analizar alteraciones epigenéticas y genéticas en estas muestras. En la actualidad, se han desarrollado técnicas de NSG y de *droplet-based digital PCR* para la identificación de mutaciones y secuencias metiladas (Poulet, Massias, and Taly 2019).
- ✓ **Exosomas:** Los exosomas son un tipo particular de vesículas extracelulares que poseen un tamaño de entre 30 y 100 nm que contienen en su interior proteínas y ácidos nucleicos entre otros componentes. En la literatura fueron descriptas como intermediarios en el intercambio de información entre células. Los exosomas derivados de células tumorales pueden “convertir” células normales en tumorales y se ha encontrado que los miRNAs incluidos dentro de los mismos pueden promover metástasis, aumentar la migración celular e incluso conferir resistencia a drogas en células a distancia. Los exosomas son detectables en

sangre de pacientes de distintos tipos de cáncer, y se los encontraron correlacionados con la progresión tumoral, la inhibición de la respuesta inmune, angiogénesis y metástasis (Poulet, Massias, and Taly 2019). Las mismas pueden ser extraídas mediante centrifugación por gradiente de densidad, ultracentrifugación o mediante la selección por marcadores específicos de membrana de exosomas. El análisis del ARN contenido en los exosomas puede ser de utilidad en la identificación de mutaciones, variantes genómicas por *splicing* o fusiones de genes (Poulet, Massias, and Taly 2019).

- ✓ **miRNAs circulantes:** Dado que es uno de los principales objetos de estudio del presente trabajo de tesis, se desarrollará en profundidad en el próximo apartado de este componente de las biopsias líquidas.

Usos y beneficios de las biopsias líquidas

Las biopsias líquidas han sido propuestas para utilizarse tanto en el diagnóstico como el pronóstico e incluso la respuesta a la terapia en el CaM. En tumores heterogéneos como son los de CaM, las biopsias líquidas permiten la identificación de mutaciones en oncogenes y amplificaciones en circulación, así como también permiten la repetición seriada de la toma de muestras, dando lugar a la identificación de metástasis que no podrían ser identificadas de otra manera. Respecto a su uso en el diagnóstico del CaM, se ha visto que analizando las CTCs presentes en circulación, se puede diferenciar pacientes con CaM metastásico de individuos sanos (Tay and Tan 2021). Por otro lado, altos niveles de ADN circulante fueron encontrados en pacientes con CaM respecto a voluntarias sanas, por lo que las cantidades de ADN circulante podrían ser utilizadas como valores para discriminar en estos casos entre enfermas y sanas, si bien parecería ser que mujeres con lesiones benignas en las mamas también presentan altos niveles de ADN circulante (Tay and Tan 2021). Otra manera de discriminar entre pacientes con CaM e individuos sanos puede ser midiendo ciertos tipos de ADN y comparar su longitud, dado que el ADNct tiende a ser más largo (siendo que se libera como resultado de una necrosis) que el ADN circulante en individuos sanos (que suele ser más corto y liberado a circulación como producto de apoptosis celular).

El uso de biopsias líquidas como predictores de sobrevida han sido muy estudiadas, principalmente la presencia de CTC, como fue mencionado anteriormente. Por otro

lado, altos niveles de ADNct en circulación también correlacionaron con peor sobrevida libre de recurrencia y sobrevida total, a la vez que una mayor cantidad de alteraciones genéticas en el ADNct también correlacionaron con peor sobrevida (Tay and Tan 2021). Las biopsias líquidas también pueden ser utilizadas en el monitoreo del tratamiento en pacientes con CaM, dado que es una técnica que puede ser utilizada en múltiples ocasiones a lo largo del tiempo, sin generarle mayores inconvenientes a los pacientes, y permitiendo identificar si el mismo está respondiendo o no al tratamiento. En aquellos pacientes no respondedores, o cuyo riesgo de recaída fuera mayor, tendrían la posibilidad de complementar el tratamiento con otras opciones (Banys-Paluchowski, Krawczyk, and Fehm 2020). Es por esto que el uso de biopsias líquidas no solo sería útil para el diagnóstico de la enfermedad sino también para el seguimiento y pronóstico de los pacientes.

Los beneficios del uso de las biopsias líquidas son principalmente el fácil acceso a las muestras, el bajo riesgo que confiere la toma de las mismas y el menor tiempo en el procesamiento (Banys-Paluchowski, Krawczyk, and Fehm 2020; Poulet, Massias, and Taly 2019). Al día de hoy, hay muy pocas técnicas basadas en biopsias líquidas que se hayan implementado en la clínica para el diagnóstico temprano del CaM, por lo que nuevos estudios y esfuerzos son necesarios para poder acercar estas alternativas a la sociedad.

El uso de miRNAs circulantes como biomarcadores

Desde hace varios años, distintos laboratorios de investigación a nivel mundial se encuentran investigando a los miRNAs como biomarcadores para el diagnóstico temprano (Jafari et al. 2018). Los miRNAs se encuentran en su mayoría intracelulares, pero también se pueden encontrar fuera de las células, en cuyo caso se denominarán miRNAs circulantes, y se encuentran tanto en fluidos corporales, como sangre u orina, y en medios de cultivo. Los miRNAs circulantes pueden ser liberados al espacio extracelular de manera activa, en cuyo caso pueden funcionar como moléculas señalizadoras, o pueden ser liberados de manera pasiva, que serán principalmente como consecuencia de células en proceso de apoptosis o necrosis, células expuestas a procesos inflamatorios o células que han sufrido daños (Valihrach, Androvic, and Kubista 2020). Los miRNAs circulantes pueden encontrarse libres, asociados a proteínas, en

cuerpos apoptóticos o dentro de vesículas, particularmente en exosomas (Chong, Yeap, and Ho 2020). Aquellos miRNAs que se encuentran en complejos o dentro de vesículas, se encuentran protegidos de la degradación, siendo la fracción miRNAs circulantes más estable y por lo tanto los mejores candidatos como potenciales biomarcadores. De los distintos tipos de vesículas que contienen miRNAs, los exosomas son las más estudiadas. El empaquetamiento de miRNAs en este tipo de vesículas es selectivo, generando vesículas con destinos y cargas diferentes.

Respecto al rol de los miRNAs circulantes en el CaM, han sido ampliamente estudiados, y se encontraron involucrados en diversos procesos clave, tales como proliferación, apoptosis, invasión y metástasis, invasión, angiogénesis, desregulación inmune y trastornos metabólicos (Figura 6) (Chong, Yeap, and Ho 2020).

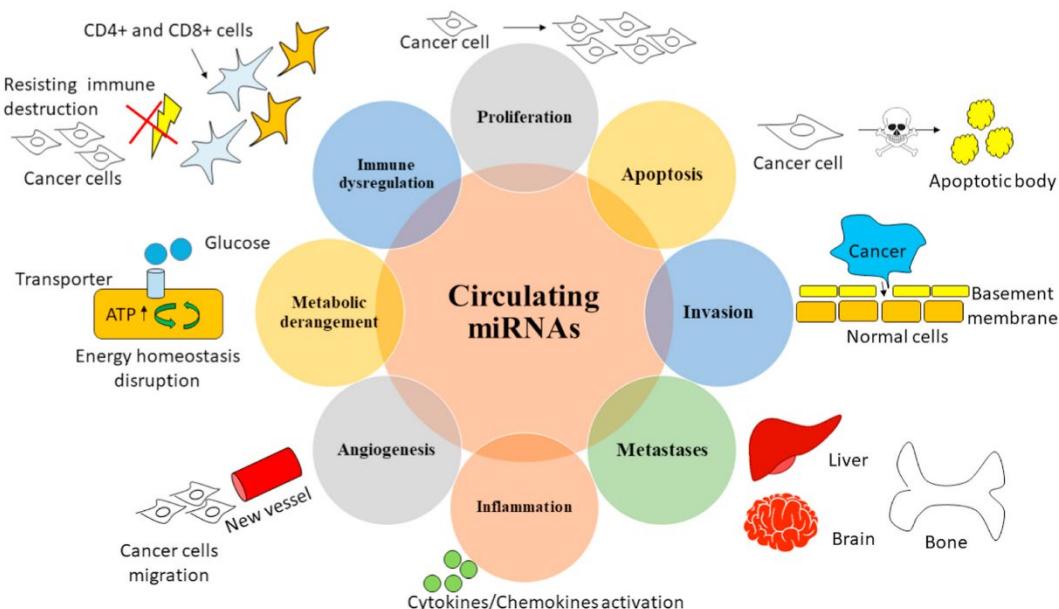


Figura 6: Procesos regulados por miRNAs circulantes en CaM. Los miRNAs circulantes presentes en pacientes con CaM podrían regular procesos tales como proliferación, apoptosis, invasión, metástasis, inflamación, angiogénesis, trastornos metabólicos y desregulación del sistema inmune (Chong et al, 2020).

La presencia de los miRNAs en fluidos biológicos, su gran estabilidad y el fácil acceso a los mismos son las principales características que los convierten en atractivos para ser utilizados como biomarcadores, razón por la cual se estudiarán en profundidad en el presente trabajo de tesis.

Antecedentes del laboratorio en investigación con miRNAs

En el laboratorio donde se llevó a cabo la presente tesis, se han realizado diversos estudios sobre el rol del síndrome metabólico en la progresión del CaM y el cáncer de próstata, así como también el estudio de diversos miRNAs y su rol en la tumorigénesis y metástasis (Dalton et al. 2019; Farré et al. 2018; Massillo et al. 2019; Porretti et al. 2018; De Luca et al. 2016; Massillo et al. 2020; Duca et al. 2021).

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de desórdenes fisiopatológicos que comprenden la alteración de al menos 3 de estos factores: obesidad abdominal, presión arterial, triglicéridos, colesterol, y glucosa en sangre. Estudios epidemiológicos determinaron que los pacientes con SM poseen un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cánceres y de mayor agresividad. C-terminal Binding Protein (CTBP1) es un factor que reprime la expresión de genes supresores tumorales y es activado por su unión al NAD+/NADH. Nuestro grupo fue el primero en determinar que CTBP1 controla la transcripción del gen supresor tumoral BRCA1 en el CaM. A partir de estos hallazgos y debido a que CTBP1 es una proteína que se activa en condiciones de alta energía (alto NADH), en nuestro laboratorio se generó un modelo murino para estudiar el efecto de la activación de CTBP1 sobre el desarrollo del cáncer de próstata y CaM. Para ello, ratones nude fueron alimentados con una dieta enriquecida en grasa (DG) la cual aumentó el NADH intratumoral e indujo un estado similar al SM. El silenciamiento de la expresión de CTBP1 disminuyó drásticamente el crecimiento tumoral de mama y de próstata respecto a los tumores con expresión control de CTBP1 únicamente en los animales que tenían un estado similar al SM, validando de ésta manera nuestra hipótesis (De Luca et al. 2016; Farré et al. 2018; Dalton et al. 2019). Por lo tanto, CTBP1 surge como una proteína que asocia el desarrollo de estos tipos de cánceres y el SM.

Utilizando microarreglos de expresión de ARNm y herramientas bioinformáticas, se encontró que CTBP1 modula la expresión de genes involucrados en vías de adhesión y comunicación celular, apoptosis y procesos metabólicos. Además, se realizaron microarreglos de expresión de miRNAs a partir de xenotransplantes obtenidos por inyección de células tumorales de próstata o de mama que tienen silenciada la expresión de CTBP1 o células control en animales con SM. Estos estudios permitieron describir por primera vez que CTBP1 es capaz de modular la expresión de múltiples miRNAs en el

cáncer de próstata y CaM que regulan procesos relacionados con la progresión y el desarrollo del cáncer (De Luca et al. 2016; Farré et al. 2018; Dalton et al. 2019).

Más recientemente, se generó un modelo murino no inmunodeficiente de SM y cáncer de próstata. Este modelo permitió determinar que el SM aumenta el crecimiento tumoral de alotransplantes murinos de próstata y que estos ratones tenían una mayor cantidad de tejido adiposo, hipertrofia de adipocitos, mayor densidad de *crown like structures* e inducción de la expresión de genes y miRNAs que regulan la inflamación y la adipogénesis, lo cual lleva a un fenotipo pro-inflamatorio, una característica importante del SM (Massillo et al. 2019). Estos resultados describen un nuevo mecanismo por el cual el tejido adiposo asociado al SM aumenta el crecimiento tumoral prostático. En otro trabajo del grupo se observó que CTBP1 y la DG aumentaron la migración y disminuyeron la adhesión celular, las metástasis a pulmón y la enfermedad neoplásica en el hígado modulando la expresión de diversos genes y miRNAs (Farré et al. 2018).

En resumen, en los últimos años nuestro laboratorio se focalizó en la investigación acerca del rol de los miRNAs en modelos animales asociados al SM y cáncer, lo cual permitió, en este trabajo de tesis comenzar a trabajar en la detección de miRNAs en circulación en ratones para posteriormente pasar a ensayos clínicos, adaptando las técnicas ya utilizadas previamente en el laboratorio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis se basa en la siguiente hipótesis: **Los microRNAs (miRNAs) circulantes de los pacientes con CaM son diferentes a los de los individuos sin enfermedades oncológicas. La identificación, estudio, caracterización y validación de estos miRNAs permitirá generar, en el futuro, nuevos biomarcadores para el diagnóstico de estas enfermedades.**

En base a esto, el objetivo general de este trabajo de tesis es **identificar nuevos candidatos para ser utilizados como biomarcadores basados en la utilización de miRNAs circulantes que permitan mejorar el diagnóstico del CaM.**

Los objetivos específicos propuestos son:

Objetivo 1. Investigar el rol de miRNAs y genes con relevancia clínica en modelos animales con CaM

Utilizando dos modelos animales, ratones Balb/c o NOD scid gamma (NSG), inoculados de manera subcutánea en la almohadilla mamaria con células de CaM de origen murino o humano, respectivamente, se propone analizar la expresión de genes y miRNAs relevantes en el CaM en tumores, mamas y en circulación (plasma) mediante RT-qPCR. Se propone además investigar el rol y la relevancia de estos miRNAs mediante análisis bioinformáticos.

Objetivo 2. Identificar el perfil de miRNAs circulantes en plasma de pacientes con CaM

Luego de establecer protocolos clínicos con instituciones de salud, se propone generar una cohorte exploratoria de pacientes con CaM y voluntarias sanas (VS) para aislar miRNAs circulantes a partir del plasma de las mismas. Mediante dos tecnologías, microarreglos de expresión y miRNA-seq, se propone identificar miRNAs candidatos para ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico del CaM.

Objetivo 3. Validar los miRNAs circulantes en plasma de pacientes con CaM

Para investigar la fuerza de cada miRNA como candidato para ser utilizado como biomarcador de diagnóstico del CaM, se propone validar los miRNAs biomarcadores candidatos identificados en el objetivo específico 2, en diferentes cohortes de pacientes y VS: *i) exploratoria; ii) validatoria; iii) validatoria in silico*. También se propone analizar

la expresión de los miRNAs candidatos en tumores y tejidos normales adyacentes al tumor de pacientes con CaM obtenidos de repositorios públicos.

Objetivo 4. Establecer un modelo predictivo para el diagnóstico del CaM

Una vez determinados y validados los miRNAs candidatos, se propone utilizar enfoques estadísticos (en particular modelos logísticos) para establecer la combinación de miRNAs óptima y las métricas asociadas, incluyendo sensibilidad y especificidad del modelo elegido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 1:
Líneas celulares, modelos *in vivo* e
histología

Condiciones de crecimiento de las líneas celulares

La línea celular murina de CaM triple negativo 4T1 (ATCC: CRL-2539) se cultivó en medio de cultivo RPMI 1649 (Invitrogen). Las líneas celulares humanas de CaM triple negativo MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) con expresión control (Ctrl RNAi) o disminuida de Kaiso (shKaiso) generadas por el laboratorio del Dr. Kevin Gardner (Universidad de Columbia, New York, USA) fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) suplementado con HEPES 1x. Todas las líneas fueron suplementadas con 10% suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,5 µg/ml de anfotericina) y se mantuvieron en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO₂ 5%. Las líneas generadas por transfección estable Ctrl RNAi y shKaiso se crecieron en medio de cultivo suplementado con dosis de mantenimiento de puromicina 2 µg/ml (Sigma Aldrich).

Experimentos *in vivo*

Modelo murino de xenotransplantes de CaM con expresión modulada de Kaiso en ratones inmunosuprimidos

Ratones hembra NOD scid gamma (NSG) de 4 semanas de edad (N=14) gentilmente cedidos por el laboratorio de la Dra. Claudia Lanari, se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo a las normas de cuidado del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). El protocolo fue aprobado por el CICUAL del IBYME con fecha 27 de noviembre de 2017, numero de protocolo 013/2017. Los animales fueron aleatorizados en 2 grupos (N=7) e inoculados de manera s.c. en la almohadilla mamaria con 2x10⁶ células con expresión control (Ctrl RNAi) o disminuida de Kaiso (shKaiso). Se midió el tamaño tumoral de los xenotransplantes tres veces por semana, utilizando un calibre digital y el volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula: 0,523 x ancho² x largo, donde el ancho representa la dimensión de menor tamaño del tumor. Luego de 4-6 semanas, cuando el tamaño de los xenotransplantes generados fue alrededor de 2500 mm³, los animales se sacrificaron y se obtuvieron, por un lado, sangre de manera intracardíaca, y por otro lado muestras de tumor, pulmón, riñón e hígado. La sangre fue colectada en tubos conteniendo 60 µL de EDTA 0.5M (pH=8), luego se centrifugó para obtener el plasma, para la posterior extracción de miRNAs circulantes. Los tejidos fueron sumergidos en formalina 10% para el posterior análisis histopatológico y, por otro lado, los tumores fueron inmediatamente sumergidos en Tri-

Reagent (Molecular Research Center) y congelados a -80°C para su posterior extracción de ARN total como se detallará en el siguiente capítulo. La presencia de macrometástasis en tejidos blandos se observó utilizando una lupa de mesada.

Modelo murino de alotransplantes de CaM en ratones inmunocompetentes

Ratones hembra Balb/c de 16 semanas de edad (N=16) se adquirieron del bioriego de la Universidad de La Plata y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo a las normas de cuidado del bioriego del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). El protocolo fue aprobado por el CICUAL del IBYME con fecha 22 de mayo de 2017, numero de protocolo 013/2017. Los animales fueron aleatorizados en 2 grupos (N=8): Control o CaM. Los ratones del grupo CaM fueron inoculados de manera s.c. en la almohadilla mamaria con 1×10^4 células 4T1. Se midió el tamaño tumoral de los xenotransplantes tres veces por semana, utilizando un calibre digital y el volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula: $0,523 \times \text{ancho}^2 \times \text{largo}$, donde el ancho representa la dimensión de menor tamaño del tumor. Luego de 4 semanas, los animales se sacrificaron y se colectaron muestras de tumor del grupo CaM y glándulas mamarias del grupo Control. Los tejidos fueron inmediatamente sumergidos en Tri-Reagent (Molecular Research Center) y congelados a -80°C para su posterior extracción de ARN total como se detallará en el siguiente capítulo.

Histología

Tinción con hematoxilina-eosina

Las muestras de tumores generados y tejidos murinos fueron fijados en formalina 10% y al día siguiente enviados al servicio de la Dra. Marcela F. Alvarez (Universidad de Maimónides) para su inclusión en parafina, corte y tinción con hematoxilina-eosina (H&E). En estos cortes se analizó la presencia de micrometástasis en pulmones, riñones e hígado de ratones inoculados con células Ctrl RNAi y shKaiso.

Capítulo 2:

**Métodos para el análisis de la expresión
de ARNm y miRNAs**

Aislamiento de ARN total y miRNAs

A partir de tejido

El aislamiento del ARN total (incluidos los miRNAs) proveniente de tejidos se realizó a partir de las muestras sumergidas en Tri-Reagent como se mencionó anteriormente. Al momento de la extracción, los mismos fueron descongelados y homogeneizados dando tres pulsos de 10 segundos a máxima potencia utilizando un homogeneizador PRO 200 (PRO Scientific). Los homogenatos obtenidos fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se llevó a cabo el aislamiento del ARN como lo detalla el fabricante, incubando las muestras alrededor de 16 horas en isopropanol a -20°C, para favorecer el precipitado de ARN pequeños como ser los miRNAs. El pellet de ARN total se secó a 60°C en intervalos de a 5 minutos hasta que los restos del etanol utilizado para los lavados se hubiera evaporado completamente, se resuspendió en 30 µl de H₂O libre de RNAsas, incubando las muestras durante 10 minutos a 55-60°C. El RNA se conservó a -70°C luego de evaluar la concentración y la pureza del mismo con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

A partir de plasma (miRNAs circulantes)

El aislamiento de ARN total (incluidos los miRNAs) a partir de plasma de ratones o de pacientes y VS se realizó utilizando Tri-Reagent (Molecular Research Center). A 200 µl de plasma se le agregaron 10 fmoles de un miRNA sintético (*spike in* = cel-miR-39-3p) y luego se le adicionaron 600 µl de Trireagent. Se homogeneizó, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se agregaron 120 µl de cloroformo. Se agitó vigorosamente durante unos segundos y luego se incubó a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Luego de la incubación, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Luego se tomaron 350 µl de la fase acuosa, se le agregó 300 µl de isopropanol y se incubaron las muestras por aproximadamente 16 horas a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol 75% frío centrifugando luego de cada lavado a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego de los lavados, se dejó secar el pellet a 55-60°C durante unos minutos hasta que el etanol se hubiera evaporado completamente. Se resuspendió el pellet en 22 µl de agua libre de RNAsas y se incubó durante 10 minutos a 55-60°C. Las muestras luego se conservaron a -70°C. La

concentración y pureza en este caso no se evaluó, dado que, al ser concentraciones muy bajas, el NanoDrop no llega a analizar la muestra con certeza.

Análisis de la expresión de ARN mensajero (ARNm) por RT-qPCR

La retrotranscripción del ARN total de tumores se realizó utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total, con una relación A260/A280 (pureza respecto de proteínas) mayor a 1,8 y una relación A260/A230 (pureza respecto de compuestos orgánicos) mayor a 1,6. Se mezclaron el ARN, agua libre de RNAsas y 1 µl de Oligo dT (0.5 µg/µl) y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Luego, se agregó una mix de 4 µl de Buffer 5X específico para la enzima, 1 µl de dNTPs (10 mM) y 1 µl de la enzima RT. Se incubó la mezcla durante 60 minutos a 42°C para la síntesis y 5 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Para realizar la qPCR, se utilizaron 1 o 2 µl de cDNA puro o diluido (1/20) obtenido mediante la RT, que se amplificó en una mezcla de reacción de 3.5 µl de agua ROUX, 0.5 µl de una mix de oligos Fw y Rv específicos 10 µM y 5 µl de la mix Sso Advanced Universal mix con Sybr Green (Bio-Rad Life Science). La reacción de PCR se llevó a cabo por duplicado en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) o en un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El ciclado de amplificación se detalla a continuación:

95°C 2 min 95°C 15 s 60 °C 1 min Lectura fluorescencia	} 40 ciclos Curva de “melting” de 60 a 95°C + 0.3 °C cada 6 s
---	--

La temperatura de *annealing* utilizada para todos los genes fue de 60°C.

Los oligos utilizados se diseñaron utilizando el programa Beacon Designer 5 y se corroboraron con el UCSC Genome Browser Home (<https://genome.ucsc.edu/>). Los mismos fueron comprados a la empresa Macrogen, y se listan en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de oligos utilizados para la técnica de RT-qPCR

Oligo	Secuencia (5'-3')	T ann (°C)
-------	-------------------	------------

RT-Kaiso Fw	AGAGGAAAGGGCATGGAGAGT	60
RT-Kaiso Rv	GGCCACGTTGCTCATTCAAG	60
RT-CTBP1 Fw	TACAGCGAGCAGGCATCC	60
RT-CTBP1 Rv	TGGTCCTTGTGACACAGTTC	60
RT-CTBP2 Fw	CCTTAGCACAAGCCCTCAAG	60
RT-CTBP2 Rv	TGCTCACTGTACCAGGCAGT	60
RT-FOXA1 Fw	AGGAACGTGAAGATGGAAGG	60
RT-FOXA1 Rv	ATGTTGCCGCTCGTAGTC	60
RT-GATA3 Fw	CAGACCACCAACACACTCT	60
RT-GATA3 Rv	GGATGCCTCCTCTTCATAGTCA	60
RT-CCND1 Fw	GCGGAGGGAGAACAAACAGAT	60
RT-CCND1 Rv	TGAGGCGGTAGTAGGACAGG	60
RT-DNMT1 Fw	CAGCCAACAGAGGACAAC	60
RT-DNMT1 Rv	CACACCATCACCAACTCG	60
RT-EZH2 Fw	GGGCACAGCAGAAGAACTAAAG	60
RT-EZH2 Rv	AAGCGTATGAAAGGAGTGTAAGC	60
RT-ACTB Fw	AAGATCATTGCTCCTCCTGAGC	60
RT-ACTB Rv	CATACTCCTGCTTGCTGATCCA	60

El cálculo de los niveles de expresión de los genes analizados se realizó mediante el método del delta-delta CT ($\Delta\Delta CT$). Para ello, utilizando el programa StepOne Software v2.3, se determinó el ciclo al cual cada muestra alcanzó el umbral de fluorescencia automático del programa (CT) (Current Protocols in Molecular Biology). Cabe destacar que el umbral automático del programa asegura que, en ese umbral, todas las muestras se encuentren en la fase exponencial de amplificación. Para cada muestra analizada, se determinó el promedio de los valores de CT para el gen a evaluar (X) y para el gen de expresión constitutiva ACT β de la siguiente manera:

$$\overline{CT} = \frac{CT_1 + CT_2}{2}$$

La diferencia en los valores de CT del gen X y del gen de expresión constitutiva para cada muestra determina el primer delta-CT (ΔCT). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta CT = \overline{CT}_{genX} - \overline{CT}_{ACTB}$$

Finalmente, debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas a los niveles de expresión del gen X de cada muestra normalizado con el gen constitutivo de la siguiente manera:

$$Exp_{relativa} = 2^{-\Delta CT}$$

Finalmente se calculó el valor promedio y desvío estándar de este valor obtenido en “n” réplicas biológicas.

Análisis de la expresión de miRNAs por *Stem-loop* RT-qPCR

Diseño de los oligos para la técnica de *stem-loop* RT-qPCR

El diseño de los oligos para la técnica de RT-qPCR fue realizado adaptando los lineamientos presentes en el trabajo de Chen *et al.* (C. Chen et al. 2005). Para ello, la secuencia del miRNA maduro fue descargada utilizando la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Luego, para el diseño del oligo *stem-loop* para la RT, se utilizó una secuencia de tipo *stem-loop* (GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC) seguida por una secuencia de seis bases complementarias y escritas de manera 5'-3' a los últimos seis nucleótidos del extremo 5' del miRNA maduro. Para el diseño del oligo Forward para la qPCR, se utilizó la secuencia del miRNA maduro sin las últimas 6 bases del extremo 5'. Luego, para extender el largo del oligo, se le agregó una secuencia corta de C y G al extremo 5' (por ejemplo: GCGGCAGG). Finalmente, para la realización del oligo Reverse que será universal a todos los miRNAs, se diseñó una secuencia complementaria a la del *stem-loop*. La temperatura de melting (Tm), la auto-complementariedad y los productos inespecíficos se analizaron utilizando la herramienta Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los criterios de exclusión fueron una Tm óptima de 60°C con un rango de +/- 5°C, una auto-complementariedad menor a

4 y auto-complementariedad 3' también menor a 4. El fundamento de la RT-qPCR se encuentra descripto en la Figura 7 (Kramer 2011).

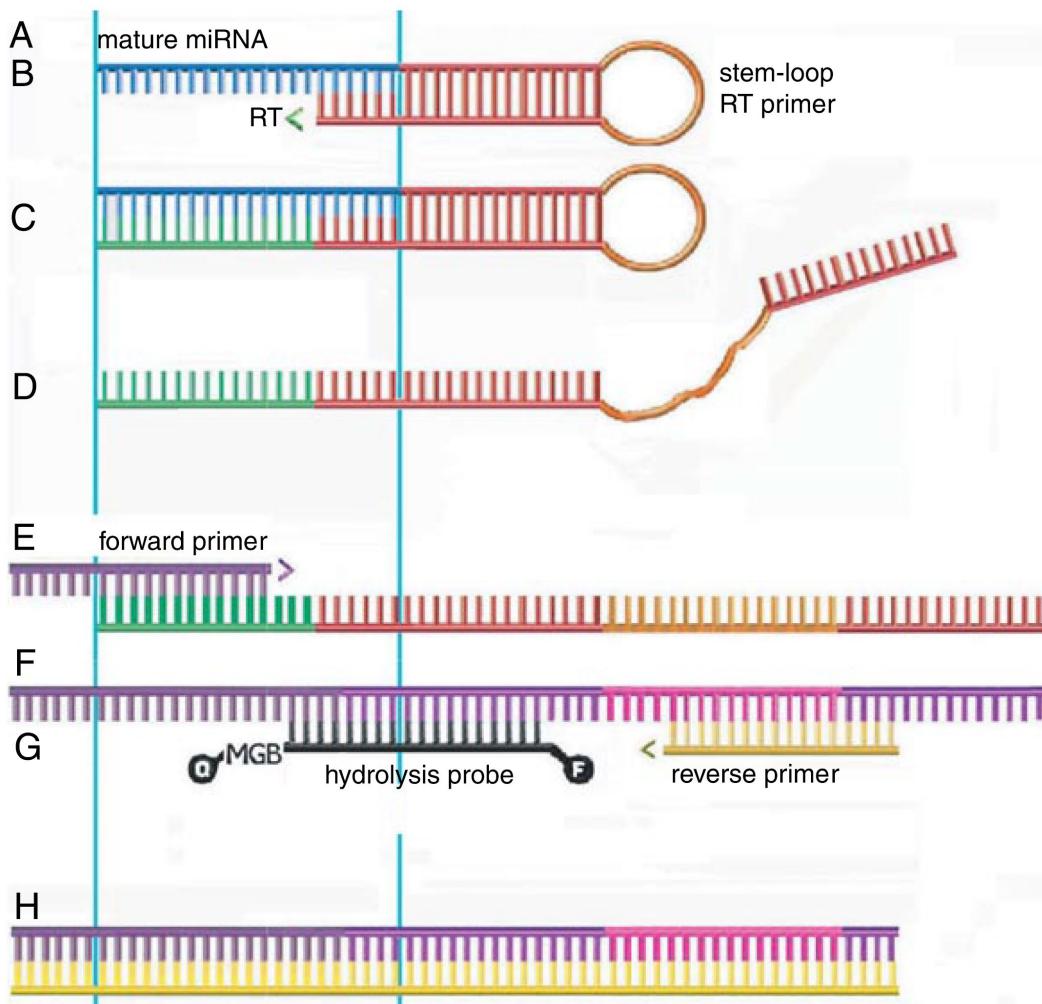


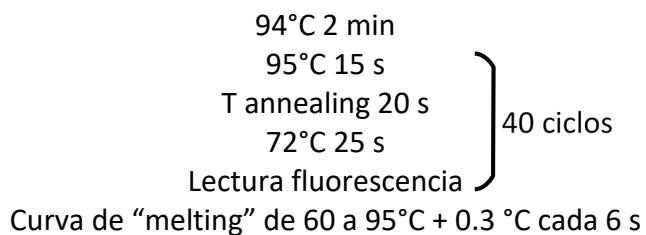
Figura 7. Stem-loop RT-qPCR. Los pasos A-D serán los correspondientes a la RT, y de la E-H los correspondientes a la qPCR. A) miRNA maduro (azul). A-H) Las líneas celestes muestran el límite de la secuencia del miRNA maduro dentro de las secuencias "extras" añadidas para realizar la RT y qPCR. Las puntas de flecha indican las direcciones de polimerización. B) 6 nt del primer *stem-loop* hibridan con el miRNA maduro. RT: retrotranscriptasa. C) primera cadena de cDNA luego de la polimerización y D) luego de la desnaturación por calor. E) El primer forward añade 6 nt. F) segunda cadena de cDNA. G) El primer reverse universal hibrida con la secuencia del *stem-loop*. H) Producto de PCR definido por los extremos 5' de los primers forward y reverse. (Kramer MF 2011)

Stem-loop RT-qPCR para miRNAs en tejido

La retrotranscripción del ARN total de tumores se realizó utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA) utilizando el método *Stem-loop* descripto en Chen et al (C. Chen et al. 2005). El cDNA se sintetizó a partir de 100 ng de ARN total, con una relación A260/A280 (pureza respecto de proteínas) mayor a 1,8 y una relación A260/A230

(pureza respecto de compuestos orgánicos) mayor a 1,6. Se mezclaron el ARN, agua libre de RNAsas y una mix de hasta 6 primers *stem-loop* específicos para cada miRNA (se utiliza 1 μ l de cada primer STEM específico 1 μ M), los cuales se utilizan para alargar el producto original, y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Luego se agregó una mix de 5 μ l de Buffer 5X específico para la enzima, 1 μ l de dNTPs 10 mM y 1 μ l de la enzima RT. Se incubó luego durante 30 minutos a 16°C, paso clave para la técnica de *stem-loop*, luego 60 minutos a 42°C para la síntesis y 5 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Para realizar la qPCR, se utilizaron 1 o 2 μ l de cDNA puro o diluido (1/20) obtenido mediante la RT, que se amplificó en una mezcla de reacción 0.2 μ l de EasyTaq DNA Polymerase 5U/ μ l (TransGen Biotech Co.), 2.5 μ l de Buffer de reacción 10x, 1.25 μ l de una mix de oligos Fw específico y Rv universal 2 μ M, 0.5 μ l de dNTPs 10 mM, 0.25 μ l de SYBR Green (Sigma) y agua ROUX hasta completar un volumen total de reacción de 25 μ l. La reacción de PCR se llevó a cabo por duplicado en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) o en un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El ciclado de amplificación se detalla a continuación:



La temperatura de *annealing* utilizada para los miRNAs se detalla en la Tabla 2. Los oligos utilizados fueron comprados a la empresa Macrogen, y se listan en la Tabla 2.

Tabla 2: Lista de oligos utilizados para la técnica de Stem-loop RT-qPCR a partir de tejido

Oligo	Secuencia (5'-3')	T _{ann} (°C)
RT-Stem-loop-Rv	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	–
RT-mmu-miR-21a-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACCCAGAGGAGACTCAACA	–
RT-mmu-miR-21a-5p Fw	CGGGGGGTAGCTTATCAGACTG	65
RT-mmu-miR-106b-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACCCAGAGGAGACATCTGC	–
RT-mmu-miR-106b-5p Fw	GCAGCGGTAAAGTGCTGACAG	67

RT-mmu-miR-125b-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACTCACAA	–
RT-mmu-miR-125b-5p Fw	CCGCCTCCCTGAGACCTAAC	65
RT-mmu-miR-221-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACGAAACC	–
RT-mmu-miR-221-3p Fw	GGCGGAGCTACATTGTCTGCTG	65
RT-mmu-miR-138-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCGGCCT	–
RT-mmu-miR-138-5p Fw	GGCGGAGCTGGTGTGGTGAATC	67
RT-mmu-miR-143-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACGAGCTA	–
RT-mmu-miR-143-3p Fw	GGGCGGTGAGATGAAGCACTG	67
RT-mmu-miR-146a-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACAACCCA	–
RT-mmu-miR-146a-5p Fw	CGGGCGGTGAGAACTGAATTCC	65
RT-mmu-miR-205-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCAGACT	–
RT-mmu-miR-205-5p Fw	CGCGTCCTCATTCCACCGG	65
RT-mmu-miR-191-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCAGCTG	–
RT-mmu-miR-191-5p Fw	GCGGCAACGGAATCCAAAAG	70
RT-hsa-miR-10b-5pFwSTEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCACAAA	–
RT-hsa-miR-10b-5pFw	CCCGCTACCCGTAGAACCGAA	70
RT-hsa-miR-125a-5p Fw STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACTCACAG	–
RT-hsa-miR-125a-5p Fw	CCCCCTCCCTGAGACCCTTAAC	65
RT-hsa-miR-150-5p Fw STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCACTGG	–
RT-hsa-miR-150-5p Fw	CCCCCTCTCCCAACCCTTGT	65
RT-hsa-miR-195-5pFwSTEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACGCCAAT	–
RT-hsa-miR-195-5pFw	GGGGGGTAGCAGCACAGAAAT	65
RT-hsa-miR-16-5pFwSTEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACGCCAA	–
RT-hsa-miR-16-5pFw	GGCCCGTAGCAGCACGTAAATA	65
RT-hsa-miR-93-5p Fw STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCTACCT	–

RT-hsa-miR-93-5p Fw	CGGCAAAGTGCTTCGTGC	65
RT-hsa-miR-106a-5p Fw STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCTACCT	-
RT-hsa-miR-106a-5p Fw	GGCGGAAAGTGCTTACAGTGC	65
RT-hsa-miR-17-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCTACCT	-
RT-hsa-miR-17-5p Fw	GGATGGCAAAGTGCTTACAGTGC	65

Nota: Los oligos para los miRNAs miR-125b-5p, miR-221-3p y miR-21-5p son los mismos que los utilizados para los miRNAs murinos

El cálculo de los niveles de expresión de los miRNAs analizados se realizó mediante el método del $\Delta\Delta CT$ como se mencionó anteriormente, normalizando los niveles de expresión del miRNA de interés al miR-191-5p o a la media geométrica del miR-191-5p y miR-103a-3p como se indicara en cada gráfico. En el caso en que se normalizó el valor de expresión relativa al grupo control, primero se promediaron los valores ER_x (ER_x) de las muestras del grupo control de la siguiente manera:

$$ER_{X \text{ grupo control}} = \sum \frac{ER_{Xc1} + \dots + ER_{Xcn}}{N}$$

Los valores de expresión relativa de cada muestra ER_x , fueron normalizados al nivel ER_x medio del grupo control de la siguiente manera:

$$ER_{X \text{ grupo experimental normalizado al control}} = \frac{\sum \frac{ER_{Xe1} + \dots + ER_{Xen}}{N}}{ER_{X \text{ grupo control}}}$$

En todos los casos se corrió el control negativo NRT (ARN que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa). Finalmente se calculó el valor promedio y desvío estándar de este valor obtenido en “n” réplicas biológicas.

Stem-loop RT-qPCR para miRNAs circulantes

La retrotranscripción se realizó utilizando el método *Stem-Loop* descripto en Chen et al (C. Chen et al. 2005). El cDNA se sintetizó a partir de 4 μ l de ARN total utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA). Se mezclaron el ARN, agua libre de RNAsas y una mix de hasta 6 oligos *stem-loop* específicos para cada miRNA (se utiliza 1 μ l de cada primer STEM específico), los cuales se utilizan para alargar el producto original, y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Luego se agregó una mix de 4 μ l de Buffer 5X

específico para la enzima, 1 μ l de dNTPs 10 mM y 1 μ l de la enzima RT. Se incubó luego durante 30 minutos a 16°C, paso clave para la técnica de *stem-loop*, luego 60 minutos a 42°C para la síntesis y 5 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Para realizar la qPCR, se utilizaron 1 μ l de cDNA puro, 3.5 μ l de agua ROUX, 0.5 μ l de una mix de oligos Fw específico del miRNA que se quiere detectar y Rv universal que se aparea con el *stem-loop* y 5 μ l de la mix FastStart Universal SYBR Green Master (ROCHE). La reacción de PCR se llevó a cabo por duplicado en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) o en un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El ciclado de amplificación se detalla a continuación:

50°C 2 min
 95°C 10 min
 95°C 15 s
 T annealing 15 s
 60°C 1 min
 Lectura fluorescencia

} 40 ciclos

Curva de “melting” de 60 a 95°C + 0.3 °C cada 6 s

La temperatura de *annealing* utilizada para todos los miRNAs fue de 65°C.

Los oligos utilizados fueron comprados a la empresa Macrogen, y se listan en la Tabla 3.

Tabla 3: Lista de oligos utilizados para la técnica de Stem-loop RT-qPCR a partir de plasma

Oligo	Secuencia (5'-3')	T ann (°C)
RT-Stem-loop-Rv	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	-
RT-hsa-miR-21-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACTCAACA	-
RT-hsa-miR-21-5p Fw	CGGGGGGTAGCTTATCAGACTG	65
RT-hsa-miR-106a-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCTACCT	-
RT-hsa-miR-106a-5p Fw	GGCGGAAAGTGCTTACAGTGC	65
RT-hsa-miR-125a-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACTCACAG	-
RT-hsa-miR-125a-5p Fw	CCCCCTCCCTGAGACCCCTAAC	65
RT-hsa-miR-17-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCTACCT	-

RT-hsa-miR-17-5p Fw	GGATGGCAAAGTGCCTACAGTGC	65
RT-hsa-miR-106b-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACGCAGCA	-
RT-hsa-miR-106b-3p Fw	GGGCCGCACTGTGGGTAC	65
RT-hsa-miR-150-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCACTGG	-
RT-hsa-miR-150-5p Fw	CCCCCTCTCCAACCCTTGT	65
RT-hsa-miR-16-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCGCAA	-
RT-hsa-miR-16-5p Fw	GGCCCGTAGCAGCACGTAAATA	65
RT-hsa-miR-335-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACACATT	-
RT-hsa-miR-335-5p Fw	CGGCGGTCAAGAGCAATAACG	65
RT-hsa-miR-339-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCGGCT	-
RT-hsa-miR-339-3p Fw	GGTGAGCGCCTCGACGAC	65
RT-hsa-miR-339-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCGTGAG	-
RT-hsa-miR-339-5p Fw	CCCTCCCTGTCCCTCAGGAG	65
RT-hsa-miR-574-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACTGTGG	-
RT-hsa-miR-574-3p Fw	CGCCACGCTCATGCACAC	65
RT-cel-miR-39-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACCAAGAGGAGACCAAGCT	-
RT-cel-miR-39-3p Fw	CGGGGTACCGGGTGAAATC	65

El cálculo de los niveles de expresión de los miRNAs analizados se realizó mediante el método del $\Delta\Delta CT$ como se mencionó anteriormente, normalizando los niveles de expresión del miRNA de interés al cel-miR-39-3p. En todos los casos se corrió el control negativo NRT (pool de ARN de todas las muestras de pacientes y voluntarios o de ratones) que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa. Finalmente se calculó el valor promedio y desvío estándar de este valor obtenido en “n” réplicas biológicas.

Análisis estadístico y representación gráfica de los resultados

Los diferentes experimentos fueron analizados como se indica en cada caso utilizando los programas GraphPad 8.0.1 y RStudio 1.4.1106. La significancia estadística fue del 5%

en todos los casos. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R versión 4.0.5. utilizando las librerías que se indican en el capítulo próximo. En los gráficos se representa el promedio de los experimentos realizados con su desvío estándar normalizado al control o la distribución de las muestras utilizando boxplots graficando la mediana y los rangos intercuartílicos, en función de lo que facilitara la comprensión en cada caso. Para evaluar normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizaron Shapiro-Wilks y el test de Levene o test F respectivamente. Cuando los supuestos se cumplieron, se utilizó Prueba T-Student, y cuando no se cumplieron Mann-Whitney, Wilcoxon o el test de la mediana fue utilizado.

Capítulo 3:

**Muestras de pacientes, microarreglos de
expresión de miRNAs y secuenciación y
análisis bioinformáticos**

Diseño del estudio y enrolamiento de individuos

Se enrolaron pacientes con CaM y voluntarias sanas (VS) durante enero del 2017 y julio del 2021. Los Comités de docencia e investigación y/o de Ética de las instituciones revisaron y aprobaron la recolección de muestras de sangre y la recopilación de datos clínicos y patológicos de las pacientes y VS. El estudio se condujo de acuerdo a los principios éticos para investigación médica delineados en la Declaración de Helsinki, y se obtuvieron consentimientos informados (CI) firmados de todas las pacientes y VS.

Se establecieron y aprobaron los protocolos clínicos con Hospital Militar Central Dr. Cosme Argerich (CABA) (FECHA DE APROBACION: 7/6/2017), Instituto Quirúrgico del Callao (CABA) (FECHA DE APROBACION 5/6/2019), Hospital Municipal de Vicente López "Prof. Dr. Bernardo Houssay" (GBA) (FECHA DE APROBACION 27/7/2017), Hospital de Oncología Marie Curie (CABA) (FECHA DE APROBACION 12/1/2017) y Hospital Interzonal General de Agudos "Profesor Dr. Luis Güemes" (GBA) (FECHA DE APROBACION 10/6/2018) para enrolar pacientes con diagnóstico de CaM. Los criterios preestablecidos de inclusión de pacientes para el estudio fueron: mujeres mayores de 18 años con diagnóstico de adenocarcinoma de mama de cualquier subtipo y estadio, documentado con o sin informe de anatomía patológica, que no hayan sido sometidos a cirugía y/o terapia (quimioterapia, inmunoterapia o radiación), y sin antecedentes de enfermedad oncológica previa.

Por otro lado, se establecieron protocolos para VS en el Hospital Militar Central Dr. Cosme Argerich (CABA) (FECHA DE APROBACION: 7/6/2017) y en el Hospital Municipal de Vicente López "Prof. Dr. Bernardo Houssay" (GBA) (FECHA DE APROBACION 4/6/2021). Los criterios de inclusión fueron mujeres mayores de 18 años que no poseen diagnóstico previo o actual de cáncer.

Luego de la firma del CI el/la médico/a interviniente completó un anexo con datos filiatorios y clínicos de las pacientes y VS y extrajo una muestra de sangre. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa (un mínimo de 8 ml y hasta un máximo de 15 ml), la cual se colocó en tubos estériles libres de RNAsas que contenían 1 mL de EDTA 0.5 M pH 8. Las muestras fueron transportadas con triple envoltorio al IBYME. Una vez que las muestras arribaron al laboratorio, se procedió a la codificación de las mismas. La codificación de las muestras se llevó a cabo por el responsable a cargo de la

investigación, que cambió en forma totalmente confidencial el nombre, apellido y DNI del paciente por un código alfa-numérico único. Luego, se aisló el plasma mediante centrifugación de la sangre a 2000 rpm durante 10 minutos, se alicuotaron las muestras y almacenaron a -70 °C bajo llave.

Se separaron a las pacientes y VS en distintas cohortes: una cohorte exploratoria, donde se incluyeron 30 CaM y 36 VS, y una cohorte validatoria, donde se incluyeron 100 CaM y 73 VS. Las principales características de las pacientes se detallan en la Tabla suplementaria 1 y se resumieron en la Tabla 4:

Tabla 4: Características de las cohortes utilizadas en la búsqueda y validación de miRNAs candidatos:

Cohorte	<i>Exploratoria</i>	<i>Validatoria</i>
N Pacientes CaM	30	100
Edad (DE)	53 (12)	58 (13)
Estadio		
0	1	11
I	4	42
II	11	19
III	13	4
IV	1	1
Sin datos	-	23
Subtipo molecular		
Luminal A	5	58
Luminal B	8	5
Her2	7	5
Triple Negativo	4	3
Sin datos	5	18
Tipo Histológico		
In Situ	2	11
Infiltrante	26	78
Sin datos	2	11
Ductal	10	29
Otros	18	60
Sin datos	2	11
Grado		
G1	1	27
G2	10	45
G3	13	2
Sin datos	6	26
N Voluntarios Sanos	36	73
Edad (DE)	49 (11)	38 (12)

Microarreglos de expresión de miRNAs (Affymetrix)

A partir de ARN circulante obtenido del plasma de pacientes con CaM o VS (n= 30 y 36 respectivamente) se llevaron a cabo microarreglos de expresión de miRNAs. Para ello, se agruparon a las pacientes con CaM en función de su estadio: Estadios 0-IA (n=5), estadio IIA (n=6), estadio IIB (n=5), estadio IIIA (n=8), estadio IIIB, IIIC y IV (n=6). Luego se realizó la extracción de miRNAs a partir de 800 μ l de plasma de pacientes o VS en extracciones de 1600 μ l por columna utilizando el kit NucleoSpin® miRNA Plasma (Macherey- Nagel) siguiendo el protocolo correspondiente. En el caso de los estadios 0-IA, IIA, IIB y IIIB, IIIC y IV se utilizaron 3 columnas por grupo; en el caso del estadio IIIA se utilizaron 4 columnas, y por último en el caso de los VS, se los separó en 4 grupos, y se utilizaron 20 columnas en total. Se realizaron dos eluciones con 20 μ l de H₂O de grado biología molecular por columna utilizada, y se juntaron todas las eluciones pertenecientes al grupo correspondiente. Luego, se concentraron utilizando el liofilizador Jouan RCT 60 (Thermofisher). Las muestras se resuspendieron en 11 μ l H₂O RNAsa-free. La concentración y la pureza de los miRNAs se evaluaron utilizando NanoDrop 2000, teniendo en cuenta que el 10 % de la concentración calculada por el NanoDrop corresponde a la cantidad de miRNAs como se indica en (Garcia-Elias et al. 2017).

Por microarreglo, se utilizó una masa de 140 ng de ARN circulante para hibridar 9 microarreglos de expresión de miRNAs GeneChip® miRNA 4.0 Array (Affymetrix). Se utilizaron 5 para CaM y 4 para VS. La hibridación se llevó a cabo en el servicio técnico a terceros del IFEVA (Facultad de Agronomía, UBA). La normalización de los datos y su análisis fue realizada utilizando los programas Expression Console™ Software 1.3.1 y Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC). Los miRNAs diferencialmente expresados fueron identificados mediante distintos análisis que se detallan en la sección de Resultados (Capítulo 3, Figura 35), seleccionando aquellos que tenían un p-valor \leq 0,05 y 1,5 veces de cambio (VC) más en CaM o Estadios tempranos (ET): 0-IIIB vs VS o Estadios avanzados (EA): IIIA-IV según correspondiera.

Secuenciación de miRNAs

Para la secuenciación de miRNAs, 1 mL de plasma de 6 pacientes con CaM y 4 VS fue enviado a GenoHub (REAL SEQ BIOSCIENCES INC, USA). Allí los miRNAs fueron aislados, secuenciados y analizados comparando entre CaM y VS utilizando los siguientes sistemas y sus versiones: Ubuntu 18.04.2 LTS x86_64-pc-linux-gnu (64-bit), R versión 3.6.0 -- "Planting of a Tree", FastQC v0.11.5, cutadapt versión 2.3, bowtie versión 1.2.2, DESeq2_1.22.2, Rsubread_1.32.4, BiocParallel_1.16.6, Ggplot2_3.1.0. El listado de miRNAs correspondientes a la secuenciación fue luego comparado con los miRNAs candidatos obtenidos de los microarreglos de expresión, tal como se describe en la sección de Resultados (Capítulo 3, Figura 35).

Análisis bioinformático

Bases de datos públicas

✓ XENA

Los datos clínico-patológicos, de expresión génica y de expresión de miRNAs maduros a partir de tejido de CaM (n=1097) y tejido normal adyacente (TNA) (n=114) de pacientes y de glándulas mamarias normales (GMN) (n=80) se obtuvieron de la cohorte de pacientes incluidas en el proyecto TCGA Breast Cancer (BRCA) o en el proyecto GTEx, disponibles en la herramienta bioinformática UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/>) (Goldman et al. 2020) . Los valores de expresión de miRNAs y de ARN, medido mediante miRNA-seq o RNA-seq, se informaron como \log_2 (LPM+1) siendo LPM la abreviatura de lecturas por millón. En este trabajo, al evaluar la expresión entre TNA y CaM se utilizaron 75 muestras de cada tejido las cuales se encuentran pareadas. Al momento de evaluar solamente la expresión de miRNAs en CaM para separar por subtipos, se utilizaron 490 muestras y al separar por estadios, se utilizaron 445 muestras. Por último, al momento de analizar la expresión de genes en CaM separando por subtipos, se utilizaron 821 muestras.

El criterio para separar a los pacientes en subtipos fue de acuerdo PAM50, que separa a los tumores en 4 grandes grupos: Luminales A, Luminales B, Her2 y Basales. A la hora de separar a los pacientes según sus estadios, se utilizó el dato obtenido del AJCC en la base de datos de XENA, y se agrupó aquellos estadios entre I y II como ET y aquellos comprendidos entre III y IV como EA.

Al momento del análisis estadístico, la normalidad se evaluó utilizando Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas se evaluó utilizando el test de Levene, el test F o analizando los boxplots según correspondiera en cada caso. Para analizar los datos pareados, se utilizó la prueba-T pareada cuando los datos así lo permitieron. Cuando no se cumplieron los supuestos, se utilizó el test de Wilcoxon.

A la hora de evaluar 3 o más grupos, se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguida de Tukey cuando los datos así lo permitieron. Cuando los supuestos no se cumplieron, se analizaron los datos utilizando Kruskal-Wallis seguido del Test de Dunn. En todos los casos, se utilizó un nivel de significancia del 5%. Los análisis fueron llevados a cabo con el software R y graficados utilizando GraphPad Prism 8.0.1.

✓ **Gene Expression Omnibus (GEO)**

Para la comparación de los modelos predictivos entre distintos tipos de cáncer, se utilizaron los datos de expresión a partir de sueros de diversas cohortes de pacientes, que fueron hibridizados en microarreglos de expresión. Todas las bases de datos fueron descargadas del repositorio público Gene Expression Omnibus (GEO) (“Home - GEO - NCBI” n.d.). Toda la información de los microarreglos fue generada a partir de 3D-Gene Human miRNA Oligo Chip (Toray Industries, INC.). Se utilizaron 1272 pacientes con CaM y 1272 VS (GSE73002) (Shimomura et al. 2016), 100 pacientes con cáncer de vejiga y 100 VS (GSE113486) (Usuba et al. 2019), 1417 pacientes con cáncer gástrico y 1417 VS (GSE164174) (Abe et al. 2021), 345 pacientes con carcinoma hepatocelular y 345 VS (GSE113740) (Yamamoto et al. 2020), 1566 pacientes con cáncer de pulmón y 1566 VS (GSE137140) (Asakura et al. 2020), 320 pacientes con cáncer de ovario y 320 VS (GSE106817) (Yokoi et al. 2018), 282 pacientes con cáncer de próstata y 282 VS (GSE112264) (Urabe et al. 2019) y por último 273 pacientes con sarcoma y 273 VS (GSE124158) (Asano et al. 2019).

En el caso de la cohorte de CaM, para evaluar normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizaron Shapiro-Wilks y el test de Levene o el test F respectivamente. Cuando los supuestos se cumplieron, se utilizó Prueba T-Student, y cuando no se cumplieron Mann-Whitney, Wilcoxon o el test de la mediana fue utilizado. Los modelos logísticos correspondientes a cada cohorte de pacientes se realizaron utilizando distintas

combinaciones de miRNAs a partir de la expresión de los datos obtenidos de GEO. Se calcularon todas las métricas asociadas a los respectivos modelos y se compararon entre sí utilizando las herramientas notadas en la sección que habla de los modelos realizados que se encuentra más adelante.

Herramienta bioinformática TNMplot

Para analizar la expresión génica entre glándulas mamarias normales, CaM y tejido de CaM metastásico, se utilizó la herramienta bioinformática TNMplot (<https://TNMplot.com>.) (Bartha and Győrffy 2021). Esta herramienta realiza los gráficos y el análisis estadístico entre los grupos utilizando Kruskal-Wallis seguido del Test de Dunn. En este caso, se utilizaron datos de expresión génica de 242 mamas normales, 7569 CaM y 82 tejidos de CaM metastásicos. En todos los casos, se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Análisis de componentes principales (PCA)

Para realizar el análisis de componentes principales, se utilizaron los datos de expresión génica descargados de TCGA BRCA y de GTEx mencionados anteriormente. El análisis de componentes principales (PCA) fue realizado para determinar la distribución de las muestras de CaM, GMN y TNA basadas en la expresión de 51 genes blanco experimentalmente validados que comparten en común hsa-miR-21-5p y hsa-miR-106b-5p pero que no comparten con hsa-miR-205-5p y hsa-miR-143-3p. Para realizar dicho análisis, se utilizó el software R, en particular se utilizó la función “prcomp” incluida dentro del paquete stats (versión 4.0.2). Se determinó la variabilidad comprendida entre las distintas dimensiones, y se eligió graficar las primeras dos componentes, dado que entre ellas sumaban aproximadamente el 43% de la variabilidad total explicada por dicho análisis. A su vez, se graficó el bi-plot, gráfico que se utiliza para ver el aporte de cada una de las variables a las componentes. En particular en este caso, cada variable es un gen de los 51 utilizados.

Análisis de enriquecimiento de grupo de genes de muestra única (ssGSEA)

Para analizar la regulación coordinada de un set de genes definido en muestras de CaM, se realizó un análisis de enriquecimiento de grupo de genes de muestra única (ssGSEA). Para ello, los datos de expresión génica de los 51 genes mencionados anteriormente, de definidos como $\log_2(LPM+1)$ de 474 muestras de CaM y de 76 muestras de TNA fueron

obtenidos a partir de la cohorte de TCGA BRCA utilizando la herramienta XENA y se cargaron en la web utilizando la herramienta bioinformática GenePattern (<https://www.genepattern.org.>). Como resultado, para cada una de las muestras se obtuvo un perfil de enriquecimiento del set de 51 genes utilizado. Luego, se analizó el coeficiente de correlación de Spearman entre este perfil de enriquecimiento para cada una de las muestras y la expresión de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p, tanto para los TNA como para CaM, utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1. En todos los casos, se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Análisis de enriquecimiento funcional

Para identificar los genes blanco experimentalmente validados modulados por los miRNAs hsa-miR-21-5p, miR-106b-5p, miR-205-5p y miR-143-3p, se utilizó la herramienta bioinformática DIANA TARBASE v8, estableciendo un valor umbral >0,5 (Karagkouni et al. 2018). Luego, se realizó el análisis de enriquecimiento funcional a partir de los genes blanco identificados mediante DIANA utilizando la herramienta Enrichr y el plug de ClueGo Cytoscape. Por otro lado, para establecer los términos y las vías de señalización, se utilizaron aquellos pertenecientes a KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) y a BioPlanet. (<http://tripod.nih.gov/bioplanet/>). Finalmente, con los resultados obtenidos se construyó una red entre la interacción miRNA-gen blanco-vía de señalización utilizando un diagrama Sankey.

Matrices de correlación

Para identificar la correlación entre los genes blanco y el miRNA hsa-miR-106b-5p en CaM, datos de expresión génica y del miRNA se obtuvieron a partir de tumores de pacientes con CaM pertenecientes a la cohorte TCGA BRCA utilizando la herramienta XENA como fue explicado anteriormente. Se realizó una matriz de correlación entre los genes y el miRNA utilizando el software R, en particular el paquete Hmisc, y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman y su significancia estadística. Finalmente, las muestras se dividieron por subtipos, utilizando el PAM50 como clasificación y se graficó la correlación entre la expresión del miRNA y los genes diferenciando cada muestra según su subtipo.

Curvas de Kaplan-Meier

Las curvas de sobrevida general (OS) para los miRNAs hsa-miR-21-5p y hsa-miR-106b-5p se realizaron utilizando los datos de expresión de los mismos de la cohorte METABRIC obtenida a partir de la herramienta bioinformática miRpower (<https://kmplot.com>) (Lánczky et al. 2016). Las curvas de OS y de sobrevida libre de recaída (RFS) para los genes seleccionados se realizaron utilizando los datos de expresión de los mismos de la cohorte METABRIC obtenida a partir de la herramienta bioinformática Kaplan–Meier plotter (<https://kmplot.com>) (Győrffy 2021). Se estableció como punto de corte entre alta y baja expresión de los miRNAs o los genes el valor de la mediana.

En todos los casos se evaluó el supuesto de proporcionalidad del hazard (es decir, que el comportamiento de la variable a analizar sea independiente del tiempo) y se calculó la significancia estadística utilizando el test de Cox–Mantel, conocido también como el test de log-rank. Tanto el análisis estadístico como los gráficos fueron realizados utilizando las librerías survminer y survival del software R. En todos los casos se utilizó una significancia estadística del 5%.

Desarrollo de modelos estadísticos

Selección del modelo

✓ Variable dependiente del modelo

Como variable dependiente se utilizó la presencia o ausencia de CaM, determinada por los médicos responsables en cada hospital a partir de al menos una de estas técnicas: mamografía, mamografía magnificada, resonancia magnética nuclear, ecografía mamaria y por último biopsia que confirmaran el diagnóstico de poseer CaM.

✓ Variables predictoras

Se utilizaron 11 variables predictoras, que fueron la expresión de 11 miRNAs analizados mediante *Stem-loop RTqPCR* en plasma de mujeres con o sin CaM a listar: hsa-miR-16-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-106a-5p, miR-106b-3p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-335-5p, miR-339-3p, miR-339-5p, miR-574-3p.

Ánálisis de datos y estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos. Se evaluó la distribución de los datos, y se eligió transformar las variables predictoras utilizando el logaritmo en base 10, dado que presentaban distribuciones muy asimétricas.

Al momento de armar el modelo predictivo, se tuvo en cuenta diversos aspectos, a saber: la colinealidad de las variables, la presencia de datos atípicos, los supuestos asociados al modelo elegido y la selección de variables. En particular, dado que uno de los objetivos del presente trabajo fue elegir el modelo que mejor prediga y no el que mejor explique el comportamiento de los datos, si bien se evaluaron todos los parámetros, se eligió el modelo que mejor sensibilidad tuviera, sin tener en cuenta la colinealidad de las variables.

En cuanto a la selección de variables para ser incluidas en el modelo, se utilizaron 2 abordajes: i) se seleccionaron mediante regresión de Lasso, técnica que permite ir eliminando variables que no fueran relevantes para el modelo, o ii) se seleccionaron mediante *Random Forest*, una técnica de *machine learning* que combina la clasificación de las variables, y la importancia de estas en el modelo, dando como resultado un *ranking* de las variables de mayor a menor importancia, y los nodos asociados, que pueden ser de guía para dividir aquellas más importantes de las menos importantes.

Se eligió la técnica de regresión logística como modelo predictivo, y se utilizó *leave-one-out cross-validation* (LOOCV) para poder comparar los modelos en función de las métricas de interés, principalmente teniendo en cuenta el modelo que tuviera mejor sensibilidad, pero también se calcularon: especificidad, área bajo la curva de la ROC, *Accuracy*, Precisión o Valor Predictivo Positivo, Valor Predictivo Negativo y Tasa de Falsos Positivos.

La significancia estadística fue del 5%. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R versión 4.0.5. Los paquetes utilizados se mencionan a continuación: *ggplot2*, *Rmisc*, *psych*, *car*, "nlme", *emmeans*, *multcompView*, *readxl*, *pROC*, *ROCit*, *tidyverse*, *glmnet*, *caret*, *tableone*, *dplyr*, *ggpubr*, *kableExtra*, *ResourceSelection*, *InformationValue*, *gridExtra*, *foreach*, *boot*, *randomForest*, *epiDisplay*, *jtools*, *ggstance*, *sjPlot*, *sjlabelled*, *sjmisc*, *rstatix*, *broom*, *mgcv*.

RESULTADOS

**Capítulo 1: El rol de hsa-miR-106b-5p y
hsa-miR-21-5p y su interacción con genes
blanco en el CaM**

El primer objetivo específico del presente trabajo de tesis doctoral se basó en investigar el rol de miRNAs y genes con relevancia clínica en modelos animales con CaM, lo cual se desarrollará en los primeros dos apartados de resultados. En este primer capítulo, se utilizó un modelo de ratones Balb/c que fueron inoculados o no con células de CaM murinas. Así, se seleccionó una firma de miRNAs desregulados en tejido tumoral comparado al normal en el modelo animal, y se hizo la analogía con tejidos tumorales y normales adyacentes (TNA) al tumor de pacientes con CaM obtenidos de repositorios públicos. Se encontraron dos miRNAs que estaban aumentados y dos disminuidos tanto en tumores murinos como humanos con respecto a los tejidos no tumorales. Luego, utilizando herramientas bioinformáticas, se estableció un conjunto de genes blanco correspondientes a los miRNAs que se encontraban aumentados, y se analizó la correlación entre la expresión de los miRNAs y los genes identificados utilizando bases de datos públicas. A su vez, se analizaron las vías en las que se encontraban involucrados tanto los miRNAs como los genes blanco, y se comparó la expresión de los genes identificados en tumores y TNA. Finalmente se analizó la expresión de los miRNAs y los genes blanco en los tumores separando por subtipos y por estadios, y su correlación con la sobrevida general y la sobrevida libre de recaída.

Modelo murino utilizado

Se desarrolló un modelo murino de CaM triple negativo utilizando ratones hembra Balb/c. Los mismos fueron separados al azar en dos grupos, uno control y otro que fue inoculado con células de CaM murinas 4T1, tal como se observa en la Figura 8. Luego de 4 semanas, los ratones fueron sacrificados y se colectaron tumores del grupo inoculado y glándulas mamarias (GM) del grupo no inoculado para su posterior análisis.

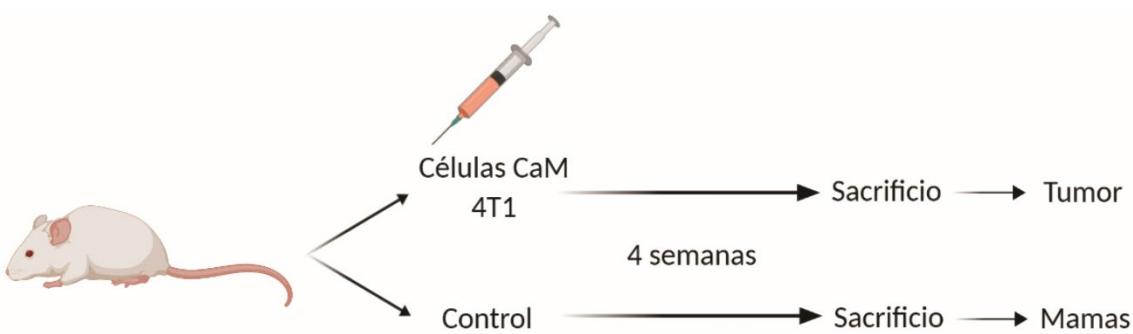


Figura 8: Esquema del modelo murino desarrollado. Ratones hembra Balb/c fueron inoculados en la almohadilla mamaria o no con 1×10^4 células de CaM triple negativo murinas 4T1. Luego de

cuatro semanas, los ratones fueron sacrificados y se colectaron tumores y glándulas mamarias para su posterior análisis.

El CaM modula la expresión de diversos miRNAs en alotrasplantes de células 4T1 murinas y en tumores humanos

Se buscó en bibliografía miRNAs relacionados al desarrollo y progresión del CaM (Alarmo et al. 2016; Y. C. Kim and Cutler 2020; Nurzadeh, Naemi, and Sheikh Hasani 2021; Hong et al. 2020), para luego determinar la expresión de los mismos en los ratones del modelo explicado anteriormente. De esta manera se estableció una lista de 8 miRNAs indicados en la Figura 9. Se aislaron miRNAs de las GM y de los tumores generados, y se analizó su expresión mediante *stem-loop* RT-qPCR (Figura 9). Se observó que los miRNAs mmu-miR-21a-5p, miR-106b-5p, miR-125b-5p y miR-221-3p se encontraban aumentados mientras que los miRNAs mmu-miR-138-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p y miR-205-5p se encontraban disminuidos de manera significativa en tumores respecto a GM.

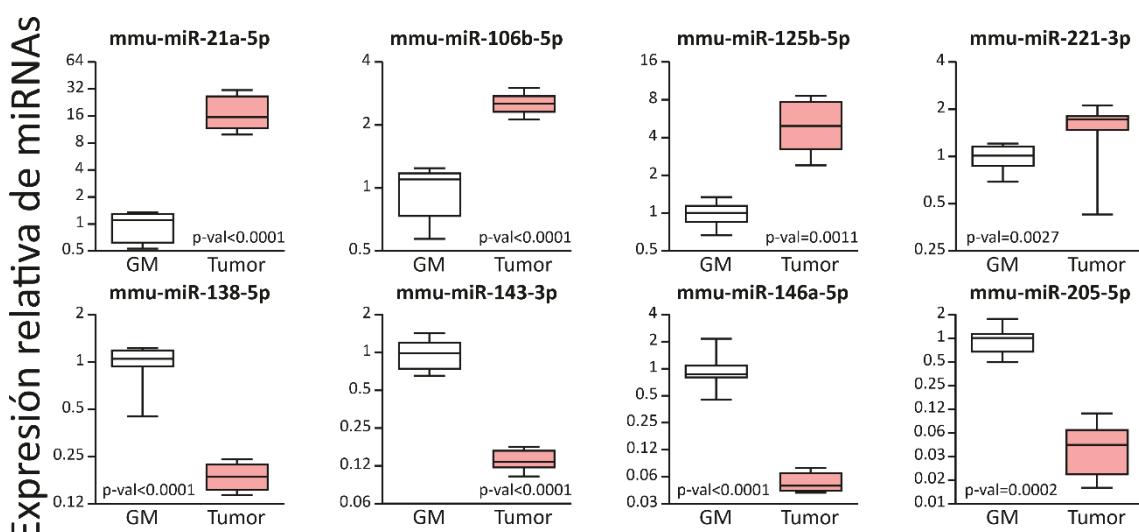


Figura 9: La expresión de miRNAs se encuentra modulada en CaM respecto a mamas normales en ratones Balb/c. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados mediante *stem-loop* RT-qPCR en los tumores 4T1 generados en los ratones (Tumor) y en las glándulas mamarias (GM) de los ratones no inoculados utilizando oligos específicos para los miRNAs indicados (n = 8 por grupo; las corridas fueron realizadas por duplicado). Los datos fueron normalizados a la expresión del miRNA mmu-miR-191-5p y a GM. Para el análisis estadístico, se utilizaron prueba-T, test de Welch o test de la mediana según correspondiera.

Luego, para analizar el perfil de expresión de estos miRNAs en tumores y TNA de pacientes con CaM, se obtuvieron los datos de secuenciación de ARN de la cohorte de

TCGA-BRCA utilizando la herramienta bioinformática UCSC Xena (Goldman et al. 2020). La expresión de los miRNAs maduros se analizó pareando la información relativa al tumor y TNA de la misma paciente (Figura 10). Se encontró que la expresión de los miRNAs hsa-miR-125b-5p, miR-221-3p, miR-143-3p y miR-205-5p se encontraba disminuida, mientras que la expresión de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p se encontraba aumentada en CaM respecto a TNA. No hubo diferencias significativas en cuanto a los miRNAs hsa-miR-138-5p y miR-146a-5p.

Dado que la secuencia de los miRNAs suele ser compartida entre especies, en este caso entre humanos y ratones, y siendo que la expresión de los miRNAs miR-21-5p, miR-106b-5p, miR-143-3p y miR-205-5p se encontraba aumentada o disminuida respectivamente tanto en tumores murinos como humanos comparados con glándulas mamarias o TNA, se continuó el análisis haciendo foco en estos cuatro miRNAs.

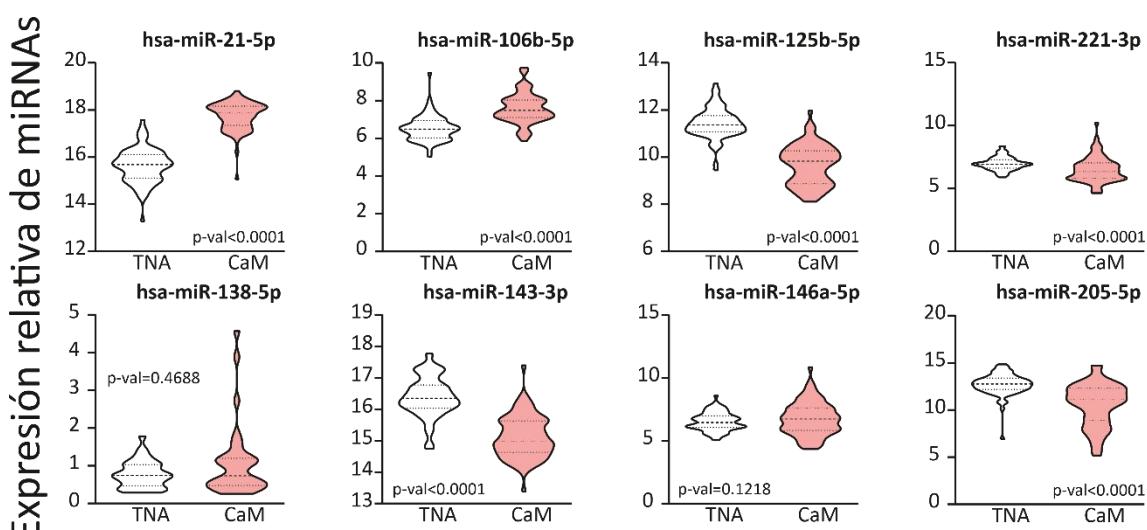


Figura 10: La expresión de miRNAs se encuentra modulada en CaM respecto a TNA en pacientes. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados a partir de los datos obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaM) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-BRCA graficada en lecturas por millón (n= 75). Los nombres de cada uno de los miRNAs analizados se encuentran en la parte superior de los gráficos en negrita. Para el análisis estadístico, se utilizaron prueba-T pareada o Test de Wilcoxon según correspondiera.

Los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p comparten diversos genes blanco en común

Se obtuvo una lista de genes experimentalmente validados para los miRNAs hsa-miR-106b-5p, miR-21-5p, miR-143-3p y miR-205-5p utilizando la herramienta DIANA

TARBASE v8 en colaboración con el Dr. Ezequiel Lacunza (UNLP, Buenos Aires, Argentina). Luego, para analizar los genes blanco en común entre los miRNAs se utilizó un diagrama de Venn (Figura 4). La lista de los miRNAs numerados en cada nodo de la Figura 11, se encuentra informada en la Tabla Suplementaria 2 dentro del Anexo. En base a este análisis, se obtuvieron dos conjuntos de genes blanco. El primero incluyó aquellos genes modulados exclusivamente por los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p que se encontraban aumentados en tumores, excluyendo los genes modulados también por los miRNAs hsa-miR-143-3p y miR-205-5p. El segundo set de genes fue aquel modulado exclusivamente por los miRNAs hsa-miR-143-3p y miR-205-5p, excluyendo el gen modulado por el miRNA hsa-miR-106b-5p. De esta manera, el primer set quedó conformado por 51 genes, los cuales se listan en la Tabla 5, y el segundo set fue comprendido por un solo gen blanco en común (SENP2).

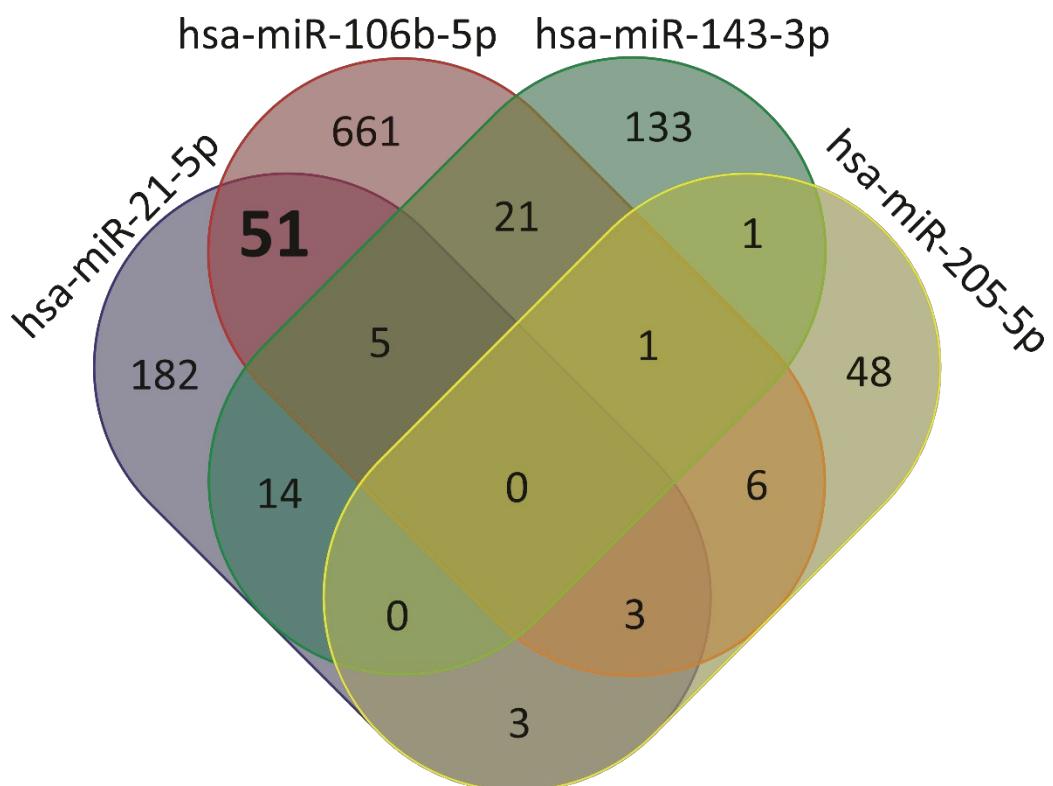


Figura 11: Diagrama de Venn realizado con los genes blanco experimentalmente validados. Utilizando los genes blanco experimentalmente validados obtenidos de la herramienta DIANA TARBASE de los miRNAs hsa-miR-106b-5p, miR-21-5p, miR-143-3p y miR-205-5p, se realizó un diagrama de Venn.

Tabla 5: Genes blanco experimentalmente validados en común entre hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p.

ABAT	CNOT6	HBP1	MEF2A	RPS6KA3	UBE2W
APPL1	DEGS1	HIAT1	MSI2	RSF1	WEE1
ARL1	EPHA4	IGF2BP1	NIPAL1	RYBP	YOD1
ARMC8	FAM160B1	KANSL1L	PAFAH1B1	SCD	YY1
ARRDC3	FAM46C	KPNA4	PANK3	SESN1	ZRANB1
BRWD1	FRS2	LAMC1	PHF6	SNX30	ZYG11B
CBFB	GAB1	LTV1	PLAG1	STAT3	
CCNI	GAPVD1	MAP3K2	PPP1R3B	TBCEL	
CHD9	GNG12	MARCH6	PRRX1	TOPORS	

Se enumeran los genes blanco compartidos exclusivamente entre hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p, pero no con los miRNAs hsa-miR-143-3p y miR-205-5p.

En base a los resultados enumerados, se puede concluir que se encontraron dos miRNAs (hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p) aumentados tanto en tumores murinos como humanos de CaM respecto a GM o TNA. A su vez, a partir de un análisis de sus genes experimentalmente validados mediante un diagrama de Venn, se encontró una firma de 51 genes que se encontraba modulada exclusivamente por estos dos miRNAs. Se continuó el análisis focalizando en estos genes.

La expresión de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p se correlaciona negativamente con la expresión de sus genes blanco

Para poder determinar la relevancia de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p en tejidos de CaM o TNA de pacientes, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando la expresión normalizada de los 51 genes experimentalmente validados identificados anteriormente en glándulas mamarias normales (GMN), tumores de mama o TNA, obtenida mediante la herramienta XENA. Al hacer el PCA, las primeras dos componentes explicaron el 33,4% y el 9,3% respectivamente de la variabilidad total y fueron las elegidas para realizar el gráfico (Figura 12). Se encontraron diferencias en la expresión general entre GMN y tumores de mama, que se vio reflejada en la disposición de estas muestras dentro de las dos dimensiones del gráfico. Por un lado, se puede observar que las GMN se dispusieron principalmente en el lado derecho del gráfico, mientras que el CaM se dispuso del lado izquierdo y principalmente en el extremo

inferior (Figura 12A). A su vez, en el biplot (Figura 12B) se puede observar que los 51 genes en conjunto contribuyeron a la dimensión 1 (eje X) de una manera similar, indicando que en conjunto todos los genes contribuyeron en la discriminación entre tejido tumoral y normal adyacente.

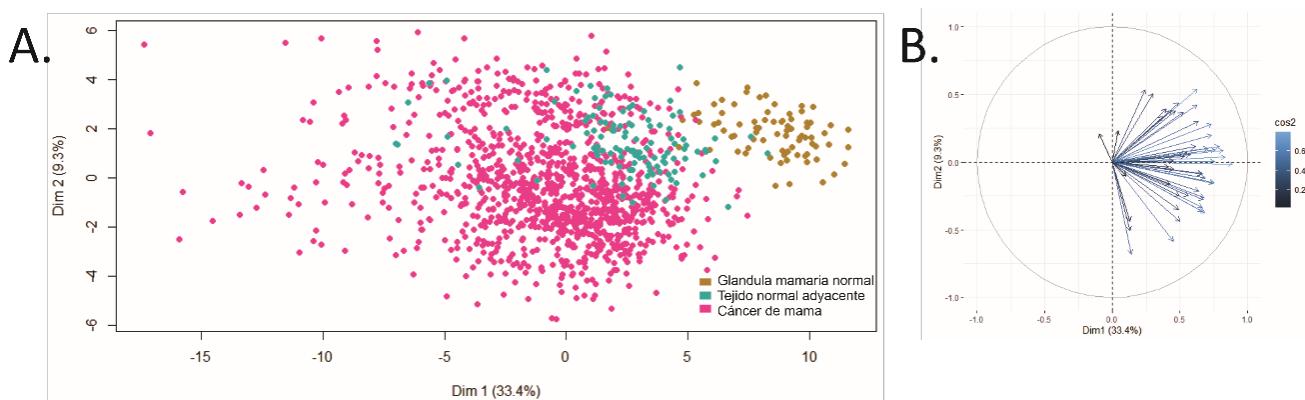


Figura 12: Gráficos del análisis de componentes principales realizado con la expresión de la firma de 51 genes blanco. (A) Utilizando los datos de expresión de los 51 genes blanco se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Se graficó mediante un scatterplot las dos primeras componentes (Dim 1 y Dim 2) del PCA. Los círculos dorado, azul y rosa representan muestras de glándulas mamarias normales, tejido normal adyacente y tejido tumoral de mama respectivamente. (B) Gráfico correspondiente al biplot del PCA representando los 51 genes en común y su relevancia en cada una de las dos componentes principales (Dim 1 y Dim 2). Cada flecha corresponde a un gen.

A su vez, se realizó un análisis de enriquecimiento en un set de genes de muestra única (ssGSEA) utilizando los datos de expresión obtenidos de la cohorte de TCGA BRCA. Con este se buscó explorar si la firma de los 51 genes blanco podría encontrar su expresión aumentada o disminuida de una manera coordinada entre los tumores de mama o el TNA. En la Figura 13 se puede observar que los 51 genes blanco mostraron un enriquecimiento de ssGSEA positivo tanto en tejido de CaM como en el normal adyacente, al ver los valores del eje X en el gráfico. Finalmente, se analizó la correlación entre el valor de enriquecimiento del ssGSEA y la expresión de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p tanto para el tejido tumoral como para el TNA (Figura 13). Se encontró una correlación negativa entre la expresión de los miRNAs y el enriquecimiento del ssGSEA en el caso del tejido tumoral, mientras que no hubo correlación en el caso del TNA.

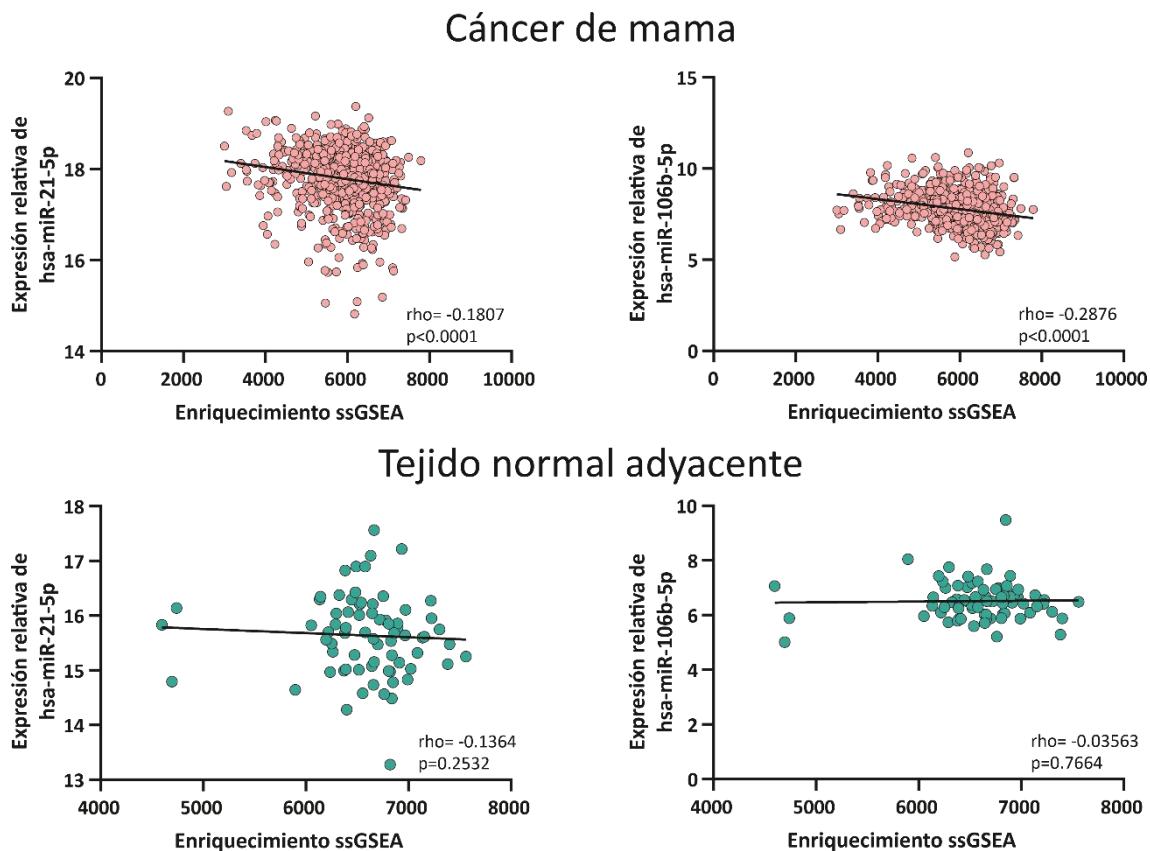


Figura 13: La expresión de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p se correlaciona negativamente con la expresión de los genes blanco en conjunto. Utilizando la expresión de la firma de 51 genes blanco de tumores o de tejido normal adyacente (TNA) obtenida de la cohorte de TCGA-BRCA, se llevó a cabo un enriquecimiento del set de genes de muestra única (ssGSEA). Se calculó la correlación de Spearman entre el enriquecimiento del ssGSEA y la expresión de los miRNAs maduros para tumores de mama (panel superior) y para TNA (panel inferior) y su p-valor asociado.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p tienen un rol relevante en la tumorigénesis ya que sus valores de expresión permiten distinguir tejido normal de tumoral. Asimismo, los genes blanco identificados de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p fueron validados utilizando herramientas bioinformáticas ya que su expresión correlaciona negativamente.

Los genes blanco de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p se encuentran involucrados en vías relacionadas con el cáncer y el metabolismo

Para poder identificar aquellas vías asociadas a todos los genes experimentalmente validados de los cuatro miRNAs identificados al inicio del presente capítulo (hsa-miR-21-5p, miR-106b-5p, miR-143-3p y miR-205-5p), se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG, estableciendo un p-valor <0,05. La lista de todas las vías involucradas y los genes relacionados, separados por los inherentes a los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p y a los miRNAs hsa-miR-143-3p y miR-205-5p se encuentran en el Anexo (Tablas suplementarias 3 y 4). Se seleccionó un subgrupo de genes que están involucrados en vías relevantes para el CaM y se representaron junto con las mismas utilizando un diagrama de cuerdas con la colaboración del Dr. Ezequiel Lacunza (UNLP, Buenos Aires, Argentina) (Figura 7). Particularmente, a partir de este análisis se pudieron identificar 12 genes blanco comunes a los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p, los cuales se encuentran marcados con un asterisco rojo en la Figura 14. Estos genes se encontraban asociados a procesos relacionados con el cáncer, incluyendo la vía de señalización de las MAPK, la vía de señalización de TGF-β, la vía río abajo de ERBB1, la vía de señalización de mTOR y de Wnt, así como también asociados a procesos metabólicos como ser la vía de señalización de la insulina.

Al analizar los genes blanco de los miRNAs hsa-miR-205-5p y miR-143-3p, se encontró que también estaban involucrados en vías relacionadas con el cáncer, incluyendo senescencia y autofagia, señalización de EGFR en cáncer, regulación de miRNAs en la respuesta por daño al ADN entre otras, pero no hubo genes compartidos entre estos dos miRNAs en particular.

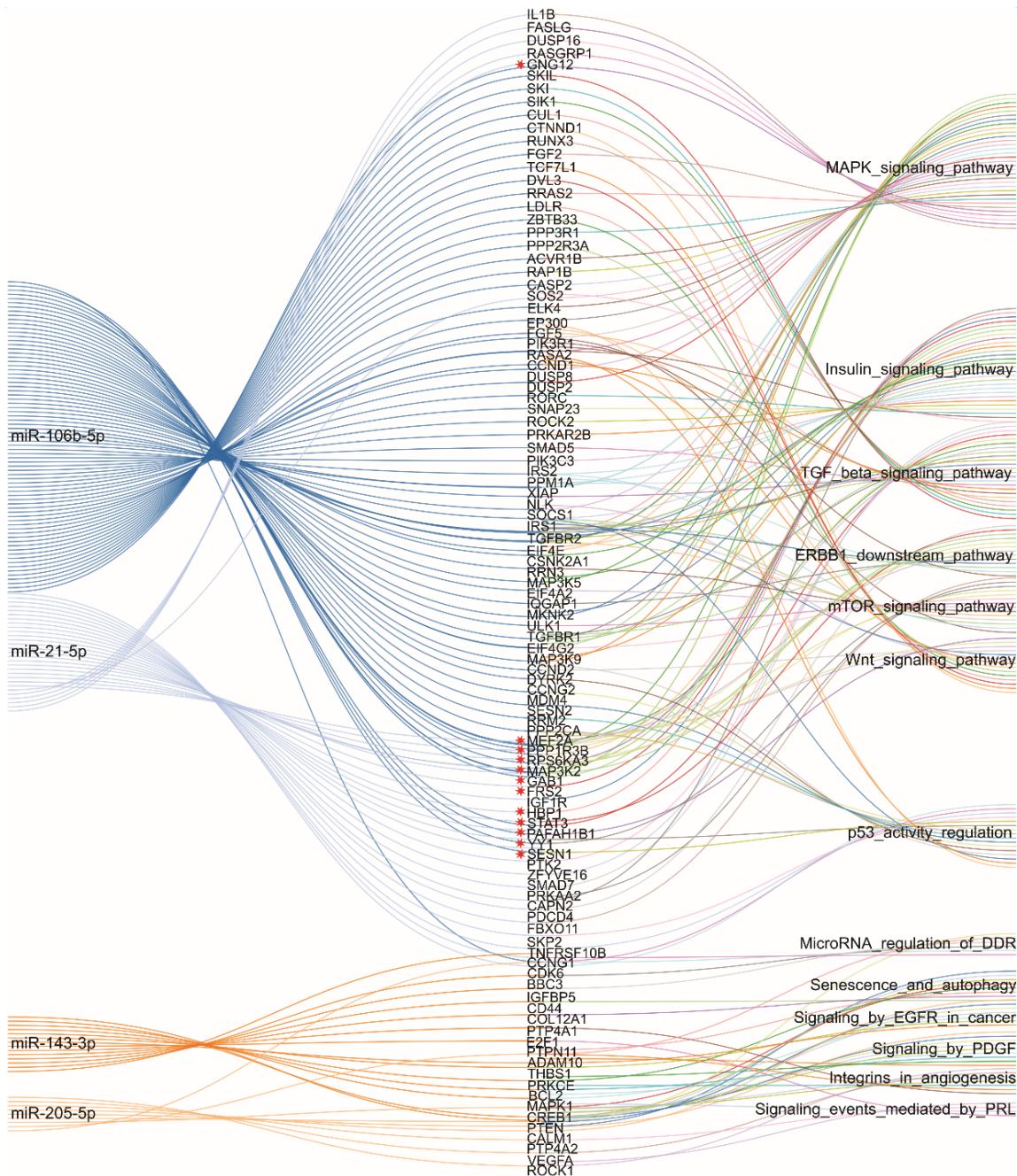


Figura 14: Vías relacionadas con los genes blanco de los miRNAs hsa-miR-106b-5p, miR-21-5p, miR-143-3p y miR-205-5p. Utilizando los datos de KEGG correspondientes a los genes experimentalmente validados de los miRNAs mencionados y basado en un ranking donde se incluyeron las vías más significativas, se realizó un diagrama de cuerdas. Los genes más relevantes relacionados con los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p se encuentran identificados con un asterisco rojo.

Finalmente, se analizó el rol en el CaM de los 12 genes identificados en la Figura 14: GAB1, GNG12, HBP1, MEF2A, PAFAH1B1, PPP1R3B, RPS6KA3, SESN1, MAP3K2, YY1, FRS2 and STAT3. Utilizando los datos de expresión de tejido tumoral y TNA obtenidos de

la herramienta XENA, se parearon las muestras de las mismas pacientes y se procedió a comparar la expresión entre ambos tejidos (Figura 15). Se encontró que los genes GAB1, GNG12, HBP1, MEF2A, PAFAH1B1, PPP1R3B, RPS6KA3 and SESN1 estaban disminuidos en CaM respecto a TNA, mientras que los genes MAP3K2 and YY1 se encontraban aumentados. Por último, no se encontraron diferencias significativas entre CaM y TNA para los genes FRS2 y STAT3.

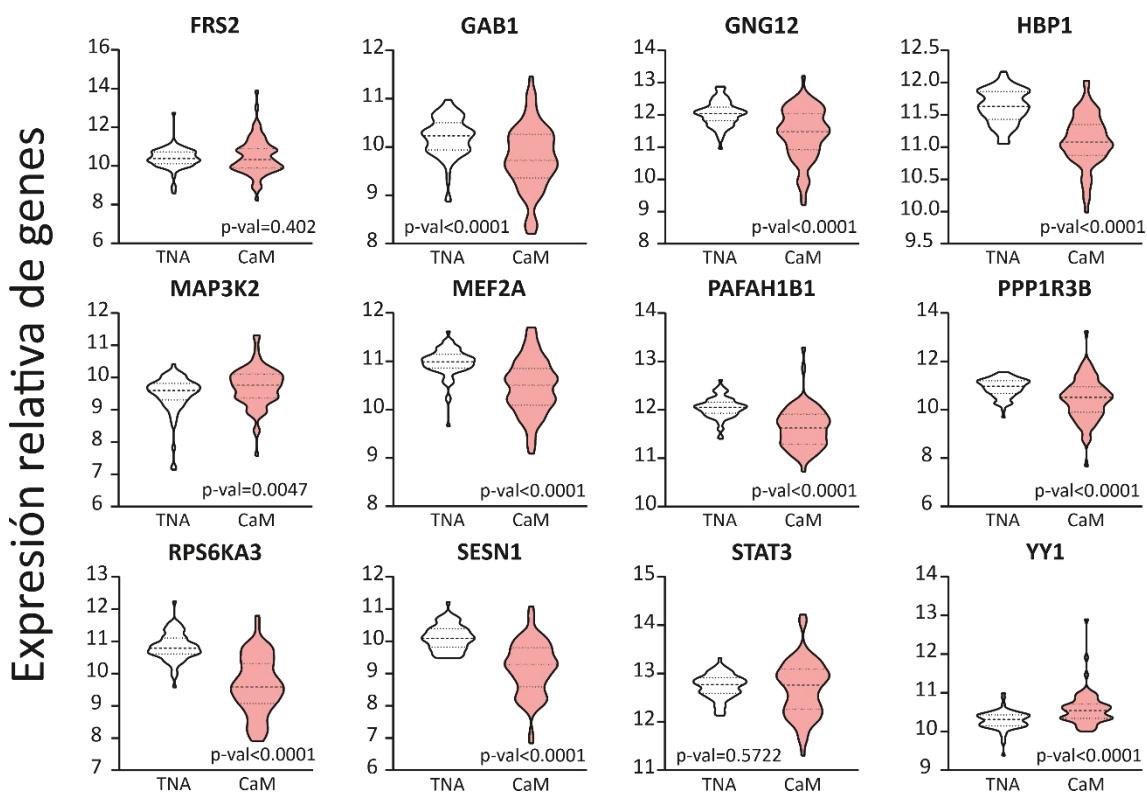


Figura 15: La expresión de los genes experimentalmente validados de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p se encuentra modulada en CaM respecto a TNA en pacientes. Se analizó la expresión de los genes mencionados a partir de los datos obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaM) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-BRCA graficada en lecturas por millón ($n= 75$). Los nombres de cada uno de los genes analizados se encuentran en la parte superior de los gráficos en negrita. Para el análisis estadístico, se utilizaron prueba-T pareada o Test de Wilcoxon según correspondiera.

En conclusión, se encontró que los miRNAs hsa-miR-106b-5p, miR-21-5p, miR-143-3p y miR-205-5p tienen genes blanco experimentalmente validados que se encuentran involucrados en diversas vías relevantes para el desarrollo del CaM. Al analizar un subconjunto de 12 genes para los miRNAs hsa-miR-106b-5p y miR-21-5p, se encontró que estos están diferencialmente expresados al comparar tejido tumoral con TNA. En

particular, se continuó el análisis con los 8 genes que se encontraban disminuidos en CaM dado que podrían ser supresores tumorales.

La expresión de los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p se encuentra aumentada en subtipos de CaM más agresivos y son predictores de peor sobrevida

Se comparó la expresión de los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p entre subtipos y estadios dentro del CaM utilizando los datos obtenidos de la cohorte de TCGA-BRCA. En la Figura 16 se puede observar que el miRNA hsa-miR-106b-5p se encuentra aumentado en subtipos más agresivos como el Basal, mientras que el hsa-miR-21-5p se encuentra aumentado en subtipos de agresividad intermedia como los Luminales B y Her2. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de estos miRNAs separando los tejidos tumorales por estadio (Figura 16).

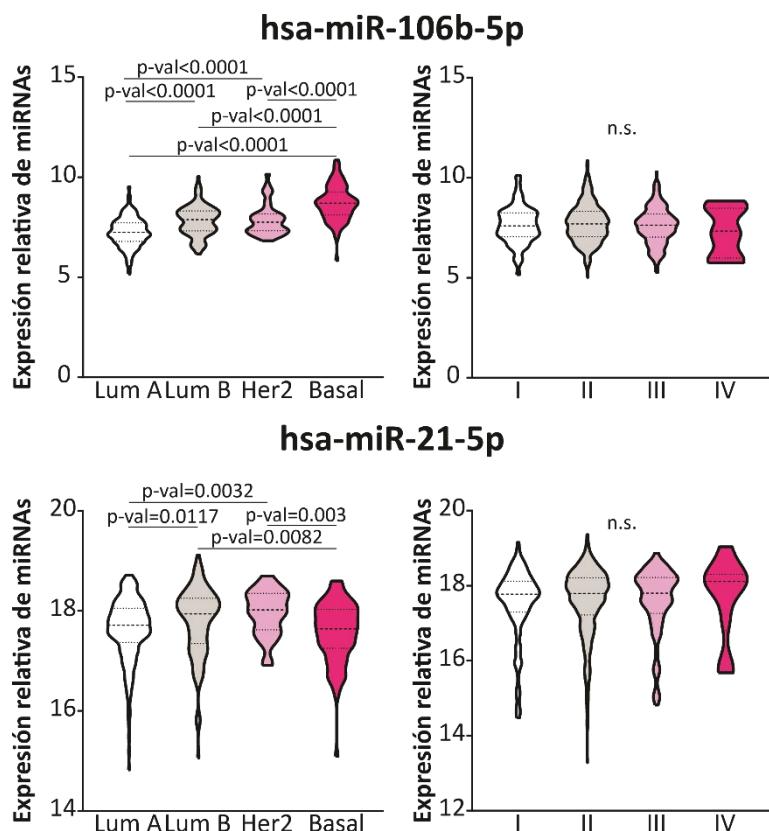


Figura 16: La expresión de miRNAs se encuentra modulada en distintos subtipos de CaM en pacientes. Se analizó la expresión de los miRNAs mencionados a partir de los datos obtenidos de tumores de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-BRCA utilizando la herramienta XENA. Los tumores se dividieron según su subtipo (Luminal A, Luminal B, Her 2 y Basal, panel izquierdo, n=490) y según su estadio (I-IV, panel derecho, n=445) y se graficó su expresión en

lecturas por millón. Los nombres de cada uno de los miRNAs analizados se encuentran en la parte superior de los gráficos en negrita. Para el análisis estadístico, se utilizaron ANOVA de una vía seguida por Tukey o Kruskal-Wallis seguida por Dunn según correspondiera.

Para hacer un estudio más completo sobre la relevancia de los miRNAs en el CaM, también se analizó la sobrevida total de pacientes con CaM basada en la expresión a nivel tumoral de los miRNAs **hsa-miR-106b-5p** y **miR-21-5p**. Para ello, se realizaron los gráficos de Kaplan-Meier utilizando los datos de expresión de los miRNAs de una cohorte de 1262 pacientes pertenecientes a la cohorte METABRIC obtenidos mediante la herramienta bioinformática miRpower. Como se observa en la Figura 17, aquellas pacientes con una alta expresión de **hsa-miR-21-5p** o de **hsa-miR-106b-5p** tuvieron una sobrevida menor.

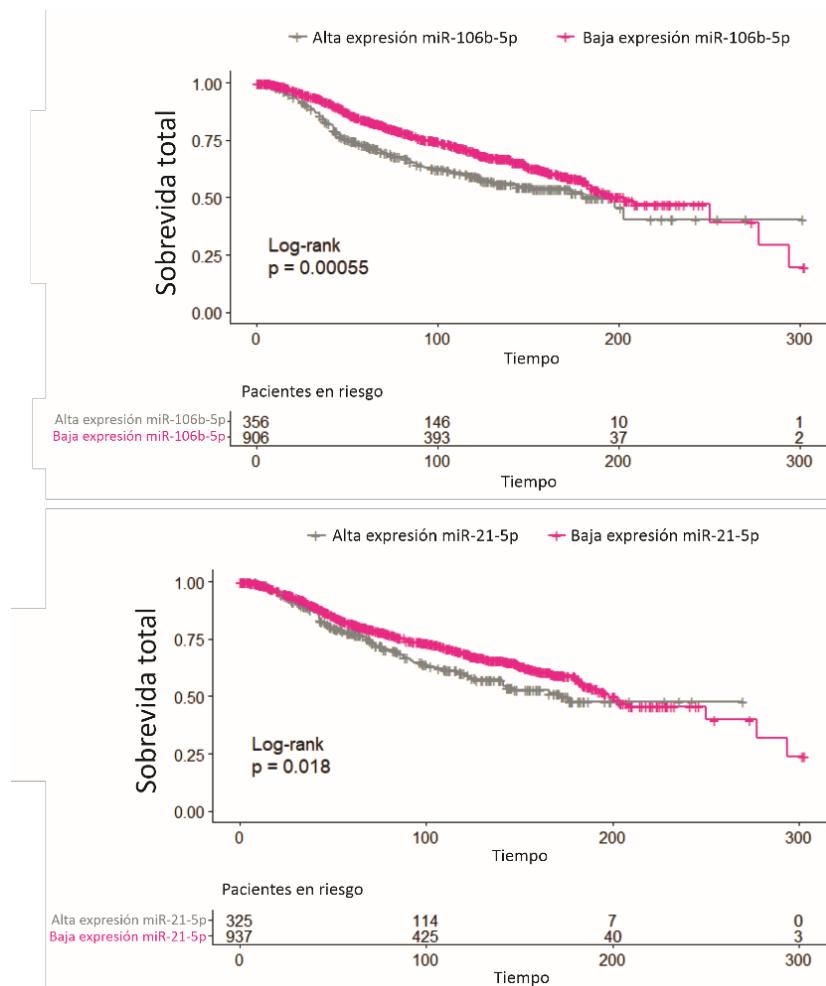


Figura 17: Niveles elevados de miR-106b-5p y miR-21-5p correlacionan con una peor sobrevida total en CaM. Utilizando los datos de expresión de los miRNAs en tejido tumoral obtenidos con la herramienta miRpower, se realizaron las curvas de Kaplan-Meier para comparar la sobrevida

total entre pacientes con CaM con niveles de expresión altos o bajos de los miRNAs hsa-miR-106b-5p o miR-21-5p respectivamente. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Cox-Mantel.

En resumen, estos resultados sugieren que los miRNAs hsa-miR-106b-5p y miR-21-5p son buenos biomarcadores pronóstico del CaM ya que se encuentran aumentados en subtipos más agresivos del CaM, y que niveles elevados de los mismos en CaM correlacionan con una peor sobrevida de las pacientes.

La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 se encuentra disminuida en subtipos más agresivos de CaM y podría ser utilizada como biomarcador pronóstico de sobrevida total y libre de recaída

Utilizando los datos de expresión de los ocho genes seleccionados a partir de las Figuras 14 y 15 en tejido tumoral, se buscó analizar la relevancia de los mismos en cuanto a su rol en la agresividad del CaM. Para ello, a partir de los datos obtenidos de la cohorte de TCGA-BRCA de los genes seleccionados, se separó a los tumores de acuerdo a su subtipo. Como se puede ver en la Figura 18, se identificó un grupo de genes (GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1) cuya expresión se encontraba disminuida en subtipos más agresivos comparados con aquellos menos agresivos. Estos resultados concuerdan con lo observado en la Figura 16, donde la expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p se encontraba aumentada en subtipos más agresivos. A su vez, también se encontró que la expresión de los genes MEF2A, PAFAH1B1, PPP1R3B y RPS6KA3 estaba disminuida en tumores de agresividades intermedias (Luminal B y Her2) y aumentada en los subtipos Luminal A y Basal. Este último descubrimiento iría en línea con lo observado para el miRNA hsa-miR-21-5p, sugiriendo entonces que estos cuatro genes podrían estar siendo regulados por este miRNA y el primer subgrupo de genes por el miRNA hsa-miR-106b-5p.

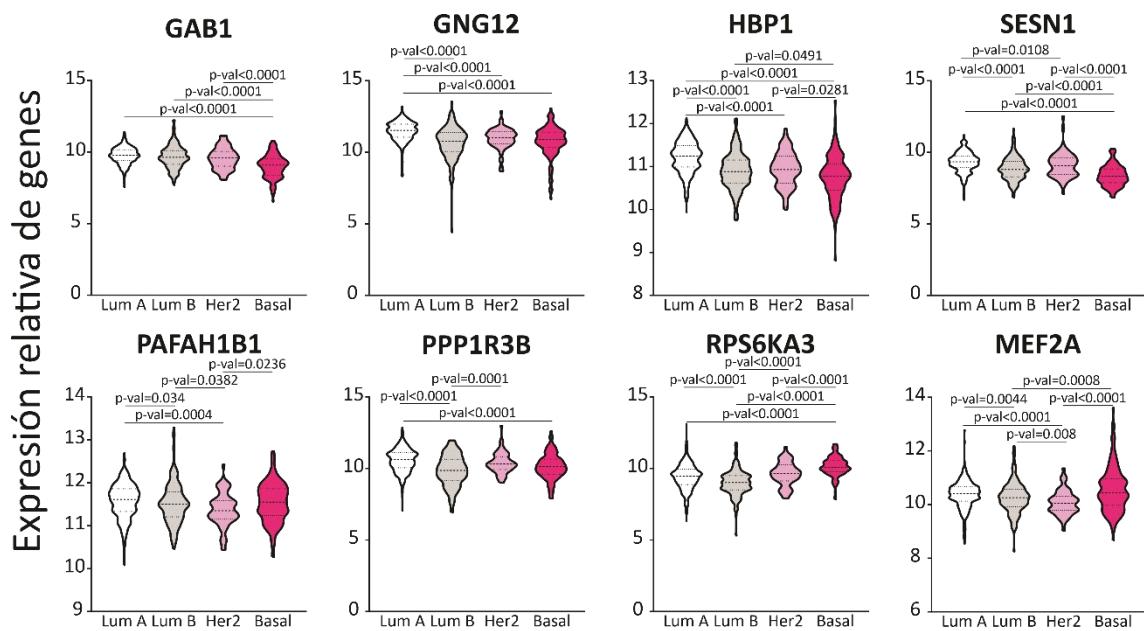


Figura 18: La expresión de los ocho genes seleccionados se encuentra modulada en distintos subtipos de CaM en pacientes. Se analizó la expresión de los genes indicados a partir de los datos obtenidos de tumores de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-BRCA utilizando la herramienta XENA. Los tumores se dividieron según su subtipo (Luminal A, Luminal B, Her2 y Basal, n=490) y se graficó su expresión en lecturas por millón. Los nombres de cada uno de los genes analizados se encuentran en la parte superior de los gráficos en negrita. Para el análisis estadístico, se utilizaron ANOVA de una vía seguida por Tukey o Kruskal-Wallis seguida por Dunn según correspondiera.

Para continuar analizando la relevancia de los genes elegidos en la agresividad del CaM, se determinó la sobrevida total y la sobrevida libre de recaída utilizando la expresión de aquellos genes que se encontraban disminuidos en subtipos más agresivos. Para ello, se descargó la expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 de tejido tumoral de una cohorte de 1879 pacientes con CaM utilizando la herramienta Kaplan-Meier plotter y se realizaron las curvas correspondientes. Se determinó que aquellos pacientes con baja expresión de los genes GNG12, HBP1 y SESN1 tuvieron una peor sobrevida total, sin haber diferencias en el caso del gen GAB1 (Figura 19).

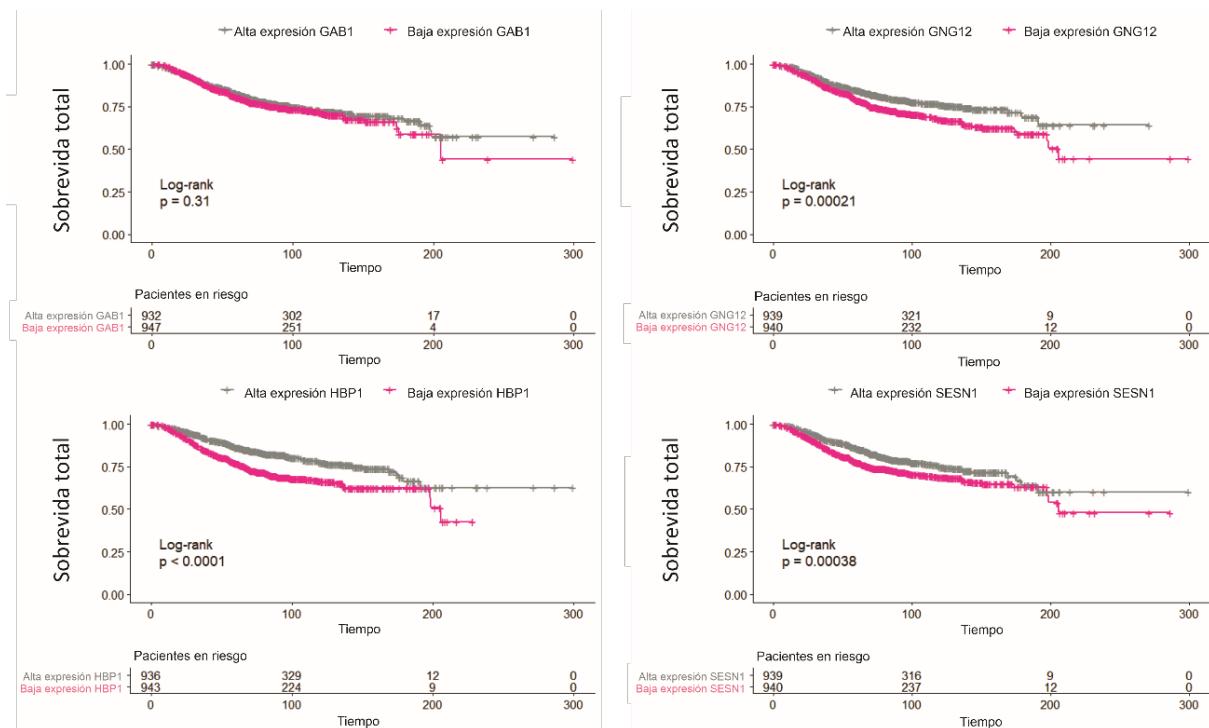


Figura 19: Niveles elevados de GNG12, HBP1 y SESN1 correlacionan con una peor sobrevida total en CaM. Utilizando los datos de expresión de los genes en tejido tumoral obtenidos utilizando la herramienta Kaplan-Meier plotter, se realizaron las curvas para comparar la sobrevida total entre pacientes con CaM (n=1879) con niveles de expresión altos o bajos de los genes indicados. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Cox-Mantel.

También se encontró que aquellos pacientes con baja expresión de cada uno de los cuatro genes mencionados anteriormente presentaron una peor sobrevida libre de recaída (Figura 20).

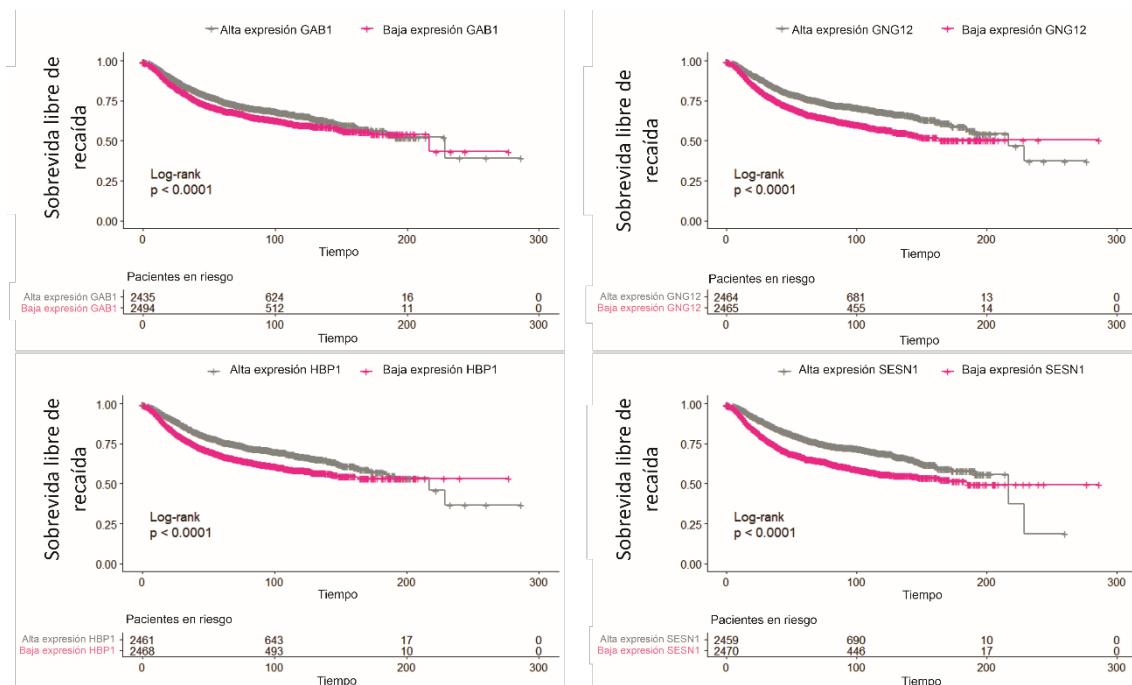


Figura 20: Niveles elevados de GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 correlacionan con una peor sobrevida libre de recaída en CaM. Utilizando los datos de expresión de los genes en tejido tumoral obtenidos utilizando la herramienta Kaplan-Meier plotter, se realizaron las curvas para comparar la sobrevida libre de recaída entre pacientes con CaM (n=1879) con niveles de expresión altos o bajos de los genes indicados. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Cox-Mantel.

Estos resultados demuestran que los genes MEF2A, PAFAH1B1, PPP1R3B y RPS6KA3 podrían estar siendo modulados principalmente por el miRNA hsa-miR-21-5p, mientras que los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 lo serían por el miRNA hsa-miR-106b-5p. A su vez, los genes de este segundo grupo podrían ser importantes en la clínica como biomarcadores pronóstico en pacientes con CaM más agresivo, dado que aquellos que tienen la expresión de estos genes disminuida mostraron una peor sobrevida total y libre de recaída.

La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 correlaciona negativamente con la expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p en CaM

Para determinar si efectivamente los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 podrían ser regulados por el miRNA hsa-miR-106b-5p en tumores de mama, se realizó una matriz de correlación utilizando los datos de expresión de tumores obtenidos de la cohorte TCGA-BRCA. Se encontró que la expresión de los cuatro genes correlaciona negativamente con la expresión del miRNA de manera significativa, con valores de coeficiente de correlación entre 0,2 y 0,4 aproximadamente (Figura 21). A su vez, también se encontró una correlación positiva entre la expresión del gen HBP1 y los genes GAB1, GNG12 y SESN1, con coeficientes de correlación de aproximadamente 0,4 (Figura 21).

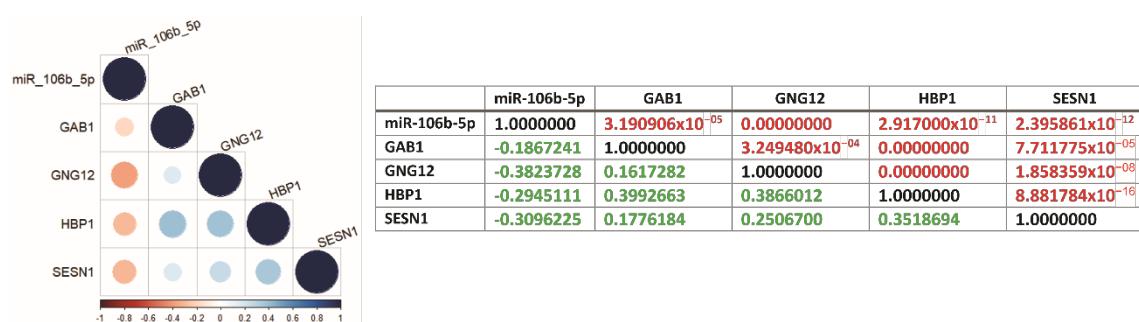


Figura 21: La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 se correlaciona negativamente con la expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p en tumores de mama. A partir de

la expresión de los genes y miRNA mencionados obtenidos de tumores de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-BRCA utilizando la herramienta XENA, se realizó una matriz de correlación. Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y sus respectivos *p*-valores, los cuales se informaron en la tabla en verde y rojo respectivamente.

Por otro lado, se determinó la correlación existente entre la expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p y sus genes blanco en términos de distintos subtipos de CaM. Para ello, se utilizaron los mismos datos que en el caso de la figura anterior y se graficó la correlación entre la expresión del miRNA y cada uno de los genes blanco identificando cada paciente según el subtipo molecular. Como se observa en la Figura 22, aquellas pacientes con subtipos más agresivos como el Basal presentaban mayor expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p y menor expresión de los genes analizados, en contraposición con lo observado en subtipos menos agresivos como el Luminal A, que tenía una menor expresión del miRNA y mayor expresión de los genes blanco comparativamente.

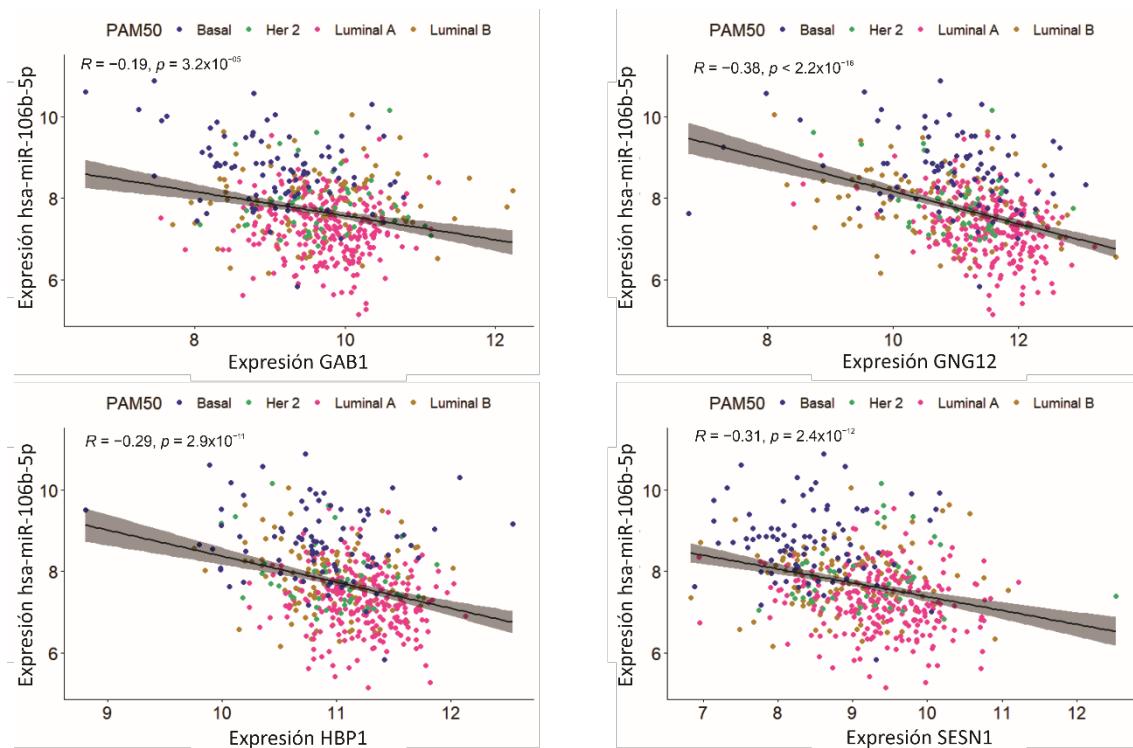


Figura 22: Tumores de mama de subtipos más agresivos tienen mayores niveles de expresión de hsa-miR-106b-5p y menores niveles de expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1.
A partir de la expresión de los genes y miRNA mencionados obtenidos de tumores de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-BRCA utilizando la herramienta XENA, se los separó de acuerdo a su subtipo molecular (Luminal A, Luminal B, Her2 y Basal) y se realizaron gráficos de correlación entre el miRNA y cada uno de los genes. Se calcularon los coeficientes de correlación

de Spearman y sus respectivos p-valores. Los círculos rosa, dorado, verde y azul representan los subtipos Luminal A, Luminal B, Her2 y Basal respectivamente.

La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 se encuentra disminuida en tejido tumoral y en metástasis de CaM

Finalmente, para determinar la importancia de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 en la metástasis del CaM, se utilizó la herramienta bioinformática TNMplot, la cual cuenta con una cohorte de 7893 individuos, con información de la expresión de genes en tejido mamario normal, tumoral y metastásico. Al utilizar esta herramienta se encontró que la expresión de los cuatro genes estaba disminuida en CaM respecto a mamas normales (Figura 23), resultado similar al obtenido previamente comparando tejido tumoral y TNA en la cohorte de TCGA-BRCA (Figura 15). Más importante aún, fue que la expresión de estos genes se encontraba significativamente disminuida en tejido metastásico comparado con mamas normales y CaM primario.

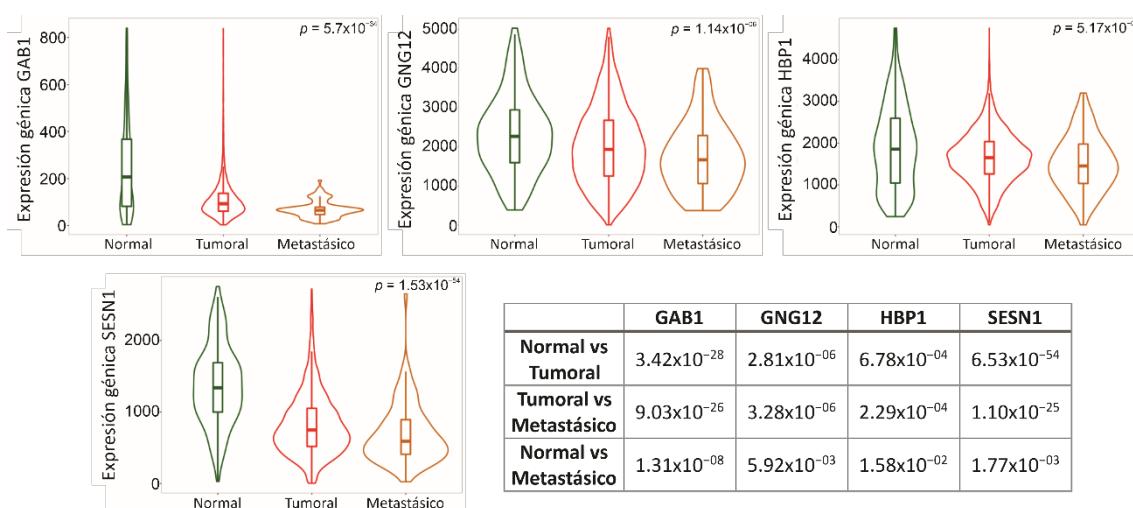


Figura 23: La expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 disminuye conforme progresá la enfermedad. Utilizando la herramienta bioinformática TNMplot y a partir de la expresión de los genes mencionados en glándulas mamarias normales (Normal, n=242), tejido tumoral (Tumoral, n=7569) y tejido metastásico (Metastásico, n=82) del CaM se realizaron los gráficos correspondientes. Para el análisis estadístico se utilizó Kruskal-Wallis seguido de Dunn. El p-valor del análisis general de Kruskal-Wallis se encuentra informado en la esquina superior derecha de cada gráfico. Los p-valores correspondientes a las comparaciones realizadas mediante el test de Dunn se encuentran documentados en la tabla al final de la figura.

En base al conjunto de los resultados informados en el presente capítulo, se propone el modelo hipotético esquematizado en la Figura 24: en TNA o en subtipos de CaM

menos agresivos, la expresión del hsa-miR-106b-5p es muy baja, mientras que la expresión de los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1 es elevada. A medida que se desarrolla la enfermedad, o en subtipos más agresivos, la expresión del hsa-miR-106b-5p aumenta, lo que genera una disminución en los genes blanco GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1, favoreciendo el desarrollo de metástasis y la agresividad del CaM, dando como resultado un peor pronóstico de las pacientes con esta enfermedad.

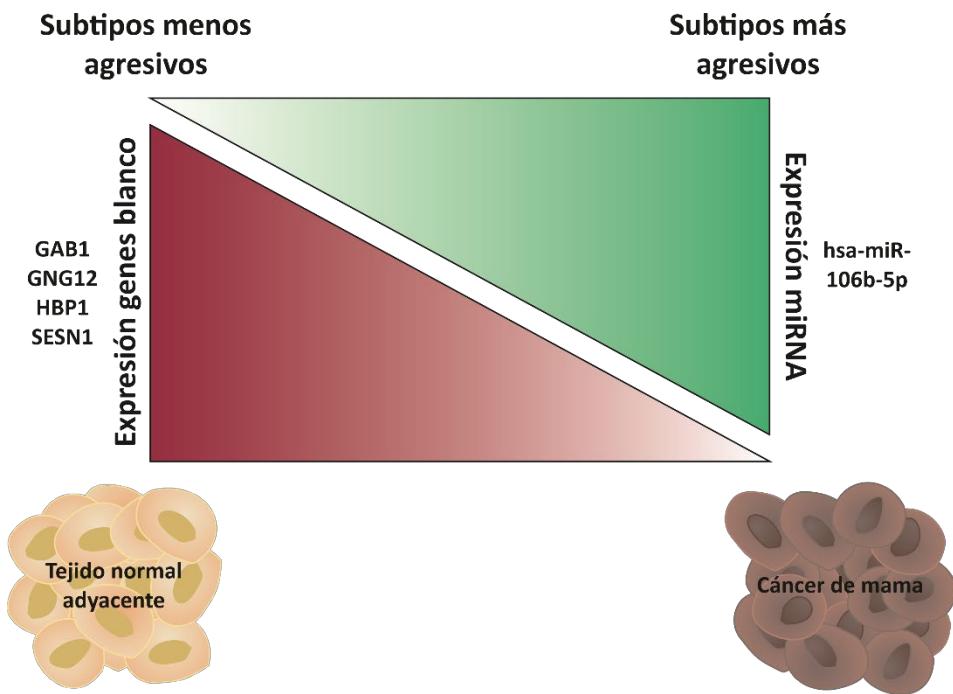


Figura 24: Modelo hipotético propuesto.

Capítulo 2: El rol de Kaiso y los miRNAs en el CaM y la autofagia secretoria

Continuando con el primer objetivo específico de investigar el rol de miRNAs y genes con relevancia clínica en modelos animales con CaM, en este segundo capítulo del presente trabajo de tesis, se utilizó un modelo de ratones NSG que fueron inoculados con células de CaM triple negativo con expresión control o disminuida de Kaiso. Se analizó el crecimiento de los tumores generados y el desarrollo de macro- y micro-metástasis en los dos grupos experimentales. A su vez, se midió la expresión de diversos genes y miRNAs relacionados con Kaiso y el desarrollo del CaM en los tumores desarrollados. La expresión de estos mismos miRNAs se analizó a su vez en el plasma de los ratones inoculados, para comparar la presencia de los mismos en circulación. Finalmente, se determinó, mediante técnicas de inmunohistoquímica, la presencia y localización sub-cellular de LC3A/B tanto en los tumores generados como en los focos metastásicos, para analizar el rol de Kaiso en la autofagia secretoria.

Modelo murino utilizado

El segundo modelo desarrollado en el presente trabajo de tesis se llevó a cabo utilizando ratones hembra NSG. Los mismos fueron separados al azar en dos grupos, y fueron inoculados con células de CaM triple negativo humanas MDA-MB-231 con expresión control (Ctrl RNAi) o disminuida de Kaiso (shKaiso), generadas en el laboratorio dirigido por el Dr. Kevin Gardner (Universidad de Columbia, New York, USA) tal como se describe en Materiales y Métodos y en la Figura 25. Se testeó la expresión de Kaiso en las líneas celulares previamente a la inoculación y se constató que la expresión de Kaiso se encontraba disminuida respecto a las células control (Datos no mostrados). Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 2.500 mm^3 , los ratones fueron sacrificados y se colectaron tumores, sangre y tejidos blandos como hígado y pulmón para su posterior análisis.

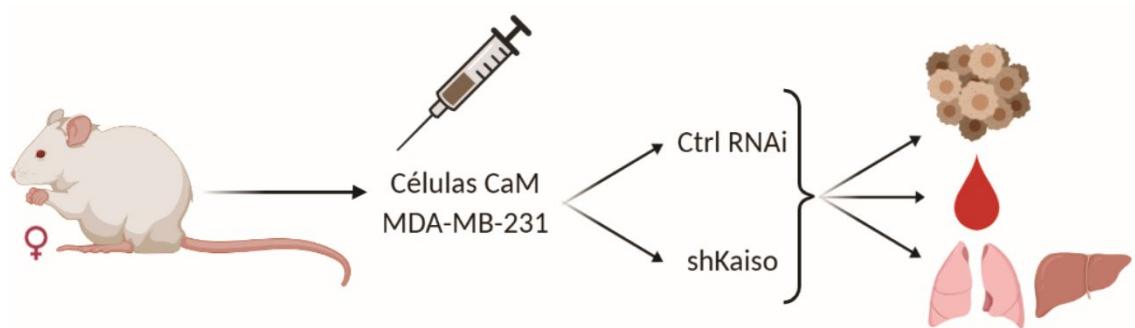


Figura 25: Esquema del modelo murino desarrollado. Ratones hembra NOD scid gamma (NSG) fueron inoculados en la almohadilla mamaria con 2×10^6 células MDA-MB-231 con expresión control (Ctrl RNAi) o disminuida de Kaiso (shKaiso). Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 2.500 mm^3 , los ratones fueron sacrificados y se colectaron tumores, sangre y tejidos blandos para su posterior análisis.

La disminución de la expresión de Kaiso en xenotransplantes redujo el crecimiento tumoral y el desarrollo de macrometástasis

Luego de inoculados los ratones, se midió el crecimiento tumoral tres veces por semana durante aproximadamente un mes. Como se observa en la Figura 26, los tumores con expresión disminuida de Kaiso presentaron una reducción del volumen tumoral.

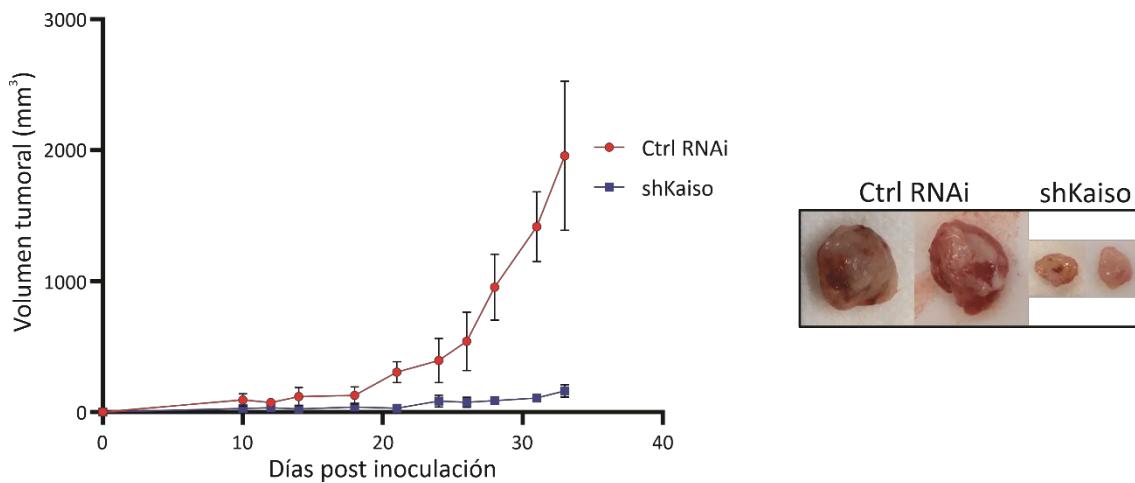


Figura 26: La disminución de la expresión de Kaiso genera una baja en el crecimiento tumoral. Ratones hembra NSG fueron inoculados con células MDA-MB-231 con expresión control (Ctrl RNAi, n=7) o disminuida de Kaiso (shKaiso, n=7). El volumen tumoral se midió tres veces a la semana. Se grafica el promedio y desvío estándar de cada grupo (panel izquierdo). Se tomaron fotos representativas de los tumores de cada grupo experimental (panel derecho).

Al momento del sacrificio y de realizar las autopsias de los ratones, se encontró que los ratones que fueron inoculados con células Ctrl RNAi presentaban macrometástasis tanto en pulmones como en hígados (Figura 27A), mientras que no se distinguió presencia de las mismas en el grupo shKaiso. Los tejidos blandos fueron fijados, incluidos en parafina y los cortes fueron teñidos con H&E. Al analizar la presencia de micrometástasis, se observó que los ratones inoculados con células Ctrl RNAi presentaban un mayor número de focos metastásicos respecto a los ratones inoculados con células shKaiso (Datos no

mostrados). Imágenes representativas de las micrometástasis en tejidos blandos de los ratones inoculados con células shKaiso y Ctrl RNAi se presentan en la Figura 27B.

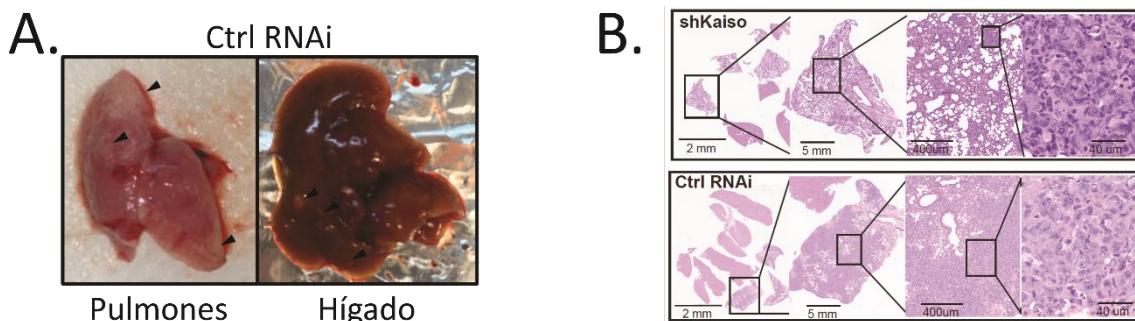


Figura 27: Los ratones inoculados con células con expresión control de Kaiso presentaron macro metástasis. (A) Las flechas indican la presencia de macrometástasis en pulmones e hígado de un ratón representativo inoculado con células Ctrl RNAi. (B) Tinción con H&E en cortes histológicos de tejidos blandos de ratones NSG inoculados con células Ctrl RNAi o con células shKaiso. Se muestra la presencia de micrometástasis en mayores aumentos.

Kaiso modula la expresión de sus genes blanco y miRNAs relacionados en xenotranplantes murinos

Para determinar el rol de Kaiso en el tejido tumoral, se aisló el ARN proveniente de los xenotransplantes generados con expresión disminuida o control de Kaiso. Luego, se procedió a hacer las RT-qPCR para medir la expresión de genes que se encuentran involucrados en procesos de proliferación y supervivencia del CaM. Se encontró que los xenotransplantes con expresión disminuida de Kaiso mostraban una baja de la expresión de CTBP1, FOXA1, CCND1 y DNMT1 y un aumento de la expresión de GATA3 (Figura 28). No se encontraron cambios significativos en la expresión de CTBP2 y de EZH2 (Figura 28).

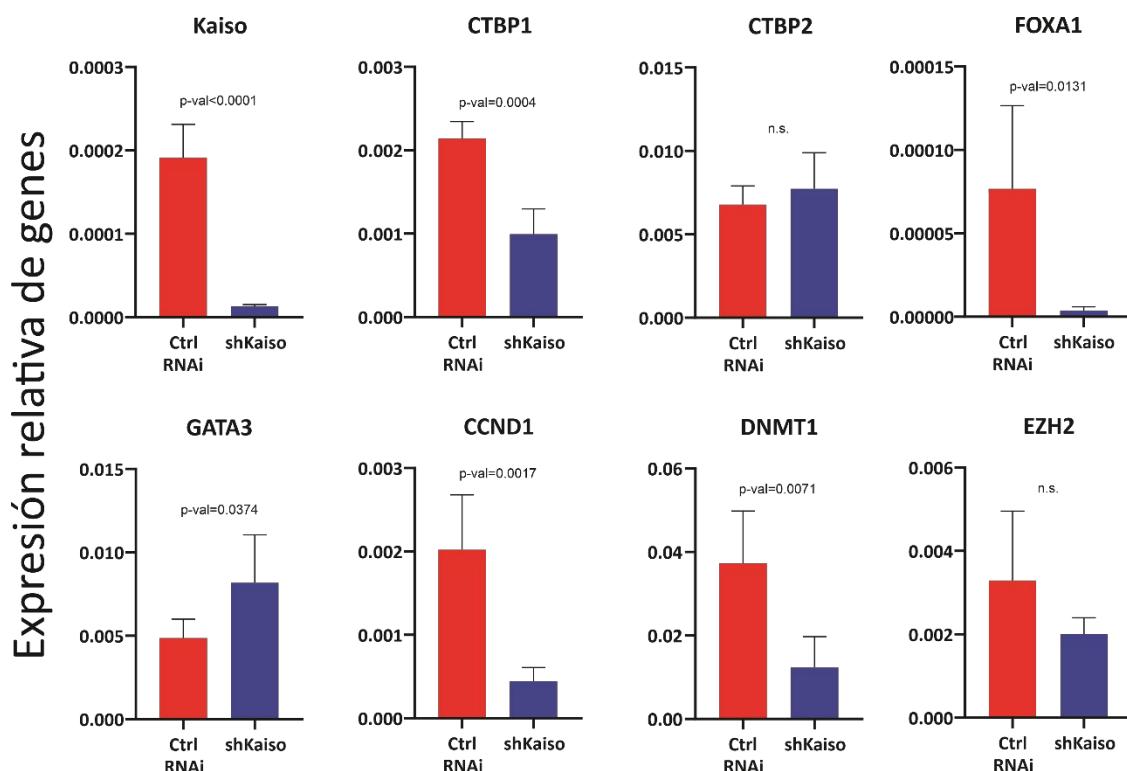


Figura 28: Kaiso modula la expresión de genes involucrados en la progresión del CaM en xenotransplantes. Se analizó la expresión de los genes mencionados mediante RT-qPCR en los tumores con expresión control (Ctrl RNAi, n=7) o disminuida de Kaiso (shKaiso, n=7) generados en tumores NSG utilizando oligos específicos. Las corridas fueron realizadas por duplicado. Los datos fueron normalizados a la expresión de β -Actina. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Welch.

Asimismo, se midieron en estos xenotransplantes miRNAs que se encuentran involucrados en la progresión y sobrevida del CaM o que tienen relación con Kaiso. En los xenotransplantes con expresión disminuida de Kaiso, el miRNA hsa-miR-125b-5p se encontró disminuido, mientras que los miRNAs hsa-miR-10b-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR195-5p y miR-221-3p se encontraron aumentados (Figura 29). No hubo diferencias significativas en la expresión de los miRNAs hsa-miR-16-5p, miR-21-5p, miR-93-5p y miR-106a-5p (Figura 29).

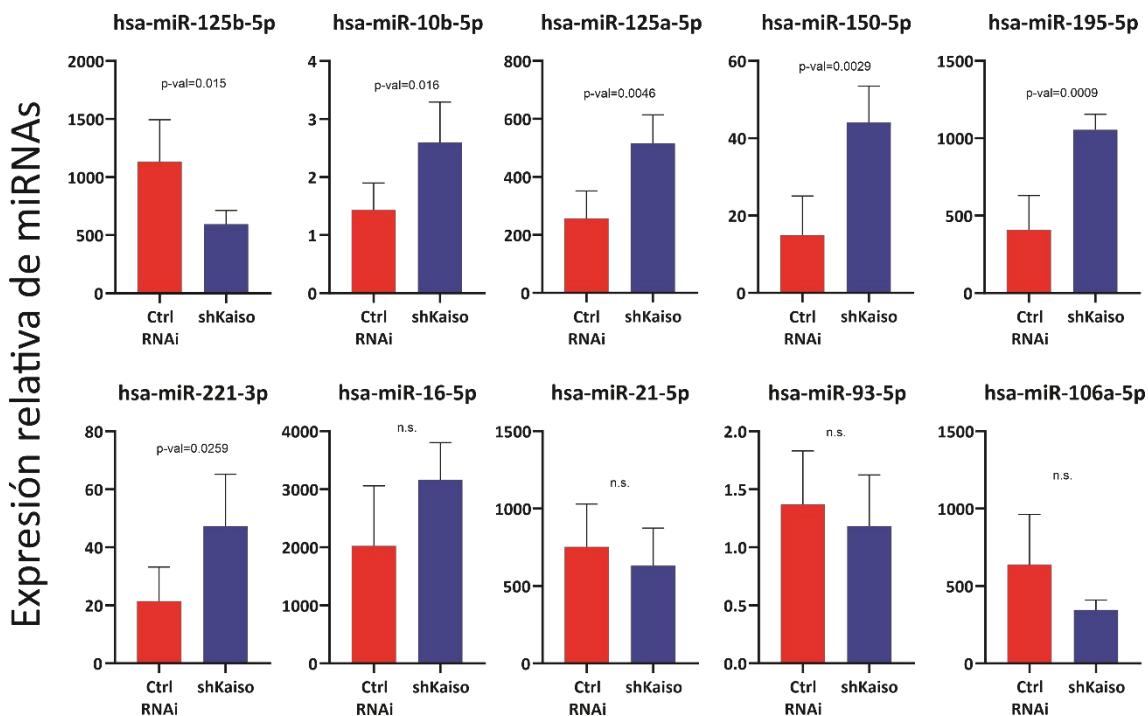


Figura 29: Kaiso modula la expresión de miRNAs relacionados e involucrados en la progresión del CaM en xenotransplantes. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados mediante *stem-loop* RT-qPCR en los tumores con expresión control (Ctrl RNAi, n=7) o disminuida de Kaiso (shKaiso, n=7) generados en ratones NSG utilizando oligos específicos para los miRNAs indicados. Las corridas fueron realizadas por duplicado. Los datos fueron normalizados a la media geométrica de los miRNAs hsa-miR-191-5p y miR-103a-3p. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Welch.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la disminución de la expresión de Kaiso genera una disminución en el crecimiento tumoral de mama y de macrometástasis pulmonares y hepáticas. A su vez, esta disminución en el crecimiento tumoral podría estar dada por la modulación de diversos genes y miRNAs que se encuentran modulados en ausencia de Kaiso.

La expresión de los miRNAs circulantes presentes en plasma de ratones inoculados con células de CaM con expresión disminuida o control de Kaiso se encuentra alterada

Dado que se encontró que Kaiso a nivel tumoral modula la expresión de diversos genes y miRNAs, se quiso estudiar si además la modulación de esta proteína podría cumplir algún rol en la regulación de los miRNAs circulantes de estos ratones. Para ello, al momento del sacrificio se colectó su sangre en un tubo con EDTA, y se obtuvo el plasma

por centrifugación. El ARN total (incluyendo los miRNAs circulantes) fue extraído y se midió la expresión de los mismos miRNAs indicados en la Figura 22 mediante *stem-loop* RT-qPCR. Se encontró que los ratones que habían sido inoculados con células con expresión disminuida de Kaiso tenían una reducción en la circulación de hsa-miR-125b-5p y miR-21-5p en plasma y un aumento de hsa-miR-16-5p y miR-93-5p (Figura 30).

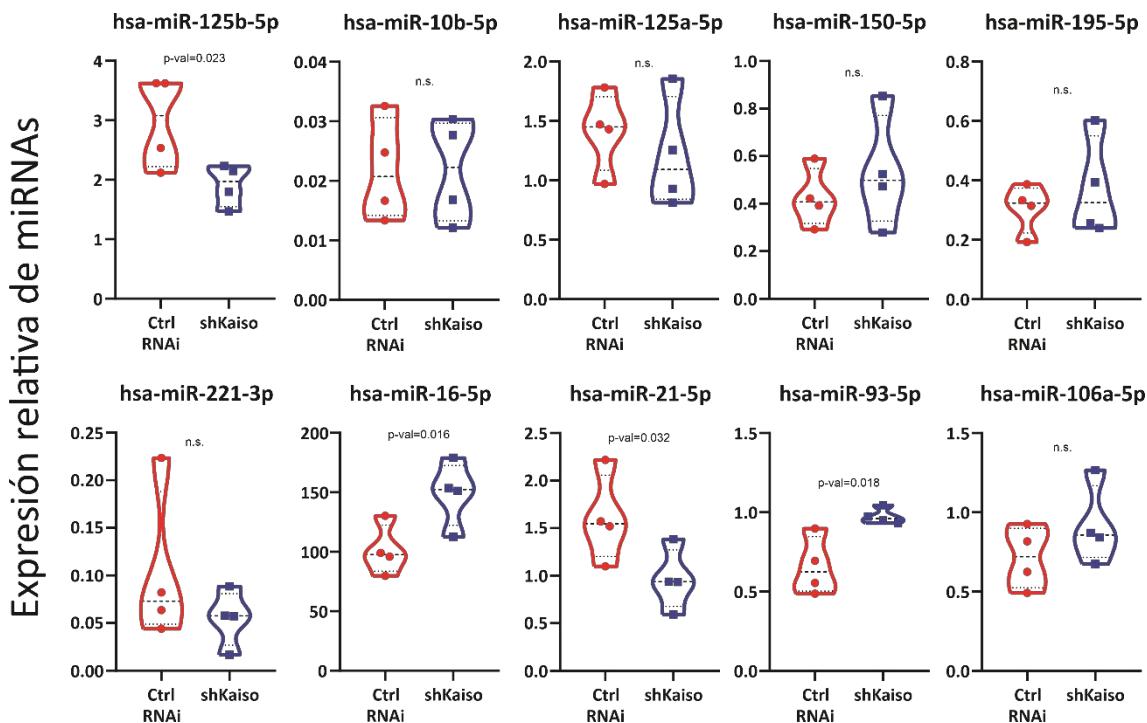


Figura 30: La disminución de la expresión de Kaiso a nivel tumoral modula la presencia de miRNAs en el plasma de ratones. Se analizó la expresión de los miRNAs mencionados mediante *stem-loop* RT-qPCR en el plasma de los ratones NSG inoculados con células con expresión control (Ctrl RNAi, n=7) o disminuida de Kaiso (shKaiso, n=7) utilizando oligos específicos para los miRNAs indicados. Las corridas fueron realizadas por duplicado. Los datos fueron normalizados al *spike-in* cel-miR-39-3p. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Welch.

Antecedentes del rol de Kaiso en autofagia

Estudios previos del grupo del Dr. Kevin Gardner demostraron que Kaiso tiene un rol en la autofagia, dada su interacción con la proteína LC3A/B (Singhal et al. 2021). En particular en este trabajo, en el cual colaboramos, analizaron en líneas celulares con expresión control o disminuida de Kaiso la formación de focos de LC3, proteína que fue conjugada con GFP. La conjugación de esta proteína facilita la visualización de la incorporación de LC3 a estructuras de membranas autofagocíticas (Figura 31A). Allí encontraron que, en ausencia de Kaiso, la formación de focos de LC3 disminuía

significativamente, lo cual se traduce en una disminución en la formación de estructuras autofagocíticas (Singhal et al. 2021).

A su vez, también midieron la presencia de focos de LC3 en presencia o ausencia de cloroquina (CQ), droga que estabiliza los autofagosomas (Figura 31A) y analizaron la activación o no de esta proteína, mediante un inmunoblot (Figura 31B). En el caso en que la proteína se encontrara activada (LC3ii), es decir conjugada con fosfatidiletanolamina (PE), le aportaría un cambio en la movilidad, mientras que en ausencia de PE (LC3i) la proteína se mueve con mayor dificultad. En presencia de Kaiso encontraron un aumento en la cantidad de focos de LC3 y en la conjugación de LC3i a LC3ii en presencia de CQ. Por otro lado, al disminuir la expresión de Kaiso, la CQ no tuvo ningún efecto en la formación de focos de LC3 ni en la conjugación de LC3i a LC3ii (Singhal et al. 2021). Tampoco se vieron cantidades considerables de LC3ii en ausencia de Kaiso. Finalmente, analizaron si Kaiso y LC3 se encontraban cercanas a nivel celular. Para ello, llevaron a cabo ensayos de co-localización mediante inmunofluorescencia. Lo que vieron es que, tanto en líneas celulares con fenotipo Luminal (MCF7) como con fenotipo basal (MDA-MB-231), LC3 y Kaiso colocalizaban perfectamente (Figura 31 C-D) (Singhal et al. 2021).

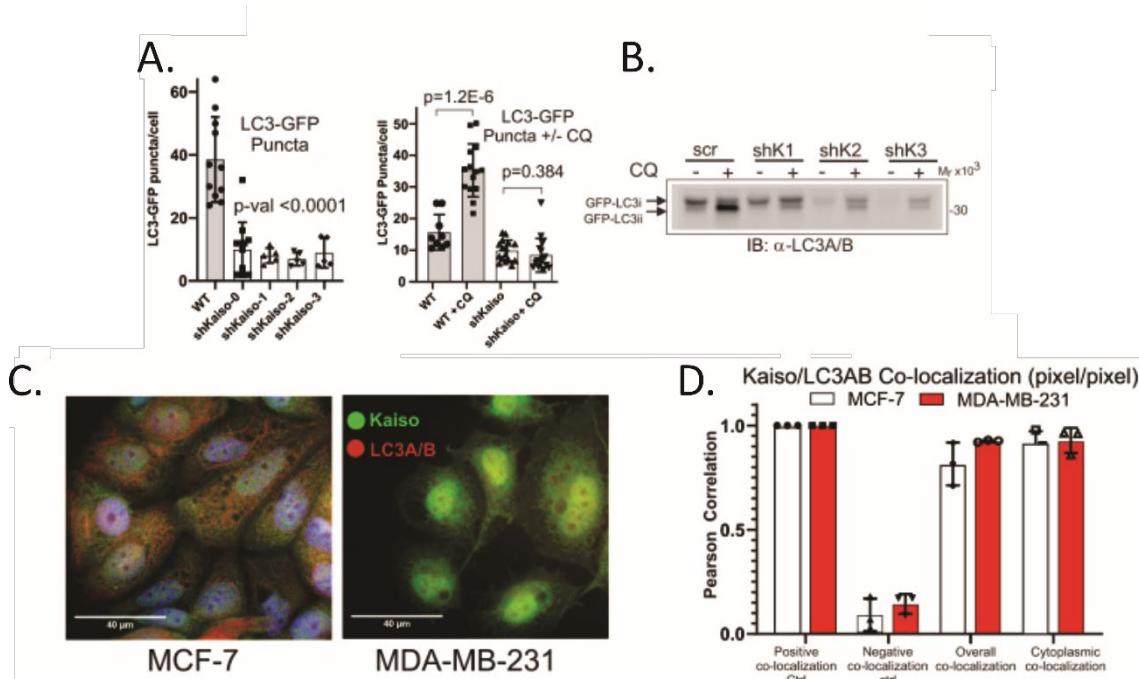


Figura 31: Células con expresión disminuida de Kaiso tienen defectos en la maduración de LC3A/B. (A) Análisis de inmunofluorescencia cuantitativo de GFP-LC3 en la formación de focos

de LC3 (promedio de focos por célula antes (panel izquierdo) y después (panel derecho) del agregado de cloroquina en células MDA-MB-231 que tienen expresión de GFP-LC3. (B) Análisis de inmunoblot de la lipidación de LC3A/B (Formación de GFP-LC3ii) en células MDA-MB-231 transfectadas con un RNAi scramble control (scr) comparado con 3 distintos tipos de short hairpins contra Kaiso (shK1, shK2 y shK3). (C) Co-localización mediante inmunofluorescencia de Kaiso (verde) y LC3A/B (rojo) en células MCF7 y MDA-MB-231. (D) Perfiles cuantitativos de la co-localización de Kaiso y LC3A/B en citoplasma y núcleo (overall) de células MCF7 y MDA-MB-231. Esta figura fue adaptada de Singhal *et al*, 2021.

La disminución de la expresión de Kaiso generó una acumulación de LC3A/B citoplasmática en xenotransplantes y en focos metastásicos murinos

Para profundizar en el estudio del rol de Kaiso en relación a LC3, proteína clave en la autofagia, tanto a nivel tumoral como a nivel metastásico, cortes en blanco de las muestras de tumor, pulmón, hígado y riñón fueron teñidos utilizando la técnica de inmunohistoquímica en el laboratorio del Dr. Kevin Gardner. Se utilizaron anticuerpos anti-LC3A/B y se midió la intensidad de señal utilizando un score entre 0 y 3, siendo 0 el de menor intensidad y 3 el de mayor intensidad. A su vez, se utilizó el H-score para evaluar en conjunto tanto la intensidad de la señal como el porcentaje de células teñido con cada intensidad de señal. Para determinar el H-score, primero se evaluó la intensidad de la marca como se indicó en el párrafo anterior. Luego, se cuantificó el porcentaje de células teñidas con cada intensidad de marca y se multiplicó el porcentaje calculado por la intensidad de señal (0 a 3). Finalmente, se sumaron esos valores calculados y se obtuvo el H-score, siendo el máximo valor el de 300. Si el valor del H-score es menor a 10 se considera negativo, entre 10 y 100 débilmente positivo, entre 101 y 200 moderadamente positivo y finalmente entre 201 y 300 intensamente positivo. También se analizó la distribución de las intensidades de señal de LC3A/B dentro del citoplasma de los tumores o las células metastásicas presentes en tejidos blandos de los ratones inoculados con células Ctrl RNAi o shKaiso.

Como se observa en la Figura 32, la tinción con LC3A/B mostró un aumento en la acumulación de LC3A/B citoplasmática en los tumores con expresión disminuida de Kaiso, resultado consistente con la deficiencia en la maduración y el procesamiento de membranas autofagocíticas demostrado previamente. A su vez, al comparar de manera cuantitativa la intensidad de señal, se vio que los tumores con expresión disminuida de

Kaiso presentaron aproximadamente 8 veces más una intensidad de señal 3+ comparado a los tumores con expresión control.

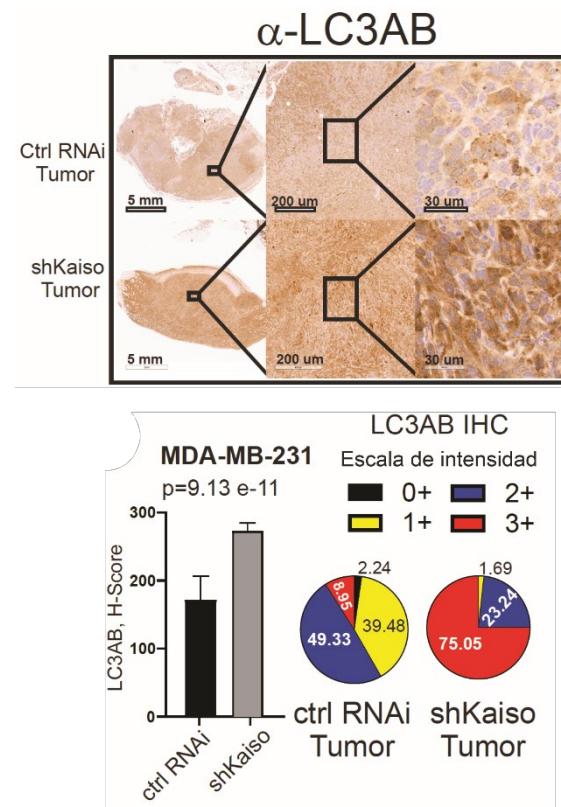


Figura 32: La disminución de Kaiso a nivel tumoral generó una acumulación de LC3A/B en el citoplasma. Se realizó la inmunomarcación de la proteína LC3A/B en cortes histológicos de tumores con expresión control (ctrl RNAi) o disminuida de Kaiso (shKaiso) utilizando anticuerpos anti-LC3A/B y se realizó una comparación cuantitativa en cuanto a la cantidad de células que presentaban LC3A/B en el citoplasma, así como su intensidad de señal, y se analizaron en conjunto mediante el H-Score. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba T.

Al momento de analizar la presencia de LC3 A/B en los focos metastásicos presentes en los tejidos blandos de los ratones inoculados con células con expresión control o disminuida de Kaiso, se encontró la misma tendencia que en el caso de los tumores. En la Figura 33 se puede ver que también hubo un aumento en la acumulación de LC3A/B en los focos metastásicos con expresión disminuida de Kaiso, así como también una intensidad de señal alta (3+) de aproximadamente 3 veces más comparado con las metástasis con expresión control de Kaiso.

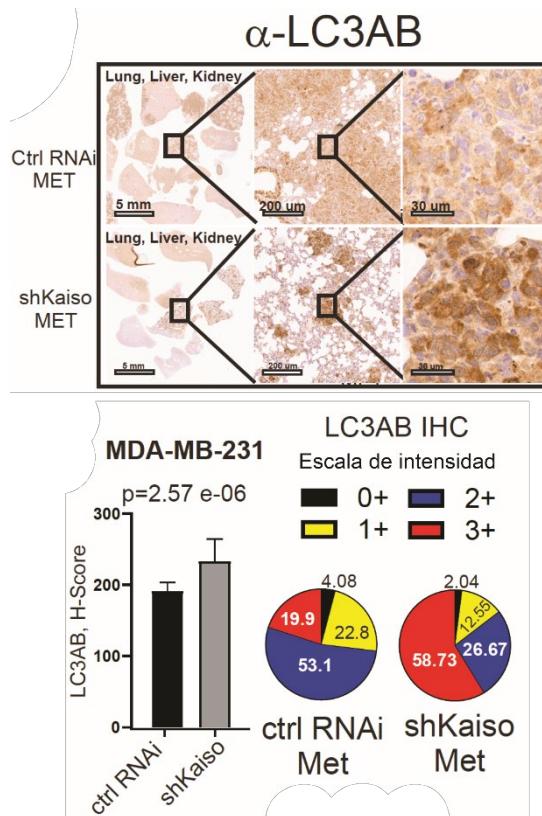


Figura 33: La disminución de la expresión de Kaiso en focos metastásicos generó una acumulación de LC3A/B en el citoplasma. Se realizó la inmunomarcación de la proteína LC3A/B en cortes histológicos de tejidos blandos con presencia de focos metastásicos provenientes de tumores con expresión control (ctrl RNAi) o disminuida de Kaiso (shKaiso) utilizando anticuerpos anti-LC3A/B y se realizó una comparación cuantitativa en cuanto a la cantidad de células que presentaban LC3A/B en el citoplasma, así como su intensidad de señal, y se analizaron en conjunto mediante el H-Score. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba T.

A partir de los resultados presentados, se puede concluir que existe una asociación entre la proteína clave en la autofagia LC3A/B y Kaiso. Esto impactaría en los niveles de miRNAs circulantes, lo cual modularía su secreción mediante la autofagia secretoria modulada por LC3. Estudios futuros son necesarios para investigar el rol de Kaiso en la formación de las membranas autofagocíticas y su expresión regulada en conjunto con LC3 tanto a nivel tumoral como a nivel metastásico.

Capítulo 3: Identificación de miRNAs circulantes para el diagnóstico del CaM

Si bien el diagnóstico del CaM ha ido mejorando con el avance de las tecnologías y del conocimiento científico, son necesarios métodos mejores y más sensibles para diagnosticar la enfermedad en etapas tempranas, para disminuir aún más la muerte por CaM. En este capítulo, proponemos el uso de biopsias líquidas como una herramienta para complementar a los métodos de tamizaje utilizados en la clínica, en particular el uso de miRNAs circulantes en plasma. Para ello, mediante el uso de microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs en plasma de pacientes con CaM y VS, se identificó un grupo de miRNAs que se encuentra aumentado en circulación de pacientes CaM respecto a VS. Luego, se validaron estos miRNAs circulantes mediante una técnica independiente (RT-qPCR), en un número mayor de pacientes con diagnóstico de CaM comparando con VS. Finalmente, estos resultados fueron validados utilizando una cohorte de pacientes obtenida de repositorios públicos. Asimismo, se analizó la expresión de los miRNAs en circulación, separando a las pacientes por subtipos y estadios, y también la expresión de los miRNAs en tumores en comparación con TNA o en función del subtipo y estadio tumoral.

Métodos utilizados para la identificación de miRNAs candidatos

Luego de haber establecido las condiciones óptimas para la extracción de miRNAs circulantes utilizando modelos preclínicos, se procedió a analizar muestras de pacientes con CaM y VS con el objetivo de identificar y validar miRNAs para ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico del CaM. Para ello, se establecieron protocolos de investigación que fueron evaluados por varias instituciones de salud como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron 239 muestras de plasma de pacientes con CaM y VS como se detalla en la Figura 34. Se dividieron las muestras en dos cohortes: una exploratoria y una validatoria. En la primera, se incluyeron 30 pacientes con CaM, las cuales a su vez se dividieron en estadios tempranos (ET) y estadios avanzados (EA), y se compararon con 36 VS. Las muestras de la cohorte exploratoria fueron utilizadas para la identificación de los miRNAs utilizando microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs, y que fueron luego validados mediante RT-qPCR. En la cohorte validatoria, se incluyeron 100 pacientes con CaM y 73 VS, que fueron utilizadas para la validación analítica (es decir por otra técnica: RT-qPCR) de los datos obtenidos de los microarreglos y la secuenciación de miRNAs. Finalmente, se utilizó una cohorte validatoria externa, la

cual incluyó datos de microarreglos de expresión de miRNAs a partir de suero de pacientes con CaM y VS (1272 por grupo) obtenidos de repositorios públicos.

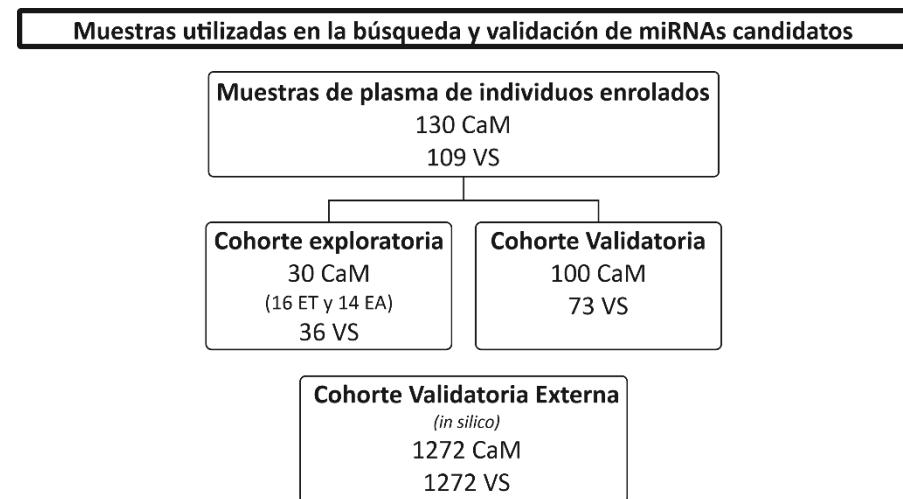


Figura 34: Esquema de las muestras y cohortes de voluntarias enroladas en el protocolo de investigación. Se colectaron muestras de plasma de pacientes con CaM y VS de los distintos hospitales que se detallaron en la sección Materiales y Métodos para la identificación y validación de miRNAs que puedan ser utilizados en el diagnóstico del CaM. También se obtuvieron datos de expresión de microarreglos de expresión a partir de suero de pacientes con CaM y VS de repositorios públicos con los que se estableció la cohorte validatoria externa. El número de muestras en cada caso está indicado. ET= Estadios Tempranos; EA= Estadios Avanzados.

Para la identificación de los miRNAs candidatos para el diagnóstico temprano del CaM, se utilizaron dos tecnologías, microarreglos de expresión (Affymetrix) y secuenciación de miRNAs (GenoHub) como se observa en la Figura 35. Para la primera tecnología, se utilizó plasma de 30 pacientes con CaM y de 36 VS, pertenecientes a la cohorte exploratoria. Las muestras de CaM se dividieron en 5 sub-grupos, según su estadio: 0-IA, IIA, IIB, IIIA y IIIB, IIIC y IV, como se detalló anteriormente en Materiales y Métodos. Se realizaron extracciones de ARN de modo tal de obtener la masa necesaria de miRNAs circulantes para llevar a cabo los microarreglos de miRNAs. Se hibridizaron 9 microarreglos de miRNAs: 5 correspondientes al grupo de pacientes con CaM y 4 al grupo de VS. Como resultado se obtuvieron listas de miRNAs medidos con distintas intensidades de señal, que se analizaron utilizando el software TAC según se detalla en Materiales y Métodos.

Como se describe en la Figura 35, para los análisis se utilizaron como criterios de selección un p -valor $<0,05$ y veces de cambio o Fold-change $>1,5$. Así, se generaron 3 listas de miRNAs diferencialmente expresados: una primer lista con 129 miRNAs aumentados en circulación de las pacientes con CaM en ET (0-IIIB) respecto a pacientes con CaM en EA (IIIA-IV), informados en la Tabla suplementaria 5; una segunda lista con 75 miRNAs aumentados en circulación de las pacientes con CaM respecto a VS informados en la Tabla suplementaria 6, y una tercera lista con 137 miRNAs aumentados en circulación de pacientes con CaM en ET respecto a VS informados en la Tabla suplementaria 7.

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo es identificar aquellos miRNAs que permitieran ser utilizados para el diagnóstico temprano de la enfermedad, se realizaron nuevas comparaciones, donde se buscó identificar aquellos miRNAs que estuvieran en común entre las listas anteriormente mencionadas. De esta manera, se obtuvieron 3 listas nuevas como se detalla en la Figura 35, una de 48 miRNAs (Tabla suplementaria 8), una de 91 miRNAs (Tabla suplementaria 9) y una de 73 miRNAs, identificada en rosa en la Figura 35 y detallada en la Figura 36, con la que se continuó el análisis.

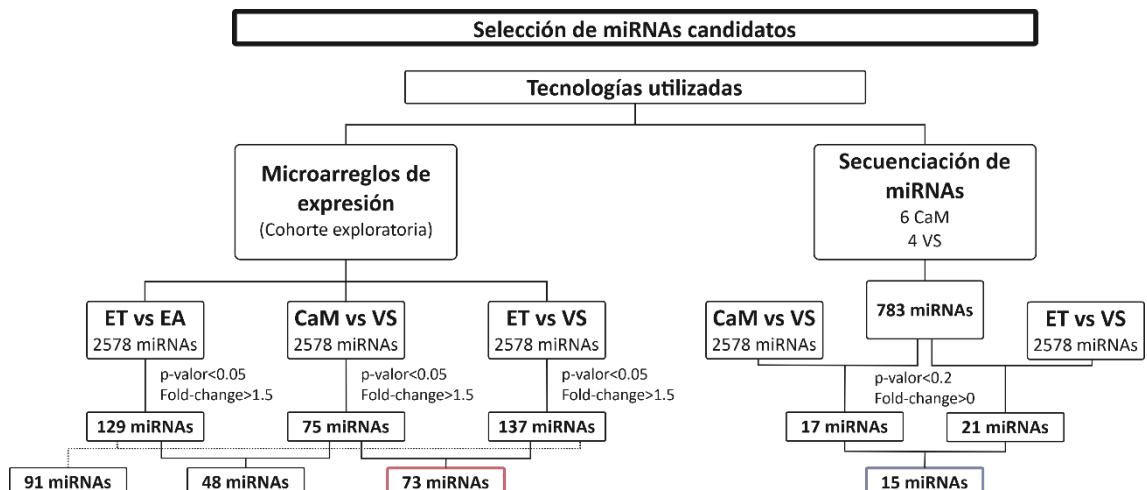


Figura 35: Esquema de la selección de miRNAs candidatos biomarcadores obtenida a partir de las diferentes cohortes de pacientes y tecnologías utilizadas. Se utilizaron dos tecnologías para la identificación de miRNAs candidatos, microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs. Se utilizó plasma de pacientes con CaM o VS de la cohorte exploratoria para los microarreglos de expresión o 6 pacientes CaM y 4 VS de la cohorte validatoria. Luego, con los datos obtenidos, se realizaron comparaciones de las listas de miRNAs obtenidas, con distintos criterios de selección (p -val $<0,05$ o $<0,2$ y Fold-change $>1,5$ o >0 según correspondiera). Finalmente se obtuvieron dos listas finales de miRNAs identificadas con rosa y azul. Se indica en todos los casos el número de voluntarias enroladas y de miRNAs obtenidos.

Para la segunda tecnología, se utilizó el plasma de 6 pacientes con CaM en estadios tempranos (Ia: n=2, Ib: n=2 y Ic: n=2) y de 4 VS, ambos correspondientes a la cohorte validatoria. Las muestras se enviaron en hielo seco a la empresa GenoHub en Estados Unidos, y allí se realizó la extracción de miRNAs circulantes, la secuenciación de los miRNAs y el análisis estadístico correspondiente. A partir de este análisis, se obtuvo una lista de 783 miRNAs diferencialmente expresados entre CaM y VS, listados en la Tabla suplementaria 10. Luego, esta lista de miRNAs fue comparada con los miRNAs obtenidos de los microarreglos de expresión, utilizando como criterio de selección un p -valor<0,2 y un Fold-change>0. Los miRNAs diferencialmente expresados identificados mediante secuenciación se compararon, por un lado, con la lista de miRNAs identificados en los microarreglos de expresión al comparar CaM vs VS y, por otro lado, con la lista de miRNAs identificados al comparar ET vs VS. De este nuevo análisis, se obtuvieron 2 listas de miRNAs en común, una de 17 (Tabla suplementaria 11) y otra de 21 (Tabla suplementaria 12) respectivamente. Finalmente, se compararon estas listas y se obtuvo una lista final de 15 miRNAs identificada en azul en la Figura 35 y detallada en la Figura 36, con la que se continuó también el análisis.

hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-4730	hsa-miR-6769b-5p
hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-3591-3p	hsa-miR-4734	hsa-miR-6780b-5p
hsa-miR-1233-5p	hsa-miR-3648	hsa-miR-4749-5p	hsa-miR-6785-5p
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-3648	hsa-miR-4793-3p	hsa-miR-6796-5p
hsa-miR-1261	hsa-mir-3656	hsa-miR-5093	hsa-mir-6798
hsa-miR-1275	hsa-miR-3665	hsa-mir-5703	hsa-miR-6799-5p
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-371b-5p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-6812-5p
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-3907	hsa-miR-595	hsa-miR-6875-3p
hsa-miR-185-3p	hsa-miR-3960	hsa-miR-602	hsa-miR-6879-5p
hsa-miR-1915-3p	hsa-miR-4298	hsa-miR-6087	hsa-miR-7107-5p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-4440	hsa-miR-6125	hsa-miR-7110-5p
hsa-miR-297	hsa-miR-4443	hsa-miR-6125	hsa-miR-7114-5p
hsa-miR-3064-5p	hsa-miR-4462	hsa-miR-6127	hsa-miR-7704
hsa-miR-3135b	hsa-miR-4486	hsa-miR-6165	hsa-miR-7847-3p
hsa-miR-3148	hsa-miR-4535	hsa-miR-6510-5p	hsa-miR-8071
hsa-miR-3162-5p	hsa-miR-4656	hsa-miR-6514-3p	hsa-miR-93-3p
hsa-miR-3175	hsa-miR-4701-3p	hsa-miR-6729-5p	
hsa-miR-3178	hsa-miR-4717-3p	hsa-mir-6736	
hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4725-3p	hsa-miR-6753-5p	

hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-4732-5p
hsa-miR-1180-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-486-3p
hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-505-3p
hsa-miR-3196	hsa-mir-378c	hsa-miR-548p
hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-3960	hsa-miR-6511b-3p

Figura 36: Listas finales de miRNAs candidatos para ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico temprano del CaM. A partir del análisis de los resultados producto de los microarreglos de expresión y miRNA-seq, se obtuvieron dos listas de miRNAs para ser luego validadas. El recuadro señalado en color rosa proviene de los resultados obtenidos por microarreglos de expresión y el azul por secuenciación. En negrita se observan aquellos miRNAs que se lograron poner a punto y con los que se continuó la validación.

Una vez obtenidas las listas de miRNAs candidatos indicadas en la Figura 36, se procedió a la puesta a punto de alrededor de 34 oligos seleccionados al azar para poder llevar a cabo las RT-qPCRs correspondientes. Para ello, se diseñaron oligos siguiendo el método del *Stem-loop*. A continuación, se aisló miRNAs a partir del plasma de las pacientes con CaM o VS de la cohorte exploratoria. Se armó una muestra que contenía 1 ul de cada paciente con CaM (n=30) de esta cohorte y otra que contenía 1 ul de cada VS (n=36). Estas muestras combinadas, fueron utilizadas para la puesta a punto de la RT-qPCR de los 34 miRNAs candidatos. Dado que el método del *Stem-loop* utilizado para la identificación de miRNAs suele ser complejo, se logró poner a punto solo 11 de los 34 oligos, identificados en negro en la Figura 36, y fue con esos 11 con los que se continuó el análisis.

Validación de los miRNAs candidatos

Cohorte exploratoria

Una vez puesta a punto la RT-qPCR de los 11 miRNAs candidatos, se continuó con la validación de los mismos mediante el uso de *stem-loop* RT-qPCR. Para ello, se utilizó el ARN de plasma de 30 pacientes con CaM y 36 VS pertenecientes a la cohorte exploratoria, se sintetizó cDNA y luego se realizó la qPCR como se describe en Materiales y Métodos. De los 11 miRNAs candidatos, los miRNAs miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, miR-150-5p, miR-335-5p, miR-339-3p y miR-574-3p se encontraban aumentados en circulación de pacientes con CaM respecto a VS, en línea con lo encontrado a partir de los microarreglos de expresión y la secuenciación de miRNAs, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el caso de los miRNAs miR-21-5p, miR-106b-3p, miR-125a-5p y miR-339-5p (Figura 37).

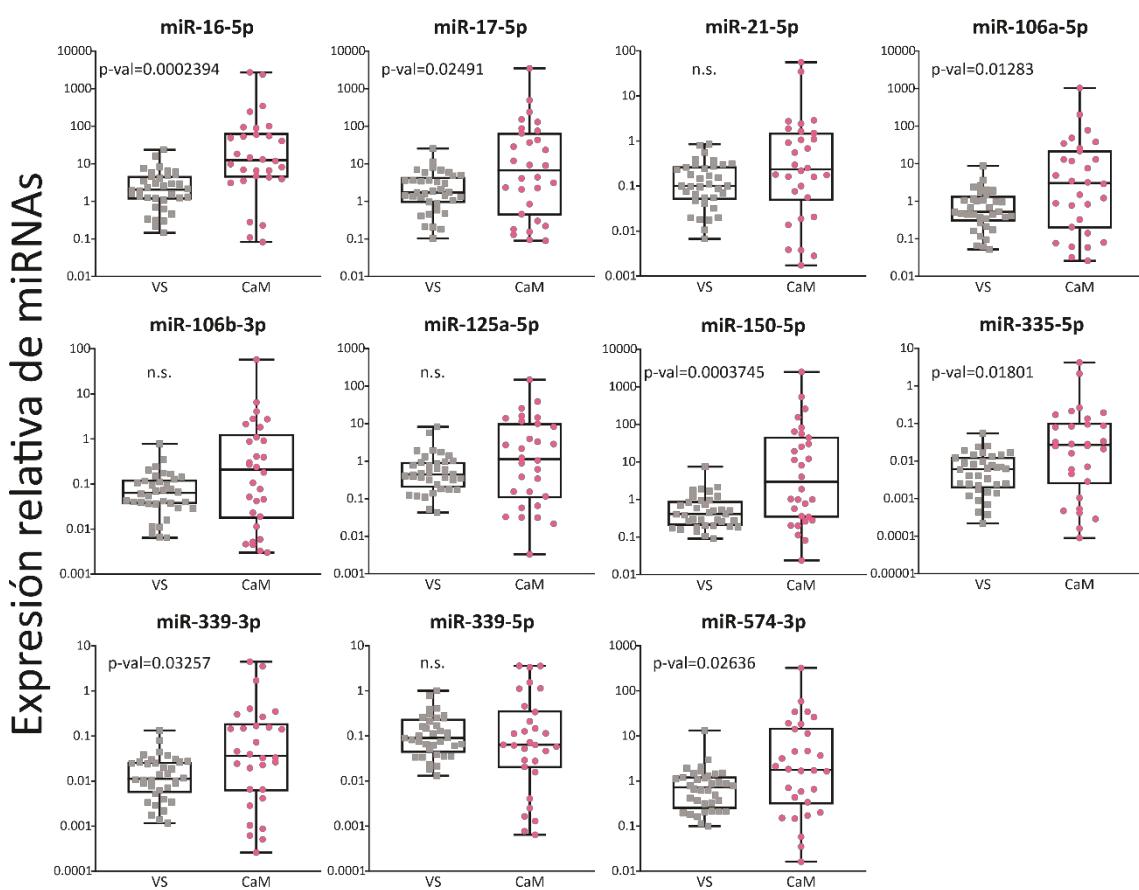


Figura 37: Validación de miRNAs candidatos en la cohorte exploratoria. Expresión de los miRNAs circulantes indicados medidos por *stem-loop* RT-qPCR a partir de plasma de pacientes con CaM (n=30) o voluntarias sanas (VS) (n=36). Los datos se encuentran normalizados al *spike-in* cel-miR-39-3p. Se muestran gráficos de cajas indicando con puntos cada muestra individualmente para mostrar la variabilidad correspondiente a cada grupo experimental. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test

de Wilcoxon o de la mediana, según correspondiera. El término n.s. se utilizó cuando las diferencias no fueron significativas

Utilizando los datos de expresión de la qPCR, se realizó una curva ROC para cada uno de los miRNAs candidatos. La misma proporciona información acerca de que tan buen biomarcador es el miRNA para poder diferenciar entre una paciente con CaM de una VS. Para tal fin, se calcula el valor del área bajo la curva o AUC. Los valores de la misma pueden ir entre 0,5 y 1. Un valor de AUC de 0,5 indica que la expresión del miRNA no sirve para discriminar entre enfermos y sanos, dado que tiene 50% de probabilidades de diagnosticar como enfermo y 50% de diagnosticar como sano, un AUC entre 0,7 y 0,8 es considerado aceptable, entre 0,8 y 0,9 muy bueno y por encima de 0,9 se considera excelente.

En la Figura 38 se observa que los miRNAs miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, miR-150-5p, miR-335-5p, miR-339-3p y miR-574-3p son buenos biomarcadores para diferenciar entre sanos y enfermos, dado que sus AUC dan valores por encima de 0,5, estando la mayoría entre 0,6 y 0,8. Por otro lado, los miRNAs miR-21-5p, miR-106b-3p, miR-125a-5p y miR-339-5p no serían buenos para diferenciar entre sanos y enfermos dado que sus AUC son cercanas a 0,5 (Figura 38).

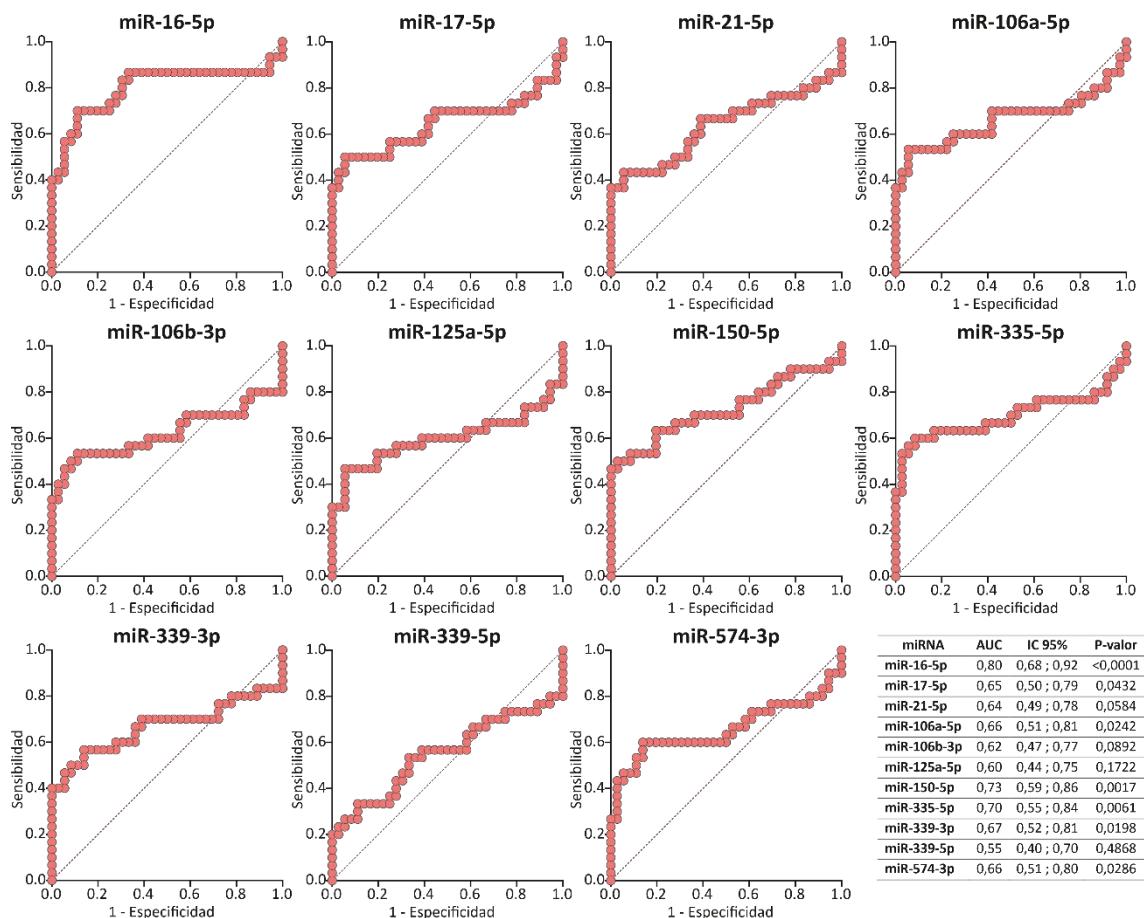


Figura 38: Curvas ROC correspondientes a los miRNAs medidos en la cohorte exploratoria.
 Utilizando los datos de expresión de los 11 miRNAs candidatos medidos mediante stem-loop RT-qPCR a partir de plasma de pacientes con CaM (n=30) y VS (n=36), se realizaron las curvas ROC correspondientes utilizando modelos logísticos. Se calcularon los valores de área bajo la curva (AUC), sus correspondientes intervalos de confianza (IC) y los p-valores asociados, los cuales se observan en la tabla de la esquina inferior derecha. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

Cohorte validatoria

Se utilizó una segunda cohorte de pacientes independiente con CaM y VS con mayor número de muestras para realizar una validación más robusta, ya que estos nuevos individuos (exceptuando los 10 utilizados para la secuenciación de miRNAs) no habían sido utilizados en la etapa de la identificación de los biomarcadores. Por lo tanto, a partir de plasma de 100 pacientes con CaM y 73 VS, se aislaron miRNAs circulantes, se sintetizó cDNA y se realizaron las qPCR respectivas para los 11 miRNAs identificados.

En este caso, se observó que los 11 miRNAs se encontraban significativamente aumentados en circulación de pacientes con CaM respecto a VS (Figura 39), coincidiendo con lo encontrado a partir de microarreglos de expresión y de secuenciación de miRNAs.

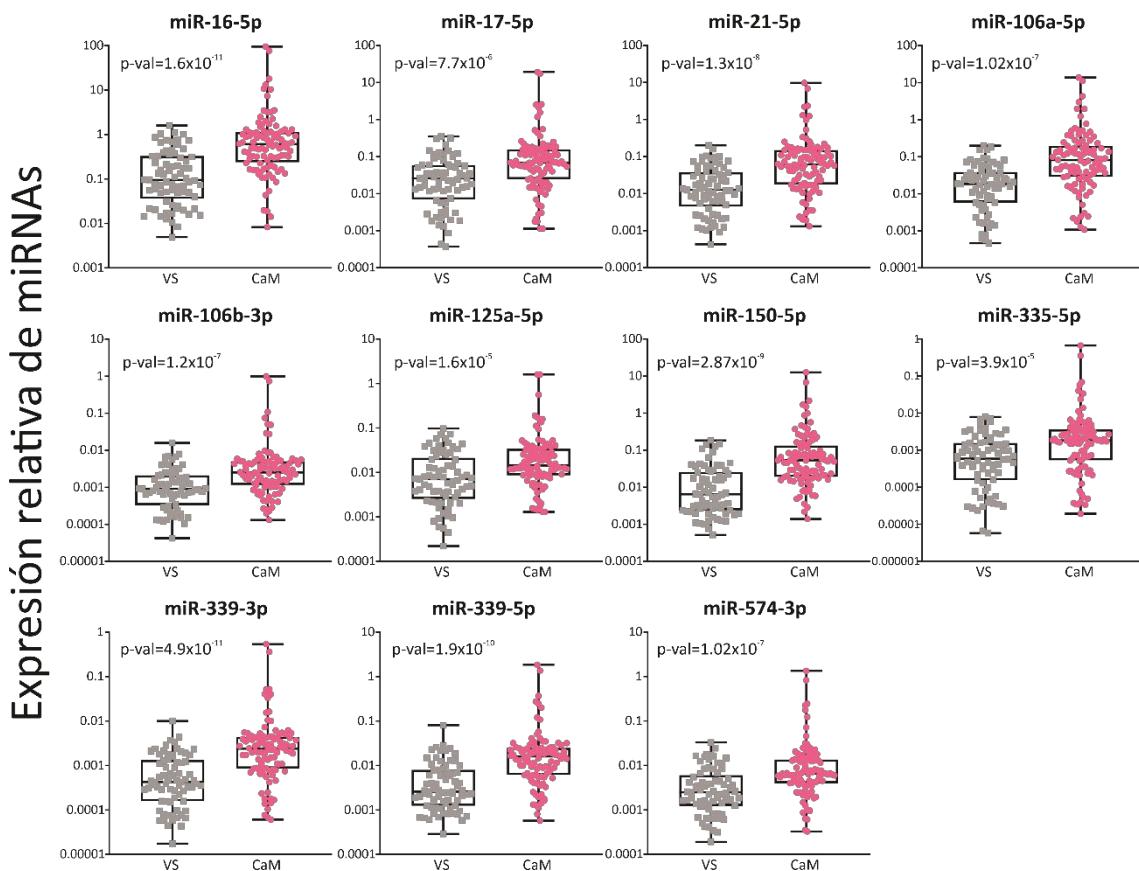


Figura 39: Validación de miRNAs candidatos en la cohorte validatoria. Expresión de los miRNA circulantes indicados medidos por *stem-loop* RT-qPCR a partir de plasma de pacientes con CaM (n=100) o VS (n=73). Los datos se encuentran normalizados al *spike-in* cel-miR-39-3p. Se muestran gráficos de cajas indicando con puntos cada muestra individualmente para mostrar la variabilidad correspondiente a cada grupo experimental. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Wilcoxon o de la mediana, según correspondiera.

A su vez, también se realizaron todas las curvas ROC asociadas a cada uno de los miRNAs en esta segunda cohorte de más individuos, y se encontró que los 11 miRNAs son buenos biomarcadores para diferenciar a una paciente enferma de un individuo sano, ya que los valores de AUC en este caso rondaron aproximadamente entre 0,7 y 0,8 (Figura 40).

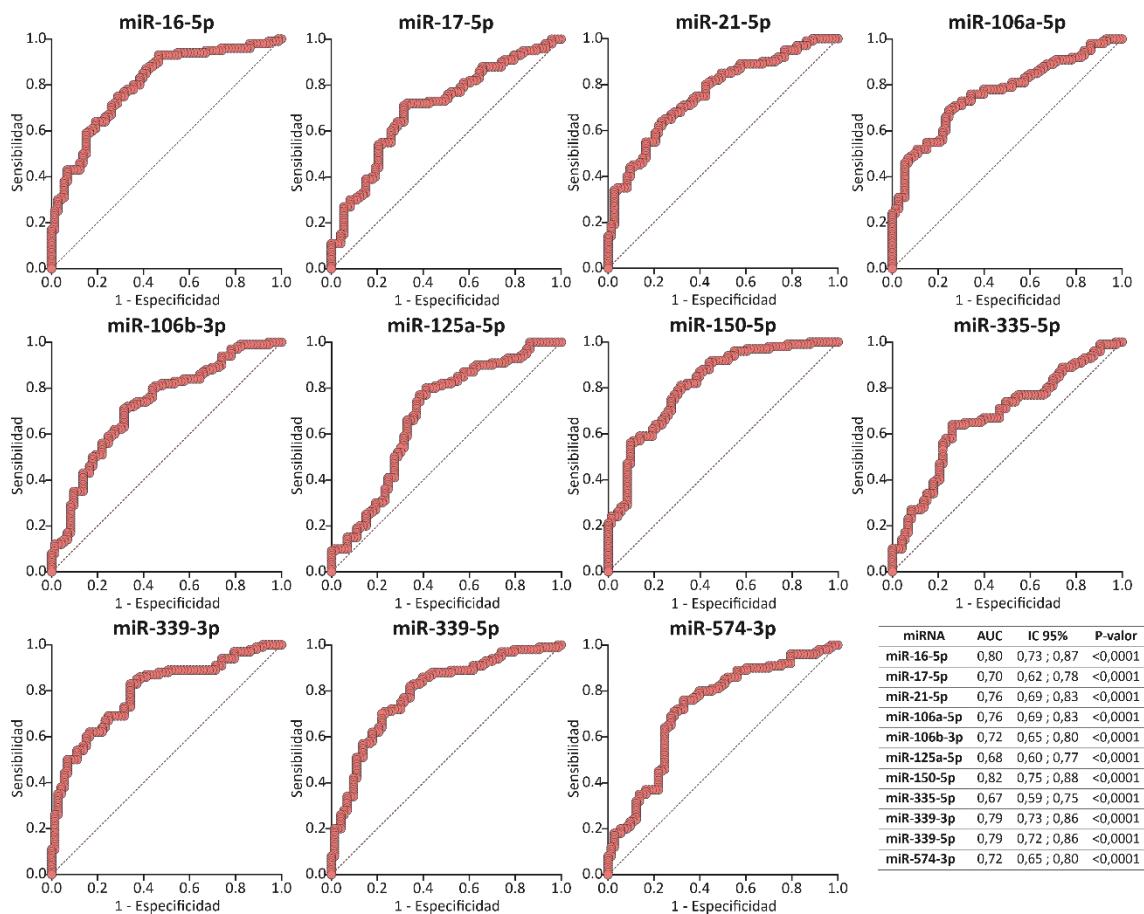


Figura 40: Curvas ROC correspondientes a los miRNAs medidos en la cohorte validatoria. Utilizando los datos de expresión de los 11 miRNAs candidatos medidos mediante *stem-loop* RT-qPCR a partir de plasma de pacientes con CaM (n=100) y VS (n=73), se realizaron las curvas ROC correspondientes utilizando modelos logísticos. Se calcularon los valores de área bajo la curva (AUC), sus correspondientes intervalos de confianza (IC) y los p-valores asociados, los cuales se observan en la tabla de la esquina inferior derecha. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

Cohorte validatoria externa *in silico*

Finalmente, dado que los análisis realizados anteriormente con ambas cohortes (exploratoria y validatoria) fueron en pacientes de distintos hospitales dentro de Argentina, y en particular en CABA y GBA sin contemplar demasiada heterogeneidad, se propuso comprobar que los miRNAs encontrados también se encontrarían aumentados en cohortes de pacientes con CaM y VS en otros países, con ambientes diferentes, alimentación, etc. Para ello, se obtuvieron datos de microarreglos de expresión realizados a partir de suero de 1272 pacientes con CaM y 1272 VS procedentes del National Cancer Center Hospital (NCCH) de Japón (Shimomura et al. 2016). Una vez obtenidos los datos de expresión, se procedió a analizar la expresión de los 11 miRNAs

candidatos en esta nueva cohorte, que se denominó validatoria externa *in-sílico*. Gratamente, se encontró que los 11 miRNAs se encontraban significativamente aumentados en circulación de pacientes con CaM respecto a VS tal como se observó en la cohorte validatoria (Figura 41).

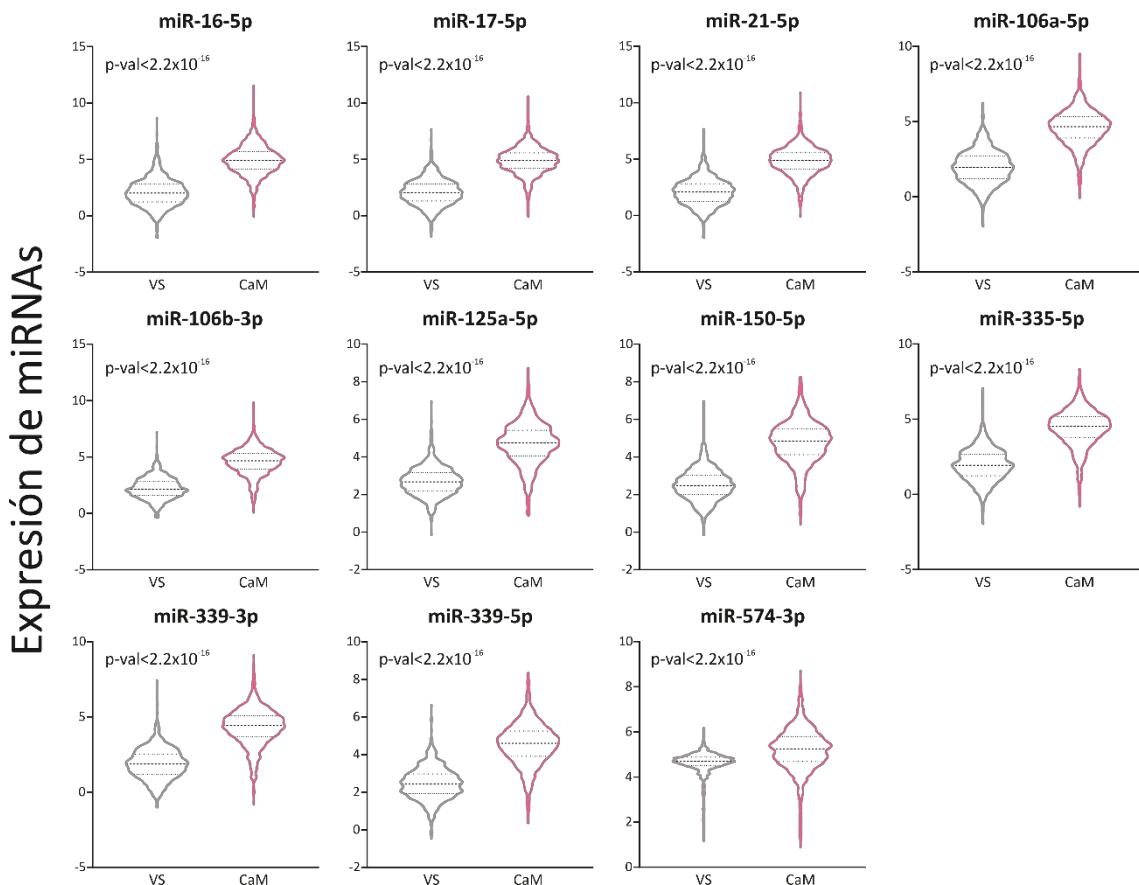


Figura 41: Validación de miRNAs candidatos en la cohorte validatoria externa *in-sílico*. Expresión de los miRNA circulantes indicados obtenidos a partir de repositorios públicos. Los mismos fueron medidos mediante microarreglos de expresión a partir de suero de pacientes con CaM (n=1.272) o VS (n=1.272). Se realizaron gráficos de violín para mostrar la variabilidad correspondiente a cada grupo experimental junto con los valores de su mediana y densidad. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Wilcoxon o de la mediana, según correspondiera.

Así como se calcularon las curvas ROC en las dos cohortes anteriores, en esta cohorte externa validatoria *in-sílico* también se calcularon utilizando los datos de expresión de los microarreglos para cada uno de los miRNAs candidatos. Se encontró que los 11 miRNAs son excelentes biomarcadores dado que todos presentaron valores de AUC por encima de 0,9 a excepción del miR-574-3p que presentó un AUC de 0,7, siendo considerado un biomarcador aceptable (Figura 42).

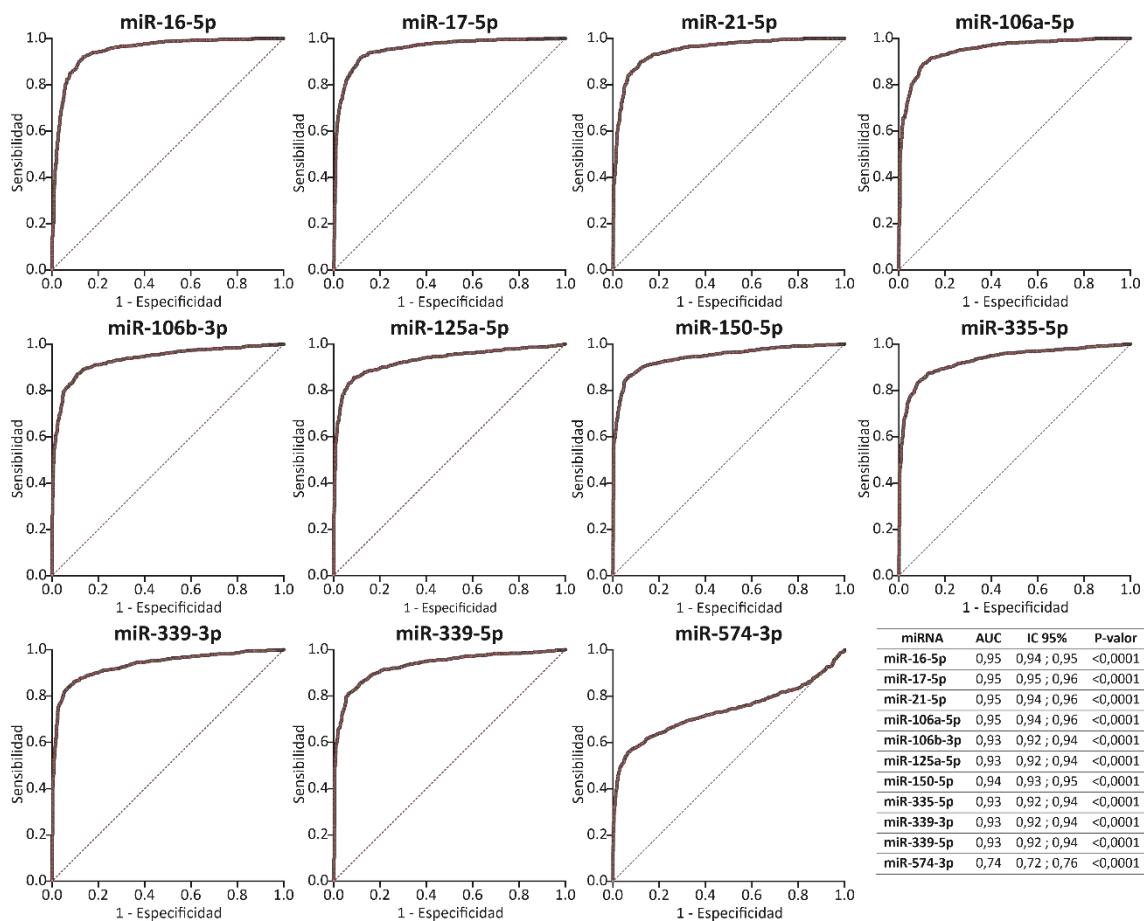


Figura 42: Curvas ROC correspondientes a los miRNAs medidos en la cohorte validatoria externa *in-silico*. Utilizando los datos de expresión de los 11 miRNAs candidatos obtenidos de repositorios públicos, medidos mediante microarreglos de expresión a partir de suero de pacientes con CaM (n=1.272) y VS (n=1.272), se realizaron las curvas ROC correspondientes utilizando modelos logísticos. Se calcularon los valores de área bajo la curva (AUC), sus correspondientes intervalos de confianza (IC) y los p-valores asociados, los cuales se observan en la tabla de la esquina inferior derecha. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

De esta manera, se puede concluir que, a partir de la utilización de microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs, y mediante la validación por stem-loop RT-qPCR a partir de muestras de plasma y suero de pacientes con CaM y VS, se identificaron 11 miRNAs que podrían ser utilizados en la clínica como biomarcadores de la enfermedad.

Análisis de los miRNAs candidatos en muestras de pacientes

Existe evidencia que indica que la expresión de un miRNA a nivel de tejido tumoral no necesariamente condice con el comportamiento de dicho miRNA en circulación en el contexto de una enfermedad como podría ser el cáncer. Es por ello que en el presente

trabajo se analizó la expresión de los miRNAs candidatos a ser utilizados como biomarcadores en circulación en tejido tumoral y TNA utilizando datos obtenidos de la herramienta bioinformática XENA. Este análisis se realizó de manera puramente descriptiva en una cohorte de pacientes de la que se disponía de información, ya que, para hacer una comparación más rigurosa y sobre la cual hacer conclusiones comparando miRNAs circulantes y tumorales, se debería haber analizado, de las mismas pacientes utilizadas anteriormente, la expresión de los miRNAs tanto en los tumores con en TNA, tejidos que no se encuentran a disposición, dado que no se logró conseguir una cantidad suficiente de tejido tumoral y normal adyacente para comparar en las pacientes enroladas.

Expresión de los miRNAs comparando CaM y TNA

A partir de los datos de expresión de miRNAs obtenidos de la herramienta bioinformática XENA, se analizó la expresión de los 11 miRNAs candidatos mencionados anteriormente en tejido tumoral y en TNA de manera pareada para 75 individuos. Se encontró que los miRNAs hsa-miR-16-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-106a-5p y miR-339-3p estaban aumentados, mientras que los miRNAs hsa-miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-335-5p y miR-574-3p se encontraban disminuidos en tejido tumoral comparado con TNA (Figura 43). No se encontraron diferencias entre la expresión en CaM y TNA en el caso de los miRNAs miR-106b-3p y miR-339-5p (Figura 43).

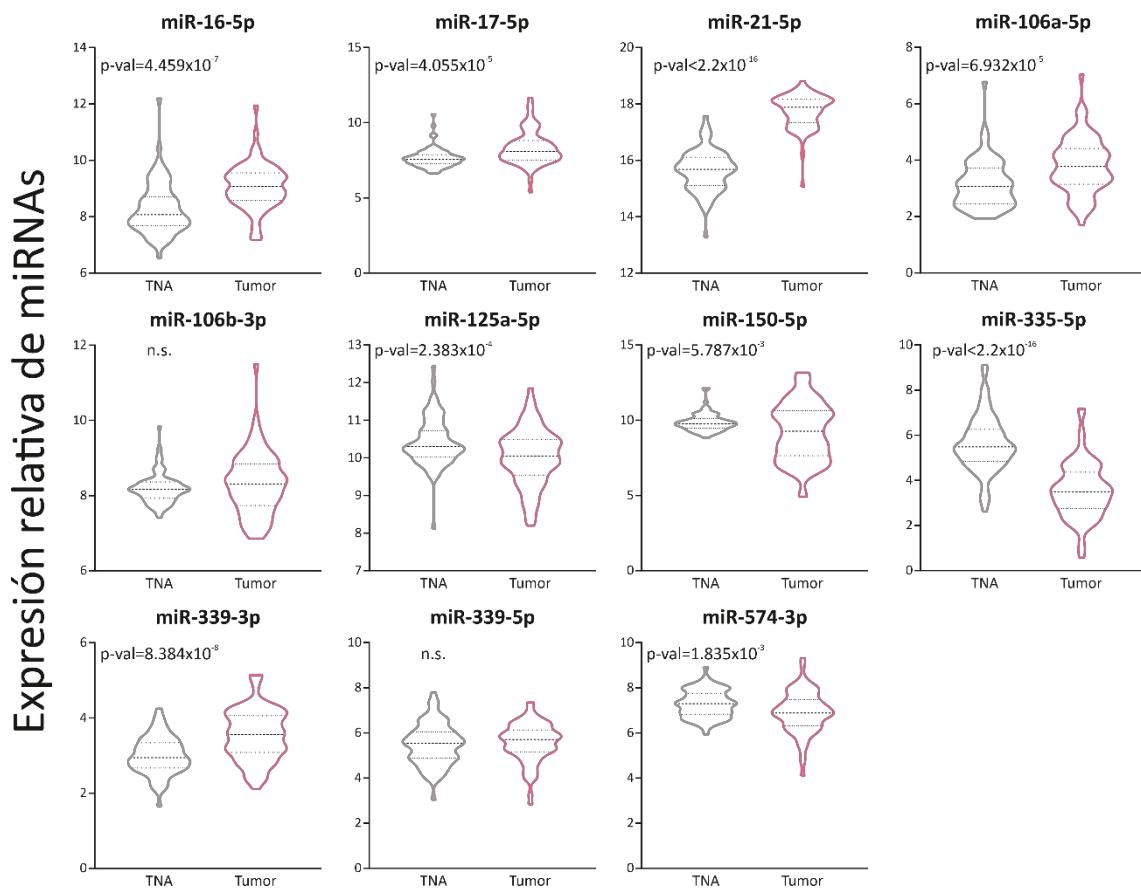


Figura 43: Expresión de miRNAs candidatos en tejido tumoral y normal adyacente. Los datos de expresión de los 11 miRNAs candidatos de tejido tumoral de CaM (Tumor) (n=75) y tejido normal adyacente (TNA) (n=75) informados como \log_2 (LPM+1) se obtuvieron utilizando la herramienta bioinformática XENA. Se muestran gráficos de violín para indicar la variabilidad correspondiente a la expresión de los miRNAs en cada tejido junto con los valores de su mediana y densidad. Los datos graficados corresponden a muestras pareadas de las que se obtuvieron tanto tejido tumoral como TNA. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T pareada o test de Wilcoxon, según correspondiera. El término n.s. fue utilizado cuando no existieron diferencias significativas.

Expresión de los miRNAs comparando al CaM por subtipos y por estadios

Considerando que existen diferencias en la expresión de los miRNAs candidatos según se expresen en tumores o TNA, y utilizando nuevamente los datos obtenidos de XENA, se evaluó la expresión de los 11 miRNAs candidatos en tejido tumoral separándolo respecto a su clasificación PAM50 en Luminales A, Luminales B, Her2 y Basales, y por otro lado se los agrupó en tumores en ET de la enfermedad (0-II) y en EA (III-IV), de manera de evaluar si había alguna correlación entre el aumento de la expresión de miRNAs en tejido tumoral y subtipos más agresivos de la enfermedad o estadios avanzados. Este mismo análisis se quiso realizar utilizando datos de miRNAs circulantes

en plasma o suero de pacientes con CaM y VS, pero no existen al día de la fecha conjuntos de datos que reporten los estadios y subtipos correspondientes a las pacientes junto con la expresión de los miRNAs circulantes

Respecto a la evaluación de la expresión de los miRNAs separando las muestras de tejido por subtipo, se pudo observar que en el caso de los miRNAs hsa-miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, miR-106b-3p, miR-150-5p, miR-339-3p, miR-339-5p y miR-574-3p, su expresión se encontraba aumentada en mayor medida en subtipos más agresivos como ser el basal, independientemente de que se encontraran aumentados o disminuidos en tejido tumoral respecto a TNA (Figura 44). En el caso del hsa-miR-125a-5p, se encontró el comportamiento contrario, siendo que se encontraba aumentado en subtipos menos agresivos como Luminal A y B respecto a la expresión en los tumores Her2 (Figura 44). Finalmente, no hubo diferencias significativas en la expresión del hsa-miR-335-5p separando a los tumores por subtipos (Figura 44).

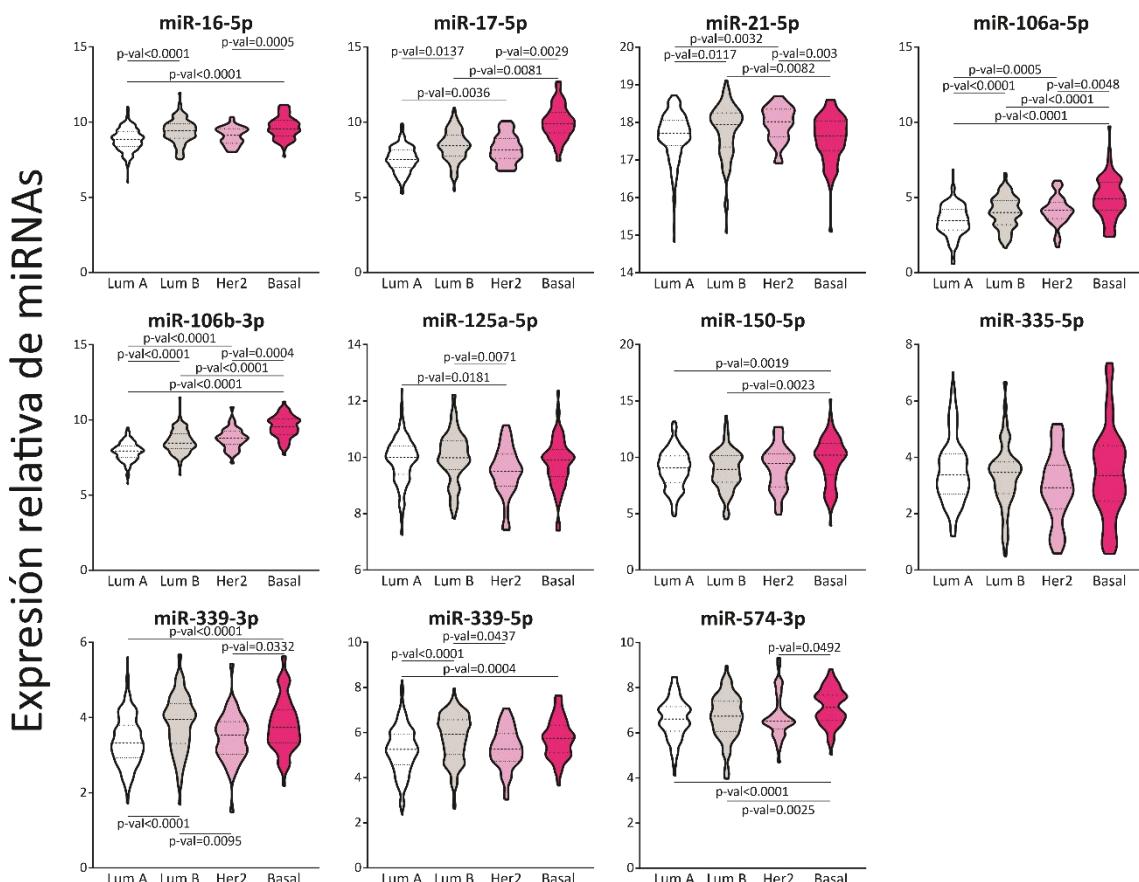


Figura 44: Expresión de miRNAs candidatos en tejido tumoral separado según su PAM50. Los datos de expresión de los 11 miRNAs candidatos de tejido tumoral de CaM (n=490) informados como \log_2 (LPM+1) se obtuvieron utilizando la herramienta bioinformática XENA. Se muestran los gráficos de violín correspondientes para indicar la variabilidad correspondiente a la expresión

de los miRNAs en cada subtipo junto con los valores de su mediana y densidad. Los tumores se dividieron en Luminales A (n=250), Luminales B (n=114), Her2 (n=43) y Basales (n=83). La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando ANOVA de una vía seguida de Tukey o Mann-Whitney seguido de Dunn, según correspondiera. Solo se informaron los p-valores significativos en el gráfico.

Luego, se evaluó la expresión de los miRNAs en tejido tumoral, separando las muestras en ET y EA. Se encontró que solamente en el caso del hsa-miR-339-3p había un aumento en la expresión de este miRNA en tumores en EA respecto a ET (Figura 45).

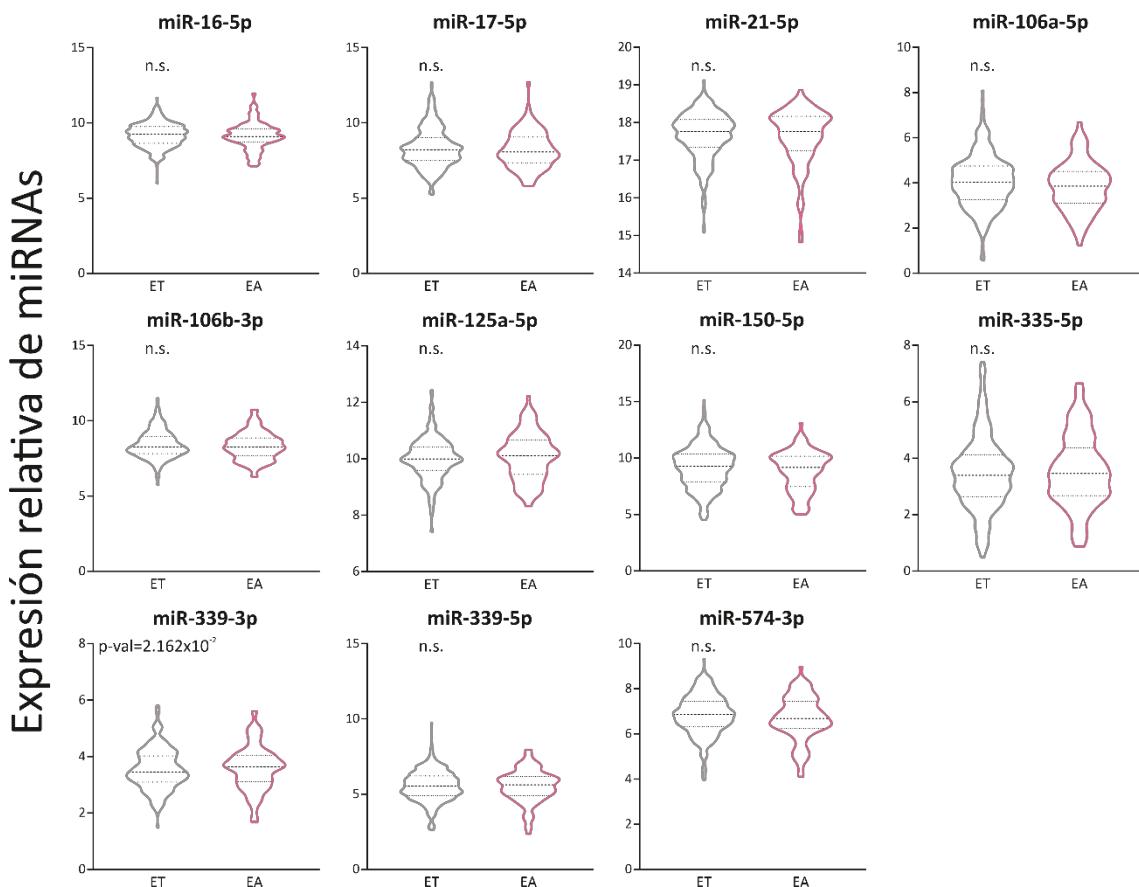


Figura 45: Expresión de miRNAs candidatos en tejido tumoral separado en estadios avanzados o tempranos. Los datos de expresión de los 11 miRNAs candidatos de tejido tumoral de CaM (n=445) informados como \log_2 (LPM+1) se obtuvieron utilizando la herramienta bioinformática XENA. Se muestran los gráficos de violín correspondientes para indicar la variabilidad correspondiente a la expresión de los miRNAs en cada estadio junto con los valores de su mediana y densidad. Los tumores se dividieron en estadios tempranos (ET), agrupando los comprendidos entre I y II (n=345) y estadios avanzados (EA) agrupando los comprendidos entre III y IV (n=100). La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Wilcoxon o test de la mediana según correspondiera. El término n.s. fue utilizado cuando no existieron diferencias significativas.

En función de estos resultados, se puede concluir que los miRNAs biomarcadores candidatos para el diagnóstico de CaM tienen distinta expresión al comparar tumor y plasma, no observándose correlación en todos los casos. Sin embargo, los 11 miRNAs parecerían estar involucrados en fenotipos más agresivos de la enfermedad ya que se encuentran aumentados en subtipos con peor pronóstico.

**Capítulo 4: Desarrollo, selección y
comparación de modelos predictivos para
el diagnóstico del CaM**

El último objetivo específico del presente trabajo fue establecer un modelo predictivo para el diagnóstico del CaM para ser utilizado, en un futuro, para tamizaje del CaM en la clínica. La pregunta principal a responder fue: *¿Cuál es la combinación óptima de estos 11 miRNAs para realizar un diagnóstico con la mayor sensibilidad posible y el menor número de miRNAs?* Para ello se utilizaron distintas herramientas de *machine learning* para establecer el modelo que mejor permita diferenciar entre pacientes con CaM e individuos sanos, utilizando como variables explicativas el Ln de la expresión de determinados miRNAs en plasma medidos mediante *stem-loop RT-qPCR*. Para tal fin, se utilizaron las técnicas de selección de variables Random-Forest y Regresión de Lasso, basadas en el uso de algoritmos matemáticos que permiten establecer automáticamente variables relevantes para ser utilizadas en la construcción de los modelos predictivos. A su vez, también se tuvo en cuenta, para la selección de variables, aquellas que fueran significativas en los diversos modelos elegidos. También se utilizó la regresión logística combinada con *leave one out cross validation* (LOOCV) como método para la construcción del modelo predictivo. Luego, para elegir el modelo óptimo, se compararon las métricas de cada uno y la cantidad de miRNAs que incluía cada modelo, y se eligió aquel que tuviera mayor sensibilidad y menor número de miRNAs. Finalmente, se analizó la combinación de miRNAs elegida en diversos tipos de cáncer para establecer si dicha combinación era específica para el diagnóstico del CaM o si podría ser útil en el diagnóstico de otros tipos de cáncer.

Es muy importante mencionar que este capítulo del trabajo de tesis pudo llevarse a cabo debido a que, en paralelo con la carrera de doctorado, la Licenciada Paula L. Farré, cursó y aprobó la carrera de Especialización en Estadística para Ciencias de la Salud en la FCEN, UBA, pudiendo consultar además a expertos en bioestadística acerca de los análisis y modelos aplicados.

Selección de un grupo de miRNAs para el diagnóstico del CaM

A la hora de realizar un modelo predictivo, lo primero que se debe realizar es un análisis de los datos con los que se va a trabajar, y tratar de que sean lo más homogéneos posibles. En el presente trabajo de tesis, las variables a ser utilizadas para la elección del modelo óptimo fueron la expresión en plasma de los 11 miRNAs medidas mediante

stem-loop RT-qPCR transformados con el Ln, de manera de garantizar que los datos se comportaran de manera normal. Luego, utilizando las técnicas de selección de variables automatizadas Regresión de Lasso y Random Forest, se seleccionaron distintas combinaciones de miRNAs para luego ser modelizados. En este capítulo se introducirán distintos conceptos de *machine learning* de manera simplificada para permitir al lector la correcta comprensión de las técnicas utilizadas hasta la selección del modelo final, debido a que no es el foco del presente trabajo el trasfondo algebraico inherente a los distintos algoritmos matemáticos.

Técnicas de *machine learning* utilizadas en la selección de miRNAs

✓ Regresión de Lasso:

La técnica de Regresión de Lasso se basa en un modelo matemático que penaliza de manera automática aquellas variables que sean menos relevantes para el modelo o que no den nueva información, de manera de eliminarlas. Esto permite elegir aquellas variables que hayan “sobrevivido” a la técnica de selección de manera objetiva. El coeficiente que usa Lasso para penalizar se denomina Lambda (λ), y a medida que el valor de este crece, el número de variables que sobreviven disminuye.

Para utilizar esta técnica de selección en el presente trabajo, se utilizaron la expresión de los 11 miRNAs candidatos transformada como se mencionó anteriormente y, utilizando el software RStudio, se procedió con el análisis. Como resultado de la aplicación del algoritmo, el programa devuelve una serie de gráficos que dan cuenta de la selección que se realizó. Lo que se observa en la Figura 46 es, por un lado, la representación de cada uno de los 11 miRNAs con una línea de color determinada. Luego, se observa la manera en que se van penalizando cada uno de los miRNAs al ir desapareciendo las líneas correspondientes a medida que se avanza sobre el eje X de izquierda a derecha (Figura 46).

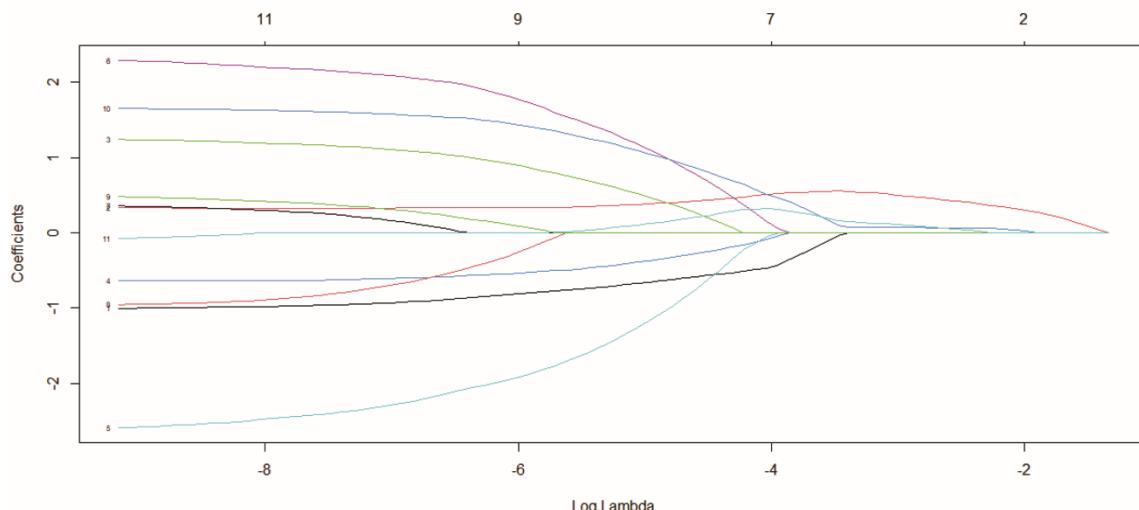


Figura 46: Gráfico de la penalización de los coeficientes mediante Regresión de Lasso. Utilizando el \log_{10} de la expresión de los miRNAs candidatos medida mediante *stem-loop RT-qPCR*, se realizó la selección automática de variables mediante la Regresión de Lasso. En el eje X superior se informa la cantidad de variables que sobreviven a la selección a medida que aumenta el valor del coeficiente de penalización Lambda. Cada línea de color representa una variable (miRNA) determinado.

En la parte superior del gráfico (Figura 46), los números que se observan son la cantidad de miRNAs que fueron sobreviviendo en cada punto, y denota que, a medida que se avanza en el eje X, estos números disminuyen. En la parte inferior del gráfico (Figura 46), se observa el valor del logaritmo de Lambda, y se ve como, a medida que crece el mismo, los miRNAs van desapareciendo hasta que finalmente todos toman valor cero.

La regresión de Lasso luego permite definir de manera automática cuál es el número óptimo de miRNAs a incluir en el modelo, y de qué miRNAs se trata. En la Figura 47 se puede ver que se definieron 8 miRNAs como el número óptimo, valor que se encuentra definido en la parte superior del gráfico delimitada por las líneas azul y naranja. En particular, los 8 miRNAs seleccionados por este método fueron: miR-150-5p, miR-106a-5p, miR-125a-5p, miR-17-5p, miR-339-5p, miR-339-3p, miR-335-5p y miR-16-5p.

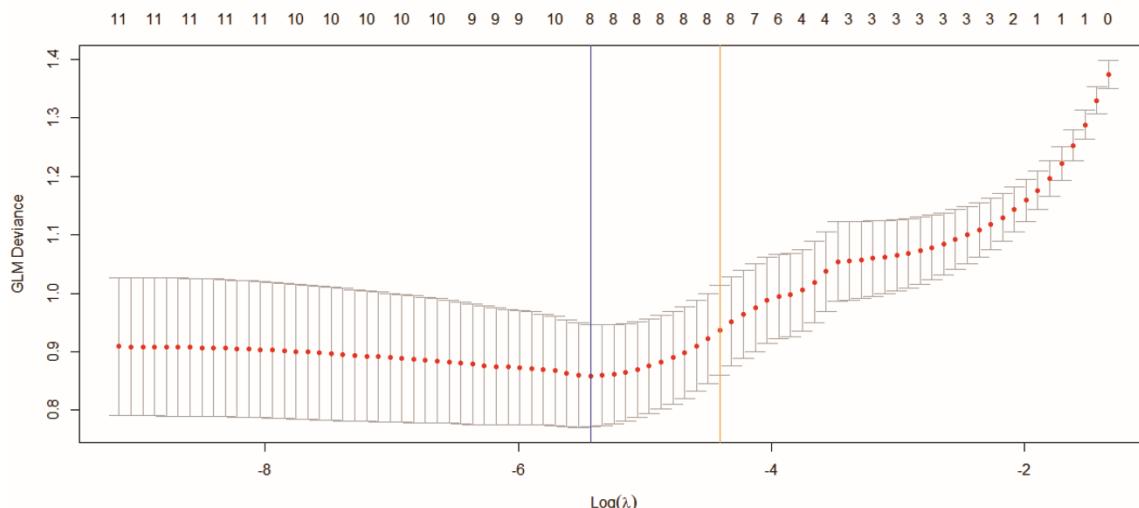


Figura 47: Gráfico del número óptimo de variables seleccionada automáticamente mediante Regresión de Lasso. Utilizando el \log_{10} de la expresión de los miRNAs candidatos medida mediante *stem-loop* RT-qPCR, se realizó la selección automática de variables mediante la Regresión de Lasso. En el eje X superior se informa la cantidad óptima de miRNAs en cada valor del coeficiente de penalización Lambda (eje X inferior). Las líneas de color azul y naranja delimitan el número óptimo de miRNAs seleccionado automáticamente mediante algoritmos matemáticos.

✓ Random Forest

Otra técnica que se utilizó en la selección de miRNAs para ser utilizados en modelos predictivos fue la de Random Forest. La misma consiste en un algoritmo que, mediante árboles de decisiones, da como resultado un ranking de variables, de la más importante a la menos importante según este algoritmo, a la vez que determina nodos o saltos en la importancia de las variables, que permiten hacer una selección de variables más clara. En particular en este trabajo, el ranking obtenido por Random Forest se detalla en la Figura 48. En la misma, se puede observar cómo los miRNAs miR-150-5p, miR-16-5p, miR-106a-5p, miR-339-3p y miR-339-5p fueron clasificados en el ranking como los 5 más importantes según el orden de aparición y se estableció un salto entre estos y los siguientes miRNAs demostrado con el cambio en el valor del MeanDecreaseAccuracy asociado a cada miRNA.

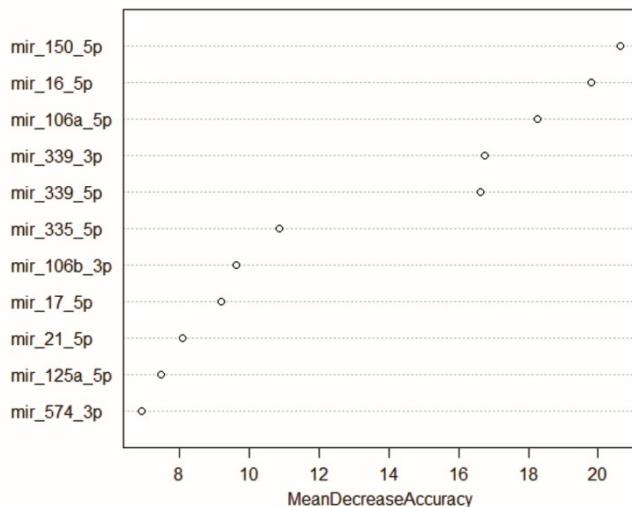


Figura 48: Gráfico de ranking de miRNAs obtenidos mediante Random Forest. Utilizando el \log_{10} de la expresión de los miRNAs candidatos medida mediante *stem-loop* RT-qPCR, se realizó la selección automática de variables mediante Random Forest. Los miRNAs más importantes seleccionados mediante esta técnica se informaron en orden descendiente. Los nodos para tomar decisiones sobre que subgrupo de miRNAs elegir se observan en las distancias existentes entre los círculos vacíos correspondientes a cada miRNA en particular.

En conclusión, utilizando técnicas de machine learning se logró establecer dos subgrupos de miRNAs particulares. El primero, conformado por 8 miRNAs (miR-150-5p, miR-106a-5p, miR-125a-5p, miR-17-5p, miR-339-5p, miR-339-3p, miR-335-5p y miR-16-5p) identificado utilizando la Regresión de Lasso y un segundo subgrupo, conformado por 5 miRNAs (miR-150-5p, miR-16-5p, miR-106a-5p, miR-339-3p y miR-339-5p) definido mediante el uso de Random Forest. Estos conjuntos serán a continuación los utilizados en la construcción de modelos predictivos para el diagnóstico temprano del CaM.

Modelos predictivos propuestos

Luego de establecidos los subgrupos de miRNAs candidatos, se procedió a la construcción de los modelos predictivos utilizando los valores de Ln de la expresión de dichos miRNAs circulantes medidos mediante *stem-loop* RT-qPCR en plasma de pacientes con CaM o VS mediante el uso de técnicas de *machine learning*. En particular, se utilizó la regresión logística, ya que permite generar un modelo que dé como

resultado la probabilidad que tiene un individuo de tener o no determinada condición o enfermedad. Esto permite clasificar a distintos individuos como sanos o enfermos teniendo en cuenta la probabilidad calculada para cada uno por el modelo predictivo. Otro punto importante a tener en cuenta es que la regresión logística también evaluará si cada una de las variables (los miRNAs en este caso) utilizadas en el modelo son relevantes o no, con un p-valor asociado. Aquellas que no fueran estadísticamente significativas, serán eliminadas del modelo predictivo.

A su vez, la regresión logística se combinó con el uso de LOOCV. A los fines del presente trabajo, y de manera simplificada, es un algoritmo que permite realizar una validación cruzada más robusta utilizando cantidades de individuos no tan grandes, como fue en este caso, y permite obtener métricas más confiables, concepto que se introducirá más adelante.

Para el presente trabajo, se construyeron en total 5 modelos predictivos, tal como se observa en la Figura 49. El Modelo 1 estuvo conformado por los 11 miRNAs candidatos; el Modelo 2 estuvo conformado por 5 miRNAs (miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p, miR-335-5p y miR-16-5p), aquellos que fueron estadísticamente significativos en el Modelo 1. Luego, se construyó el Modelo 5 a partir de los miRNAs identificados por Random Forest (miR-150-5p, miR-16-5p, miR-106a-5p, miR-339-3p y miR-339-5p), donde solo fue significativo el miR-150-5p. También se construyó el Modelo 3 utilizando los miRNAs identificados mediante la Regresión de Lasso (miR-150-5p, miR-106a-5p, miR-125a-5p, miR-17-5p, miR-339-5p, miR-339-3p, miR-335-5p y miR-16-5p), que dio lugar al Modelo 4, conformado por 4 miRNAs (miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p), que fueron los estadísticamente significativos del Modelo 3 (que a su vez fueron los mismos 4 miRNAs significativos del Modelo 2). El criterio de selección final se realizó al comparar las métricas particulares de cada modelo.

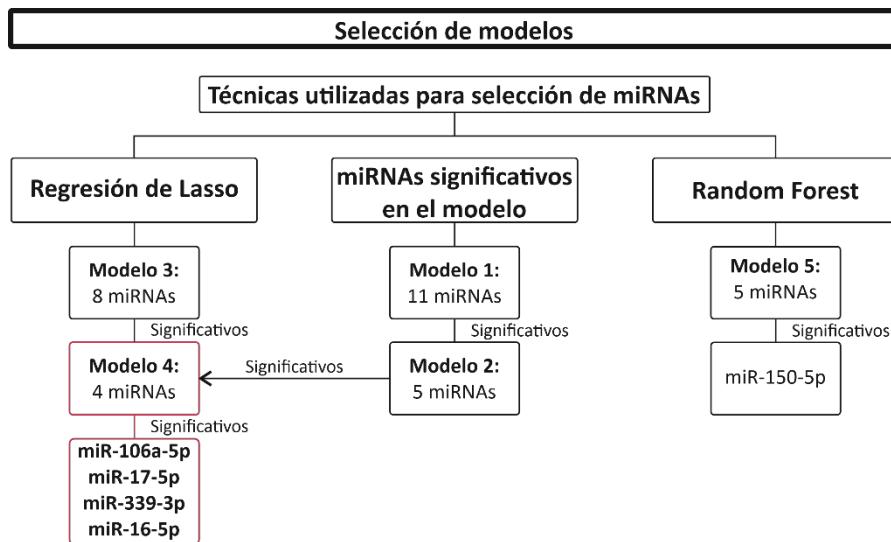


Figura 49: Esquema para la selección de modelos predictivos y técnicas utilizadas. Se utilizaron tres técnicas para la selección de modelos predictivos: Regresión de Lasso, Random Forest, y seleccionar los miRNAs que fueron significativos del modelo de los 11 miRNAs candidatos en conjunto. Se construyeron todos los modelos utilizando técnicas de machine learning y se seleccionó el mejor modelo, indicado en color rosa.

A la hora de elegir el mejor modelo posible, es muy importante definir el criterio que se utilizará para tal fin, el cual se basará en la métrica que busque destacar o maximizar/minimizar. Dentro de las métricas que se pueden calcular de un modelo, las 7 que se definen en la Figura 50 suelen ser las más utilizadas. Si, por ejemplo, se busca “no perderse” ningún individuo potencialmente enfermo, como es nuestro caso, se buscará aquel modelo que tenga mayor sensibilidad, dado que es preferible realizar otro análisis para descartar la enfermedad que sub-diagnosticarlo o, en otras palabras, tener una tasa un poco más alta de falsos positivos que de falsos negativos. Por otro lado, si se buscara descartar una enfermedad, se intentaría que la prueba o modelo a utilizar tenga una alta especificidad. Otras métricas interesantes son el *Accuracy* y la *Precisión* o *valor predictivo positivo*, dado que ambas dan cuenta de la performance del modelo. Ellas evalúan qué tan bien fueron clasificados tanto enfermos como sanos al usar el modelo y, por otro lado, qué tan bien fueron clasificados como positivos los individuos realmente enfermos respectivamente. A su vez, a la hora de evaluar el *valor predictivo negativo*, este parámetro habla también de qué tan bien funciona el modelo, al saber la proporción de individuos clasificados como negativos dentro de aquellos sanos. Finalmente, el *AUC ROC* combina tanto la especificidad como la sensibilidad como fue

mentionada anteriormente, y, a su vez, son muy útiles para determinar el punto de corte o *threshold* que se utilizará para clasificar a los individuos como sanos o enfermos. Este punto de corte es un valor de probabilidad, como el que se calcula para cada individuo del modelo, y se establece que, si el valor del individuo está por encima del punto de corte se clasificará como enfermo, y si se encuentra por debajo, como sano.

Definición de métricas de un modelo	
Sensibilidad	Porcentaje de individuos enfermos que son clasificados como positivos por el modelo
Especificidad	Porcentaje de individuos sanos que son clasificados como negativos por el modelo
AUC ROC	Área bajo la curva ROC que combina datos sensibilidad y especificidad para determinar el punto de corte
Accuracy	Porcentaje de individuos (enfermos y sanos) que fueron bien clasificados por el modelo del total de individuos analizados
Precisión (Valor predictivo positivo)	Porcentaje de verdaderos enfermos dentro de los que fueron clasificados como positivos por el modelo
Valor predictivo negativo	Porcentaje de individuos sanos dentro de los que fueron clasificados como negativos por el modelo
Tasa de falsos positivos	Porcentaje de individuos que fueron clasificados por el modelo como enfermos siendo sanos

Figura 50: Conjunto de definiciones sobre las métricas para medir la *performance* de un modelo predictivo. Se listan las siete métricas más utilizadas en el *machine learning* a la hora de comparar modelos y las definiciones de cada una.

En este trabajo, dado que se quiso generar un modelo predictivo para diagnóstico temprano, y en particular para ser utilizado a futuro en un primer tamizaje en la clínica, fue muy importante que el modelo tuviera la mayor sensibilidad posible. Otro punto importante fue la cantidad de miRNAs finalmente utilizados en este modelo, ya que, al minimizar el número de miRNAs, la implementación a futuro en la clínica podría ser de menor costo, ya que se deberían medir en el plasma de las pacientes un menor número de miRNAs circulantes.

Luego de realizar todos los modelos predictivos utilizando las técnicas de *machine learning* previamente descriptas, se calcularon las métricas asociadas a cada uno y se

enlistaron en la Tabla 6. En la misma se pueden observar todas las métricas de los modelos nombrados del 1 al 5 y los nombres de los miRNAs involucrados en cada modelo. El modelo elegido fue el Modelo 4 (comprendido por los miRNAs: miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p) ya que fue el que mostró la sensibilidad más alta de los 5, con un valor del 92%, seguida del Modelo 2 con una sensibilidad del 88%, luego el Modelo 1 con un 87% de sensibilidad, el Modelo 5 con un 85% y finalmente el Modelo 3 con un 77%. Respecto al resto de las métricas, solo se hará foco en las del modelo elegido.

En particular el Modelo 4 contó con una especificidad del 71%, un valor de *Accuracy* del 83%, una precisión del 81%, un valor predictivo negativo del 87% y una tasa de falsos positivos del 29%. El valor del AUC ROC fue similar en todos los modelos, lo que habla que, si bien el mejor modelo en cuanto a la sensibilidad fue el 4, todos son buenos modelos predictores para el CaM.

Tabla 6: Resumen de los miRNAs incluidos y las métricas obtenidas a partir de los modelos predictivos.

Modelos	miRNAs incluidos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUCROC	Accuracy (%)	Precision (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Tasa Falsos Positivos (%)
1	150-5p, 106b-3p, 106a-5p, 125a-5p, 17-5p, 574-3p, 339-5p, 339-3p, 335-5p, 16-5p, 21-5p	87	73	0,88	81	81	80	23
2	106a-5p, 17-5p, 339-3p, 335-5p, 16-5p	88	77	0,89	83	84	82	23
3	150-5p, 106a-5p, 125a-5p, 17-5p, 339-5p, 339-3p, 335-5p, 16-5p	77	86	0,89	81	89	73	14
4	106a-5p, 17-5p, 339-3p, 16-5p	92	71	0,89	83	81	87	29
5	150-5p, 106a-5p, 339-5p, 339-3p, 16-5p	85	66	0,8	77	77	76	34

Mediante el uso de *machine learning* se construyeron 5 modelos predictivos utilizando el \log_{10} de la expresión de miRNAs circulantes medida mediante *stem-loop RT-qPCR* a partir de plasma de pacientes con CaM y VS incluyendo distintas combinaciones de miRNAs. Se midieron las métricas correspondientes para medir la performance de los modelos.

Testeo del modelo propuesto en otros tipos de cáncer

Con el objetivo de analizar si la combinación de 4 miRNAs (miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p) obtenida por el modelo predictivo es específica para el diagnóstico

del CaM o si podría también estar detectando otros tipos de cáncer, se evaluaron datos obtenidos de repositorios públicos de microarreglos de expresión de miRNAs a partir de suero de pacientes con CaM (n=1272), cáncer gástrico (n=1417), hepatocelular (n=345), de ovario (n=320), de pulmón (n=1566), de próstata (n=282), sarcoma (n=273) y de vejiga (n=100), con sus respectivos VS. Utilizando la información de la expresión de los miRNAs antes mencionados, se generó un modelo predictivo para cada uno de los tipos de cáncer previamente enumerados, y los valores de sus métricas y puntos de corte establecidos se informaron en la Tabla 7. En ella se puede ver que, en concordancia con lo analizado anteriormente, la sensibilidad del modelo para el CaM fue del 91%, siendo el valor más alto junto con el modelo predictivo de sarcoma. En particular, al comparar ambos modelos, se puede ver que, si bien la sensibilidad fue similar, el resto de las métricas fueron mejores en el modelo del CaM, tendencia que se mantuvo al comparar con los otros tipos de cáncer analizados. Por último, al momento de comparar los puntos de corte, fueron todos muy similares entre los modelos y cercanos al 0,5, algo que era esperable y que establece que, a la hora de calcular las probabilidades de estar enfermos de los individuos, aquellos que obtengan un valor por encima de 0,5 se los clasificarán como enfermos. También se realizaron los modelos utilizando las combinaciones de miRNAs correspondientes al Modelo 1, Modelo 2 y Modelo 5, incluidas en el ANEXO correspondientes a las Tablas suplementarias 13, 14 y 15 respectivamente.

Tabla 7: Resumen de las métricas obtenidas a partir de modelos predictivos realizados para distintos tipos de cáncer utilizando los miRNAs miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p.

Tipo de cáncer	Cantidad de pacientes	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUCROC	Accuracy (%)	Precision (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Tasa Falsos Positivos (%)
Mama	1272	0,4625	91	90	0,96	91	90	91	10
Gástrico	1417	0,4701	81	71	0,84	76	74	79	28
Hepatocelular	345	0,507	88	79	0,88	84	81	87	21
Ovario	320	0,5178	79	79	0,88	79	79	79	21
Pulmón	1566	0,4366	85	73	0,87	79	76	83	27
Próstata	282	0,4905	58	62	0,64	60	61	60	38
Sarcoma	273	0,4159	91	85	0,92	88	85	90	15
Vejiga	100	0,4687	88	78	0,87	83	80	87	22

A partir de repositorios públicos, se obtuvieron los datos de microarreglos de expresión de miRNAs circulantes a partir de suero de pacientes con distintos tipos de cáncer y sus respectivos VS. Mediante el uso de *machine learning* se construyeron modelos predictivos utilizando la expresión correspondiente a los miRNAs miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p. Se midieron las métricas correspondientes para medir la performance de cada uno de los modelos.

Se informa también la cantidad de pacientes utilizados para cada tipo de cáncer. La cantidad de VS incluidos en cada caso fue la misma que la de los pacientes.

En base a los resultados mencionados, se puede concluir que, mediante técnicas de machine learning, se obtuvo un modelo predictivo que incluye 4 miRNAs (miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p), que es capaz de discriminar entre individuos sanos y enfermos con un 92% de sensibilidad. De manera interesante, al utilizar esta combinación de 4 miRNAs en pacientes con distintos tipos de cáncer, se encontró que la misma sigue siendo muy buena para discriminar entre enfermos oncológicos y sanos. Estos resultados deberán ser abordados en el futuro si se desea utilizar esta combinación de miRNAs como herramienta de diagnóstico ya que, si bien la sensibilidad para el CaM es mayor, habrá que estandarizar un manejo de las pacientes que incluya un protocolo clínico adecuado en el caso de obtener un resultado positivo del test.

DISCUSIÓN

El rol de hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-21-5p y su interacción con genes blanco en el CaM

En el primer capítulo del presente trabajo de tesis, utilizando un modelo murino y muestras de pacientes con CaM, se identificaron miRNAs y genes que podrían ser utilizados como biomarcadores de agresividad y pronóstico para esta enfermedad. En particular, se identificó que los miRNAs hsa-miR-21-5p y miR-106b-5p se encontraban aumentados en subtipos Her2⁺ o CaM altamente agresivo, respectivamente, con respecto al tejido no tumoral. Asimismo, los genes blanco de estos miRNAs se encontraban disminuidos en CaM respecto al TNA en pacientes. En ambos casos, una alta expresión de los miRNAs correlacionó con una peor sobrevida total de las pacientes.

En la literatura, hay numerosa evidencia que propone al hsa-miR-21-5p como un oncomiR (M. Liu et al. 2019; Chang et al. 2016; J. Lu et al. 2020; Qian et al. 2009). El mismo se encuentra localizado en la región 17q23.2, la cual ha sido encontrada amplificada en carcinomas mamarios y contiene diversos oncogenes presentes (Haakensen et al. 2016). Este miRNA se encontró aumentado en carcinomas ductales *in situ* (DCIS) comparados con tejidos mamarios benignos (Haakensen et al. 2016), aumentado en diversos cánceres, incluyendo al CaM (M. Liu et al. 2019; J. Lu et al. 2020; Yu et al. 2018; Pourteimoor, Paryan, and Mohammadi-Yeganeh 2018), y en circulación de pacientes con CaM respecto a VS (Haakensen et al. 2016; Yu et al. 2018; Pourteimoor, Paryan, and Mohammadi-Yeganeh 2018; Mango et al. 2019), punto que se discutirá en mayor profundidad más adelante en este trabajo. En particular, el miRNA hsa-miR-21-5p se encontró aumentado en plasma de pacientes con CaM con subtipos Luminal B y Her2, sugiriendo un posible link entre el miRNA y el receptor Her2 (H. Wang et al. 2019). En línea con esto y los resultados del presente trabajo de tesis, existe evidencia en la literatura de la sobreexpresión del receptor Her2 en conjunto con la del miRNA hsa-miR-21-5p (Newie et al. 2016); a su vez, este miRNA también fue encontrado aumentado en tumores Her2⁺ respecto a otros subtipos (Newie et al. 2016), y asociado a CaM más agresivos (Qian et al. 2009; Calvano Filho et al. 2014).

En relación a la progresión del CaM, el miRNA hsa-miR-21-5p se encontró involucrado en procesos como patogénesis, proliferación, invasión, apoptosis, EMT, control del ciclo celular y metástasis en células tumorales del CaM (Chang et al. 2016; J. Lu et al. 2020;

Qian et al. 2009; Yu et al. 2018; Pourteimoor, Paryan, and Mohammadi-Yeganeh 2018; H. Wang et al. 2019; Newie et al. 2016). También fue propuesto como un regulador oncogénico de vías como PI3K/AKT mTOR y TGF β 1 (Calvano Filho et al. 2014; Pourteimoor, Paryan, and Mohammadi-Yeganeh 2018; Qian et al. 2009). Finalmente, se encontró una asociación entre la sobreexpresión del miRNA y una peor sobrevida libre de enfermedad en estadios tempranos del CaM (Qian et al. 2009).

Todos estos hallazgos en conjunto con los resultados de esta tesis apoyan la idea del miRNA hsa-miR-21-5p como biomarcador en el diagnóstico y pronóstico del CaM.

El miRNA hsa-miR-106b-5p es miembro del *cluster* 106b-25 y parálogo del *cluster* 17-92 (Moi et al. 2019), el cual fue encontrado amplificado y/o sobreexpresado en diversos tumores, incluido el CaM (De Rinaldis et al. 2013; Zheng et al. 2015; Guarnieri et al. 2018). En particular, se encontró aumentado en circulación de pacientes con CaM comparado a VS (Zheng et al. 2015) y en tumores de CaM respecto a lesiones benignas de mama (Moi et al. 2019; Zheng et al. 2015). En línea con lo informado en el presente trabajo, el miRNA hsa-miR-106b-5p fue encontrado aumentado en CaM triple negativo comparado con otros subtipos (Moi et al. 2019). El rol de este miRNA en la progresión del CaM ha sido ampliamente reportado en la literatura: se lo encontró asociado a EMT (De Rinaldis et al. 2013; Zheng et al. 2015; Tan et al. 2019; K.-H. E. Chen et al. 2017; Z. Wang et al. 2020), progresión tumoral (Gong et al. 2015), proliferación celular y migración (K.-H. E. Chen et al. 2017; Z. Wang et al. 2020), control del ciclo celular y en respuesta al estrés (Zheng et al. 2015; Schrijver, van Diest, and Moelans 2017), y a apoptosis y angiogénesis (De Rinaldis et al. 2013; Guarnieri et al. 2018). Existe también evidencia de que el miRNA hsa-miR-106b-5p podría estar involucrado modulando el efecto de TGF β 1 sobre el crecimiento tumoral y la metástasis (Gong et al. 2015) y en la activación de la vía Rho/rock (Z. Wang et al. 2020).

En estudios pre-clínicos se demostró que el miRNA hsa-miR-106b-5p podría ser utilizado para predecir la presencia de metástasis del CaM (Zheng et al. 2015; Schrijver, van Diest, and Moelans 2017), ya que en modelos murinos donde se desarrollaron tumores de CaM sobreexpresando este miRNA, hubo presencia de metástasis en pulmones (Z. Wang et al. 2020) y un aumento en el número de nódulos metastásicos en el hígado de los ratones (Gong et al. 2015). En la clínica, el miRNA hsa-miR-106b-5p se encontró

aumentado en tumores metastásicos comparado con no metastásicos, en metástasis comparado con tumores primarios (Gong et al. 2015) e incluso en metástasis secundarias comparada con metástasis primarias (Schrijver, van Diest, and Moelans 2017). Finalmente, respecto a la sobrevida en pacientes con CaM, se encontró que aquellos que tienen menor expresión del miRNA hsa-miR-106b-5p tienen mayor sobrevida libre de enfermedad (Gong et al. 2015). En otro estudio, pacientes con CaM con alta expresión del miRNA tuvieron peor sobrevida libre de enfermedad y sobrevida total, así como también un aumento en el riesgo de recurrencia del CaM (Zheng et al. 2015). Por último, el *cluster* 106b-25 también se encontró asociado a un menor tiempo de recaída (Guarnieri et al. 2018). En conjunto, la evidencia presentada junto con los resultados obtenidos permite proponer al miRNA hsa-miR-106b-5p como un buen biomarcador para predecir recurrencia y progresión de la enfermedad, así como también sería un buen biomarcador pronóstico que permitiría identificar recurrencia local o a distancia y subtipos de CaM de alto riesgo.

En el primer capítulo del presente trabajo también se encontró que los miRNAs hsa-miR-106b-5p y miR-21-5p comparten diversos genes target, y se focalizó en particular en los genes GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1, los cuales se encontraron disminuidos en tumores primarios y metástasis del CaM.

Si bien existe poca evidencia del rol de GNG12 en el CaM, el grupo de Lee *et al.* (Lee et al. 2020) encontró que su expresión se encontraba disminuida en DCIS de tipo recurrente a nivel local respecto al de tipo no recurrente, que apoya el resultado obtenido en este trabajo. Por otro lado, el gen SESN1 fue encontrado involucrado en la regulación del metabolismo y el envejecimiento mediante la vía AMPK/mTOR (Sanli et al. 2012). Este gen interactúa con AMPK en la respuesta al estrés, la supresión de la tumorigénesis y el mantenimiento de la integridad genómica (Sanli et al. 2012). A su vez, se encontró que la mutante p53 bloquea el complejo SESN1/AMPK, desencadenando efectos oncocénicos tales como inhibición de la apoptosis, aumento en la resistencia a drogas y proliferación (Cordani et al. 2018). En particular en pacientes con p53 mutado, la baja expresión de diversos genes, entre ellos SESN1, correlacionó con peor sobrevida libre de recaída y sobrevida libre de metástasis a distancia (Cordani et al. 2016).

En cuanto al gen HBP1, diversos estudios lo propusieron como un represor transcripcional, ya que posee un dominio de tipo caja HMG de unión al ADN, que impide la unión entre el ADN y factores activadores de la transcripción (Escamilla-Powers et al. 2010; Paulson et al. 2007; J. Kim et al. 2006; H. Li et al. 2011). El gen HBP1 se encuentra localizado en el cromosoma 7q31.1, región que se encuentra frecuentemente delecionada en diversos tipos de cáncer (Escamilla-Powers et al. 2010; Bollaert, de Rocca Serra, and Demoulin 2019) incluyendo al CaM, donde se vio que aproximadamente el 30% de los pacientes con CaM tienen mutantes o variantes de HBP1 (Paulson et al. 2007; J. Kim et al. 2006). También, se ha encontrado que HBP1 puede inhibir la vía de señalización de Wnt, al inhibir CiclinaD1 y c-Myc (Escamilla-Powers et al. 2010; J. Kim et al. 2006; H. Li et al. 2011) y podría ser inhibido por la vía PI3K/AKT, dado que puede ser fosforilado por esta última (Bollaert, de Rocca Serra, and Demoulin 2019). Por último, se vio que este gen podría ser un importante mediador en la senescencia y diferenciación inducida por oncogenes (Escamilla-Powers et al. 2010; Paulson et al. 2007).

En modelos de CaM preclínicos, se encontró que la disminución de la expresión de HBP1 aumentó la progresión del ciclo celular, la proliferación, invasión, migración y tumorigénesis (Paulson et al. 2007; H. Li et al. 2011). A su vez, y en línea con lo identificado en el presente trabajo, se encontró que HBP1 se encuentra disminuido en tumores de CaM comparado con tejidos normales, lo cual correlacionó con un peor pronóstico, recidiva y sobrevida libre de recaída (Escamilla-Powers et al. 2010; Paulson et al. 2007; Bollaert, de Rocca Serra, and Demoulin 2019). Por último, el miRNA hsa-miR-17-5p, el cual es miembro del *cluster* 17-92 y parálogo del *cluster* 106b-25, se une al gen HBP1, disminuyendo su expresión (Bollaert, de Rocca Serra, and Demoulin 2019). Este último hallazgo podría indicar que el miRNA hsa-miR-106b-5p podría estar también mediando la disminución de HBP1 en el tumor, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

El rol de GAB1 en el CaM ha sido ampliamente estudiado y, en contraposición con los resultados presentados en este trabajo, ha sido propuesto en la literatura como un oncogen. Este gen es una proteína de anclaje clave que permite la vía de señalización río debajo de c-Met, entre otros receptores tirosin-kinasas (Veeraraghavan et al. 2014; Ortiz-Padilla et al. 2013), se encuentra involucrado en la formación de invadopodios

(Veeraraghavan et al. 2014), permite que se produzca la dimerización de factores de crecimiento epidérmicos (EGFR) involucrados en la señalización de PI3K (Mouradian et al. 2014) y se encuentra a su vez implicado en la activación de MAPK inducida mediante EGFR (Gensler, Buschbeck, and Ullrich 2004). En su rol como proteína de anclaje, GAB1 puede ser fosforilado, lo cual desencadena la estimulación de factores de crecimiento (Ortiz-Padilla et al. 2013). Dependiendo del estímulo y el contexto celular, el efecto desencadenado puede ser positivo o negativo (Ortiz-Padilla et al. 2013). En particular, en contextos con altos niveles de ácido linoleico, la concentración proteica de GAB1 disminuye, pero aumenta su asociación con EGFR, resultando en un aumento de AKT fosforilado (Mouradian et al. 2014).

En modelos preclínicos, un aumento en la expresión de GAB1 promovió la migración celular *in vitro* y la metástasis *in vivo*, por medio de la regulación de PAR3, desencadenando la disociación del complejo PAR, y por lo tanto induciendo la EMT (X. Wang et al. 2019). En pacientes, y en contraposición a la evidencia presentada, GAB1 se encontró aumentado en tumores de CaM comparado a hiperplasias mamarias benignas (X. Wang et al. 2019). A su vez, la sobre-expresión de GAB1 se encontró asociada al desarrollo de metástasis en subtipos de CaM Her2 y triple negativo (X. Wang et al. 2019). Sin embargo, el estudio mencionado anteriormente se realizó con un número bajo de individuos, lo que podría ser la causa de la diferencia entre esos resultados y los informados en el presente trabajo de tesis.

En conjunto, estos datos muestran que, en los tumores de mama, la alta expresión de hsa-miR-106b-5p disminuye la expresión de genes supresores tumorales (GAB1, GNG12, HBP1 y SESN1), lo cual provocaría tumores más agresivos empeorando el pronóstico de las pacientes.

El rol de Kaiso y los miRNAs en el CaM y la autofagia secretoria

En el segundo capítulo del presente trabajo, se desarrolló un modelo murino utilizando ratones NSG que fueron inoculados con células de CaM triple negativo humanas con expresión control o disminuida de Kaiso. Se encontró que la disminución en la expresión de Kaiso en tumores redujo el crecimiento tumoral, junto con la presencia de micro y

macro-metástasis. A su vez, la disminución de Kaiso en los tumores moduló expresión de genes clave en la progresión del CaM y de diversos tsmiRs y oncomiRs tanto a nivel tumoral como en circulación. Finalmente, mediante técnicas de inmunohistoquímica se identificó que la disminución en la expresión de Kaiso generó un aumento de la acumulación citoplasmática de LC3, proteína clave en la autofagia, tanto en los tumores como en los focos metastásicos presentes en tejidos blandos en los ratones.

En la literatura hay una extensa cantidad de evidencia que relaciona a Kaiso con el CaM triple negativo, dado que se encontró que una alta expresión de Kaiso correlaciona con subtipos de CaM más agresivos y con menor sobrevida libre de metástasis, a la vez que se vio aumentada su expresión también en líneas celulares más agresivas de CaM (Pierre et al. 2019). Es por este motivo que el modelo elegido para el desarrollo de este modelo fue en líneas celulares de CaM triple negativas, donde la expresión basal de Kaiso suele encontrarse elevada.

El rol de Kaiso en el desarrollo de tumores *in vivo* ha sido descripto previamente, donde se vio que el silenciamiento de Kaiso demora el crecimiento tumoral, a la vez que disminuyó el desarrollo de metástasis en pulmón e hígado (Blessing I. Bassey-Archibong et al. 2017), lo cual coincide con lo presentado en este trabajo. Otros estudios demostraron que la disminución de la expresión de Kaiso disminuyó la proliferación y la expresión de genes fundamentales como Ciclina D1 (Blessing I. Bassey-Archibong et al. 2017), lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo a nivel tumoral, a la vez que moduló marcadores de EMT (Pierre et al. 2019) y aumentó la apoptosis celular (Blessing I. Bassey-Archibong et al. 2017). El silenciamiento de Kaiso en las líneas de CaM más agresivas resultó en una disminución del fenotipo más metastásico, dado que disminuyó tanto la migración como la invasión de estas células, a la vez que disminuyó la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina y Vimentina, a la vez que aumentó la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina (Jones et al. 2014).

En el presente trabajo, se encontró que la disminución de la expresión de Kaiso en xenotransplantes provocó una disminución en la expresión de CTBP1, FOXA1 y DNMT1 a la vez que aumentó la expresión de GATA3. CTBP1, un co-represor de genes supresores tumorales, ha sido previamente reportado involucrado en la proliferación, aumento del crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis en el CaM (De Luca et al. 2016; Farré et

al. 2018), lo que lo convierte en un atractivo gen que podría ser blanco de Kaiso, si bien se necesitan más estudios para poder afirmar esto. Por otro lado, ha sido ampliamente reportado el rol de FOXA1 en CaM de tipo Luminal A, donde se lo propone como biomarcador de buen pronóstico (Q. Hu et al. 2014; Shou et al. 2016) pero no existe evidencia de su rol en el CaM triple negativo, por lo que más estudios deberían ser realizados para determinar la relación entre Kaiso y este gen.

Un gen que si ha sido reportado como modulador de FOXA1 ha sido GATA3, dado que puede unirse a su promotor, pero su expresión no es inter-dependiente (Bernardo and Keri 2012). Estos genes suelen encontrarse íntimamente relacionados en la literatura. A su vez, GATA3 ha sido también reportado como un factor de transcripción cuya expresión se encuentra conservada en diversos tipos de tejidos, incluyendo la glándula mamaria (Takaku, Grimm, and Wade 2015). GATA3 se encuentra en altas cantidades principalmente en células luminales epiteliales y, en modelos animales de CaM, al perder la expresión de GATA3, las células se vuelven menos diferenciadas, lo que desencadena en el desarrollo de metástasis (Takaku, Grimm, and Wade 2015). Al momento de hacer la analogía entre lo que se encuentra reportado en la literatura con el modelo presentado en esta tesis, podría explicar el porqué del aumento de la expresión de este gen al disminuir la expresión de Kaiso, si bien el mecanismo por el cual sucedería no se encuentra dilucidado todavía.

El rol de DNMT1 en el CaM triple negativo también ha sido descripto en la literatura. Se ha encontrado que la expresión de DNMT1 se encuentra asociada con peor sobrevida de pacientes, y que se encuentra aumentada en el subtipo triple negativo, promueve la EMT y el crecimiento de células stem tumorales, a la vez que induce autofagia celular (Wong 2021). También se encontró que la expresión de DNMT1 a nivel tumoral correlacionó con ER⁻, PR⁻ y Her2⁺, con valores de Ki67 altos y con peor sobrevida en pacientes con metástasis óseas y pulmonares (Cha, Jung, and Koo 2017). En conjunto esto propone a DNMT1 como otro posible blanco de Kaiso, si bien se necesitan más estudios para poder confirmar esto.

En cuanto al rol de Kaiso en la modulación de miRNAs en el CaM, al día de la fecha no hay trabajos que hablen al respecto. En el presente trabajo se ha encontrado que la disminución de la expresión de Kaiso en tumores de CaM triple negativo aumentó la

expresión de tsmiRs/oncomiRs como hsa-miR-10b-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-195-5p y miR-221-3p, a la vez que disminuyó la expresión de hsa-miR-125b-5p. Estudios futuros serán necesarios para investigar en profundidad el mecanismo de regulación de los miRNAs mediado por Kaiso.

Si bien Kaiso tiene un rol muy importante en cuanto a la progresión del CaM al modular diversos genes y miRNAs, la localización subcelular de la proteína también es fundamental. En la literatura se informó que tumores de grados más altos y con mayor proliferación tenían a Kaiso aumentado en el núcleo respecto a tumores de bajo grado, así como también en tumores más agresivos (Vermeulen et al. 2012). En línea con estos resultados, otros autores también observaron que altos niveles de Kaiso en el núcleo de tumores ductales invasivos de CaM correlacionaron con peor sobrevida total, metástasis en nódulos linfáticos y con invasión local (Jones et al. 2014). Otros estudios demostraron que al comparar la localización de Kaiso entre células de CaM más agresivas (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) con líneas menos agresivas no metastásicas (MCF-7), las primeras tenían mayores niveles de Kaiso nuclear, a la vez que la última poseía mayor concentración de Kaiso en el citoplasma (Jones et al. 2014).

Estudios realizados por el grupo del Dr. Kevin Gardner presentados anteriormente, mostraron que Kaiso y la proteína clave en la autofagia LC3 co-localizaban en células de CaM, y que la disminución de la expresión de Kaiso en estas células generó la disminución de focos de LC3A/B (Singhal et al. 2021), lo cual sugiere que Kaiso tendría un rol en los primeros pasos de la autofagia.

La autofagia fue definida en un principio como un proceso metabólico mediante el cual, a través de la formación del autofagosoma, se degradan principalmente componentes celulares (Zahoor and Farhan 2018). Originalmente se observaba este proceso en condiciones de estrés o de privación de nutrientes, pero actualmente se sabe que la autofagia puede ocurrir en condiciones de homeostasis, cumpliendo otro tipo de roles, como es el caso de la autofagia secretoria, donde se pueden encontrar otros componentes celulares como ser proteínas o ácidos nucleicos (New et al. 2019). El proceso de autofagia comienza con la formación de un fagóforo, el cual secuestra componentes celulares. En este primer paso, la conjugación de LC3i a LC3ii mediante la lipidación es clave. Luego de la formación de fagóforo, este madura y se convierte en un

autofagosoma, el cual se puede unir luego a lisosomas, desencadenando en la degradación de los componentes cargados en el autofagosoma inicialmente (New et al. 2019). Las vesículas formadas mediante el proceso de autofagia también pueden ser liberadas al exterior de la célula, y es lo que se conoce como autofagia secretoria (Ponpuak et al. 2015). En el presente trabajo de tesis se propone que este proceso podría estar siendo modulado mediante Kaiso y su interacción con LC3. En particular, se observó que, cuando la expresión de Kaiso está disminuida, la proteína LC3A/B se acumuló en el citoplasma tanto en los tumores primarios como en los focos metastásicos presentes en los tejidos blandos de los animales. Así mismo, también se observó que la disminución de la expresión de Kaiso generó que el perfil de miRNAs circulando en el plasma de los ratones fuera distinto entre el grupo control y el shKaiso. Es por esto que se plantea que Kaiso podría tener un rol fundamental en el proceso de la formación del autofagosoma, reteniendo a LC3A/B en el citoplasma y, por lo tanto, imposibilitando que cumpla su función en los primeros pasos de la autofagia. Esto llevaría a que la secreción de miRNAs al torrente sanguíneo se viera modulada, pudiendo influir en el desarrollo del CaM.

En conjunto, los datos presentados proponen, por primera vez, que Kaiso es capaz de regular la expresión de diversos genes y miRNAs que son importantes en la progresión del CaM. Asimismo, Kaiso tendría un rol importante en la autofagia, secuestrando una proteína clave en este proceso como es LC3 en el citoplasma celular, lo cual desencadena un perfil de expresión de miRNAs en circulación distinto al que se da en presencia de Kaiso a nivel tumoral.

Identificación de miRNAs circulantes para el diagnóstico del CaM

En el tercer capítulo de este trabajo de tesis, se obtuvo una combinación de miRNAs diferencialmente expresados en plasma de pacientes con CaM y VS que son útiles para el diagnóstico de esta enfermedad. Utilizando 239 muestras de plasma de participantes enroladas en varias instituciones de salud de Argentina y mediante microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs, sumado a una validación por la técnica de *stem-loop* RT-qPCR y una validación *in-sílico* con 2544 individuos, se generó un panel de 11 miRNAs que se encontraban aumentados en la sangre de mujeres con CaM con respecto

a VS (hsa-miR-16-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-106a-5p, miR-106b-3p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-335-5p, miR-339-3p, miR-339-5p y miR-574-3p). Más aún, aplicando técnicas de *machine learning* se estableció una combinación de solo 4 de esos miRNAs que sirve para detectar el CaM con un 92% de sensibilidad. Esta herramienta en el futuro podría ser utilizada para generar un kit para el diagnóstico temprano del CaM que se pueda implementar como método de tamizaje de rutina. Asimismo, los 11 miRNAs fueron luego analizados en el tejido tumoral y TNA de pacientes obtenidos de repositorios públicos, y se encontró que la expresión de algunos de estos miRNAs, cuya expresión estaba aumentada en el plasma de las pacientes, también se encontraba elevada a nivel tumoral, aunque no correlacionó en todos los casos. Además, la mayoría de estos miRNAs se encontraban aumentados en subtipos más agresivos de CaM, pero no hubo diferencias en la expresión en cuanto a los estadios, excepto por el miRNA hsa-miR-339-3p que estaba aumentado en estadios avanzados de la enfermedad.

Existe en la literatura extensa evidencia del rol de los miRNAs en el CaM a nivel tumoral, pero actualmente el volumen de trabajos sobre el rol y función de los miRNAs circulantes no es tal. Más aún, el uso de los miRNAs circulantes como biomarcadores de enfermedades según la literatura, resulta controversial ya que se muestran diversos aspectos favorables y otros no tanto en cuanto a su implementación en la clínica.

La mayor ventaja que presentan los miRNAs es que pueden circular en fluidos corporales, tales como la sangre u orina, y que son extremadamente estables. Se ha encontrado en el laboratorio que los miRNAs se mantienen estables en sangre entera a temperatura ambiente al menos por 48h, lo cual resulta un aspecto valorable si se desea utilizar como método de tamizaje/diagnóstico. Estos miRNAs se pueden encontrar tanto libres, como asociados a proteínas o dentro de vesículas (Felekkis and Papaneophytou 2020), y se ha propuesto en la literatura que el modo en que se secretan los miRNAs va a depender tanto de la célula de la que se esté liberando como del destino y de la función que va a cumplir el mismo (Felekkis and Papaneophytou 2020).

Por otro lado, otra ventaja del uso de miRNAs circulantes como biomarcadores de diagnóstico es su fácil acceso, de manera mínimamente invasiva, sumado a que son enfermedad-específicos (Felekkis and Papaneophytou 2020). Todos los individuos presentan un conjunto de miRNAs en circulación; sin embargo, en presencia de

enfermedades oncológicas, metabólicas o incluso otro tipo de enfermedades, como cardiológicas o neuropatologías, este conjunto se ve alterado, pudiendo esta característica ser aprovechada para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades.

En contraposición, en la literatura se observa que no parecería haber una consensuada reproducibilidad de los resultados de los miRNAs circulantes en los diferentes laboratorios. Así, por ejemplo, se ha investigado, sin llegar a un consenso, sobre la utilización de plasma o de suero para obtener miRNAs circulantes de sangre. En principio, se podría pensar que el uso del suero sería mejor, debido a la sencillez con la que se puede obtener, pero su principal problema es que, en el tiempo en el que se genera el proceso de coagulación, se pueden liberar al mismo diversos miRNAs provenientes de células presentes en la sangre, o incluso los miRNAs podrían quedar “atrapados” en el coágulo (Felekkis and Papaneophytou 2020). Por otro lado, si se parte del plasma, se minimizan estos efectos pero es sumamente importante la elección del anticoagulante a ser utilizado, ya que compuestos como heparina o citrato inhiben la RT-qPCR (Felekkis and Papaneophytou 2020). Es por este motivo que las muestras colectadas en el presente trabajo fueron siempre en EDTA, que no interfiere en etapas posteriores. Cabe aclarar que, previo a la elección de plasma, se comparó experimentalmente el uso del suero y del plasma obteniendo mejores resultados con muestras de este último.

En cuanto a la extracción y cuantificación de los mismos, hay diversas alternativas, desde la utilización de columnas específicas para la extracción de miRNAs en plasma, que fueron las utilizadas en combinación con los microarreglos de expresión, hasta el uso de Trizol, o reactivos comerciales similares, por su bajo costo y su amplio uso en la clínica. En este trabajo se compararon ambas técnicas obteniéndose resultados similares, es por ello que, en el caso de los microarreglos de expresión, donde se necesitaban fracciones más puras de miRNAs, se utilizaron columnas de extracción de miRNAs y para la RT-qPCR se utilizó Trireagent (similar al Trizol). Luego de extraídos los miRNAs, su cuantificación es otra desventaja, ya que existen pocos métodos capaces de medir concentraciones tan bajas como las relativas a los miRNAs en circulación, entre los cuales se encuentra el Qubit. Para resolver este inconveniente, en el presente trabajo se estandarizó la

técnica de aislamiento de miRNAs utilizando volúmenes constantes en todo el proceso de extracción.

Por último, una gran desventaja es que no existe consenso sobre qué miRNAs podrían ser utilizados para la normalización de la expresión de los mismos en circulación, por lo que lo estándar es utilizar miRNAs sintéticos como *spike-in* en la extracción, como fue realizado en el presente trabajo (Felekkis and Papaneophytou 2020). Cabe aclarar que este aspecto fue abordado experimentalmente comparando varios miRNAs en circulación endógenos sin éxito (datos no mostrados).

Al hacer un análisis en particular de los 11 miRNAs identificados, en su mayoría se encuentran reportados como biomarcadores para el CaM presentes en plasma o suero de pacientes respecto a VS, algunos solo han sido reportados en su rol como miRNAs en tejidos, y hay algunos cuyo rol no ha sido reportado ni en tejido ni en circulación en relación al CaM.

En cuanto al miRNA hsa-miR-16-5p, en la literatura ha sido reportado como un tsmiR, el cual se encuentra involucrado en la vía de NFκβ (Ruan and Qian 2019). En líneas celulares de CaM, una alta expresión del mismo indujo apoptosis, arresto del ciclo celular y produjo una disminución de la invasión y migración celular (Haghi, Taha, and Javeri 2019), a la vez que una baja expresión indujo el fenotipo contrario y disminuyó el crecimiento tumoral *in vivo* (Ruan and Qian 2019). En pacientes, hay evidencia contraria de su expresión a nivel tumoral, dado que se lo encontró tanto aumentado como disminuido en tumores respecto a tejido normal adyacente (Ruan and Qian 2019; Zou et al. 2021), pero si se vio que una baja expresión de hsa-miR-16-5p en tumores correlacionó con una peor sobrevida (Ruan and Qian 2019; Masoudi-Khoram et al. 2020). Por último, se lo encontró aumentado tanto en exosomas derivados de suero como en suero total de pacientes con CaM respecto a VS (Zou et al. 2021).

Continuando con el miRNA hsa-miR-17-5p, su rol en cáncer y en particular en CaM tanto a nivel tumoral como en circulación ha sido ampliamente reportado, existiendo trabajos enteros sobre este miRNA en particular (Bobbili et al. 2017; Dellago, Bobbili, and Grillari 2017). El mismo pertenece al *cluster 17-92*, el cual ha sido encontrado sobreexpresado en diversos tipos de cáncer (Bobbili et al. 2017) y se lo ha descripto como un oncomiR,

dado que promueve la migración e invasión en líneas celulares de CaM (Yizhen Wang et al. 2019; Bao et al. 2021), así como también se lo vio involucrado en la regulación de la proliferación celular, autofagia y apoptosis (Bobbili et al. 2017) y en la EMT (Bao et al. 2021). A su vez, pacientes con tumores con alta expresión de hsa-miR-17-5p tuvieron una peor sobrevida libre de recaída a 5 años (Yaozong Wang et al. 2018). Por otro lado, hay otros trabajos donde proponen al hsa-miR-17-5p como un tsmiR, dado que se lo encontró disminuido en líneas de CaM y en tumores CaM triple negativo, a la vez que su sobre-expresión disminuyó la proliferación y migración celular en líneas celulares y la metástasis *in vivo* (Jie Li et al. 2017). También se lo reportó involucrado en la apoptosis, mediando el aumento de p53 al inhibir STAT3 (Liao et al. 2017), y en la vía de PTEN/Akt (Bao et al. 2021). Finalmente, también ha sido reportado aumentado en CaM respecto a TNA, aumentado en subtipos basales respecto a Luminales A (Calvano Filho et al. 2014; Moi et al. 2019) y en tumores de alto grado (Moi et al. 2019). Respecto a su rol como biomarcador en el CaM, hay reportes contrarios. Por un lado, algunos autores reportaron que encontraron al hsa-miR-17-5p disminuido en suero de pacientes con CaM, y que podría ser un buen biomarcador debido a que obtuvieron un buen valor de AUC (Lv et al. 2020). En otros trabajos, proponen que un aumento en los niveles de hsa-miR-17-5p podría ser una alarma temprana sobre la presencia de cáncer, pero no parecería ser tumor específico (Bobbili et al. 2017). Así mismo, otros autores han encontrado al hsa-miR-17-5p aumentado en suero de pacientes con CaM, en estadios tempranos de la enfermedad respecto a avanzados y en tumores de bajo grado respecto a los de alto grado (Swellam et al. 2019). Finalmente, han encontrado que este biomarcador presentó mejor sensibilidad que los marcadores tumorales utilizados en la clínica como CEA y CA 15-3 para el diagnóstico del CaM (Swellam et al. 2019).

Con respecto al miRNA hsa-miR-21-5p, cuyo rol en el CaM ha sido discutido anteriormente, ha sido ampliamente reportado y se lo encontró aumentado tanto en plasma como en suero de pacientes con CaM respecto a VS (Ashirbekov et al. 2020; Koi et al. 2020; Matamala et al. 2015; Ferracin et al. 2015), aumentado en vesículas extracelulares de suero en pacientes con CaM respecto VS y en vesículas extracelulares presentes en medio de cultivo de líneas de CaM (Koi et al. 2020), así como también aumentado en pacientes con estadios tempranos de la enfermedad respecto a VS (Yu et

al. 2018). A su vez, altos niveles de hsa-miR-21-5p en suero de pacientes con CaM correlacionaron con peor sobrevida libre de recurrencia y libre de enfermedad (G. Wang et al. 2015).

El rol a nivel tumoral del miRNA hsa-miR-106a-5p presenta algunas contradicciones. Por un lado, Xing y colaboradores han encontrado al hsa-miR-106a-5p aumentado en CaM respecto a TNA y en líneas triple negativo de CaM con respecto a otros subtipos, encontrando además que éste miRNA, dentro de exosomas, promovió la migración, invasión y proliferación en células de CaM triple negativo (Xing et al. 2020). En contraposición, Du y colaboradores encontraron al hsa-miR-106a-5p disminuido en CaM respecto a TNA, así como en líneas de CaM triple negativo (Du et al. 2021). A su vez, describieron que éste miRNA disminuyó la viabilidad celular, migración e invasión, aumentando la apoptosis y regulando genes involucrados en la EMT (Du et al. 2021). Finalmente, identificaron que bajos niveles de hsa-miR-106a-5p correlacionaron con una peor sobrevida en pacientes con CaM (Du et al. 2021). Sin embargo, en concordancia con los hallazgos de esta tesis respecto a su uso como biomarcador del CaM, se lo ha reportado aumentado tanto en plasma y suero de pacientes con CaM respecto a VS, y en particular en exosomas derivados de plasma y de suero de pacientes (Zou et al. 2021; M. Li et al. 2018).

El miRNA hsa-miR-125a-5p ha sido ampliamente reportado en la bibliografía como un tsmiR en CaM. Se ha publicado que el mismo inhibe la proliferación celular, la invasión, migración y EMT, a la vez que promueve la apoptosis (Yan et al. 2018; L.-B. Wang et al. 2019; Z. Liang et al. 2019; Li et al. 2021; Minini et al. 2021; Hsieh et al. 2014). En modelos *in vivo*, se ha encontrado que el hsa-miR-125a-5p disminuye el crecimiento tumoral, la metástasis y la angiogénesis (Hsieh et al. 2014). A su vez, se lo ha visto involucrado en la vía de MEK1/2/ERK1/2 y en la vía de Caspasa3/Bcl-2 (Z. Liang et al. 2019). En la clínica, se ha visto que el hsa-miR-125a-5p se encuentra disminuido en CaM respecto TNA o a mamas normales (Yan et al. 2018; He et al. 2015; Minini et al. 2021). Asimismo, tumores más chicos de mama mostraron mayor expresión del hsa-miR-125a-5p, a la vez que bajos niveles correlacionaron con una peor sobrevida de las pacientes (Hsieh et al. 2014). En concordancia con los hallazgos de esta tesis, en un trabajo de Ferracin y

colaboradores, los niveles en la circulación de hsa-miR-125a-5p se encontraron aumentados en suero de pacientes con CaM respecto a VS (Ferracin et al. 2015).

El miRNA hsa-miR-150-5p ha sido reportado tanto como oncomiR como tsmiR en CaM. Por un lado, ha sido encontrado aumentado en CaM y en líneas celulares (Q. Lu, Guo, and Qian 2019) y ensayos en líneas celulares tumorales demostraron que aumenta la proliferación, migración e invasión celular, a la vez que aumentó marcadores EMT como vimentina y N-cadherina disminuyendo marcadores epiteliales como E-cadherina (Q. Lu, Guo, and Qian 2019). Por otro lado, también se lo ha encontrado disminuido en CaM respecto a TNA (H. Jia et al. 2021; X. Hu et al. 2019), y esto correlacionó con una peor sobrevida (H. Jia et al. 2021). Ensayos con líneas celulares demostraron que un aumento en el miRNA hsa-miR-150-5p disminuyeron proliferación, migración e invasión, al mismo tiempo que aumentaron la apoptosis (H. Jia et al. 2021; X. Hu et al. 2019; Jiang et al. 2019). No se ha encontrado reportado como biomarcador en circulación para el CaM, pero sí se ha encontrado relacionado como el cáncer colorectal: se encontró que el hsa-miR-150-5p se encontraba asociado a la progresión del cáncer colorectal (F. Liu and Di Wang 2019), y por otro lado que los niveles de este miRNA en exosomas derivados de suero se encontraban disminuidos en pacientes con este tipo de cáncer respecto a VS, los cuales aumentaron luego de ser operados (Zhao et al. 2019).

Otro miRNA que ha sido reportado como tsmiR es el hsa-miR-335-5p. Este miRNA se ha encontrado disminuido en CaM respecto a TNA y en líneas celulares de CaM (Q. Jia et al. 2020; She et al. 2020; Mahmoudian et al. 2021). En cuanto a su rol a nivel tumoral, se vio que el miRNA disminuyó la formación de colonias, la glicólisis (Q. Jia et al. 2020), la migración e invasión celular (Q. Jia et al. 2020; She et al. 2020) modulando la vía de Rock1, así como también aumentó la apoptosis (She et al. 2020). En la clínica, bajos niveles de hsa-miR-335-5p a nivel tumoral en pacientes con CaM triple negativo correlacionó con una peor sobrevida (Zhang et al. 2021). También se encontró al miRNA disminuido en estadio III de la enfermedad respecto a I-II, lo que lo convierte en un buen biomarcador diagnóstico (Mahmoudian et al. 2021). De su rol como biomarcador en circulación del CaM no hay evidencia, pero si existen trabajos que lo identificaron tanto en suero como en plasma de pacientes con cáncer colorectal y proponen que combinado

con otros 5 miRNAs podrían ser utilizados en el diagnóstico temprano de este tipo de cáncer (Marcuello et al. 2019; Herreros-Villanueva et al. 2019).

El rol del miRNA hsa-miR-339-5p ha sido ampliamente reportado en la literatura. Su expresión se ha encontrado disminuida en CaM respecto a TNA o tejidos benignos (Feng et al. 2020; Wu et al. 2010; Mahmoudian et al. 2021) y en líneas celulares agresivas de CaM (Wu et al. 2010). Se lo ha encontrado involucrado en la modulación de la viabilidad celular, la formación de colonias, la migración e invasión, así como en la senescencia y apoptosis (Feng et al. 2020; Wu et al. 2010; Jansson et al. 2015), a la vez que modularía la vía de p53 (Jansson et al. 2015). Finalmente, una baja expresión del miRNA hsa-miR-339-5p en tumores de pacientes con CaM correlacionó con una peor sobrevida total y libre de recaída (Wu et al. 2010). En la literatura, fue propuesto su uso como biomarcador para la identificación de metástasis en nódulos linfáticos en pacientes con CaM en estadios tempranos a partir de la medición del mismo en plasma (Escuin et al. 2021). Sin embargo, su uso para el diagnóstico temprano del CaM no fue propuesto aún, como si lo fue en el diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón (Sun et al. 2018) o de glioblastoma, combinado con otros 7 miRNAs (Ebrahimkhani et al. 2018).

El rol en el CaM del hsa-miR-574-3p ha sido poco descripto. Su expresión se ha encontrado disminuida en CaM respecto a tejido normal (Ujihira et al. 2015; Krishnan et al. 2015) y ha sido propuesto como biomarcador pronóstico (Krishnan et al. 2015). Su presencia en circulación como biomarcador para el diagnóstico temprano del CaM no ha sido reportado al día de la fecha, pero sí ha sido identificado aumentado en plasma de pacientes con osteosarcoma (Allen-Rhoades et al. 2015) y en exosomas y sedimento urinario de pacientes con cáncer de próstata (Paiva et al. 2020) y también se reportó que altos niveles de hsa-miR-574-3p en plasma de pacientes con cáncer de cabeza y cuello correlacionó con un peor pronóstico (Summerer et al. 2015).

Del hsa-miR-106b-3p no hay reportes en relación a su rol tanto en CaM como en su uso como biomarcador para esta enfermedad. En el carcinoma de células escamosas de esófago se lo encontró aumentado tanto en líneas celulares como en tejido canceroso, a la vez que un aumento en este miRNA promovió proliferación, migración, invasión y EMT, a la vez que se lo vio involucrado en la vía de Wnt/β-catenina (Qiao et al. 2019), lo cual lo propone como un oncomiR. Respecto a su rol en circulación, se lo encontró

aumentado en exosomas derivados de suero de pacientes con cáncer colorectal metastásico, el cual correlacionó con un peor pronóstico (H. Liu et al. 2020). Los exosomas derivados de suero de pacientes con cáncer colorectal contenido al miRNA hsa-miR-106b-3p promovieron la migración, invasión y EMT de líneas celulares y el desarrollo de metástasis pulmonares *in vivo* (H. Liu et al. 2020). También se lo encontró circulando en plasma y suero de pacientes con carcinoma hepatocelular respecto a VS o a pacientes con cirrosis, y fue propuesto en combinación con otros miRNAs como biomarcador diagnóstico (Moshiri et al. 2018). También fue propuesto como biomarcador en el diagnóstico temprano del cáncer pancreático en combinación con otros paneles de miRNAs (Cao et al. 2016) y como biomarcador pronóstico para el adenocarcinoma del pulmón (Xue et al. 2020). Otro miRNA del que no hay información sobre su rol en CaM es el hsa-miR-339-3p. En cáncer colorectal se lo ha encontrado disminuido y se lo relacionó con la disminución en proliferación, migración e invasión en líneas tumorales (C. Zhou, Lu, and Li 2015), así como también se lo ha encontrado disminuido en glioblastoma (R. Liang and Tang 2020). Respecto al rol en circulación, se ha encontrado aumentado en circulación de pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo (Medina-Villaamil et al. 2014).

En conclusión, se han identificado diversos miRNAs que se encuentran aumentados en circulación en pacientes con CaM y actúan a nivel tumoral como oncomiRs y/o como tsmiRs, cuyo rol en CaM ha sido en su gran mayoría descripto. Muchos de estos miRNAs ya han sido reportados como posibles biomarcadores para ser utilizados en el diagnóstico temprano del CaM, pero otros están siendo descriptos por primera vez en el presente trabajo como el hsa-miR-106b-3p, el miR-574-3p y el miR-339-3p. A partir de estos hallazgos es que se buscó, en el siguiente paso, identificar la combinación de miRNAs que mejor pudiera predecir el CaM mediante modelos logísticos, punto que se discutirá a continuación.

Desarrollo, selección y comparación de modelos predictivos para el diagnóstico del CaM

Es importante que el diagnóstico del CaM continúe mejorando con el tiempo, de modo de disminuir las muertes por esta enfermedad año tras año. La manera de conseguir

este objetivo es desarrollando mejores técnicas de diagnóstico temprano. El presente trabajo tuvo como uno de los objetivos específicos el de establecer un modelo predictivo para el diagnóstico temprano del CaM. Mediante la expresión de diversos miRNAs validados por *stem-loop RT-qPCR* a partir de plasma de pacientes con CaM y VS, y utilizando diversas técnicas de *machine learning* entre las que se encontraron la de selección de variables y la de construcción de modelos logísticos, se obtuvo un modelo final que, utilizando la expresión de 4 miRNAs en plasma, permite obtener la probabilidad de poseer CaM con una alta sensibilidad.

Dos aspectos deben considerarse en la lectura de este trabajo de tesis: el término “diagnóstico” y el término “temprano”. En este trabajo de tesis, se utilizaron pacientes con CaM tanto de estadios tempranos como avanzados, sin embargo, algunos análisis fueron guiados para ponderar los miRNAs que aparecen aumentados en estadios tempranos. La combinación obtenida de 4 miRNAs sirve para la detección del CaM y, en base a los estudios que se realizaron, no se puede saber si esta combinación permite diagnosticar el estadio o subtipo de la enfermedad, lo cual debería ser abordado de otra manera. Asimismo, varios trabajos (Urabe et al. 2019; Abe et al. 2021; Yokoi et al. 2018; Asano et al. 2019; Asakura et al. 2020; Shimomura et al. 2016; Usuba et al. 2019; Yamamoto et al. 2020) indican que la circulación alterada de los miRNAs, como consecuencia de una patología, surge de manera temprana, incluso antes de poder identificar la enfermedad con los métodos convencionales de detección, como en el caso del CaM serían las imágenes. Sin embargo, para confirmar que esta combinación de 4 miRNAs sirve para el diagnóstico temprano, deberían llevarse a cabo otros estudios. Así, por ejemplo, nuestro grupo de trabajo comenzó recientemente una prueba piloto en instituciones de salud para abordar el tema de la detección temprana enrolando voluntarias sin diagnóstico previo de CaM que concurren al control ginecológico anual. Para ello, se está llevando a cabo una prueba piloto en el hospital Posadas y en el Hospital Militar Central, donde se están enrolando mujeres de entre 50 y 70 años (n=500) que concurren a su control ginecológico sin antecedentes de enfermedad oncológica previa y, luego de la firma del CI, se les solicita una muestra de sangre junto con los estudios que se llevan a cabo de rutina como ser mamografías y/o ecografías mamarias. En estas muestras de sangre se medirán los 4 miRNAs finales propuestos

(miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p y miR-16-5p), se aplicará el algoritmo obtenido mediante la regresión logística y se obtendrá un valor de probabilidad de tener CaM. A su vez, se ha establecido una colaboración para analizar las imágenes de las participantes mediante inteligencia artificial con un software desarrollado por IMAGO systems (New York, USA), el cual se encuentra también en período de prueba, y que propone, mediante el análisis de las imágenes por inteligencia artificial, el identificar tumores de CaM u otras lesiones en la mama de manera más precisa y previa a las imágenes convencionales. En resumen, en esta prueba piloto la combinación de biopsias líquidas con inteligencia artificial, sumado a las imágenes convencionales, permitirán establecer cuan temprana es la detección del CaM para avalar el uso de biopsias líquidas como un método de tamizaje rutinario. Una vez determinado este parámetro se podrá buscar su implementación como un kit de detección temprana para el CaM de menor costo y menos invasivo que los métodos actuales.

En la actualidad, el método de detección temprana del CaM utilizado como *gold standard* es la mamografía, que luego puede ser complementada con otras técnicas de imágenes diagnósticas como mamografía magnificada, ecografía mamaria y/o resonancia magnética nuclear. Sin embargo, el diagnóstico se completa con el análisis molecular a partir de una biopsia estándar. A su vez existe, al día de hoy, la utilización de marcadores tumorales en sangre como es el CEA, el CA 125 y el CA 15-3 (R. Chen et al. 2020). Se realizará a continuación la comparación de métricas relevantes entre el método diagnóstico propuesto en el presente trabajo y las técnicas que se utilizan al día de hoy en la clínica.

En el presente trabajo, se analizaron las métricas relativas al modelo logístico elegido, que demostró un 92% de sensibilidad, un 71% de especificidad, un AUC ROC de 0,89, un *Accuracy* del 83%, un valor predictivo positivo (VPP) o precisión del 81%, un valor predictivo negativo (VPN) del 87% y una tasa de falsos positivos del 29%. Respecto a la mamografía, los valores de sensibilidad de la técnica, en conjunto con especificidad y otras métricas como VPP o AUC han sido ampliamente reportados en diversos trabajos, y se han realizado revisiones sistemáticas y meta-análisis comparando distintos trabajos. Diversos autores informaron que encontraron valores de sensibilidad y especificidad para la mamografía del 52 y 90,5 % (Sorin et al. 2018), en otros casos del 81 y 96% (Zhu

et al. 2016), del 82 y el 94% (S. H. Kim et al. 2019), del 87% (sin informar valores de especificidad) (Niell et al. 2017) hasta del 97 y el 64,5% (Zeeshan et al. 2018). Esto permite concluir entonces que la sensibilidad y especificidad asociadas a la mamografía son muy variables, debido a diversos factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de equipo y el personal involucrado en el análisis. Sin embargo, al comparar en promedio entre los valores informados para la mamografía y los valores informados del método propuesto en la presente tesis doctoral, este último es mejor como herramienta de tamizaje respecto a la mamografía. A su vez, se ha visto que la sensibilidad de la mamografía disminuye drásticamente en casos de mujeres con mamas densas (30-63% vs 76-98%), lo cual lo convierte en un problema en el diagnóstico temprano del CaM en estas mujeres (Niell et al. 2017). Este problema no se encontraría en el caso del uso de la biopsia líquida con miRNAs que se propone en este trabajo. Asimismo, otra ventaja con respecto a la mamografía, es que, según se informó en la literatura (Urabe et al. 2019; Abe et al. 2021; Yokoi et al. 2018; Asano et al. 2019; Asakura et al. 2020; Shimomura et al. 2016; Usuba et al. 2019; Yamamoto et al. 2020), la detección de miRNAs antecede temporalmente a la aparición de la imagen, con lo cual esto podría ser una ventaja al comparar con las imágenes.

Otro aspecto a tener en cuenta es el menor costo que puede tener el realizar biopsias líquidas respecto a la realización de mamografías. Si se considera que un equipo mamográfico tiene un costo de alrededor de los U\$250.000, y se destaca también la baja invasividad y no toxicidad de las biopsias líquidas con respecto a las mamografías, este ensayo se podría implementar a edades mucho menores, sobretodo en pacientes con antecedentes familiares de CaM. Por lo tanto, esta biopsia líquida basada en miRNAs podría incluirse en la clínica como un ensayo de primer tamizaje que deberá indefectiblemente ser confirmado en el caso que de positivo por imágenes pero que reduciría mucho el uso de la mamografía aumentando la sensibilidad.

Continuando con otros métodos de tamizaje del CaM utilizados en la clínica como ecografías mamarias y resonancias magnéticas nucleares, hay diversos trabajos donde también se analizaron la sensibilidad y especificidad de estas técnicas. En cuanto a la ecografía mamaria, esta ha presentado valores de sensibilidad entre 75 y 83% (Melnikow et al. 2016; Pereira et al. 2020) y de especificidad entre 19 y 94%, pudiendo

concluir entonces que es muy variable si se la usa como primer técnica de tamizaje. Se vio que, al utilizar a la ecografía como método de tamizaje secundario, en mujeres cuyas mamografías habían dado negativas, se descubrieron un 96% de cánceres ocultos, lo que propone que la combinación entre mamografía y ecografía mamaria es de mucha utilidad.

Finalmente, al comparar la sensibilidad y especificidad de la resonancia magnética nuclear, la sensibilidad ha ido entre un 75 y 100% (Melnikow et al. 2016; Pereira et al. 2020) y la especificidad entre un 78 y 94% (Melnikow et al. 2016), lo que lo convierte en la mejor técnica de tamizaje para el CaM que hay disponible en gran parte de la población. La desventaja es que cuando se propone a la resonancia magnética nuclear como método de tamizaje primario, se debe tener en cuenta que es un estudio más costoso, que el equipo no se encuentra disponible en todas las instituciones de salud, y que lleva un análisis experto para la interpretación de los resultados (Melnikow et al. 2016). De esta manera, al comparar la resonancia magnética nuclear con las biopsias líquidas propuestas en este trabajo de tesis, se encontró que esta última tiene una sensibilidad similar o menor, sin embargo la biopsia líquida presenta una gran ventaja en cuanto al bajo costo, simplicidad y el acceso a la infraestructura en cualquier laboratorio de análisis clínicos que lo convierte en una herramienta atractiva para ser utilizado como primer método de tamizaje pero que luego puede ser complementada con una resonancia magnética nuclear.

Todos los métodos por imágenes más utilizados en el tamizaje del CaM involucran técnicos especializados en dichas tecnologías. Esto convierte a estos estudios en operador-dependiente (S. H. Kim et al. 2019), debido a que hay un trabajo de interpretación. Esto es una desventaja a la hora de compararlas con las biopsias líquidas, ya que, si bien se necesita de profesionales especializados que lleven adelante la RT-qPCR, no sería dependiente del operador en su interpretación.

Por último, dado que en la actualidad hay algunos marcadores tumorales que ya se utilizan en la clínica y que se miden en circulación de pacientes, se comparó los valores de sensibilidad y especificidad del CAE, el CA 125 y el CA 15-3 en el diagnóstico del CaM con los valores obtenidos mediante el modelo del presente trabajo. Por un lado, en el trabajo de Chen *et al.* se observó que al medir los marcadores en suero de pacientes con

CaM, el CEA tiene una sensibilidad del 7%, el CA 125 del 5% y el CA 15-3 del 8%, valores muy bajos comparados con los del modelo (R. Chen et al. 2020). En otro trabajo, se encontró que el CEA obtuvo una sensibilidad y especificidad del 83,2 y 80% respectivamente en la detección del CaM, y en el caso de CA 15-3, de 73,8 y 95,7% respectivamente (Swellam et al. 2019). Si bien estos valores parecerían estar más cercanos a los del modelo propuesto en este trabajo, ya se ha discutido en la literatura que estos marcadores no parecerían ser buenos para el diagnóstico temprano del CaM (Fang et al. 2017) pero sí podrían ser buenos como biomarcadores pronóstico al medirlos de manera pre-quirúrgica (Junxian Li et al. 2020).

Al hablar del primer tamizaje del CaM, en la bibliografía se plantean principalmente dos cuestionamientos interesantes; por un lado, el costo/beneficio de realizar estudios de imágenes todos los años y por otro lado el sobre-diagnóstico que surge como consecuencia de esto.

Respecto a los beneficios que se observaron respecto al tamizaje del CaM y, como consecuencia, a la detección temprana del mismo, si bien el descenso en las muertes es un elemento muy importante, hay otras cuestiones subyacentes que también son importantes de mencionar. Primeramente, el diagnóstico temprano permite la disminución en la morbilidad de las pacientes asociadas al tratamiento, como ser una disminución en las mastectomías realizadas y la disminución en la toxicidad causada por la utilización de quimioterapéuticos (Niell et al. 2017). Por otro lado, el diagnóstico temprano permite la posibilidad de acceder a terapias más conservativas, lo que resulta en una disminución de los efectos adversos de las cirugías, una disminución en el dolor que sufrirían las pacientes a causa de terapias invasivas y también una disminución en el estrés psicológico (Niell et al. 2017). A su vez, si el tumor se encuentra localizado, se puede realizar la biopsia del ganglio centinela y no se realizará la disección axilar en principio, y si el tumor es pequeño o en estadios tempranos de la enfermedad, permite la posibilidad de tratar a las pacientes con métodos alternativos a la quimioterapia (Niell et al. 2017).

En relación las desventajas que se encuentran asociadas al *screening* del CaM, el sobre-diagnóstico y los falsos positivos resultantes de éste son los dos puntos más abordados en la bibliografía. El sobre-diagnóstico en este caso está definido como la

detección de cánceres mediante el tamizaje que nunca hubiesen sido sintomáticos o que de otro modo no hubiesen sido identificados en la vida de la persona, y que no le hubiesen traído ningún efecto adverso a la misma (Marmot et al. 2012; Niell et al. 2017; Seely and Alhassan 2018). En el caso particular del CaM, se cree que hay muchos carcinomas ductales *in situ* que son sobre-diagnosticados, lo que lleva a un sobre-tratamiento como consecuencia de esta sobre-detección (Niell et al. 2017; Seely and Alhassan 2018). Igualmente cabe destacar que la detección y el tratamiento de este tipo de carcinomas demostró haber sido efectivo en la disminución de malignidades invasivas (Seely and Alhassan 2018). Finalmente, y en relación al sobrediagnóstico, la otra desventaja del tamizaje son los falsos positivos. Estos traen como consecuencia en los individuos diagnosticados ansiedad, un posible sobre-tratamiento o un mayor riesgo de ser irradiados innecesariamente (Niell et al. 2017; Seely and Alhassan 2018). Los casos de falsos positivos suelen darse en caso de carcinomas lobulillares o en pacientes que presentan mamas densas, que se ha mencionado anteriormente que podrían dar imágenes que no sean muy nítidas (Seely and Alhassan 2018).

Yendo en particular a las limitaciones que presenta el modelo propuesto en el presente trabajo de tesis, se sabe que la edad es un factor de riesgo en el desarrollo del CaM, y en el presente trabajo se puede ver que se utilizaron cohortes significativamente diferentes en edad en pacientes con CaM y VS. Es un aspecto importante que se tuvo en cuenta a la hora de enrolar individuos en el estudio, pero no se logró una mejor distribución en edad, dado que las VS eran mujeres que concurrieron al centro de hemoterapia del Hospital Militar Central o al Hospital Bernardo Houssay a donar sangre, y por ese motivo las edades son dispares. Igualmente, no hay evidencias al día de hoy de que haya dependencia entre la edad de las pacientes y la expresión de los miRNAs, por lo que no sería un problema en el análisis del presente trabajo.

Al momento de proponer nuevos métodos diagnósticos, es muy importante primero delimitar la población sobre la que se hicieron los análisis, que será a futuro la población blanco a la que se le propondrá realizarse esta nueva prueba diagnóstica. En el caso de este trabajo, el criterio de inclusión de las mujeres enroladas en los protocolos fueron pacientes sin enfermedad oncológica previa ni recidivas, que presentaran CaM (en el caso de las pacientes) o que se encontraran sin presencia de enfermedades oncológicas,

que fueran mayores de edad y mujeres principalmente, por lo que, a la hora de aplicar esta prueba a futuro, es un criterio que se deberá tener en cuenta.

Por otro lado, dado que los miRNAs y su detección suelen ser un tanto complejos, se deberá hacer una puesta a punto y comprobación utilizando distintas enzimas y equipamiento, o estandarizar su uso al recomendar enzimas y aparatos específicos, a la vez que se deberán incluir controles positivos, que serán ADN sintético diseñado específicamente para cada uno de los miRNAs a detectar.

Finalmente, otro aspecto no menor a considerar es el manejo de las pacientes con resultado positivo de este ensayo de biopsias líquidas basado en los 4 miRNAs. Es muy importante no olvidar que un resultado positivo puede deberse a la presencia de una enfermedad oncológica. Si bien se detecta CaM con mayor sensibilidad, la paciente puede tener otro tipo de cáncer. En este sentido, se ha conversado con médicos de varias especialidades para estandarizar un protocolo que inicie descartando el CaM, pero continúe con otros estudios de imágenes (tomografía computarizada y resonancia magnética nuclear) para descartar otras patologías oncológicas de una manera secuencial. Finalmente, este ensayo no se ha probado en pacientes con lesiones benignas de la mama, este dato deberá estudiarse a futuro, comenzando en la prueba piloto que se está llevando a cabo.

En base a la información brindada, en este trabajo de tesis se propuso por primera vez la combinación de los miRNAs hsa-miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p y miR-339-3p como biomarcadores de detección para el CaM mediante el desarrollo de un modelo logístico, el cual predice con una alta sensibilidad la probabilidad de una mujer de tener CaM. Este modelo propuesto tendría una mayor sensibilidad comparado con los métodos de tamizaje que se utilizan en la actualidad en la clínica, afirmación que se confirmará o no al momento de la realización de la prueba piloto y posterior seguimiento de las mujeres, y podría, en un futuro, ser utilizado como una herramienta nueva para la detección temprana del CaM.

ANEXO**Capítulo 3 Materiales y Métodos****Tabla suplementaria 1: Tabla resumen de las características principales de las pacientes utilizadas en las cohortes exploratoria y validatoria.**

Nº identificadorio	Cohorte	Estadio	Subtipo	Histológico	Grado Nottingham	Edad
182	Exploratoria	0	S/D	Carcinoma Ductal In Situ	3	56
187	Exploratoria	IA	HER2	Carcinoma Infiltrante NST	S/D	43
192	Exploratoria	IA	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	2	62
198	Exploratoria	IA	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	2	43
200	Exploratoria	IA	S/D	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	79
11	Exploratoria	IIA	LUMB	Carcinoma Ductal Infiltrante	S/D	60
61	Exploratoria	IIA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	61
183	Exploratoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	70
202	Exploratoria	IIA	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	2	36
207	Exploratoria	IIA	TNBC	Carcinoma Ductal Infiltrante	S/D	34
209	Exploratoria	IIA	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	3	50
9	Exploratoria	IIB	HER2	Carcinoma ductolobulillar Infiltrante	3	59
10	Exploratoria	IIB	LUMB	Carcinoma Infiltrante NST	3	51
15	Exploratoria	IIB	TNBC	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	70
194	Exploratoria	IIB	LUMA	Carcinoma ductolobulillar Infiltrante	2	61
208	Exploratoria	IIB	HER2	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	47
7	Exploratoria	IIIA	TNBC	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	3	49
8	Exploratoria	IIIA	HER2	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	3	48
13	Exploratoria	IIIA	LUMB	Carcinoma Infiltrante NST	3	69
16	Exploratoria	IIIA	HER2	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	45
127	Exploratoria	IIIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	62
191	Exploratoria	IIIA	LUMB	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	3	39
193	Exploratoria	IIIA	LUMB	Carcinoma Infiltrante NST	3	40
201	Exploratoria	IIIA	LUMB	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	32
18	Exploratoria	IIIC	LUMB	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	68
100	Exploratoria	IIIC	HER2	S/D	3	44
148	Exploratoria	IIIB	HER2	Carcinoma Infiltrante NST	2	52
186	Exploratoria	IIIC	TNBC	Carcinoma Infiltrante NST	S/D	52
196	Exploratoria	IIIB	S/D	S/D	S/D	S/D
199	Exploratoria	IV	LUMB	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	3	55
261	Validatoria	0	N/A	Carcinoma lobulillar In Situ	S/D	38
243	Validatoria	0	N/A	Carcinoma In Situ	3	43

325	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	44
232	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	1	55
290	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	59
335	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	61
239	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	62
324	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	63
238	Validatoria	0	N/A	Carcinoma In Situ	2	66
333	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	S/D	68
153	Validatoria	0	N/A	Carcinoma Ductal In Situ	2	70
296	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	41
322	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	44
330	Validatoria	IA	HER2	Carcinoma Infiltrante NST/NOS	S/D	44
229	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	47
235	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	49
184	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	2	50
300	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	51
326	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	S/D	51
302	Validatoria	IA	HER2	Carcinoma Infiltrante NST	2	52
356	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	54
270	Validatoria	IA	TNBC	Carcinoma Infiltrante NST	2	54
346	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	55
320	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	2	56
305	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	58
314	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	60
244	Validatoria	IA	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	2	60
306	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	61
192	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	2	62
266	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	67
301	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	68
349	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	68
357	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	68
341	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	69
321	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma ductolobulillar Infiltrante	2	70
369	Validatoria	IA	LUMB	Carcinoma Infiltrante NST	1	72
329	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	76
312	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	79
297	Validatoria	IA	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	1	S/D
343	Validatoria	IB	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	45
236	Validatoria	IB	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	53
281	Validatoria	IB	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	54

230	Validatoria	IB	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	2	60
245	Validatoria	IB	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	72
336	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	48
313	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	50
359	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	51
355	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	53
342	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	63
323	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	67
237	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	69
246	Validatoria	IC	LUMB	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	77
309	Validatoria	IC	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	78
331	Validatoria	IIA	HER2	Carcinoma Infiltrante NST	2	29
318	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	37
436	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	42
310	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	45
292	Validatoria	IIA	TNBC	S/D	S/D	45
291	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	S/D	45
271	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	47
345	Validatoria	IIA	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	1	48
299	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	S/D	51
365	Validatoria	IIA	HER2	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	2	54
273	Validatoria	IIA	LUMB	Carcinoma lobulillar Infiltrante	1	61
370	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	79
308	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	81
316	Validatoria	IIA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	82
248	Validatoria	IIB	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	1	53
337	Validatoria	IIB	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	2	66
328	Validatoria	IIB	S/D	S/D	S/D	68
272	Validatoria	IIB	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	74
227	Validatoria	IIB	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	84
364	Validatoria	IIIA	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	S/D	55
347	Validatoria	IIIA	S/D	Carcinoma papilar invasivo	1	62
307	Validatoria	IIIA	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	68
350	Validatoria	IIIB	HER2	Carcinoma Infiltrante NST	2	52
211	Validatoria	IV	S/D	S/D	S/D	44
348	Validatoria	S/D	S/D	Ginecomastia	S/D	18
435	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	36
332	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	S/D	41
181	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	S/D	42
233	Validatoria	S/D	LUMB	Carcinoma Infiltrante NST	2	44

180	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma Ductal Infiltrante	S/D	47
358	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	49
295	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma lobulillar Infiltrante	1	55
188	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	58
429	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	59
210	Validatoria	S/D	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	2	60
362	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	1	61
242	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	61
353	Validatoria	S/D	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	1	66
298	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma Infiltrante Micropapilar	3	66
264	Validatoria	S/D	S/D	Carcinoma Infiltrante NST	1	67
319	Validatoria	S/D	LUMA	Carcinoma Infiltrante NST	2	67
361	Validatoria	S/D	TNBC	Carcinoma Infiltrante NST	2	69
278	Validatoria	S/D	LUMB	Carcinoma Infiltrante NST	2	71
269	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	75
363	Validatoria	S/D	S/D	Carcinoma Infiltrante tipo NOS	2	82
371	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
372	Validatoria	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D

De las pacientes informadas en la tabla también se han colectado otros datos como BMI, peso, altura, diámetro de la cintura, presión arterial, presencia de metástasis en ganglios, pTNM o cTNM, así como también valor de BIRADS de las mamografías/ecografías, antecedentes familiares y personales de cáncer entre otros datos, los cuales no son mostrados dado la falta de información en varios casos. Abreviaturas utilizadas en la tabla: LUMA: Luminales A; LUMB: Luminales B; TNBC: Triple negativo; S/D: Sin datos; N/A: No aplica

Capítulo 1 Resultados

Tabla suplementaria 2: Lista de genes blanco utilizada para el Diagrama de Venn

miRNAs	Number of genes	Common genes						
Hsa-miR-106b-5p, miR-143-3p & miR-21-5p	5	PRKAB2	TNFRSF10B	RC3H2	CBX5	STRN		
Hsa-miR-106b-5p, miR-205-5p & miR-21-5p	3	PTP4A2	GRSF1	ATL3				
Hsa-miR-106b-5p, miR-143-	1	AHNAK						

3p & miR-205-5p								
Hsa-miR-106b-5p & miR-21-5p	51	LTV1	GNG12	FAM160B1	KANSL1L	PIHF6	ABAT	BRWD1
		CCNI	ARMC8	ZRANB1	WEE1	SESN1	MSI2	IGF2BP1
		CHD9	EPHA4	SCD	TOPORS	MAP3K2	FAM46C	RYBP
		ARL1	CNOT6	STAT3	GAPVD1	ARRDC3	NIPAL1	
		YOD1	UBE2W	HBP1	KPNA4	PLAG1	RSF1	
		PAFAH1B1	PRRX1	HIAT1	CBFB	MARCH6	GAB1	
		FRS2	YY1	PANK3	ZYG11B	DEGS1	APPL1	
		MEF2A	PPP1R3B	LAMC1	TBCEL	SNX30	RPS6KA3	
Has-miR-143-3p & miR-21-5p	14	ATXN10	GPRC5A	RMND5A	SFXN1	AP3M1	FNDC3B	RNF11
		PKD2	CCDC93	KMT2D	PDZD8	QSER1	JPH1	COL12A1
Hsa-miR-205-5p & miR-21-5p	3	FAM63B	CCNG1	TOR1AIP2				
Hsa-miR-106b-5p & miR-143-3p	21	SSH2	VGLL3	NPAT	ZNF217	ELK4	PPP2R2A	PTP4A1
		ABL2	RAD23B	PRDM4	PTPN4	VKORC1L1	CRTC3	SOBP
		PALLD	OTUD4	IER3	KAT6A	WIFP2	PPP4R2	SMIM13
Hsa-miR-106b-5p & miR-205-5p	6	ZNF827	SEMA7A	SUPT16H	B3GNT1	MED13	DNAJC13	
Hsa-miR-143-3p & miR-205-5p	1	SENP2						
Hsa-miR-21-5p	182	B3GNT5	CCAR1	SOX9	SNX29	HNRNPA2B1	ZFYVE16	DUSP16
		NUFIP2	PTK2	SEC63	FKTN	RASGRP1	CMLB	BCL11A
		ANXA1	TRIM2	RAB27B	PTAR1	EIF5	OSBPL11	TESK2
		TC2N	COPS4	FBXO46	PRICKLE2	TNPO1	CXCL10	DNM1L
		CENPQ	EIF1AX	SUB1	MTMR9	CAPN2	DDX1	ARHGAP24
		TRIM33	SKP2	PCBP1	IRF2BPL	PAPD7	IPO11	ADAM22
		HMGB3	SOS2	SMAD7	FOXX1	CEP97	AZIN1	LRRC57
		ZBTB34	THR8	DDI2	RGS1	UBA6	MDN1	CLIC2
		SMARCD1	MAPRE1	OSBPL3	RERE	ZNF10	EHD1	CLNS1A
		YEATS4	PHF16	GID4	GLCCI1	ATP5G3	RAB11A	HGSNAT
		C10orf12	NRIP1	OLR1	RTN4	OSR1	NCOA2	AGO4
		LYRM2	BNIP2	SLC44A1	FASLG	RHOB	ZNF462	GATAD2B
		ATAD2B	PRRG4	KIAA1551	FAM3C	GNAQ	NPTN	LYRM7
		TBK1	DCUN1D3	FOXN2	PRKAA2	IGF1R	AGPAT5	WDR3
		STAG2	SMC1A	PKNOX1	CCSER2	ALDH1A1	CSTB	KIAA1432
		HRK	PJA2	ZSWIM6	ATP11B	KIAA1549	MXD1	PGM3
		ARHGEF12	ENAH	TNS1	LMNB1	MRPL49	CCT5	HNRNPU
		PDCD4	LONRF2	HIPK3	KRIT1	EPM2A	RAB1A	E2F3
		DLX2	FAM208B	TXNL4A	PGRMC1	SUZ12	UX1	GOLGA4
		ANO5	PBRM1	VPS13A	SLC31A1	MED21	RUFY3	PTPN13
		ZBTB38	LMO4	PELI1	ZNF493	ST5	MIA3	USP1
		RMND5B	KLHL9	TSPAN2	BMPR2	MED28	PCBP2	SATB1
		WHSC1L1	ZNF595	SMG1	KLF7	ESYT2	IL1B	RNF6
		SOCS6	LSM3	TSPAN31	CBX4	TMED10	HAX1	SLC16A10

		FBXO11	STK38L	SPIN1	IL10	LRRC8B	RFFL	PGK1
		ATXN7L3B	PITHD1	SNTB2	FNIP2	PCDH17	CALD1	KLF3
Hsa-miR-106b-5p	661	RRN3	SLC40A1	AHRR	FAM118A	FAM105A	MCM4	MIOS
		FSTL1	MYO5B	CCDC6	STYX	ZNF717	ZBTB10	RLIM
		USP30	RNF34	DEF8	SPRYD7	FAM102A	RAB22A	KIAA1462
		CMTR2	MZT1	ZNF724P	XPOT	ZFP91	FGF5	RAB10
		UGCG	MBTPS1	ZFHX4	MARCH7	UGDH	FGFR1OP	TMEM192
		ZHX3	DUSP2	POC1B-GALNT4	TRUB1	GPR137C	DGCR14	SFMBT1
		BTG2	PIK3C3	TNKS2	DERL2	USP31	RNF24	TXN
		OTUD1	CELF1	AFF4	SLC7A11	SLC36A1	NFATC2IP	ZNF207
		COX7A2L	LARS	SAMD10	LIPT1	SOX5	PIP4K2C	SFT2D2
		PFKP	SPOPL	AKAP10	C2orf69	RAP1B	RIT1	ZNF770
		ANKRA2	SEC23IP	ALG13	SLC5A3	ADAMTS1	NABP1	PAF1
		AEN	AGPAT3	STC1	CAMK2N1	BIRC6	GPAM	FAM117B
		FGL2	IRS1	FRMPD4	NFIC	PPP3R1	MTPN	C16orf70
		RGMB	DHX33	NSD1	UTP23	USP46	SSR1	F3
		SOS1	ZNF24	FRMD6	TES	FAM117A	SLC25A36	EIF4G2
		NHLRC3	ZZEF1	MAPRE3	WDR26	APOPT1	PPP2CA	PWWP2B
		ARHGAP11A	RAD18	ARPP19	ASB1	MED17	C2CD2	FICD
		G3BP1	RAI14	LDLR	C3orf70	NLK	KIF13A	EPAS1
		MPZL2	FKBP14	RIF1	BCL11B	BCORL1	NAA30	CDC5L
		UBE2G1	FGD4	COPS2	RP2	EID2B	MSMO1	UBE3C
		AGFG1	DYNC1LI2	BVES	UBE2B	FMNL3	ADIPOR1	HNRNPH2
		GTF2A1	CRIP	RBM26	CCNT2	SNAP23	SKIDA1	MKRN1
		EP300	COIL	VLDLR	JOSD1	TMED8	GCNT4	NCOA7
		RASSF3	GPATCH2L	DBT	RNF138	SDHAF2	SYBU	ZBTB5
		C2orf49	APPBP2	HPS3	SLC35A1	PIP4K2A	DDX17	MORF4L1
		NBEAL1	ZBTB18	NAA50	LASP1	ARHGAP1	KLHDC10	PEX5L
		KBTBD8	COA5	SAMD9L	PLAA	ZBTB33	PKIA	SBNO1
		AP1G1	TMEM33	NTN4	ZBTB4	MED7	SRSF2	DOCK7
		GNAI3	ARIH1	EPHA7	MBD2	ZNF706	RAB12	B4GALT5
		VCPIP1	SIPA1L2	EDNRB	HEG1	S1PR1	ZNF106	TRPS1
		NETO2	ERAP1	EIF2S1	ZBTB6	CIC	ABHD10	FBXO28
		SLC16A14	ARL4C	EPRS	MCL1	TMX3	MED12L	CASP2
		MMS22L	POU6F1	TNFRSF17	EHBP1	MTURN	ABHD17B	CAPN7
		DSP	CCNG2	RBM7	WDR82	ANKRD13C	PANK2	BNC2
		IRF1	SCD5	SPAG9	PRNP	CHD2	ACVR1B	GTF2H3
		INIP	ACTR1A	ZNF264	FAF2	JMY	DCAF10	RANBP2
		SOX4	VPS25	PDPK1	CEP104	SLC9A6	TM9SF3	ETV1
		C5orf24	AQP4	CD2AP	MAN1A2	SNX9	FAM83D	EOGT
		PTPDC1	UBN2	WDR36	USP37	DCUN1D1	SMG7	TTC9
		MED13L	TANC1	MYCL	PTBP1	POLR2F	GINM1	ADAMTS5
		NFIA	NEBL	ROBO1	FBXO30	REEP5	SLC41A1	STK38
		RAB8B	GPATCH2	XIAP	CSRNP3	FOXA1	TGFBR2	CYBRD1
		CCDC50	UBXN7	TMEM9B	CDC40	TSC22D2	C16orf87	RBP1

		ATG2B	TP53INP2	SLC36A4	GALNT10	IFI44L	ACAP2	PPP2R3A
		TAF7	ANTXR2	GPR176	H1F0	RASA2	ZNF680	BMP2K
		LAPTM4A	PCCB	GNS	CREBL2	ANKFY1	SUCO	C3orf38
		RFC3	MAK16	IFNAR1	BBX	ABHD13	GXYLT1	SESN2
		ARL4A	SMYD5	MKLN1	CREB5	IQGAP1	NBL1	HNRNPL
		TAOK3	TPBG	LAMTOR5	WFS1	CCPG1	KCNN2	TMEM56
		RUNX3	TUSC2	B2M	PTDSS1	CKAP2	FBXL3	TMEM168
		SLK	SUV420H1	KIF5A	CUL1	TMEM181	TMEM30A	FJX1
		DIP2C	GMFB	TBC1D20	DEPDC1	ZBTB9	ATXN1	NARS
		ZNF202	TCF4	PARD6G	TNFAIP1	ITPKB	FAM168A	RNF128
		MAP3K5	NUPL1	ZFYVE20	ZDHHC17	FGF2	CTNND1	PHTF2
		ROCK2	POGK	ADO	PKN2	SLAIN2	GPD2	CSNK2A1
		ZNF704	NRAS	ZNF362	SEC23A	AMMECR1L	ZNF800	EPM2AIP1
		CYP2U1	CXCL8	UBE2J1	MCF2L	SKI	VANGL1	WAC
		SQSTM1	MAPK9	TGFBR1	LGALSL	TET2	PDZD11	LRPAP1
		FOXK2	UTP14C	HAS2	VASH2	CCNT1	CPS1	SIK1
		TMEM127	PPTC7	WDR4	DCTN4	LAMTOR1	CCDC71L	FCHO2
		SAMD12	CSTF2T	CNOT7	BRI3BP	TCERG1	CCND2	RUFY2
		LNPEP	RPP14	CRIM1	KCNK2	RRM2	LZIC	SLC17A5
		CTDSPL2	KIF14	CCND1	SOGA1	PHACTR2	AJUBA	STK17B
		KPNA3	37469	TCEB3	SIKE1	KLHL8	PIK3R1	HIPK1
		FBXO22	CDR2	NOTCH2	VEZF1	ARAP2	CYB561D1	ARSJ
		KCNC1	FOXJ2	TSNAX	PRKAR2B	PRR15	ANKIB1	MBOAT2
		FITM2	DUSP18	KDM6B	KDM5B	MFN1	HELZ	PARD6B
		GOLGA3	C10orf76	PSMD12	DNM3	ANKRD50	EIF4A2	FMN2
		BTG1	AHR	ZBTB7A	TCF7L1	EFNB2	SCAMP2	PDE4A
		C5orf28	MAGT1	IPO5	CITED2	IPO7	TET1	SAR1B
		MFSD8	COQ10B	UBE2Q2	CLSTN1	RNASEH2B	PREPL	ZNF850
		RAPH1	SERTAD2	KLF12	MYLIP	F2R	CENPI	PAK2
		PCYT1A	GOLGA1	PLEKHO2	RBM12	CAMSAP2	KLHL20	VHL
		MSH6	IQSEC2	KCNK1	NUCKS1	RBBP7	SNRPD3	MAP3K9
		GREB1	C7orf60	MEX3D	EIF4E	PIGN	PPM1G	UBXN2A
		PELO	DYRK2	CHMP3	PRPF4	DNAJC27	SPRY4	SMAD5
		MOSPD2	PCNX	IPMK	MKNK2	TMBIM6	RAP2C	C1orf43
		REEP3	RNF2	GPR157	DEDD	TNFRSF21	FBXO48	CAMK2N2
		POLR1E	SH3PXD2A	AGFG2	FOXJ3	ZNF367	RORC	RBMS1
		SEMA3A	ABCD2	FAM199X	RCCD1	PDE7A	OTULIN	ZNF445
		BTN3A1	PGM2L1	CDCA7	SLC35F5	RASL11B	RNF149	MDM4
		RPA2	ANKRD52	IRS2	EZH1	TIMMDC1	WDR37	STT3B
		TRIM3	ARNTL2	NAPEPLD	DVL3	SMU1	CDC42SE2	SYAP1
		LAMP3	TAGAP	CRYBG3	METTL14	RSBN1	SH3RF1	C2CD4A
		ABCA1	PFN2	SPECC1	F13A1	SMOC1	VMA21	UBC
		REST	TMPO	CBX8	PTPRD	KIAA1191	HIVEP3	NDN
		PLXNA1	MOB1B	CUL3	IL17RD	MOB1A	ARHGAP35	DUSP8
		OTUD3	C6orf62	RND3	TFAM	GSPT1	CAPN15	DCAF8
		LRRC58	RRAS2	CALCOCO2	SASH1	C5orf30	RIMKLA	DNAJC10

		PPM1A	NDUFS2	TRIB1	SLC22A23	CNTNAP2	ASF1A	SLC39A6
		IPO8	STRIP1	ZKSCAN1	GIPC2	TMEM200C	CTSA	XRCC2
		ULK1	NRBP1	YPEL1	LDLRAP1	MACC1	TTPAL	
		CAMTA1	ASXL2	SLC48A1	FAM8A1	KCMF1	ZMPSTE24	
		SLC2A3	BLOC1S5-TXNDC5	ITGB8	KIAA0247	SOCS1	SKIL	
		TEAD3	ZNF738	PHF12	USP15	AP3D1	CERCAM	
Hsa-miR-143-3p	133	CD44	CCSER1	GATAD1	FAM60A	TPP1	CRAMP1L	37104
		CIPC	LIMD1	KIAA1147	XPR1	LIFR	ARSD	KLHL11
		RAE1	CHD6	PTGS2	PRKCE	HCCS	EIF2AK1	COL5A1
		C9orf91	KIAA0355	NPR3	PTPN23	MGA	MAP1B	VTI1B
		NUP155	INO80D	SIPA1L3	INPP5F	PACS1	RANBP10	JDP2
		ZDHHC2	SARS	ADAM10	SLC25A25	FSCN1	RARG	ARCN1
		TFDP2	CPSF7	ANKRD17	EIF2AK2	TRAK2	BRWD3	AKAP11
		GPR180	PDP1	DRAM1	TMEM178B	CMPK1	KANK2	ZSCAN22
		BBC3	ATF7	ATXN7	GFPT1	SECISBP2L	SLC1A3	MTMR3
		TMEM19	VASH1	CTH	R3HCC1L	CXCL12	REL	GATM
		CAND1	MED14	TMED5	WDR11	EPG5	LOXL4	PGD
		TENM4	HSPA4L	CSNK2A2	SAP130	TMEM245	YARS	SLC38A7
		COL1A1	ASH1L	PPIA	KRT80	TBL1XR1	AMOTL1	RPL37
		PTPN11	EMP1	MLLT3	ARHGAP18	THBS1	RGP1	GGA2
		GTF3C3	ARPC5	GPD1L	MAPK1	JARID2	37865	SF3B3
		C5orf38	ZNF709	AMIGO1	UBE2R2	CA2	HIPK2	VPS45
		ZFP37	CDK6	KPNA1	IAPP	PRSS23	TCF20	AMER1
		FNDC1	TMEM248	IGFBP5	ANKH	PAFAH1B2	AKAP8	HDLBP
		SRSF11	ZNF281	SLC25A42	ETFDH	DCP2	IGF2R	SENP5
Hsa-miR-205-5p	48	C9orf78	KIFAP3	TTC3	CBWD5	HNRNPH3	CHCHD3	SRPR
		PTEN	BCL2	NDUFA4	NXF1	SEH1L	CCNJ	PSMD13
		NDST1	FEM1B	CBX1	VEGFA	CRLF3	HSPA9	UPP1
		TERF2IP	MRPS17	PSMD2	TP53BP1	SNW1	CREB1	CHURC1
		CHMP5	TSPYL4	RNF168	TCEAL4	IRF4	TDG	CALM1
		NEFH	E2F1	APTX	RAB31	ROCK1	TMEM39B	PHLDB2
		PSMG4	MYL6	KCNJ10	YES1	LETM2	PRELID1	

Tabla suplementaria 3: Genes blanco de los hsa-miR-205-5p y hsa-miR-143-3p y sus respectivas vías de señalización

Term	P-value	Adjusted P-value	Genes
Disease	1,13E-07	8,75E-05	SEH1L;PSMD13;SRPR;PTEN;PSMD2;MAPK1;RPL37;RAE1;KPNA1;SUPT16H;IGFBP5;NUP155;PRKCE;GFPT1;EIF2AK2;ADAM10;PTPN11;CREB1;PACS1;IAPP;TPP1;CALM1;GRSF1;PPIA;CD44;DCP2
p53 activity regulation	1,08E-05	0,003653404	CDK6;CCNG1;BCL2;PTEN;E2F1;TNFRSF10B;THBS1;BBC3;HIPK2
Signaling by PDGF	1,41E-05	0,003653404	COL1A1;CREB1;COL5A1;PRKCE;PTEN;MAPK1;PTPN11;CALM1;THBS1

Senescence and autophagy	2,20E-05	0,004045415	COL1A1;IGFBP5;BCL2;PTEN;E2F1;MAPK1;THBS1;CD44
Integrins in angiogenesis	2,61E-05	0,004045415	COL1A1;ROCK1;COL5A1;COL12A1;MAPK1;PTPN1;VEGFA
HIV factor interactions with host	1,37E-04	0,013408765	SEH1L;NUP155;PSMD13;PACS1;PSMD2;PPIA;RAE1;KPNA1
Signaling events mediated by PRL	1,38E-04	0,013408765	PTP4A1;PTP4A2;ROCK1;MAPK1
Gastrin pathway	1,60E-04	0,013408765	BCL2;PTGS2;CD44;IER3;VEGFA
Interleukin-2 signaling pathway	1,72E-04	0,013408765	YARS;YES1;AHNAK;PRKCE;DNAJC13;PTPN11;PKD2;MLLT3;PRSS23;BBC3;VEGFA;PTP4A1;RAB31;INPP5F;ATXN7;IRF4;REL;BCL2;MAPK1;UPP1;PTPN4;PHLDB2;IER3
MicroRNA regulation of DNA damage response	1,73E-04	0,013408765	CREB1;CDK6;CCNG1;E2F1;TNFRSF10B;BBC3
Physiological and pathological hypertrophy of the heart	2,27E-04	0,015990105	PRKCE;MAPK1;LIFR;CALM1
Rev-mediated nuclear export of HIV-1 RNA	2,64E-04	0,017048987	SEH1L;NUP155;RAE1;KPNA1
Interleukin-5 regulation of apoptosis	3,08E-04	0,017633183	YES1;CREB1;BCL2;REL;UPP1;PTGS2;CD44;IER3
Type I interferon (interferon-alpha/beta) pathway	3,25E-04	0,017633183	PTP4A1;PTP4A2;PTPN11;PTPN23;PTPN4
Signaling by EGFR in cancer	3,41E-04	0,017633183	CREB1;PRKCE;PTEN;ADAM10;MAPK1;PTPN11;CALM1
Melanocyte development and pigmentation pathway	4,20E-04	0,019338708	CREB1;BCL2;MAPK1
Transport of mature transcript to cytoplasm	4,63E-04	0,019338708	NXF1;SEH1L;NUP155;RAE1;SRSF11
Gene expression	4,70E-04	0,019338708	YARS;RARG;SUPT16H;CPSF7;GTF3C3;SEH1L;SF3B1;NUP155;PSMD13;SRPR;SARS;PPP2R2A;NXF1;MED14;SNW1;MED13;TFDP2;TBL1XR1;PSMD2;RPL37;RAE1;ZFP37;DCP2;SRSF11
Developmental biology	4,73E-04	0,019338708	SEMA7A;ROCK1;CSNK2A2;PTPN11;COL1A1;MYL6;MED14;MED13;CREB1;COL5A1;TBL1XR1;ABL2;MAPK1;IAPP
Hypothetical network for drug addiction	5,16E-04	0,020017683	CREB1;PRKCE;MAPK1;TERF2IP
HIV infection	6,19E-04	0,022858136	SUPT16H;SEH1L;NUP155;PACS1;PSMD13;PSMD2;RAE1;PPIA;KPNA1
PDGFB signaling pathway	8,40E-04	0,025987802	YES1;PRKCE;PTEN;EIF2AK2;MAPK1;PTPN11;ARPC5
Interferon signaling	8,56E-04	0,025987802	SEH1L;NUP155;IRF4;EIF2AK2;PTPN11;RAE1;CD44;KPNA1
Activation of BH3-only proteins	9,64E-04	0,025987802	BCL2;E2F1;BBC3
Glioma	9,99E-04	0,025987802	CDK6;PTEN;E2F1;MAPK1;CALM1
Cyclin D-associated events in G1	0,001002263	0,025987802	CDK6;TFDP2;E2F1;PPP2R2A
EGFR interaction with phospholipase C-gamma	0,001002263	0,025987802	CREB1;PRKCE;MAPK1;CALM1
Transport of mature mRNAs derived from intronless transcripts	0,001002263	0,025987802	NXF1;SEH1L;NUP155;RAE1
p38 alpha/beta MAPK downstream pathway	0,001002263	0,025987802	ELK4;CREB1;CSNK2A2;PTGS2
Tight junction	0,001004683	0,025987802	YES1;PRKCE;CSNK2A2;PTEN;PPP2R2A;AMOTL1;ASH1L
Capped intron-containing pre-mRNA processing	0,00124565	0,031181422	NXF1;CPSF7;SEH1L;SF3B3;NUP155;RAE1;SRSF11

Signaling by ERBB2	0,001300078	0,031526902	YES1;CREB1;PRKCE;PTEN;MAPK1;CALM1
Activation of NOXA and translocation to mitochondria	0,001343031	0,031581588	E2F1;BBC3
Antiviral mechanism by interferon-stimulated genes	0,001396186	0,031669421	SEH1L;NUP155;EIF2AK2;RAE1;KPNA1
Bladder cancer	0,001465087	0,031669421	E2F1;MAPK1;THBS1;VEGFA
Influenza infection	0,0014692	0,031669421	SEH1L;NUP155;EIF2AK2;RPL37;GRSF1;RAE1;KPNA1
Estrogen receptor signaling pathway	0,001574974	0,032926757	CREB1;BCL2;MAPK1
Axon guidance	0,001676784	0,032926757	COL1A1;MYL6;SEMA7A;CXCL12;CREB1;COL5A1;ROCK1;CSNK2A2;ABL2;MAPK1;PTPN11
Interactions of HIV Vpr protein with host cellular proteins	0,001744653	0,032926757	SEH1L;NUP155;RAE1;KPNA1
RANKL regulation of apoptosis and immune response	0,001789221	0,032926757	MYL6;BCL2;ADAM10;CALM1;CD44
Focal adhesion	0,001801245	0,032926757	COL1A1;MYL6;COL5A1;ROCK1;BCL2;PTEN;MAPK1;THBS1;VEGFA
S1P/S1P1 pathway	0,001821634	0,032926757	MAPK1;PTGS2;VEGFA
Immune system signaling by interferons, interleukins, prolactin, and growth hormones	0,00182455	0,032926757	SEH1L;YES1;NUP155;IRF4;EIF2AK2;MAPK1;PTPN11;RAE1;CD44;KPNA1
Syndecan 1 pathway	0,002059214	0,036317054	COL1A1;COL5A1;COL12A1;MAPK1
Integrated breast cancer pathway	0,002165805	0,037348099	CREB1;BCL2;PTEN;E2F1;MAPK1;HIPK2;VEGFA
Signaling by SCF-KIT	0,002257788	0,038087894	CREB1;YES1;PTEN;MAPK1;PTPN11
Apoptosis	0,002328336	0,03844232	ROCK1;PSMD13;IRF4;PSMD2;BCL2;E2F1;TNFRSF10B;BBC3;KPNA1
Inactivation of BCL-2 by BH3-only proteins	0,002776877	0,044892848	BCL2;BBC3
Small cell lung cancer	0,003119812	0,049407642	CDK6;PTEN;E2F1;BCL2;PTGS2

Se señala en color azul en la tabla aquellas vías de señalización incluidas en el diagrama de cuerdas de la Figura 14.

Tabla suplementaria 4: Genes blanco de los hsa-miR-21-5p y hsa-miR-106b-5p y sus respectivas vías de señalización

Term	P-value	Adjusted P-value	Genes
Interleukin-2 signaling pathway	1,28E-07	1,39E-04	RERE;TES;BTG1;CXCL8;IRS1;CITED2;FASLG;IRS2;SLC2A3;AHR;PKD2;GALNT10;FGF5;RPS6KA3;CCND2;CCND1;RGS1;CIC;IER3;IL10;EPHA4;CSNK2A1;BTN3A1;VPS13A;ARAP2;RRAS2;VEZF1;DUSP8;JOSD1;TGFB2;ITPKB;PTP4A1;IL1B;IRF1;WAC;SOS1;FAM8A1;B4GALT5;USP15;AHNAK;CBFB;PLAG1;PIK3R1;TXN;RASGRP1;MAPK9;NRAS;SOCS1;CAMK2N1;STK38;UBC;S1PR1;ZSWIM6;E2F3;ZBTB7A;LDLR;CDR2;FKTN;SPAG9;STAT3;RAB27B;DNAJC13;SMAD5;EHD1;CENPI;PKIA;CCNG2;STK17B;NFIC;YPEL1;PDCD4;ESYT2;PTPN4;BRWD1;PDE7A
TGF-beta signaling pathway	7,36E-06	0,004023598	MEF2A;PDPK1;STAT3;CUL1;XIAP;PPP2R2A;PIK3R1;RUNX3;SMA5;PTK2;TGFB2;SMAD7;TGFB2;PPP2CA;SKI;PPM1A;MAPK9;ZFYVE16;CCND1;EP300;SIK1;SOS1;SKIL;PAK2
T cell receptor regulation of apoptosis	1,14E-05	0,00416079	BIG1;CXCL8;POGK;FASLG;YY1;TBK1;CCND2;CCND1;CASP2;CEP97;IER3;IL10;ANXA1;F2R;ATP11B;VEZF1;DUSP8;RAD23B;ZDHHC17;PPM1A;HAX1;TMX3;RP2;IL1B;IRF1;KIAA0247;TFAM;TMBIM6;MAPRE1;IFNAR1;PSMD12;EPAS1;SATB1;CUL1;SLC5A3;RASGRP1

MAPK signaling pathway	1,63E-05	0,004464616	;NRAS;PGK1;BNIP2;ZBTB7A;MCL1;ZBTB18;MAP3K2;ERAP1;TNF RSF10B;KLHL20;CXCL10;SCD;PKIA;STK17B;JMY;PDE7A;TMEM9B FASLG;NLK;ACVR1B;FGF2;RASGRP1;DUSP16;ELK4;FGF5;RAP1B; RPS6KA3;MAPK9;PPP3R1;NRAS;MKNK2;CASP2;MAP3K9;PAK2;E IF4E;MAP3K5;MEF2A;MAP3K2;DUSP2;RRAS2;GNG12;DUSP8;T GFBR1;TGFBR2;PPM1A;TAOK3;IL1B;RASA2;SOS1;SOS2 RANBP2;TMED10;CELF1;DDX1;HNRNPU;CSTF2T;GTF2H3;SMC1 A;CDC40;CCAR1;PPM1G;HNRNPL;PRPF4;PTBP1;PCBP1;PCBP2;H NRNPA2B1;SRSF2;POLR2F;HNRNPH2;SNRPD3;TXNL4A;NUPL1;E IF4E
Messenger RNA processing	3,52E-05	0,006916179	A;CDC40;CCAR1;PPM1G;HNRNPL;PRPF4;PTBP1;PCBP1;PCBP2;H NRNPA2B1;SRSF2;POLR2F;HNRNPH2;SNRPD3;TXNL4A;NUPL1;E IF4E
Signaling by FGFR mutants	3,80E-05	0,006916179	FGF5;NRAS;CUX1;STAT3;GAB1;FGFR1OP;FRS2;PIK3R1;SOS1;FG F2
Messenger RNA splicing: major pathway	7,43E-05	0,010071272	HNRNPL;PTBP1;PRPF4;PCBP1;PCBP2;HNRNPA2B1;SRSF2;HNRN PU;HNRNPH2;SMC1A;CDC40;CCAR1
Antigen presentation: folding, assembly, and peptide loading of class I MHC proteins	8,23E-05	0,010071272	PSMD12;SEC23A;RNF34;UBE3C;SAR1B;UBA6;CUL3;CUL1;RNF6; UBE2J1;SOCS1;RNF138;UBE2Q2;UBC;VHL;SKP2;B2M;UBE2B;ER AP1;LNPEP;UBE2G1;PJA2;KLHL20;KLHL9;UBE2W;MKRN1;ASB1
Eukaryotic protein translation	8,75E-05	0,010071272	EIF4A2;EIF5;EIF1AX;EIF2S1;EIF4E;EIF4G2
Capped intron-containing pre-mRNA processing	9,21E-05	0,010071272	RANBP2;HNRNPU;SMC1A;CDC40;CCAR1;HNRNPL;PRPF4;PTBP1 ;PCBP1;PCBP2;HNRNPA2B1;SRSF2;POLR2F;HNRNPH2;SNRPD3; TXNL4A;EIF4E;NUPL1
Neurotrophic factor-mediated Trk receptor signaling	1,03E-04	0,010227585	RAP1B;NRAS;RIT1;CCND1;MCF2L;STAT3;GAB1;FRS2;PIK3R1;SO S1;SQSTM1
Protein processing in the endoplasmic reticulum	1,18E-04	0,010775865	MBTPS1;SEC23A;SAR1B;WFS1;CUL1;DERL2;YOD1;UBE2G1;EIF2 S1;RAD23B;UBE2J1;MAPK9;MAN1A2;DNAJC10;CAPN2;PLAA;SS R1;STT3B;MAP3K5;SEC63
Insulin signaling pathway	1,37E-04	0,010973012	PRKAA2;IRS1;ROCK2;SNAP23;RORC;IRS2;PIK3R1;IGF1R;RPS6KA 3;MAPK9;NRAS;SOCS1;PRKAR2B;MKNK2;MAP3K9;EIF4E;MAP3 K5;MAP3K2;PRKAB2;CSNK2A1;PDPK1;GAB1;RHOB;EHD1;PPP1R 3B;PIK3C3;SOS1;SOS2
p53 activity regulation	1,41E-04	0,010973012	DYRK2;RRM2;TNFRSF10B;FBXO11;YY1;PPP2CA;MAPK9;CCND2; CCND1;SESN1;CCNG2;SESN2;CCNG1;EP300;MDM4;SKP2
Signaling by insulin receptor eIF4E and p70 S6 kinase regulation	1,90E-04	0,013310553	PRKAB2;PRKAA2;IRS1;PDPK1;GAB1;IRS2;FRS2;PIK3R1;FGF2;FGF 5;PPM1A;NRAS;PIK3C3;SOS1;EIF4E
Wnt signaling pathway and pluripotency	2,01E-04	0,013310553	EIF4A2;PPP2CA;IRS1;PDPK1;PIK3R1;EIF4E;EIF4G2
Skeletal muscle hypertrophy is regulated via AKT/mTOR pathway	2,43E-04	0,014326993	TCF7L1;CTNND1;PPP2R2A;ZBTB33;PPP2R3A;NLK;PPP2CA;MAP K9;CCND2;CCND1;EP300;DVL3;LDLR;PAFAH1B1
Signaling by TGF-beta receptor complex	2,49E-04	0,014326993	PPP2CA;PDPK1;PIK3R1;EIF2S1;EIF4E;IGF1R
Gene expression	2,75E-04	0,015038801	SKI;PPM1A;USP15;CCNT2;CCNT1;UBC;SKIL;TGFBR1;TRIM33;TG FBR2;SMAD7
			EIF4A2;SMG1;ZNF493;CCNT2;THRB;CCNT1;CHD9;RORC;HNRN U;PPP2R2A;EPRS;SMG7;MED17;CCAR1;NARS;PTBP1;MED13;SN RPD3;ZNF445;TXNL4A;TNPO1;ZNF202;TEAD3;NCOA2;SUPT16H; EIF1AX;ZNF10;SMC1A;CDC40;NRBP1;MED7;PPM1A;PRPF4;CLN

SHP2 signaling	3,07E-04	0,015734837	S1A;SRSF2;TFAM;HNRNPH2;ZNF595;NOTCH2;GTF2A1;PSMD12;RRN3;PPP2CA;LARS;PCBP1;PCBP2;UBC;TCEB3;SSR1;POLR2F;EIF4E;SKIL;ZKSCAN1;RANBP2;ZNF264;MBD2;GTF2H3;EIF2S1;LSM3;SMAD7;SKI;HNRNPL;CNOT6;EIF5;CNOT7;NFIA;NFIC;HNRNPA2B1;NUPL1;TRIM33
IGF1 pathway	3,26E-04	0,015734837	NRAS;IRS1;LMO4;GAB1;GNAI3;FRS2;PIK3R1;SOS1;ARHGAP35;IGF1R
Cyclin D-associated events in G1	3,38E-04	0,015734837	IRS1;PDPK1;IRS2;PIK3R1;SOS1;PTK2;IGF1R
Signaling by NGF	3,46E-04	0,015734837	PPP2CA;CCND2;CCND1;UBC;CUL1;PPP2R2A;E2F3;SKP2
E-cadherin nascent AJ-like junctions pathway	4,07E-04	0,017565651	MEF2A;ARHGEF12;PRDM4;IRS1;PDPK1;STAT3;FRS2;IRS2;PIK3R1;RTN4;PPP2CA;DNM3;RPS6KA3;FGD4;NRAS;RIT1;PRKAR2B;MCF2L;UBC;CASP2;SOS1;SQSTM1;SOS2
Interleukin-4 regulation of apoptosis	4,18E-04	0,017565651	RAP1B;ENAH;CCND1;CSNK2A1;CTNND1;IQGAP1;PIK3R1;KLHL20
Developmental biology	4,54E-04	0,018363952	CXCL8;CITED2;SATB1;FGL2;F13A1;OSBPL11;RASGRP1;ATXN1;S1PR1;CASP2;KCNN2;TNS1;IL10;ANXA1;F3;ZDHHC17;ITPKB;ARL4C;CCPG1;STK17B;RASA2;MCM4;RBMS1;MXD1;SOS1;FJX1SEMA7A;ROCK2;CHD9;SEMA3A;NTN4;LAMC1;ACVR1B;ARHGAP35;MED17;ROBO1;RPS6KA3;NRAS;MED13;ABL2;PLXNA1;EP300;BNIP2;PAK2;MEF2A;SPAG9;NCOA2;PRNP;ARHGEF12;CSNK2A1;RGMB;PTK2;MED7;MED13L;RHOB;ENAH;DNM3;MED21;TCF4;SOS1;SOS2;PFN2
PRC2 complex long-term gene silencing through modification of histone tails	4,75E-04	0,018544146	SUZ12;YY1;CBX4;RBBP7;EZH1
Apoptosis	5,27E-04	0,019302118	HRK;DSP;PSMD12;SATB1;XIAP;TNFRSF10B;FASLG;PIK3R1;PTK2;IGF1R;LMNB1;PPP3R1;H1F0;PRKAR2B;IL1B;IRF1;UBC;CAPN2;CAPN2;DNM1L;PAK2;TNFRSF21;APPL1;MCL1
Signaling by bone morphogenetic protein (BMP)	5,59E-04	0,019302118	SKI;BMPR2;ZFYVE16;FSTL1;SMAD5;SMAD7
Plasma membrane estrogen receptor signaling	5,82E-04	0,019302118	NRAS;ROCK2;GNAQ;GNAI3;STRN;PIK3R1;SOS1;IGF1R
Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3-SMAD4 heterotrimer	5,82E-04	0,019302118	SKI;PPM1A;CCNT2;CCNT1;UBC;SKIL;TRIM33;SMAD7
Endocytosis	5,83E-04	0,019302118	IQSEC2;F2R;ZFYVE20;ARAP2;PARD6G;RAB22A;RAB11A;TGFBR1;IGF1R;SMAD7;TGFBR2;EHD1;DNM3;ACAP2;PARD6B;ZFYVE16;CHMP3;LDLRAP1;DNM1L;VPS25;LDLR
Signaling by Robo receptor	6,21E-04	0,01994998	ENAH;ABL2;SOS1;PAK2;SOS2;ROBO1;PFN2
Immune system	6,44E-04	0,020098146	EIF4A2;UBE3C;IRS1;IRS2;RPS6KA3;ACTR1A;TBK1;UBE2Q2;AP1G1;KIF5A;EP300;CASP2;KPNA4;ARIH1;SKP2;KPNA3;B2M;MEF2A;PDPK1;ZFYVE20;PJA2;ENAH;DNM3;DYN1LI2;SIKE1;IL1B;IRF1;PELI1;PIK3C3;SOS1;SQSTM1;IFNAR1;SEC23A;PSMD12;RNF34;SAR1B;UBA6;DCTN4;CUL3;CUL1;RNF6;PIK3R1;TXN;RASGRP1;UBE2J1;RAP1B;PPP2CA;MAPK9;NRAS;SOCS1;RNF138;PCBP2;UBC;VHL;EIF4E;PAK2;CTSA;RANBP2;UBE2B;STAT3;ERAP1;LNPEP;UBE2G1;KLHL20;KLHL9;UBE2W;MKRN1;NUPL1;EIF4G2;ASB1

BMP receptor signaling	6,89E-04	0,020923874	SKI;PPM1A;BMPR2;ZFYVE16;XIAP;RGMB;SMAD5;SMAD7
FSH regulation of apoptosis	7,60E-04	0,022284792	RAB1A;SMARCD1;CTNND1;SNAP23;ARHGAP1;MSMO1;CREBL2;VLDLR;NLK;ARHGAP35;PPP3R1;PGRMC1;PGK1;LDLR;IER3;MAP3K5;CSNK2A1;BCL11A;MBD2;RHOB;TGFB2;ARL4C;PTP4A1;GPRC5A;TMBIM6
p75 neurotrophin receptor-mediated signaling	7,75E-04	0,022284792	ARHGEF12;PRDM4;XIAP;PIK3R1;RTN4;RHOB;FGD4;MAPK9;MCF2L;UBC;NDN;CASP2;SOS1;SQSTM1;SOS2
TGF-beta regulation of extracellular matrix	8,69E-04	0,024111626	DLX2;SEC23A;CITED2;SEMA3A;FGL2;SLC40A1;STC1;AHR;PIK3R1;SLC7A11;LAMC1;UGCG;GOLGA4;PGRMC1;CCND1;ADAMTS1;STK38;S1PR1;SSR1;HAS2;BNIP2;E2F3;FAM3C;SKIL;MAP3K5;MAP3K2;MBTPS1;TCF7L1;F2R;ZNF10;PTPN13;F3;SMAD7;SKI;ARL4A;WEE1;NFIA;SCD;IL1B;STK17B;RBP1;CCNG1;SOS2;PFKP
mTOR signaling pathway	9,04E-04	0,024111626	EIF4A2;PRKAA2;RRN3;IRS1;PDPK1;PIK3R1;YY1;PPP2CA;RPS6KA3;NRAS;PDCD4;ULK1;EIF4E;EIF4G2
HIV-1 elongation complex formation in the absence of HIV-1 Tat	9,04E-04	0,024111626	SUPT16H;CCNT2;CCNT1;TCEB3;GTF2H3
Signaling by FGFR in disease	0,001077714	0,027434015	PDPK1;STAT3;GAB1;FRS2;PIK3R1;IL17RD;FGF2;FGF5;PPP2CA;NRAS;CUX1;PRKAR2B;UBC;FGFR1OP;SOS1
EGF receptor (ErbB1) signaling pathway	0,001095619	0,027434015	NRAS;STAT3;GNAI3;GAB1;PIK3R1;SOS1;PTK2
Actin cytoskeleton regulation	0,001126934	0,027434015	ARHGEF12;ROCK2;F2R;RRAS2;IQGAP1;PIK3R1;GNG12;SSH2;FGF2;PTK2;ARHGAP35;ENAH;FGF5;NRAS;PIP4K2A;ITGB8;PIK3C3;PIP4K2C;SOS1;PAK2;SOS2;PFN2
TGF-beta signaling in development	0,001129488	0,027434015	BMPR2;ACVR1B;SMAD5;TGFBR1;SMAD7;TGFBR2
Nuclear beta-catenin signaling and target gene transcription regulation	0,001331625	0,031640577	NCOA2;TCF7L1;CXCL8;CCND2;CCND1;CUL1;IGF2BP1;EP300;DVL3;HBP1;TCF4
Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism	0,001461916	0,033661437	ABCA1;AGPAT5;NCOA2;PRKAB2;PRKAA2;CHD9;AGPAT3;MED7;MED13L;MED17;MED13;GPAM;GPD2;MED21;PCCB;EP300;TNF;RSF21;TEAD3
ERBB1 downstream pathway	0,001494205	0,033661437	MAP3K2;PDPK1;STAT3;GAB1;PPP2R2A;IQGAP1;PIK3R1;PPP2CA;RPS6KA3;MAPK9;NRAS;CAPN2;SOS1
IGF-1 receptor and longevity	0,001570662	0,033661437	IRS1;PDPK1;PIK3R1;SOS1;IGF1R
PTEN-dependent cell cycle arrest and apoptosis	0,001570662	0,033661437	PDPK1;FASLG;PIK3R1;SOS1;PTK2
Signaling by constitutively active EGFR	0,001570662	0,033661437	NRAS;UBC;GAB1;PIK3R1;SOS1
Renal cell carcinoma	0,001622071	0,034094692	RAP1B;NRAS;EPAS1;GAB1;EP300;PIK3R1;VHL;SOS1;SOS2;PAK2;SEMA7A;ROCK2;SEMA3A;GNAI3;NTN4;LAMC1;ARHGAP35;ROBO1;EFNB2;RPS6KA3;PPP3R1;NRAS;ABL2;PLXNA1;PAK2;EPHA4;PRNP;EPHA7;ARHGEF12;CSNK2A1;RGMB;PTK2;RHOB;ENAH;DNM3;SOS1;SOS2;PFN2
Axon guidance	0,001725157	0,035577285	

Ubiquitin-mediated proteolysis	0,001988086	0,040240326	UBE3C;UBE2B;UBA6;CUL3;CUL1;XIAP;UBE2G1;UBE2J1;KLHL9;UBE2W;SOCS1;UBE2Q2;BIRC6;VHL;SKP2
Signaling events regulated by Ret tyrosine kinase	0,002126068	0,042250776	IRS1;GAB1;IRS2;FRS2;PIK3R1;SOS1;PTK2
FGF signaling pathway	0,002179446	0,04253812	PDPK1;CTNND1;STAT3;GAB1;FRS2;PIK3R1;IL17RD;SOS1;FGF2
Interleukin-1 signaling pathway	0,002396851	0,045920259	MAP3K2;CXCL8;UBE2B;CUL1;UBE2G1;PIK3R1;UBE2J1;ELK4;UBE2W;MAPK9;UBE2Q2;IL1B;PELI1;SQSTM1
Signaling events mediated by focal adhesion kinase	0,002444606	0,045920259	RAP1B;MAPK9;CCND1;ROCK2;CAPN2;PIK3R1;SOS1;ARHGAP35;PTK2
Signaling by FGFR1 mutants	0,00247877	0,045920259	FGF5;CUX1;STAT3;FGFR1OP;PIK3R1;FGF2
IGF1 signaling pathway	0,002540664	0,046264285	CSNK2A1;IRS1;PIK3R1;SOS1;IGF1R
Neurotrophin signaling pathway	0,002581996	0,046264285	PRDM4;IRS1;GAB1;IRS2;FRS2;FASLG;PIK3R1;RAP1B;RPS6KA3;MAPK9;NRAS;SOS1;SOS2;MAP3K5

Se señala en color rojo en la tabla aquellas vías de señalización incluídas en el diagrama de cuerdas de la Figura 14.

Capítulo 3 Resultados

Tabla suplementaria 5: Lista de miRNAs obtenidos a partir de microarreglos de expresión comparando ET vs EA

ID	G1 Avg (log2)	G2 Avg (log2)	G1 Standard Deviation	G2 Standard Deviation	Fold Change	P-val	FDR P-val	Overall F-Test	Overall FDR F-Test	Transcript ID(Array Design)
2050						0,00	0,08			hsa-miR-106b-3p
1158	1,77	0,9	0,53	0,08	1,84	02	46	0,0005	0,0917	hsa-miR-1180-3p
2050						0,04	0,48			hsa-miR-1228-3p
6712	2,59	1,48	0,6	0,08	2,16	88	87	0,0551	0,5	hsa-miR-1231
2050						0,02	0,41			hsa-miR-1261
6774	6,99	6,39	0,72	0,02	1,51	86	21	0,0338	0,4262	hsa-miR-1275
2050						0,01	0,35			hsa-miR-1343-5p
6779	3,52	1,39	1,55	0,57	4,37	65	88	0,0213	0,3636	hsa-miR-150-5p
2050						0,00	0,08			hsa-miR-1520-5p
6855	2,49	1,2	0,94	0,01	2,43	02	46	0,0002	0,074	hsa-miR-1546-5p
2050						0,00	0,18			hsa-miR-1587-5p
6872	3,31	2,06	0,32	1,2	2,37	28	08	0,0021	0,1503	hsa-miR-1592-5p
2050						0,00	0,11			hsa-miR-1908-5p
0418	1,6	0,89	0,72	0,12	1,64	07	02	0,0005	0,0917	hsa-miR-1920-5p
2051						0,00	0,11			hsa-miR-1924-5p
9494	4,91	3,14	0,53	1,52	3,41	08	02	0,0018	0,1425	hsa-miR-1926-5p
2050						0,00	0,09	5,40E-05		hsa-miR-1930-5p
0782	5,78	3,25	0,73	3,04	5,79	04	47	0,0021	0,0481	hsa-miR-1934-5p
2050						0,00	0,11			hsa-miR-1938-5p
1287	7,38	2,02	0,81	0,91	40,83	07	02	0,002	0,1499	hsa-miR-1946-3p
2051						0,00	0,27			hsa-miR-1950-3p
8940	3,67	2,01	0,8	0,22	3,15	77	05	0,0494	0,4907	hsa-miR-1954-5p
2050						0,00	0,07			hsa-miR-1958-5p
0788	3,48	1,01	0,82	0,5	5,56	01	71	0,0007	0,1073	hsa-miR-1962-3p
2050						0,00	0,24			hsa-miR-1966-5p
9224	8,07	6,9	0,68	0,36	2,25	61	2	0,0095	0,2667	hsa-miR-1970-5p
2050						0,00	0,12			hsa-miR-1974-5p
9226	1,58	0,83	0,52	0,08	1,68	11	51	0,0021	0,1503	hsa-miR-1978-5p
2053						0,00	0,11			hsa-miR-1982-5p
5964	2,08	1,26	1,46	0,04	1,76	09	02	0,0003	0,0765	hsa-miR-1986-5p
2050						0,00	0,11			hsa-miR-1990-5p
0795	2,01	0,95	0,68	0,4	2,08	09	02	0,002	0,1499	hsa-miR-2004-5p
2050						0,01	0,32			hsa-miR-2042-5p
0139	2,74	1,3	1,08	0,21	2,73	24	68	0,0051	0,2137	hsa-miR-2046-5p
2050						0,03	0,42			hsa-miR-210-5p
0465	1,81	1,07	1,1	0,13	1,67	08	11	0,0143	0,3172	hsa-miR-214-3p
2051						0,00	0,19			hsa-miR-218-5p
1549	3,88	1,37	0,51	0,73	5,73	35	06	0,0028	0,1566	hsa-miR-219-5p
2051						0,01	0,32			hsa-miR-2210-5p
8903	1,96	1,3	0,55	0,07	1,57	18	13	0,0105	0,2835	hsa-miR-2392-5p
2050						0,00	0,15			hsa-miR-2438-5p
6022	3,44	1,44	0,42	0,41	3,99	21	44	0,0071	0,2421	hsa-miR-2474-5p
2053						0,00	0,09			hsa-miR-2488-5p
5699	1,29	0,6	0,37	0,08	1,61	04	47	0,0023	0,1522	hsa-miR-2502-5p
2051						0,00	0,09			hsa-miR-2544-5p
9585	2,65	1,03	0,48	0,32	3,09	04	47	0,0017	0,1424	hsa-miR-2584-5p
2051						0,00	0,11			hsa-miR-2622-5p
5562	2,17	1,44	0,65	0,24	1,66	09	02	0,0003	0,0795	hsa-miR-2664-5p
2051						0,00	0,24			hsa-miR-2702-5p
5563	1,84	0,99	0,38	0,04	1,8	59	15	0,0227	0,3694	hsa-miR-2744-5p
2051						0,03	0,43			hsa-miR-2782-5p
5585	2,8	1,68	0,9	0	2,19	28	06	0,0068	0,2368	hsa-miR-2824-5p
2051						0,00	0,10			hsa-miR-2862-5p
5603	4,47	1,78	0,66	0,57	6,44	06	97	0,0014	0,1329	hsa-miR-2904-5p
2051						0,00	0,13			hsa-miR-2942-5p
5610	2,84	1,5	1,49	0,08	2,53	14	41	0,001	0,1133	hsa-miR-2984-5p
2051						0,00	0,16			hsa-miR-3024-5p
5624	2,39	1,33	1,24	0,29	2,09	23	79	0,001	0,1186	hsa-miR-3188-5p
2051						0,00	0,08	6,69E-05		hsa-miR-3224-5p
5641	3,13	1,49	1,85	0,11	3,1	02	46	0,0493		hsa-miR-3197-5p

2050						0,00	0,10				
0848	12,18	9,61	0,22	1,45	5,91	06	97	0,0017	0,1424	hsa-miR-320a	
2053						0,00	0,08				
4637	7,24	6,43	0,92	0,51	1,75	02	83	0,0002	0,074	hsa-mir-320a	
2050						0,00	0,10				
4562	11,33	8,67	0,18	1,64	6,29	06	97	0,0012	0,1329	hsa-miR-320b	
2050						0,00	0,13				
4563	10,19	7,27	0,65	1,35	7,56	15	43	0,0013	0,1329	hsa-miR-320c	
2050						0,00	0,11				
9070	7,97	5,77	0,91	0,92	4,59	09	02	0,0005	0,0928	hsa-miR-320d	
2051						0,00	0,08				
5627	5,42	1,31	0,96	0,6	17,26	03	83	0,0004	0,0833	hsa-miR-320e	
2050						0,00	0,29				
0167	1,31	0,68	0,19	0,07	1,55	9	35	0,0584	0,5067	hsa-miR-32-3p	
2050						0,03	0,43			hsa-miR-324-	
1295	2,82	1,62	0,52	0,67	2,29	41	95	0,1062	0,5761	3p	
2050						0,00	0,24			hsa-miR-339-	
1298	3,61	1,34	1,37	0,64	4,83	66	72	0,0092	0,2628	5p	
2050						0,02	0,39			hsa-miR-342-	
1280	2,05	0,87	0,68	0,51	2,28	45	43	0,0973	0,5641	3p	
2050						0,00				hsa-miR-34b-	
1169	2,45	1,38	0,53	0,35	2,11	27	0,18	0,0013	0,1329	3p	
2051						0,00	0,13			hsa-miR-3591-	
9599	2,23	1,25	0,15	0,18	1,98	15	41	0,0046	0,2047	3p	
2053						0,00	0,11				
6552	2,56	1,14	1,13	0,04	2,68	08	02	0,0009	0,1117	hsa-mir-3648	
2050						0,03	0,42			hsa-miR-378a-	
1243	2,96	1,25	1,41	0,45	3,27	13	35	0,0611	0,5166	3p	
2051						0,01	0,37				
8426	3,12	1,99	0,86	0,23	2,19	87	51	0,0013	0,1329	hsa-miR-3907	
2051						0,04	0,48				
9048	11,29	9,92	1,3	0,66	2,59	54	18	0,0027	0,1566	hsa-miR-3960	
2050						0,02	0,39			hsa-miR-423-	
2123	4,62	2,35	0,68	0,04	4,84	44	43	0,0221	0,3659	5p	
2053						0,01	0,35				
6496	5,48	4,68	0,77	0,65	1,74	6	4	0,0175	0,3407	hsa-mir-4281	
2051						5,05	0,05				
7680	2,94	1,59	0,08	0,37	2,54	E-05	95	0,0003	0,0752	hsa-miR-4298	
2051						5,38	0,05				
8801	6,54	3,98	1,15	1,15	5,91	E-05	95	05	0,0323	hsa-miR-4429	
2051						0,00	0,11				
8815	4,09	2,22	1,43	0,06	3,65	09	02	0,001	0,1133	hsa-miR-4440	
2051						0,00	0,19				
8818	6,11	4,3	0,52	4,14	3,51	37	54	0,0015	0,1416	hsa-miR-4443	
2051						0,00	0,07				
8844	3,22	1,55	0,81	0,03	3,18	01	71	0,0002	0,074	hsa-miR-4462	
2051						0,00	0,24				
8852	7,33	5,37	0,28	0,05	3,9	62	51	0,0703	0,523	hsa-miR-4467	
2051						6,31	0,05				
8880	4,91	3,18	0,69	0,72	3,33	E-05	98	05	0,0315	hsa-miR-4486	
2051						0,03	0,43				
8881	8,62	7,62	1,1	1,02	2	34	31	0,0402	0,458	hsa-miR-4487	
2051						0,00	0,24				
8887	6,32	4,6	1,23	0,77	3,3	55	04	0,0156	0,3301	hsa-miR-4492	
2051						0,02	0,40				
8893	2,37	1,11	0,46	0,36	2,39	78	71	0,1678	0,65	hsa-miR-4498	
2051						0,00	0,08				
8901	6,19	4,04	1,22	0,86	4,43	03	83	0,0012	0,1329	hsa-miR-4505	
2051						0,00	0,30				
8904	5,44	4,09	0,75	0,72	2,54	99	49	0,0374	0,4418	hsa-miR-4507	
2051						0,00	0,21				
8905	8,33	7,49	0,96	0,56	1,79	47	99	0,0033	0,1662	hsa-miR-4508	
2051						0,00	0,19				
8931	7,32	5,72	0,73	0,92	3,04	35	06	0,0083	0,2572	hsa-miR-4530	
2051						0,00	0,07				
8937	3,03	1,66	0,69	0,41	2,59	01	71	0,0002	0,074	hsa-miR-4535	
2053						0,00	0,11				
6854	1,99	1,29	1,25	0,19	1,63	07	02	0,0001	0,0734	hsa-miR-4634	
2051						0,04	0,46			hsa-miR-4640-	
9417	2,21	1,58	0,51	0,11	1,54	09	23	0,0774	0,5342	5p	

Anexo

2051						0,00	0,12			hsa-miR-4646-
9425	2,98	1,37	1,14	0,08	3,06	12	51	0,0009	0,1117	5p
2051						0,00	0,29			hsa-miR-4655-
9439	2,41	1,5	0,61	0,21	1,88	94	79	0,0073	0,2471	5p
2051						0,00	0,10			hsa-miR-4695-
9441	2,38	1,52	0,59	0,25	1,82	06	97	0,0006	0,0994	hsa-miR-4656
2051						0,00	0,24			hsa-miR-4695-
9508	1,33	0,73	0,18	0,18	1,52	63	69	0,0455	0,4781	3p
2051						0,00	0,28			hsa-miR-4695-
9507	4,94	4,03	0,55	0,86	1,89	82	05	0,0185	0,3516	5p
2051						0,00	0,24			hsa-miR-4701-
9518	3,05	1,56	0,66	0,31	2,81	55	04	0,0073	0,2463	3p
2051						0,00	0,17			hsa-miR-4710
9533	1,65	0,95	0,39	0,22	1,62	25	28	0,0119	0,3018	hsa-miR-4717-
2051						0,00	0,07			hsa-miR-4749-
9549	2,23	1,57	0,72	0,27	1,58	01	71	0,0001	0,0671	3p
2051						0,02	0,41			hsa-miR-4750-
9607	3,69	2,42	0,94	0,34	2,41	93	3	0,0094	0,2658	5p
2051						0,01	0,30			hsa-miR-4750-
9609	4,16	1,8	1,3	0,08	5,11	07	81	0,0285	0,3967	5p
2051						0,00	0,14			hsa-miR-4793-
9689	3,16	2,47	1,46	0,42	1,61	17	25	0,0004	0,0833	3p
2050						0,03	0,45			hsa-miR-486-
3105	4,12	2,85	1,41	2,2	2,41	91	14	0,0024	0,1522	5p
2050						1,02	0,02	1,49E-		hsa-miR-491-
3789	2,95	0,91	1,34	0,22	4,12	E-05	58	05	0,0315	5p
2052						0,01	0,30			hsa-miR-5087
0324	1,83	1,22	0,47	0,04	1,53	01	52	0,005	0,212	hsa-miR-5093
2052						4,62	0,02	6,40E-		hsa-miR-5100
0332	2,25	1,34	1,21	0,06	1,89	E-06	58	06	0,0212	hsa-miR-5196-
2052						0,01	0,36			5p
1785	3,86	1,36	1,16	0,02	5,67	68	18	0,0086	0,2588	hsa-miR-5739
2052						0,01	0,37			hsa-miR-5749-
0577	2,75	1,55	0,7	0,18	2,29	9	59	0,0203	0,359	5p
2052						0,03	0,44			hsa-miR-595
2180	2,04	1,21	0,57	0,17	1,77	74	68	0,0314	0,4072	hsa-miR-6085
2050						0,00	0,18			hsa-miR-6086
4299	2,35	1,07	0,84	0,48	2,43	28	08	0,0071	0,2421	hsa-miR-6127
2050						0,00	0,08			hsa-miR-6132
4332	2,92	1,44	0,81	0,26	2,78	02	66	0,0004	0,1416	hsa-miR-6176
2050						0,00	0,19			hsa-miR-6510-
4342	2,94	1,79	0,63	0,86	2,21	33	06	0,0016	0,1329	hsa-miR-6514-
2052						0,00	0,10			5p
3017	5,21	4,34	0,65	0,02	1,82	05	76	0,0028	0,1073	hsa-miR-6741-
2052						0,00	0,10			hsa-miR-6749-
3018	3,08	1,51	1,11	0,15	2,97	06	97	0,0014	0,135	hsa-miR-6756
2052						0,00	0,15			hsa-miR-6757
3019	10,28	9,21	1,32	0,2	2,11	2	44	0,0001	0,0734	hsa-miR-6807
2052						0,00	0,08			hsa-miR-6808
4047	2,84	1,4	0,25	0,41	2,7	03	83	0,0013	0,1329	hsa-miR-6954
2052						0,01	0,32			hsa-miR-6955
4053	3,75	1,4	1,92	0,24	5,1	24	68	0,0335	0,4249	hsa-miR-7048
2052						0,00	0,19			hsa-miR-7049
5021	3,03	1,7	1,1	0,43	2,51	13	0,13	0,0013	0,1329	5p
2052						0,00	0,08			hsa-miR-7050
5030	4,96	1,91	0,52	0,73	8,28	03	83	0,0007	0,1073	3p
2053						0,00	0,19			hsa-miR-7051
5404	1,43	0,79	0,24	0,32	1,56	35	1	0,0131	0,3065	hsa-miR-7052
2052						0,00	0,24			hsa-miR-7053
5395	2	1,29	0,92	0,09	1,64	6	15	0,0006	0,0988	5p
2053						0,00	0,11			hsa-miR-7054
7473	1,81	0,98	0,4	0,01	1,78	09	02	0,0031	0,1609	hsa-miR-7055
2053						0,00	0,21			hsa-miR-7056
7480	2,04	1,2	0,45	0,08	1,79	45	48	0,0056	0,2195	hsa-miR-7057
2052						0,02	0,38			hsa-miR-7058
5444	2,1	1,23	0,19	0,44	1,83	15	07	0,1412	0,6174	5p
2052						0,00	0,14			hsa-miR-7059
5459	5,31	4,42	0,56	0,44	1,85	17	26	0,0053	0,2165	5p
2052						0,00	0,22			hsa-miR-7060
5467	2,42	1,61	0,33	1,06	1,76	48	07	0,0008	0,1079	5p

2052												
5470	1,87	1,07	0,32	0,13	1,74	0,00	0,11	0,0024	0,1522	hsa-miR-6754-3p		
2052						0,00	0,24			hsa-miR-6756-5p		
5473	5,25	4,6	0,76	0,42	1,57	61	15	0,0024	0,1522	hsa-miR-6763-5p		
2052						0,01	0,33			hsa-miR-6769b-5p		
5487	3,95	2,05	0,8	0,2	3,74	34	07	0,0554	0,5	hsa-miR-6769b-5p		
2052						0,03	0,42			hsa-miR-6775-5p		
5681	3,46	2,67	1,18	0	1,73	25	91	0,0171	0,3347	hsa-miR-6779-5p		
2052						0,00	0,08			hsa-miR-6781-5p		
5511	5,87	4,66	0,65	0,12	2,31	03	83	0,0017	0,1424	hsa-miR-6796-5p		
2052						0,00	0,24			hsa-miR-6799-5p		
5519	4,59	2,79	0,82	1,1	3,46	66	72	0,0287	0,3971	hsa-miR-6805-5p		
2052						0,03	0,44			hsa-miR-6812-5p		
5523	2,21	1,41	0,88	0,6	1,75	68	42	0,0151	0,3272	hsa-miR-6849-5p		
2052						0,03	0,44			hsa-miR-6849-5p		
5553	2,76	1,85	0,39	0,67	1,88	8	76	0,042	0,4641	hsa-miR-6858-5p		
2052						0,01	0,30			hsa-miR-6861-5p		
5559	4,21	2,36	0,89	0,95	3,61	02	52	0,0115	0,2948	hsa-miR-6879-5p		
2053						0,03	0,43			hsa-miR-6885-5p		
7549	1,68	1,07	0,43	0,14	1,52	51	96	0,0264	0,3916	hsa-miR-6894-5p		
2052						0,01	0,32			hsa-miR-6902-5p		
5571	7,02	5,33	1,24	0,76	3,22	19	13	0,0111	0,2909	hsa-miR-6912-5p		
2052						0,00	0,29			hsa-miR-6914-5p		
5585	3,02	1,54	0,34	0,49	2,79	95	79	0,0397	0,4565	hsa-miR-6920-5p		
2052						0,00	0,24			hsa-miR-6924-5p		
5587	2,9	0,9	1,89	0,12	4	61	15	0,0107	0,2835	hsa-miR-6930-5p		
2052						0,00	0,24			hsa-miR-6932-5p		
5601	3,08	1,33	0,81	0,13	3,38	59	15	0,0137	0,3093	hsa-miR-6949-5p		
2052						0,00	0,16			hsa-miR-6950-5p		
5659	3,01	1,46	0,86	0,09	2,93	24	98	0,0022	0,1503	hsa-miR-6963-5p		
2052						0,03	0,42			hsa-miR-6964-5p		
5683	2,02	1,26	0,7	0,39	1,69	16	5	0,018	0,3446	hsa-miR-6970-5p		
2052						0,00	0,11			hsa-miR-6979-5p		
5719	4,37	1,66	0,45	0,82	6,51	08	02	0,0063	0,2331	hsa-miR-7112-5p		
2052						0,02	0,40			hsa-miR-7114-5p		
6182	1,55	0,93	0,45	0,34	1,54	77	71	0,0356	0,4326	hsa-miR-7116-5p		
2052						0,00	0,07			hsa-miR-7118-5p		
6186	2,91	1,19	0,45	0,15	3,29	01	71	0,0003	0,0833	hsa-miR-7844-5p		
2052						0,03	0,42			hsa-miR-7846-5p		
9136	1,99	1,14	0,37	0,28	1,8	1	11	0,082	0,5424	hsa-miR-7847-5p		
2052						0,03	0,43			hsa-miR-7849-5p		
9139	3,76	2,03	0,87	0,26	3,31	5	96	0,0551	0,5	hsa-miR-8063-3p		
2052						0,00	0,20			hsa-miR-8071-3p		
9773	2,85	1,27	1,19	0,02	2,98	4	66	0,0079	0,2538	hsa-miR-8072-3p		
2052						0,03	0,43			hsa-miR-8074-3p		
9781	3,71	2,3	0,46	0,64	2,66	53	96	0,047	0,4841	hsa-miR-8076-3p		
2052						0,00	0,30			hsa-miR-8077-3p		
9782	8,41	7,53	0,47	0,13	1,84	98	46	0,0308	0,4063	hsa-miR-8078-3p		
2050						0,01	0,37			hsa-miR-8079-3p		
5746	1,73	1,11	0,4	0	1,53	9	59	0,0107	0,2836	hsa-miR-8085-3p		
2050						0,00	0,09			hsa-miR-8086-3p		
5790	3,61	1,39	1,65	0,07	4,64	04	47	0,0006	0,1	hsa-miR-92b-3p		
2050						0,00	0,16			hsa-miR-92c-3p		
4273	4,65	2,53	1,98	0,33	4,35	23	86	0,0002	0,074	hsa-miR-93-5p		
2050						0,00	0,24			hsa-miR-93-3p		
0174	2,36	1,44	0,88	0,55	1,89	66	72	0,0002	0,074	hsa-miR-937-5p		
2050						0,00	0,18			hsa-miR-937-5p		
6006	5,85	3,6	1,92	0,01	4,76	28	08	0,0005	0,0928	hsa-miR-4486-5p		

Tabla suplementaria 6: Lista de miRNAs obtenidos a partir de microarreglos de expresión comparando CaM vs VS

ID	BrCa Avg (log2)	VS Avg (log2)	BrCa Standard Deviation	VS Standard Deviation	Fold Change	P-val	FDR P-val	Overall FDR	Overall F-Test	Transcript ID(Array Design)
2051						3,66	0,00	2,38E-05	0,0315	hsa-miR-4486
8880	4,35	1,9	1,17	0,19	5,47	E-06	91	0,05		

2052						1,09	0,01	6,40E-		
0332	2,12	1,3	1,23	0,05	1,76	E-05	45	06	0,0212	hsa-miR-5093
2050						1,32	0,01	5,40E-		hsa-miR-150-
0782	5,44	1,26	1,98	0,35	18,18	E-05	46	05	0,0481	5p
2051						4,93	0,03			hsa-miR-
9549	2,09	1,21	0,79	0,11	1,83	E-05	64	0,0001	0,0671	4717-3p
2051						5,54	0,03			
8844	2,54	1,04	1,1	0,21	2,83	E-05	67	0,0002	0,074	hsa-miR-4462
2051						0,00	0,03			hsa-miR-
9689	2,92	1,43	1,34	0,35	2,81	01	87	0,0004	0,0833	4793-3p
2051						7,66	0,03			
8937	2,44	1,42	0,93	0,17	2,02	E-05	87	0,0002	0,074	hsa-miR-4535
2051						9,92	0,03			
5562	1,69	1,01	0,63	0,11	1,6	E-05	87	0,0003	0,0795	hsa-miR-3148
2050						0,00	0,04			hsa-miR-93-
0174	1,74	0,93	0,73	0,11	1,76	01	37	0,0002	0,074	3p
2050						0,00	0,05			
6855	1,82	1	1,01	0,18	1,76	02	14	0,0002	0,074	hsa-miR-1261
2052						0,00	0,05			
3019	9,58	8,78	1,02	0,14	1,74	02	19	0,0001	0,0734	hsa-miR-6087
2053						0,00	0,05			
7541	3,05	1,41	0,4	0,37	3,13	02	48	0,0028	0,1567	hsa-mir-6798
2051						0,00	0,05			
7680	2,93	1,63	0,76	0,11	2,47	02	55	0,0003	0,0752	hsa-miR-4298
2052						0,00	0,05			hsa-miR-
6186	2,08	1,17	0,87	0,16	1,88	02	55	0,0003	0,0833	7114-5p
2052						0,00	0,05			hsa-miR-
5030	3,88	1,36	1,59	0,44	5,77	03	58	0,0007	0,1073	6514-3p
2051						0,00	0,05			
8426	2,29	1,13	0,71	0,25	2,25	03	58	0,0013	0,1329	hsa-miR-3907
2052						0,00	0,05			hsa-miR-
5531	1,98	1,17	0,69	0,14	1,75	03	66	0,0005	0,0927	6785-5p
2052						0,00	0,05			hsa-miR-
6178	4,12	2,77	1,15	0,39	2,55	03	77	0,0014	0,1329	7110-5p
2052						0,00	0,05			hsa-miR-
5467	2,4	1,24	0,67	0,16	2,23	03	77	0,0008	0,1079	6753-5p
2050						0,00	0,05			hsa-miR-34b-
1169	1,79	0,99	0,59	0,18	1,74	03	77	0,0013	0,1329	3p
2051						0,00	0,05			
9441	1,97	1,31	0,65	0,13	1,57	03	77	0,0006	0,0994	hsa-miR-4656
2050						0,00	0,05			hsa-miR-
1158	1,57	0,78	0,73	0,14	1,73	04	78	0,0005	0,0917	106b-3p
2050						0,00	0,06			
4332	2,03	1,41	0,92	0,17	1,54	04	2	0,0004	0,0833	hsa-miR-595
2050						0,00	0,06			hsa-miR-574-
4298	3,32	1,5	1,09	0,38	3,51	05	72	0,0017	0,1424	3p
2051						0,00	0,06			
8815	3,3	1,63	1,57	0,44	3,18	05	72	0,001	0,1133	hsa-miR-4440
2051						0,00	0,07			
5603	3,26	1,46	1,41	0,44	3,47	06	25	0,0014	0,1329	hsa-miR-3175
2051						0,00	0,07			
9573	5,45	1,8	0,36	0,97	12,63	06	94	0,009	0,2628	hsa-miR-4730
2050						0,00	0,08			
6872	3,23	1,37	0,97	0,34	3,63	07	04	0,0021	0,1503	hsa-miR-1275
2052						0,00	0,08			hsa-miR-
5021	2,33	1,37	1,18	0,34	1,94	07	04	0,0013	0,1329	6510-5p
2052						0,00	0,08			
4250	1,89	1,22	0,45	0,11	1,59	09	98	0,002	0,1499	hsa-miR-6165
2052						0,00	0,11			
4047	2,7	1,55	0,91	0,23	2,22	11	1	0,0013	0,1329	hsa-miR-6127
2051						0,00	0,11			hsa-miR-
8843	1,98	1,27	0,55	0,18	1,63	11	1	0,003	0,1609	3135b
2050						0,00	0,12			hsa-miR-185-
0788	2,58	1,31	1,53	0,34	2,41	14	62	0,0007	0,1073	3p
2053						0,00	0,13			
7225	3,56	2,97	0,75	0,12	1,51	17	65	0,0005	0,0927	hsa-mir-5703
2052						0,00	0,13			
8733	9,6	8,31	0,84	0,29	2,44	18	84	0,0033	0,1646	hsa-miR-7704
2050						0,00	0,14			
4342	2,33	1,58	0,76	0,19	1,68	18	1	0,0016	0,1416	hsa-miR-602

2051						0,00	0,15				hsa-miR-
9518	2,42	1,05	0,96	0,45	2,58	22	01	0,0073	0,2463	4701-3p	
2051						0,00	0,15				hsa-miR-
9565	2,22	1,15	0,6	0,26	2,09	22	01	0,0067	0,2368	4725-3p	
2051						0,00	0,15				hsa-miR-
9585	2,03	1,21	0,96	0,26	1,77	21	01	0,0017	0,1424	3064-5p	
2051						0,00	0,15				hsa-miR-
9599	2	1,23	0,56	0,2	1,71	21	01	0,0046	0,2047	3591-3p	
2053						0,00	0,15				
7480	1,6	0,94	0,54	0,21	1,58	21	01	0,0056	0,2195	hsa-mir-6736	
2051						0,00	0,15				
9048	10,32	9,45	1,04	0,33	1,83	23	04	0,0027	0,1566	hsa-miR-3960	
2052						0,00	0,15				hsa-miR-
5712	1,78	1,18	0,6	0,2	1,52	24	04	0,0038	0,1809	6875-3p	
2050						0,00	0,16				hsa-miR-125a-
0765	6,17	2,08	1,71	1,2	16,94	28	08	0,0162	0,3301	5p	
2051						0,00	0,18				hsa-miR-
5585	1,84	1,1	0,72	0,29	1,67	36	91	0,0068	0,2368	3162-5p	
2050						0,00	0,20				
6022	2,59	1,39	1,03	0,42	2,3	41	19	0,0071	0,2421	hsa-miR-297	
2052						0,00	0,20				
4035	9,31	8,27	0,96	0,38	2,06	41	19	0,0066	0,2368	hsa-miR-6125	
2053						0,00	0,23				
7265	1,77	1,09	0,35	0,26	1,6	52	44	0,0285	0,3967	hsa-mir-6125	
2052						0,00	0,24				hsa-miR-
5681	2,97	1,92	1,09	0,62	2,07	56	64	0,0171	0,3347	6769b-5p	
2051						0,00	0,28				hsa-miR-
9607	2,79	2	0,8	0,33	1,74	68	26	0,0094	0,2658	4749-5p	
2051						0,00	0,29				hsa-miR-
9615	1,97	1,38	1,25	0,37	1,51	73	85	0,003	0,1609	371b-5p	
2053						0,00	0,34				
6560	2,58	1,78	0,81	0,32	1,74	87	25	0,0084	0,2572	hsa-mir-3656	
2050						0,00	0,36				hsa-miR-20a-
0139	1,63	1,01	0,89	0,3	1,54	92	07	0,0051	0,2137	5p	
2052						0,00	0,37				hsa-miR-
5559	3,16	2,23	1,08	0,47	1,9	97	24	0,0115	0,2948	6799-5p	
2050						0,01	0,38				hsa-miR-339-
1298	2,16	0,96	1,42	0,58	2,29	04	35	0,0092	0,2628	5p	
2052						0,01	0,39				hsa-miR-
5420	8,75	8,15	0,93	0,31	1,51	1	66	0,0057	0,2215	6729-5p	
2052						0,01	0,40				
9781	3,25	1,41	0,9	0,7	3,58	16	14	0,047	0,4841	hsa-miR-8071	
2051						0,01	0,40				
5607	5,77	3,39	0,86	0,83	5,18	2	88	0,0651	0,5215	hsa-miR-3178	
2050						0,01	0,44				hsa-miR-106a-
0194	7,19	1,01	2,58	1,82	72,45	42	1	0,0426	0,4659	5p	
2050						0,01	0,44				hsa-miR-
9237	8,88	8,13	0,69	0,5	1,68	45	6	0,0469	0,4841	1915-3p	
2052						0,01	0,46				hsa-miR-
0568	2,27	1,68	0,76	0,3	1,51	61	66	0,0107	0,2835	5189-5p	
2050						0,01	0,46				hsa-miR-17-
0130	7,28	0,97	2,8	1,9	79,28	65	96	0,0421	0,4641	5p	
2052						0,01	0,48				hsa-miR-
5553	2,37	1,77	0,62	0,4	1,52	79	8	0,042	0,4641	6796-5p	
2051						0,02	0,52				
9474	5,68	3,84	1,39	0,73	3,59	46	71	0,027	0,3916	hsa-miR-4674	
2051						0,02	0,52				
7899	3,21	2,03	0,94	0,37	2,28	43	71	0,0114	0,2948	hsa-miR-3648	
2052						0,02	0,52				hsa-miR-
9139	2,67	1,67	0,99	0,69	1,99	43	71	0,0551	0,5	7847-3p	
2052						0,02	0,53				hsa-miR-
6172	5	3,08	0,76	1,35	3,78	84	64	0,1925	0,6759	7107-5p	
2051						0,02	0,53				
8818	6,58	4,91	2,4	0,58	3,19	87	64	0,0015	0,1416	hsa-miR-4443	
2052						0,02	0,53				hsa-miR-
5719	3,62	2,44	1,55	0,53	2,27	65	64	0,0063	0,2331	6879-5p	
2051						0,02	0,53				
7919	9,93	9,14	1,14	0,41	1,72	79	64	0,0083	0,2572	hsa-miR-3665	
2050						0,02	0,53				hsa-miR-
6781	3,89	2,86	0,97	0,46	2,05	97	93	0,0208	0,3613	1233-5p	

2052						0,03	0,55				hsa-miR-
5585	2,49	1,39	0,87	0,5	2,14	19	16	0,0397	0,4565		6812-5p
2051						0,03	0,55				
9580	6,71	5,76	1,17	0,49	1,94	35	79	0,0144	0,3172	hsa-miR-4734	
2052						0,03	0,56				hsa-miR-
5633	3,74	2,74	0,9	0,55	2,01	38	07	0,0459	0,4797	6780b-5p	
2050						0,04	0,60				
4391	8,53	7,82	0,75	0,29	1,64	11	15	0,0132	0,3065	hsa-miR-638	

Tabla suplementaria 7: Lista de miRNAs obtenidos a partir de microarreglos de expresión comparando ET vs VS

ID	G1 Avg (log2)	VS Avg (log2)	G1 Standard Deviation	VS Standard Deviation	Fold Change	P-val	FDR P-val	Overall F-Test	Overall FDR F-Test	Transcript ID(Array Design)
	2050	7,04	1,01	2,52	1,82	65,42	75	74	0,0426	0,4659
0194						6,53	0,02			5p
2050						E-05	06	0,0005	0,0917	hsa-miR-106b-3p
1158	1,77	0,78	0,53	0,14	1,99	0,00	0,28			hsa-miR-1180-3p
2050						0,02	0,41			
6712	2,59	1,05	0,6	0,41	2,91	96	3	0,0551	0,5	
2050						0,02	0,41			
6795	2,07	1,41	0,61	0,24	1,57	38	74	0,0286	0,3969	hsa-miR-1202
2050						0,02	0,38			hsa-miR-1229-5p
6776	2,89	1,82	0,41	0,46	2,11	01	79	0,1441	0,6223	
2050						0,02	0,42			
6779	3,52	1,48	1,55	0,61	4,1	53	46	0,0213	0,3636	hsa-miR-1231
2050						0,02	0,46			hsa-miR-1233-
6781	4,21	2,86	0,62	0,46	2,55	99	16	0,0208	0,3613	5p
2050						0,00	0,14			hsa-miR-125a-
0765	5,94	2,08	0,54	1,2	14,45	31	28	0,0162	0,3301	5p
2050						4,00	0,01			
6855	2,49	1	0,94	0,18	2,8	E-05	66	0,0002	0,074	hsa-miR-1261
2050						0,00	0,03			
6872	3,31	1,37	0,32	0,34	3,84	03	59	0,0021	0,1503	hsa-miR-1275
2050						0,00	0,05			hsa-miR-129-
0418	1,6	0,96	0,72	0,07	1,57	05	58	0,0005	0,0917	5p
2050						7,57	0,00			hsa-miR-150-
0782	5,78	1,26	0,73	0,35	23,01	E-06	91	05	0,0481	5p
2050						0,01	0,34			
0130	7,13	0,97	1,98	1,9	71,32	41	99	0,0421	0,4641	hsa-miR-17-5p
2050						0,00	0,02			hsa-miR-185-
0788	3,48	1,31	0,82	0,34	4,51	01	66	0,0007	0,1073	3p
2050						0,00	0,26			hsa-miR-1908-
9224	8,07	6,97	0,68	0,23	2,14	85	45	0,0095	0,2667	5p
2050						0,00	0,05			hsa-miR-1909-
9226	1,58	0,83	0,52	0,13	1,68	06	58	0,0021	0,1503	5p
2053						0,00	0,02			
5964	2,08	0,99	1,46	0,21	2,13	01	68	0,0003	0,0765	hsa-mir-1913
2050						0,01	0,34			hsa-miR-1915-
9237	9,34	8,13	0,85	0,5	2,32	36	34	0,0469	0,4841	3p
2050						0,00	0,09			hsa-miR-193a-
0795	2,01	1,22	0,68	0,16	1,73	15	35	0,002	0,1499	5p
2050						0,00	0,13			hsa-miR-20a-
0139	2,74	1,01	1,08	0,3	3,32	28	46	0,0051	0,2137	5p
2050						0,02	0,43			hsa-miR-210-
0465	1,81	1,01	1,1	0,34	1,75	59	04	0,0143	0,3172	3p
2051						0,00	0,15			
8903	1,96	1,24	0,55	0,18	1,64	36	82	0,0105	0,2835	hsa-miR-2392
2051						0,04	0,50			
4163	8,86	8	0,9	0,23	1,81	26	68	0,0084	0,2572	hsa-miR-2861
2050						0,00	0,06			
6022	3,44	1,39	0,42	0,42	4,14	08	65	0,0071	0,2421	hsa-miR-297
2051						0,00	0,03			hsa-miR-3064-
9585	2,65	1,21	0,48	0,26	2,73	03	59	0,0017	0,1424	5p
2051						0,00	0,07			hsa-miR-
8843	2,09	1,27	0,58	0,18	1,76	09	51	0,003	0,1609	3135b

Anexo

2051							4,36	0,01			
5562	2,17	1,01	0,65	0,11	2,24	E-05	7	0,0003	0,0795	hsa-miR-3148	
2051						0,00	0,20				
5563	1,84	1,12	0,38	0,22	1,65	54	41	0,0227	0,3694	hsa-miR-3149	
2051						0,00	0,10			hsa-miR-3162-	
5585	2,8	1,1	0,9	0,29	3,25	19	9	0,0068	0,2368	5p	
2051						0,00	0,02				
5603	4,47	1,46	0,66	0,44	8,04	01	66	0,0014	0,1329	hsa-miR-3175	
2051						0,03	0,47				
5607	5,4	3,39	1,12	0,83	4,02	42	96	0,0651	0,5215	hsa-miR-3178	
2051						0,00	0,07			hsa-miR-3180-	
5610	2,84	1,62	1,49	0,28	2,33	09	39	0,001	0,1133	3p	
2051						0,01	0,30				
5624	2,39	1,7	1,24	0,2	1,62	07	18	0,001	0,1186	hsa-miR-3188	
2051						0,00	0,24				
5638	8,52	7,65	0,78	0,17	1,82	76	81	0,0049	0,2111	hsa-miR-3196	
2051						2,19	0,01				
5641	3,13	1,06	1,85	0,22	4,2	E-05	21	05	0,0493	hsa-miR-3197	
2050						0,02	0,41			hsa-miR-324-	
1295	2,82	1,41	0,52	0,64	2,65	35	71	0,1062	0,5761	3p	
2050						0,00	0,12			hsa-miR-339-	
1298	3,61	0,96	1,37	0,58	6,28	24	1	0,0092	0,2628	5p	
2050						0,00	0,02			hsa-miR-34b-	
1169	2,45	0,99	0,53	0,18	2,75	01	82	0,0013	0,1329	3p	
2051						0,00	0,04			hsa-miR-3591-	
9599	2,23	1,23	0,15	0,2	2,01	04	84	0,0046	0,2047	3p	
2051						0,01	0,36				
7899	3,36	2,03	1,01	0,37	2,52	61	16	0,0114	0,2948	hsa-miR-3648	
2053						0,00	0,03				
6552	2,56	0,97	1,13	0,24	3,02	03	89	0,0009	0,1117	hsa-mir-3648	
2053						0,00	0,23				
6560	3,13	1,78	0,98	0,32	2,54	67	19	0,0084	0,2572	hsa-mir-3656	
2051						0,03	0,48				
7919	10,53	9,14	1,55	0,41	2,61	73	83	0,0083	0,2572	hsa-miR-3665	
2051						0,03	0,48			hsa-miR-3679-	
7936	3,16	1,65	1,02	0,63	2,83	58	39	0,1041	0,5724	5p	
2051						0,00	0,09			hsa-miR-371b-	
9615	2,06	1,38	1,38	0,37	1,6	16	56	0,003	0,1609	5p	
2051						0,00	0,03				
8426	3,12	1,13	0,86	0,25	3,97	02	1	0,0013	0,1329	hsa-miR-3907	
2051						0,00	0,09				
9048	11,29	9,45	1,3	0,33	3,58	15	35	0,0027	0,1566	hsa-miR-3960	
2050						0,04	0,50			hsa-miR-423-	
2124	3,72	1,16	0,36	1,23	5,93	19	3	0,207	0,6886	3p	
2051						2,93	0,01				
7680	2,94	1,63	0,08	0,11	2,48	E-05	39	0,0003	0,0752	hsa-miR-4298	
2051						0,00	0,07				
8802	1,79	1,2	0,41	0,03	1,51	1	68	0,0023	0,1522	hsa-miR-4430	
2051						0,00	0,02				
8815	4,09	1,63	1,43	0,44	5,51	01	66	0,001	0,1133	hsa-miR-4440	
2051						0,00	0,15				
8818	6,11	4,91	0,52	0,58	2,3	36	82	0,0015	0,1416	hsa-miR-4443	
2051						0,02	0,43				
8839	4,89	3,22	0,74	1	3,17	69	87	0,138	0,6168	hsa-miR-4459	
2051						1,63	0,01				
8844	3,22	1,04	0,81	0,21	4,52	E-05	08	0,0002	0,074	hsa-miR-4462	
2051						1,81	0,00				
8880	4,91	1,9	0,69	0,19	8,09	E-06	4	05	0,0315	hsa-miR-4486	
2051						0,00	0,24				
8901	6,19	5,33	1,22	0,33	1,81	75	59	0,0012	0,1329	hsa-miR-4505	
2051						0,01	0,35				
8931	7,32	6,33	0,73	0,31	1,99	48	47	0,0083	0,2572	hsa-miR-4530	
2051						2,06	0,01				
8937	3,03	1,42	0,69	0,17	3,05	E-05	21	0,0002	0,074	hsa-miR-4535	
2053						0,00	0,04				
6854	1,99	1,29	1,25	0,11	1,63	04	84	0,0001	0,0734	hsa-mir-4634	
2051						0,01	0,38			hsa-miR-4640-	
9417	2,21	1,58	0,51	0,35	1,55	92	39	0,0774	0,5342	5p	
2051						0,00	0,02			hsa-miR-4646-	
9425	2,98	0,88	1,14	0,28	4,3	02	86	0,0009	0,1117	5p	

Anexo

Anexo

2052						0,00	0,03			hsa-miR-6510-
5021	3,03	1,37	1,1	0,34	3,17	02	1	0,0013	0,1329	5p
2052						6,25	0,02			hsa-miR-6514-
5030	4,96	1,36	0,52	0,44	12,16	E-05	06	0,0007	0,1073	3p
2052						0,00	0,03			hsa-miR-6723-
5395	2	0,96	0,92	0,13	2,06	03	9	0,0006	0,0988	5p
2053						0,00	0,11			
7473	1,81	1,18	0,4	0,07	1,54	21	31	0,0031	0,1609	hsa-mir-6729
2052						0,00	0,23			hsa-miR-6729-
5420	9,65	8,15	1,25	0,31	2,82	69	48	0,0057	0,2215	5p
2053						0,00	0,06			
7480	2,04	0,94	0,45	0,21	2,15	07	26	0,0056	0,2195	hsa-mir-6736
2052						0,00	0,02			hsa-miR-6753-
5467	2,42	1,24	0,33	0,16	2,26	02	97	0,0008	0,1079	5p
2052						0,00	0,03			hsa-miR-6754-
5470	1,87	0,99	0,32	0,14	1,84	03	6	0,0024	0,1522	3p
2052						0,01	0,34			hsa-miR-6763-
5487	3,95	2,07	0,8	0,67	3,68	33	17	0,0554	0,5	5p
2052						0,00	0,13			hsa-miR-
5681	3,46	1,92	1,18	0,62	2,91	27	14	0,0171	0,3347	6769b-5p
2052						0,00	0,13			hsa-miR-6775-
5511	5,87	5,26	0,65	0,17	1,53	28	49	0,0017	0,1424	5p
2052						0,02	0,44			hsa-miR-
5633	3,72	2,74	0,05	0,55	1,97	76	47	0,0459	0,4797	6780b-5p
2052						0,01	0,35			hsa-miR-6781-
5523	2,21	1,35	0,88	0,32	1,82	45	35	0,0151	0,3272	5p
2052						0,00	0,04			hsa-miR-6785-
5531	2,04	1,17	0,67	0,14	1,83	03	15	0,0005	0,0927	5p
2052						0,00	0,23			hsa-miR-6796-
5553	2,76	1,77	0,39	0,4	1,99	7	8	0,042	0,4641	5p
2053						0,00	0,05			
7541	3	1,41	0,53	0,37	3,01	05	03	0,0028	0,1567	hsa-mir-6798
2052						0,00	0,13			hsa-miR-6799-
5559	4,21	2,23	0,89	0,47	3,94	27	14	0,0115	0,2948	5p
2053						0,00	0,26			
7549	1,68	1,07	0,43	0,17	1,52	89	69	0,0264	0,3916	hsa-mir-6805
2052						0,00	0,21			hsa-miR-6812-
5585	3,02	1,39	0,34	0,5	3,09	61	65	0,0397	0,4565	5p
2052						0,00	0,14			hsa-miR-6820-
5601	3,08	1,39	0,81	0,4	3,23	32	81	0,0137	0,3093	5p
2052						0,00	0,04			hsa-miR-6849-
5659	3,01	1,24	0,86	0,25	3,41	04	84	0,0022	0,1503	5p
2052						0,01	0,35			
5683	2,02	1,25	0,7	0,25	1,7	46	35	0,018	0,3446	hsa-miR-6860
2052						0,00	0,06			hsa-miR-6875-
5712	1,91	1,18	0,57	0,2	1,65	07	26	0,0038	0,1809	3p
2052						0,00	0,09			hsa-miR-6879-
5719	4,37	2,44	0,45	0,53	3,81	16	74	0,0063	0,2331	5p
2052						0,00	0,10			hsa-miR-6893-
5747	1,63	1	0,59	0,19	1,55	19	9	0,0062	0,2331	5p
2052						0,03	0,49			hsa-miR-7107-
6172	5,13	3,08	1,06	1,35	4,12	89	34	0,1925	0,6759	5p
2052						0,01	0,38			hsa-miR-7108-
6174	8,18	7,35	0,79	0,23	1,78	99	67	0,0133	0,3065	5p
2052						0,00	0,03			hsa-miR-7110-
6178	4,12	2,77	1,38	0,39	2,55	02	59	0,0014	0,1329	5p
2052						0,00	0,25			hsa-miR-7112-
6182	1,55	0,92	0,45	0,27	1,55	81	87	0,0356	0,4326	5p
2052						3,89	0,01			hsa-miR-7114-
6186	2,91	1,17	0,45	0,16	3,33	E-05	66	0,0003	0,0833	5p
2052						0,00	0,19			
8733	9,82	8,31	1,15	0,29	2,84	47	72	0,0033	0,1646	hsa-miR-7704
2052						0,02	0,41			hsa-miR-7844-
9136	1,99	1,2	0,37	0,29	1,73	3	7	0,082	0,5424	5p
2052						0,00	0,26			hsa-miR-7847-
9139	3,76	1,67	0,87	0,69	4,25	86	45	0,0551	0,5	3p
2052						0,00	0,20			
9773	2,85	1,69	1,19	0,4	2,23	56	87	0,0079	0,2538	hsa-miR-8063
2052						0,00	0,19			
9781	3,71	1,41	0,46	0,7	4,93	49	85	0,047	0,4841	hsa-miR-8071

2052						0,00	0,24				
9782	8,41	7,57	0,47	0,3	1,79	72	36	0,0308	0,4063	hsa-miR-8072	
2050						0,00	0,12			hsa-miR-874-	
5746	1,73	0,96	0,4	0,13	1,71	23	1	0,0107	0,2836	3p	
2050						0,00	0,06			hsa-miR-885-	
5790	3,61	1,99	1,65	0,3	3,06	08	65	0,0006	0,1	3p	
2050						0,00	0,10			hsa-miR-92b-	
4273	4,65	2,66	1,98	0,23	3,99	2	9	0,0002	0,074	5p	
2050						8,55	0,02				
0174	2,36	0,93	0,88	0,11	2,71	E-05	13	0,0002	0,074	hsa-miR-93-3p	
2050						0,03	0,48				
0173	5,22	2,68	0,09	1,52	5,82	68	83	0,2337	0,7051	hsa-miR-93-5p	

Tabla suplementaria 8: Lista de miRNAs en común entre las tablas suplementarias 5 (CaM vs VS) y 4 (ET vs EA)

hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4656	hsa-mir-6736
hsa-miR-1261	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-4701-3p	hsa-miR-6753-5p
hsa-miR-1275	hsa-miR-3591-3p	hsa-miR-4717-3p	hsa-miR-6769b-5p
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-3648	hsa-miR-4749-5p	hsa-miR-6796-5p
hsa-miR-185-3p	hsa-miR-3907	hsa-miR-4793-3p	hsa-miR-6799-5p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-3960	hsa-miR-5093	hsa-miR-6812-5p
hsa-miR-297	hsa-miR-4298	hsa-miR-595	hsa-miR-6879-5p
hsa-miR-297	hsa-miR-4440	hsa-miR-602	hsa-miR-7114-5p
hsa-miR-3064-5p	hsa-miR-4443	hsa-miR-6087	hsa-miR-7847-3p
hsa-miR-3148	hsa-miR-4462	hsa-miR-6127	hsa-miR-8071
hsa-miR-3162-5p	hsa-miR-4486	hsa-miR-6510-5p	hsa-miR-93-3p
hsa-miR-3175	hsa-miR-4535	hsa-miR-6514-3p	

Tabla suplementaria 9: Lista de miRNAs en común entre las tablas suplementarias 6 (ET vs VS) y 4 (ET vs EA)

hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-3197	hsa-miR-4717-3p	hsa-miR-6769b-5p
hsa-miR-1180-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-4749-5p	hsa-miR-6775-5p
hsa-miR-1231	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4750-5p	hsa-miR-6781-5p
hsa-miR-1261	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-4793-3p	hsa-miR-6796-5p
hsa-miR-1275	hsa-miR-3591-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-6799-5p
hsa-miR-129-5p	hsa-mir-3648	hsa-miR-5087	hsa-mir-6805
hsa-miR-150-5p	hsa-mir-3648	hsa-miR-5093	hsa-miR-6812-5p
hsa-miR-185-3p	hsa-miR-3907	hsa-miR-5196-5p	hsa-miR-6820-5p
hsa-miR-1908-5p	hsa-miR-3960	hsa-miR-5739	hsa-miR-6849-5p
hsa-miR-1909-5p	hsa-miR-4298	hsa-miR-575	hsa-miR-6860
hsa-mir-1913	hsa-miR-4440	hsa-miR-595	hsa-miR-6879-5p
hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-4443	hsa-miR-602	hsa-miR-7112-5p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-4462	hsa-miR-6086	hsa-miR-7114-5p
hsa-miR-210-3p	hsa-miR-4486	hsa-miR-6087	hsa-miR-7844-5p
hsa-miR-2392	hsa-miR-4505	hsa-miR-6127	hsa-miR-7847-3p
hsa-miR-297	hsa-miR-4530	hsa-miR-6510-5p	hsa-miR-8063

hsa-miR-3064-5p	hsa-miR-4535	hsa-miR-6514-3p	hsa-miR-8071
hsa-miR-3148	hsa-mir-4634	hsa-miR-6723-5p	hsa-miR-8072
hsa-miR-3149	hsa-miR-4640-5p	hsa-mir-6729	hsa-miR-874-3p
hsa-miR-3162-5p	hsa-miR-4646-5p	hsa-mir-6736	hsa-miR-885-3p
hsa-miR-3175	hsa-miR-4655-5p	hsa-miR-6753-5p	hsa-miR-92b-5p
hsa-miR-3180-3p	hsa-miR-4656	hsa-miR-6754-3p	hsa-miR-93-3p
hsa-miR-3188	hsa-miR-4701-3p	hsa-miR-6763-5p	

Tabla suplementaria 10: Lista de miRNAs obtenidos a partir de secuenciación de miRNAs comparando CaM vs VS

miRNAs	log2FoldChange	pvalue	padj
hsa-miR-199a-3p	-0,625038652	5,04E-06	0,00085702
hsa-miR-199b-3p	-0,625038652	5,04E-06	0,00085702
hsa-miR-605-3p	-0,725428547	0,00051522	0,05839127
hsa-miR-103a-3p	-0,342132015	0,00135031	0,07667367
hsa-miR-103b	-0,342132015	0,00135031	0,07667367
hsa-miR-107	-0,342119645	0,00135306	0,07667367
hsa-miR-1277-3p	-0,584095248	0,00162309	0,07883598
hsa-miR-4485-3p	3,999147074	0,00202082	NA
hsa-miR-548a-5p	-0,320565927	0,00234849	0,09981082
hsa-miR-17-5p	-0,424865100	0,0049515	0,16906157
hsa-miR-106b-5p	-0,214504194	0,0049724	0,16906157
hsa-miR-10a-5p	0,599144003	0,0060652	0,18061142
hsa-miR-1294	0,941523615	0,00648828	NA
hsa-miR-128-3p	-0,485862672	0,0071104	0,18061142
hsa-miR-19a-3p	-0,398263614	0,0074001	0,18061142
hsa-miR-548j-5p	-0,514327200	0,00743694	0,18061142
hsa-miR-200c-3p	-0,331710595	0,00835489	0,18937745
hsa-miR-708-5p	-1,424299405	0,01132425	0,23815031
hsa-let-7a-3p	1,247739879	0,01185634	NA
hsa-miR-490-5p	2,302426109	0,01252715	NA
hsa-miR-548d-5p	-0,289820011	0,01312961	0,23815031
hsa-miR-548aj-3p	1,058673108	0,01369534	NA
hsa-miR-20a-5p	-0,370023462	0,01388587	0,23815031
hsa-miR-4772-5p	1,916029367	0,01439651	NA
hsa-miR-548b-5p	-0,284161703	0,01446961	0,23815031
hsa-miR-660-5p	0,487705990	0,01455308	0,23815031
hsa-miR-93-5p	-0,144093009	0,01470928	0,23815031
hsa-miR-4433a-5p	0,931770274	0,01483074	NA
hsa-miR-140-5p	-0,263275511	0,01706484	0,24515004
hsa-miR-129-1-3p	-2,355937072	0,01713905	NA
hsa-miR-129-2-3p	-2,355937072	0,01713905	NA
hsa-miR-29c-5p	0,880653603	0,01762676	NA
hsa-miR-4488	1,418644178	0,01766851	NA

hsa-miR-362-3p	0,949835818	0,01799048	NA
hsa-miR-221-5p	0,364325443	0,01821978	0,24515004
hsa-miR-15b-5p	-0,294116276	0,0184714	0,24515004
hsa-miR-18a-5p	-0,226301925	0,01860888	0,24515004
hsa-miR-18b-5p	-0,225979835	0,01892811	0,24515004
hsa-miR-873-5p	3,317068199	0,01917888	NA
hsa-miR-331-3p	-0,539746354	0,0194678	0,24515004
hsa-miR-3960	1,172823642	0,01977992	NA
hsa-miR-148a-5p	-0,703483999	0,0206909	NA
hsa-miR-548k	-0,279575505	0,0237148	0,28796539
hsa-miR-125a-5p	-0,969298547	0,02485566	0,29141116
hsa-miR-589-3p	-0,848683061	0,02589534	NA
hsa-miR-3617-5p	0,674619885	0,02756854	0,31244348
hsa-miR-548ab	-1,182141848	0,02807254	NA
hsa-miR-378a-5p	0,925574368	0,02966701	NA
hsa-miR-374b-5p	-0,313280759	0,02984807	0,31713578
hsa-miR-374c-3p	-0,313280759	0,02984807	0,31713578
hsa-miR-99b-3p	-0,817500560	0,03025502	NA
hsa-miR-3196	2,641669706	0,03300836	NA
hsa-miR-629-5p	0,508488333	0,0348632	0,35013734
hsa-miR-181c-3p	0,380507823	0,03573437	0,35013734
hsa-miR-144-3p	0,990049460	0,03604355	0,35013734
hsa-miR-27a-5p	1,024536424	0,03658085	NA
hsa-miR-362-5p	-0,681718844	0,03695557	NA
hsa-miR-3688-5p	3,383661868	0,03829587	NA
hsa-miR-219a-2-3p	-2,002429293	0,03913663	NA
hsa-miR-222-3p	0,218616787	0,04166129	0,39346777
hsa-miR-219b-5p	-0,743296252	0,04212674	NA
hsa-miR-4799-5p	-1,793747360	0,04365727	NA
hsa-miR-494-5p	1,252270857	0,04459262	NA
hsa-miR-1271-5p	-0,494490144	0,04465296	NA
hsa-miR-224-5p	-0,885393030	0,04465547	0,41034758
hsa-miR-1180-3p	1,495037290	0,04594262	NA
hsa-miR-4732-5p	1,272480153	0,04872583	NA
hsa-miR-99b-5p	-0,784437480	0,05006855	0,44798179
hsa-miR-96-5p	1,021138744	0,0521279	0,45444835
hsa-miR-4785	-0,551440775	0,05440107	NA
hsa-miR-590-5p	-0,327785155	0,05444807	0,46277247
hsa-miR-6735-5p	-0,945393016	0,05489569	NA
hsa-miR-451a	0,822774430	0,05580492	0,46277247
hsa-miR-93-3p	-0,312166489	0,0605884	0,48886183
hsa-miR-188-3p	0,983807704	0,06074491	NA
hsa-miR-548u	-1,147705474	0,06297106	NA
hsa-let-7e-5p	-0,590265776	0,06325758	0,48886183
hsa-miR-10b-3p	1,500206464	0,06390161	NA
hsa-miR-181b-5p	0,616523274	0,06464407	0,48886183

hsa-miR-378i	2,050183827	0,06539679	NA
hsa-miR-1268b	2,007757359	0,06606814	NA
hsa-miR-148b-3p	-0,154750339	0,06611813	0,48886183
hsa-miR-486-5p	0,754756820	0,06614013	0,48886183
hsa-miR-452-5p	-0,818024381	0,0670423	NA
hsa-miR-33a-3p	-0,289346440	0,06802239	0,49207686
hsa-miR-1260b	-0,378986911	0,06969242	0,49365465
hsa-miR-19b-3p	-0,293610080	0,07157739	0,49460396
hsa-miR-589-5p	-0,674755769	0,07261131	NA
hsa-miR-545-5p	-0,209400623	0,07273588	0,49460396
hsa-miR-548d-3p	0,572646327	0,0766275	NA
hsa-miR-642a-5p	1,137707747	0,07697615	NA
hsa-miR-642b-3p	1,214672531	0,07703427	NA
hsa-miR-24-3p	-0,232144981	0,07768757	0,4980982
hsa-miR-221-3p	-0,236755828	0,0785532	0,4980982
hsa-miR-1277-5p	-0,331952273	0,07872177	0,4980982
hsa-miR-29c-3p	0,272727845	0,08010648	0,4980982
hsa-miR-196a-5p	1,410471099	0,08121019	NA
hsa-miR-219a-1-3p	-1,569099105	0,08149558	NA
hsa-miR-2276-3p	-0,734481902	0,0822137	NA
hsa-miR-769-5p	-0,425464756	0,08251751	0,4980982
hsa-miR-486-3p	0,658183250	0,08346706	0,4980982
hsa-miR-3184-5p	-0,337210794	0,0835047	0,4980982
hsa-miR-642a-3p	1,226489011	0,08514913	NA
hsa-miR-642b-5p	1,226489011	0,08514913	NA
hsa-miR-574-5p	0,260355503	0,08527291	0,49987566
hsa-miR-1283	2,309003480	0,08708592	NA
hsa-miR-338-3p	0,437689722	0,08715287	0,50223688
hsa-miR-339-5p	0,353760143	0,09245538	0,5112684
hsa-miR-374a-3p	-0,188675740	0,09318556	0,5112684
hsa-miR-378a-3p	0,219509969	0,0932313	0,5112684
hsa-miR-556-3p	-0,441840226	0,0954319	0,51502932
hsa-miR-3688-3p	1,561321914	0,09750874	NA
hsa-miR-183-3p	1,247333783	0,10055594	NA
hsa-miR-15a-3p	0,925663115	0,10262296	NA
hsa-miR-584-5p	-0,405752998	0,10395634	0,5425567
hsa-miR-664b-5p	0,995316026	0,10437799	NA
hsa-miR-363-3p	0,301047014	0,10653937	0,5425567
hsa-miR-34a-5p	-0,635772744	0,10709911	NA
hsa-miR-3074-5p	0,264671730	0,10782192	0,5425567
hsa-miR-548aw	1,506997596	0,10792102	NA
hsa-miR-340-5p	-0,198090306	0,10821815	0,5425567
hsa-miR-548ay-5p	-0,322259144	0,11071422	0,5425567
hsa-miR-196b-5p	0,239751596	0,11400184	0,5425567
hsa-miR-877-5p	0,418374979	0,11432426	0,5425567
hsa-miR-339-3p	0,192178032	0,11857499	0,5425567

hsa-miR-3615	0,736870634	0,11941098	NA
hsa-miR-100-5p	1,037131644	0,12267153	0,5425567
hsa-miR-323a-5p	0,908466206	0,12269189	NA
hsa-miR-487a-5p	0,834828994	0,12281658	0,5425567
hsa-miR-4772-3p	1,400077952	0,12318076	NA
hsa-miR-338-5p	0,325859299	0,12441613	0,5425567
hsa-miR-145-3p	0,655530025	0,12479008	0,5425567
hsa-miR-502-3p	0,674286090	0,12515026	0,5425567
hsa-miR-335-5p	0,196293534	0,12559301	0,5425567
hsa-miR-323b-5p	1,306587832	0,12943961	NA
hsa-miR-26b-5p	0,374966757	0,12990179	0,5425567
hsa-miR-125a-3p	-0,495706027	0,13005073	0,5425567
hsa-miR-378c	0,200534327	0,13147255	0,5425567
hsa-miR-766-3p	-0,579355627	0,13182203	0,5425567
hsa-miR-23c	-0,258795887	0,13249844	0,5425567
hsa-miR-301a-3p	-0,267827006	0,13468304	0,5425567
hsa-miR-187-3p	0,896826255	0,1352857	NA
hsa-miR-10a-3p	0,519460386	0,13703865	0,5425567
hsa-miR-1273h-3p	-0,931442417	0,13748775	NA
hsa-miR-654-5p	0,764706636	0,13843127	NA
hsa-let-7d-5p	-0,141453273	0,13844598	0,5425567
hsa-miR-1908-5p	-0,305027288	0,13868324	0,5425567
hsa-miR-1343-3p	-1,579103144	0,14002233	NA
hsa-miR-29b-3p	0,222785532	0,1413307	0,5425567
hsa-miR-361-5p	-0,282862310	0,14172173	0,5425567
hsa-miR-548az-5p	-0,280421146	0,14317552	0,5425567
hsa-miR-99a-5p	0,434274775	0,14361795	0,5425567
hsa-miR-889-3p	0,817567689	0,1493183	0,54986944
hsa-miR-22-3p	-0,137278211	0,15020228	0,54986944
hsa-miR-155-5p	0,426663665	0,15062383	0,54986944
hsa-miR-744-5p	-0,481831070	0,15259543	0,54986944
hsa-miR-190a-5p	0,324834359	0,15386223	0,54986944
hsa-miR-208a-3p	-0,736743289	0,15497101	NA
hsa-miR-369-5p	0,755956012	0,15525725	0,54986944
hsa-miR-4746-5p	-0,582686975	0,15681837	NA
hsa-miR-181a-5p	0,420957473	0,15892521	0,55477068
hsa-miR-6511b-3p	1,531416904	0,16006179	NA
hsa-miR-185-3p	-0,252986924	0,16312702	0,55477068
hsa-miR-548p	1,045802360	0,16330357	NA
hsa-miR-491-5p	-0,376952637	0,16389675	NA
hsa-miR-6876-5p	-0,466228533	0,16568442	NA
hsa-miR-10b-5p	1,000607852	0,16599201	0,55477068
hsa-miR-664a-3p	-0,312716333	0,16626843	NA
hsa-miR-323b-3p	0,805601983	0,16631245	0,55477068
hsa-miR-5701	1,316244702	0,16788111	NA
hsa-miR-624-5p	0,353339572	0,16840334	0,55477068

hsa-miR-766-5p	-0,200767040	0,16859689	0,55477068
hsa-miR-4723-5p	1,516445397	0,16928693	NA
hsa-miR-5189-5p	-0,713454499	0,16972744	NA
hsa-miR-708-3p	-0,352672419	0,17168732	0,55477068
hsa-miR-106b-3p	0,411419526	0,17339571	0,55477068
hsa-miR-656-5p	1,168369390	0,17438293	NA
hsa-miR-411-5p	0,746934573	0,17440094	0,55477068
hsa-miR-377-5p	0,740250230	0,17454144	0,55477068
hsa-miR-139-3p	-0,401317380	0,1745896	0,55477068
hsa-miR-193a-5p	1,092587148	0,17795201	NA
hsa-miR-330-5p	0,690510104	0,17810869	NA
hsa-miR-377-3p	0,656046116	0,17997165	0,56657742
hsa-miR-3613-5p	-0,383179991	0,18073105	NA
hsa-miR-582-5p	1,081358894	0,18099919	NA
hsa-miR-22-5p	-0,168237503	0,18217408	0,56824941
hsa-miR-9-5p	-0,438482500	0,18277481	NA
hsa-miR-23b-3p	-0,163082338	0,18465894	0,570764
hsa-miR-215-5p	0,931939691	0,18592305	NA
hsa-miR-590-3p	-0,203322794	0,186501	0,57126432
hsa-miR-505-3p	0,430160983	0,18687379	NA
hsa-miR-548aq-5p	-0,359814653	0,18800133	NA
hsa-miR-548ah-3p	-0,734431300	0,18940725	NA
hsa-miR-544a	0,727055779	0,18967589	NA
hsa-miR-135a-3p	1,119303224	0,19010079	NA
hsa-miR-186-3p	-0,371431532	0,19108782	NA
hsa-let-7b-3p	0,416845390	0,19438773	NA
hsa-miR-95-3p	0,557660107	0,19460266	NA
hsa-miR-4306	1,728475070	0,19522193	NA
hsa-miR-641	0,325985711	0,19683216	0,57414257
hsa-miR-26b-3p	0,602950913	0,19713186	NA
hsa-miR-4433b-3p	0,855451369	0,19806387	0,57414257
hsa-miR-450b-5p	0,652073104	0,19819167	NA
hsa-miR-324-5p	-0,188644144	0,19906839	0,57414257
hsa-miR-127-3p	0,699679845	0,20171168	0,57414257
hsa-miR-299-3p	1,001816084	0,20304868	NA
hsa-miR-542-5p	-0,524083288	0,20403427	NA
hsa-miR-942-5p	-0,732564585	0,20493878	NA
hsa-miR-3064-5p	0,819446005	0,20801434	NA
hsa-miR-376a-3p	0,709135542	0,21037392	0,57414257
hsa-miR-146a-5p	0,171585413	0,21197214	0,57414257
hsa-miR-485-3p	0,557800043	0,2124438	0,57414257
hsa-miR-92a-3p	-0,235778131	0,21248228	0,57414257
hsa-miR-431-5p	0,697959793	0,21330369	0,57414257
hsa-miR-539-5p	0,676460047	0,21383927	0,57414257
hsa-miR-342-5p	0,528382759	0,21460002	0,57414257
hsa-miR-1260a	-0,461061223	0,21484382	0,57414257

hsa-miR-503-5p	-0,356936974	0,21543034	0,57414257
hsa-miR-376b-3p	0,697767311	0,21551835	0,57414257
hsa-miR-29a-3p	0,294280304	0,21570373	0,57414257
hsa-miR-3200-3p	1,141648597	0,21630882	NA
hsa-miR-337-5p	0,712500064	0,21635305	0,57414257
hsa-let-7i-3p	0,489339123	0,21713372	0,57414257
hsa-miR-484	-0,500818275	0,21783645	0,57414257
hsa-miR-376c-3p	0,669026625	0,22192524	0,57988447
hsa-miR-379-5p	0,519831481	0,22342608	0,57988447
hsa-miR-205-5p	1,120199662	0,22351247	NA
hsa-miR-665	0,732956860	0,22542903	0,58065053
hsa-miR-4676-5p	-0,678340584	0,22552432	NA
hsa-miR-379-3p	0,635345674	0,22900572	NA
hsa-miR-5683	-0,715496265	0,23018075	NA
hsa-miR-548ar-3p	-1,016973619	0,23130802	NA
hsa-miR-181a-3p	0,333004795	0,23198695	0,59304934
hsa-miR-222-5p	1,118900704	0,23300351	NA
hsa-miR-16-2-3p	0,310951250	0,23392447	NA
hsa-miR-450a-5p	-0,387699205	0,23431193	0,5945228
hsa-miR-548am-3p	-0,669596608	0,23463649	NA
hsa-miR-939-5p	-0,813383404	0,23588696	NA
hsa-miR-154-5p	0,643993369	0,23727342	0,59547939
hsa-miR-671-3p	-0,269224569	0,2376194	NA
hsa-miR-6131	-1,069393278	0,2380117	NA
hsa-let-7g-3p	0,752320287	0,23838852	NA
hsa-miR-181d-5p	0,188519849	0,23941038	0,59547939
hsa-miR-654-3p	0,615498251	0,23994317	0,59547939
hsa-miR-1249-3p	-0,562868955	0,24094901	NA
hsa-miR-4662b	-0,842625871	0,24114253	NA
hsa-miR-5189-3p	-0,558853179	0,24149128	NA
hsa-miR-382-5p	0,592020547	0,24213916	0,59657474
hsa-miR-4662a-3p	-0,792431429	0,24341298	NA
hsa-miR-376a-5p	0,640070038	0,24414531	0,59718996
hsa-miR-651-3p	-0,757110183	0,24432897	NA
hsa-miR-134-5p	0,584914859	0,24818584	0,59863787
hsa-miR-5584-5p	0,331495497	0,24942136	NA
hsa-miR-605-5p	-1,172474153	0,24980634	NA
hsa-miR-154-3p	0,599093893	0,25271769	0,59863787
hsa-miR-2110	0,268656254	0,25388616	0,59863787
hsa-miR-758-5p	1,008488926	0,25586715	NA
hsa-miR-370-3p	0,619564257	0,25699192	0,59863787
hsa-miR-7854-3p	-0,509049080	0,25720051	NA
hsa-miR-224-3p	-0,654940528	0,25808073	NA
hsa-miR-200b-5p	-0,913020967	0,25810227	NA
hsa-miR-378d	0,249763726	0,25915605	0,59863787
hsa-miR-139-5p	-0,371030927	0,26022391	0,59863787

hsa-miR-487a-3p	0,566985041	0,2605036	0,59863787
hsa-miR-3940-3p	-0,612184437	0,26088916	NA
hsa-miR-548ap-3p	-0,530692608	0,26145723	NA
hsa-miR-4659a-3p	0,347299352	0,2619223	NA
hsa-miR-539-3p	0,592910676	0,26224527	NA
hsa-miR-12136	0,560118059	0,26286677	0,59863787
hsa-miR-548aa	0,203722314	0,26353775	0,59863787
hsa-miR-548t-3p	0,203722314	0,26353775	0,59863787
hsa-miR-30c-1-3p	0,197159071	0,26410494	0,59863787
hsa-miR-190b-5p	-0,245816043	0,26700568	NA
hsa-miR-200a-5p	0,883674594	0,27021273	NA
hsa-miR-550b-3p	-0,459611445	0,27096166	NA
hsa-miR-3065-5p	0,261563465	0,27274272	0,60868997
hsa-miR-181c-5p	0,228843198	0,27305606	0,60868997
hsa-miR-454-5p	-0,484414643	0,27306932	NA
hsa-miR-651-5p	-0,258737950	0,27391048	0,60868997
hsa-miR-10527-5p	-0,290308425	0,27433919	NA
hsa-miR-454-3p	0,184304590	0,27618124	0,6097508
hsa-miR-6809-5p	-0,674798963	0,28148311	NA
hsa-miR-450a-1-3p	-0,696098129	0,28218652	NA
hsa-miR-409-5p	0,564907743	0,28246581	0,61051963
hsa-miR-548ai	-0,287545772	0,28384942	0,61051963
hsa-miR-570-5p	-0,287545772	0,28384942	0,61051963
hsa-miR-432-5p	0,599703744	0,28407201	0,61051963
hsa-miR-337-3p	0,536029148	0,28550771	0,61051963
hsa-miR-1255b-5p	0,429286521	0,28710981	NA
hsa-miR-15b-3p	0,224309963	0,28763492	0,61085177
hsa-miR-331-5p	0,233440319	0,28925628	0,61085177
hsa-miR-136-5p	0,599761032	0,29108827	0,610926
hsa-miR-548ax	-0,120532935	0,29356526	0,61234472
hsa-miR-550a-3p	0,425383312	0,29496534	NA
hsa-miR-550b-2-5p	0,425383312	0,29496534	NA
hsa-miR-148a-3p	-0,154928285	0,29710021	0,61295736
hsa-miR-106a-5p	-0,260061682	0,2974646	0,61295736
hsa-miR-376b-5p	0,594005363	0,29954289	NA
hsa-miR-874-5p	0,844059456	0,30070678	NA
hsa-miR-376a-2-5p	0,620280266	0,3011707	NA
hsa-miR-30d-3p	0,191411529	0,30162889	0,61779411
hsa-miR-3188	0,769921270	0,30248999	NA
hsa-miR-576-3p	0,309282090	0,31111142	0,6334005
hsa-miR-3166	0,688124714	0,31231902	NA
hsa-miR-548av-5p	-0,859497833	0,31355804	NA
hsa-miR-324-3p	-0,202076067	0,31458113	0,63665228
hsa-miR-519a-3p	0,977193219	0,3169714	NA
hsa-miR-519b-3p	0,977193219	0,3169714	NA
hsa-miR-6813-5p	-0,662767709	0,31806173	NA

hsa-miR-130a-5p	0,314982881	0,32021169	NA
hsa-miR-4644	0,743266117	0,32050138	NA
hsa-miR-323a-3p	0,584701411	0,32059701	0,64498807
hsa-miR-6736-5p	-0,637939212	0,32371741	NA
hsa-miR-487b-3p	0,616873863	0,32375445	0,6475089
hsa-miR-6852-5p	-0,287197166	0,32522631	NA
hsa-miR-1843	0,459102300	0,32786732	NA
hsa-miR-548e-3p	-0,401864094	0,32794108	NA
hsa-miR-3135b	-0,561101466	0,32845149	NA
hsa-miR-21-3p	0,372334439	0,32864982	0,64817059
hsa-miR-188-5p	0,659069812	0,33011589	NA
hsa-miR-4301	0,479779291	0,33058162	NA
hsa-miR-1-3p	0,763421030	0,33074225	0,64817059
hsa-miR-556-5p	-0,161207972	0,33136772	0,64817059
hsa-miR-192-5p	0,248096938	0,33171083	0,64817059
hsa-miR-193a-3p	0,415811537	0,33328566	NA
hsa-miR-143-3p	0,426882616	0,3342476	0,64939534
hsa-miR-92b-5p	-0,528597845	0,33460468	NA
hsa-miR-6741-3p	-0,524528934	0,33655325	NA
hsa-miR-432-3p	0,763361240	0,33713504	NA
hsa-miR-181b-2-3p	0,618002670	0,33754925	NA
hsa-miR-5193	-0,886681499	0,3380181	NA
hsa-miR-579-5p	-0,659012632	0,33921925	NA
hsa-miR-656-3p	0,484280053	0,34093357	NA
hsa-miR-1307-5p	0,590124752	0,34390468	0,66436131
hsa-miR-136-3p	0,539855280	0,34886038	0,66621317
hsa-miR-542-3p	-0,416833421	0,34980819	NA
hsa-miR-124-3p	-1,139281893	0,35125076	NA
hsa-miR-146b-5p	0,127633888	0,35184561	0,66621317
hsa-miR-1287-5p	0,390140262	0,35336286	NA
hsa-miR-493-3p	0,583709910	0,35386182	0,66621317
hsa-let-7b-5p	0,081753173	0,35557609	0,66621317
hsa-miR-495-5p	0,632080334	0,3557205	0,66621317
hsa-miR-382-3p	0,700914900	0,35624036	NA
hsa-miR-570-3p	-0,283635066	0,35661999	0,66621317
hsa-miR-431-3p	0,424675311	0,35830184	NA
hsa-miR-381-3p	0,493798867	0,35911317	0,66720479
hsa-miR-6515-5p	0,286391369	0,35924887	NA
hsa-miR-4707-3p	0,984398771	0,36230761	NA
hsa-miR-548bb-5p	0,594082106	0,36426362	NA
hsa-miR-30a-3p	0,195545378	0,36488962	0,67252474
hsa-miR-30e-3p	0,195576496	0,36593258	0,67252474
hsa-miR-4422	0,406102716	0,36605946	NA
hsa-miR-1270	-0,378739327	0,36799475	NA
hsa-miR-1285-3p	0,228543613	0,36826129	NA
hsa-miR-4516	0,731971115	0,37106323	NA

hsa-miR-4510	-0,097487572	0,37306367	0,68194435
hsa-miR-1261	-0,718630453	0,37499624	NA
hsa-miR-1273h-5p	0,261079449	0,37503353	NA
hsa-miR-296-5p	-0,646155358	0,37569435	NA
hsa-miR-10400-5p	1,273738849	0,37585905	NA
hsa-miR-133b	0,744588418	0,37785005	NA
hsa-miR-151a-3p	-0,108505157	0,37797089	0,68278271
hsa-miR-8485	0,622175290	0,37940404	NA
hsa-miR-1250-5p	0,285638638	0,38016057	NA
hsa-miR-433-3p	0,495679274	0,38086926	0,68278271
hsa-miR-655-3p	0,423647021	0,38155159	NA
hsa-miR-19b-1-5p	-0,462570848	0,38207809	NA
hsa-miR-548n	-0,168387706	0,38268971	0,68278271
hsa-miR-3184-3p	0,112487750	0,38356323	0,68278271
hsa-miR-423-5p	0,112487750	0,38356323	0,68278271
hsa-miR-758-3p	0,449856447	0,38734933	NA
hsa-miR-4511	-0,412888231	0,38881934	NA
hsa-miR-92a-1-5p	0,268862224	0,38893591	NA
hsa-miR-885-3p	-1,107893576	0,38928682	NA
hsa-miR-4664-5p	-0,537242196	0,39084666	NA
hsa-miR-4796-3p	0,880070228	0,39263137	NA
hsa-miR-3913-3p	-0,512439863	0,39372918	NA
hsa-miR-3913-5p	-0,512439863	0,39372918	NA
hsa-miR-145-5p	0,421863810	0,39399099	0,69769237
hsa-miR-629-3p	-0,624950990	0,39612897	NA
hsa-miR-127-5p	0,446225954	0,39615728	0,69789366
hsa-miR-4688	0,589217827	0,3979587	NA
hsa-miR-130a-3p	-0,100602536	0,39859431	0,69856735
hsa-miR-548j-3p	-0,872029673	0,39879477	NA
hsa-miR-4677-3p	0,530844255	0,40077472	NA
hsa-miR-2277-5p	-0,491251890	0,40140329	NA
hsa-miR-4783-3p	0,701061262	0,40205715	NA
hsa-miR-122-3p	-0,917651866	0,40550059	NA
hsa-miR-1292-5p	-0,306825542	0,40803272	NA
hsa-miR-1303	-0,228639158	0,40884784	0,70978786
hsa-miR-409-3p	0,482159096	0,40917182	0,70978786
hsa-miR-499a-5p	-0,394661229	0,41017608	NA
hsa-miR-744-3p	0,215173225	0,41088795	NA
hsa-miR-485-5p	0,412226178	0,41783432	NA
hsa-miR-28-3p	-0,080847645	0,4180556	0,72151728
hsa-miR-1299	0,737473775	0,421971	NA
hsa-miR-133a-3p	0,662573520	0,42288766	NA
hsa-miR-548ak	0,459481074	0,42420833	NA
hsa-miR-4286	0,869782707	0,4261767	NA
hsa-miR-3179	-0,410606676	0,427046	NA
hsa-miR-551b-3p	0,585232114	0,42729609	NA

hsa-miR-433-5p	0,432315390	0,42750973	NA
hsa-miR-4714-3p	-0,577966701	0,42877466	NA
hsa-miR-7855-5p	0,647476898	0,42906383	NA
hsa-let-7i-5p	0,092255818	0,4339855	0,74522763
hsa-miR-942-3p	0,360055263	0,43434712	NA
hsa-miR-494-3p	0,371689961	0,43608599	NA
hsa-miR-30b-5p	-0,123208126	0,43854906	0,7480421
hsa-miR-1275	0,928311672	0,43917092	NA
hsa-miR-150-5p	0,405293937	0,44106714	0,7480421
hsa-miR-6764-5p	-0,293666609	0,44352431	NA
hsa-miR-6514-5p	0,750934368	0,44379446	NA
hsa-miR-23a-5p	-0,415938849	0,44466267	NA
hsa-miR-495-3p	0,365649722	0,44899852	0,7480421
hsa-miR-330-3p	-0,183522346	0,4490223	0,7480421
hsa-miR-6882-5p	-0,399417383	0,44930941	NA
hsa-miR-18a-3p	-0,293467721	0,44956142	NA
hsa-miR-1827	-0,439104907	0,45218675	NA
hsa-miR-664a-5p	0,120918995	0,45450995	0,7480421
hsa-miR-365a-3p	0,522635318	0,45508542	NA
hsa-miR-365b-3p	0,522635318	0,45508542	NA
hsa-miR-30c-5p	-0,120610693	0,45622059	0,7480421
hsa-miR-203a-3p	-0,460301970	0,45627608	NA
hsa-miR-12135	0,708691034	0,45636546	NA
hsa-miR-192-3p	0,487656764	0,4574279	NA
hsa-miR-15a-5p	0,106885893	0,45777688	0,7480421
hsa-miR-17-3p	-0,116512453	0,45926099	0,7480421
hsa-miR-4433a-3p	-0,214699241	0,45942008	0,7480421
hsa-miR-4433b-5p	-0,214699241	0,45942008	0,7480421
hsa-miR-628-3p	0,144109407	0,46083509	0,7480421
hsa-miR-183-5p	0,406453708	0,46376776	0,7480421
hsa-miR-7-1-3p	-0,207434780	0,46620812	0,7480421
hsa-miR-320c	0,171717308	0,46816833	0,7480421
hsa-miR-7704	0,798494124	0,46927714	NA
hsa-miR-329-5p	0,668422983	0,46939525	NA
hsa-miR-493-5p	0,335872760	0,46961893	0,7480421
hsa-miR-143-5p	0,307062467	0,4708265	0,7480421
hsa-miR-1287-3p	-0,276835078	0,47254875	NA
hsa-miR-30a-5p	0,480982717	0,47543164	0,75184538
hsa-miR-1185-5p	0,391675125	0,47718851	NA
hsa-miR-128-1-5p	-0,257207972	0,47916423	NA
hsa-miR-7847-3p	0,396285445	0,48158422	NA
hsa-miR-345-5p	0,113751968	0,48554327	0,75354867
hsa-miR-1228-5p	0,781773274	0,48556571	NA
hsa-miR-30e-5p	0,080247114	0,48657435	0,75354867
hsa-miR-628-5p	-0,188980035	0,48804284	0,75354867
hsa-miR-4708-3p	-0,703153004	0,48913698	NA

hsa-miR-378e	0,291387328	0,49226245	NA
hsa-miR-1301-3p	-0,160409808	0,49392609	0,75354867
hsa-miR-30d-5p	-0,187371141	0,49438503	0,75354867
hsa-miR-548ar-5p	0,210611445	0,49497012	NA
hsa-miR-652-3p	-0,078898457	0,49571606	0,75354867
hsa-miR-543	0,445618132	0,49595117	0,75354867
hsa-miR-3613-3p	-0,242916591	0,49596736	0,75354867
hsa-miR-197-3p	-0,194865470	0,49645559	0,75354867
hsa-miR-425-5p	-0,079542324	0,5003674	0,75381726
hsa-miR-424-3p	-0,286600988	0,50106677	0,75381726
hsa-miR-1273c	0,482252547	0,50187222	NA
hsa-miR-27b-5p	0,206556103	0,50192572	NA
hsa-miR-122b-5p	-0,764482981	0,50249541	NA
hsa-miR-98-3p	0,354541692	0,50366795	0,75439253
hsa-miR-548e-5p	0,288517360	0,50385058	NA
hsa-miR-412-5p	1,110622752	0,50486297	NA
hsa-miR-548ba	-0,596379322	0,50568417	NA
hsa-miR-548as-5p	-0,257755480	0,50926304	NA
hsa-miR-501-3p	0,215277965	0,50933552	0,75953543
hsa-miR-147b-3p	0,511891510	0,50996909	NA
hsa-miR-193b-5p	0,624040243	0,51001089	NA
hsa-miR-6803-3p	-0,438379741	0,51170799	NA
hsa-miR-3180-3p	-0,545968203	0,51624803	NA
hsa-miR-6770-5p	-0,172220349	0,51777831	NA
hsa-miR-20b-3p	-0,324125911	0,51824962	NA
hsa-miR-4523	0,535106913	0,52002176	NA
hsa-miR-342-3p	0,258848132	0,52287601	0,77632246
hsa-miR-3158-3p	0,246809735	0,52550288	NA
hsa-miR-1185-2-3p	0,362737091	0,52833052	0,77819701
hsa-miR-1185-1-3p	0,362179130	0,52913687	0,77819701
hsa-miR-3683	0,481024342	0,53099961	NA
hsa-miR-199a-5p	-0,205607339	0,53100502	0,77819701
hsa-miR-146b-3p	0,354111771	0,53301015	NA
hsa-miR-643	0,382088058	0,53339325	NA
hsa-miR-328-3p	-0,198055466	0,53843159	0,78160959
hsa-miR-1306-5p	-0,200085520	0,54073573	0,78160959
hsa-miR-125b-5p	0,212570711	0,54286615	0,78160959
hsa-miR-1256	0,139936373	0,54349964	NA
hsa-miR-101-3p	0,106033147	0,54395162	0,78160959
hsa-miR-103a-1-5p	-0,325893599	0,54431398	NA
hsa-miR-4454	0,206404043	0,54603559	NA
hsa-miR-329-3p	0,328181566	0,54879652	0,78160959
hsa-miR-12116	0,554012328	0,55211859	NA
hsa-miR-369-3p	0,330994933	0,55339169	0,78160959
hsa-miR-548w	-0,329771327	0,55448823	0,78160959
hsa-miR-598-3p	-0,122528580	0,55466989	0,78160959

hsa-miR-11400	-0,168791571	0,55736098	0,78160959
hsa-miR-138-5p	-0,213752670	0,55742089	NA
hsa-miR-4446-3p	-0,136763812	0,55742151	0,78160959
hsa-miR-6134	-0,354950424	0,55756387	NA
hsa-miR-574-3p	0,110482806	0,55862097	0,78160959
hsa-miR-410-3p	0,304439001	0,55890601	NA
hsa-miR-16-1-3p	-0,489228843	0,56016974	NA
hsa-miR-380-3p	0,299326701	0,56158702	NA
hsa-miR-410-5p	0,496666079	0,56178582	NA
hsa-miR-29b-2-5p	0,318596646	0,56817473	NA
hsa-miR-548f-5p	-0,413887005	0,57422894	NA
hsa-miR-429	0,370264935	0,57602062	NA
hsa-miR-23a-3p	-0,070879967	0,57607425	0,80107011
hsa-miR-370-5p	0,352964911	0,57784307	NA
hsa-let-7f-2-3p	0,283791316	0,57959922	0,80107011
hsa-miR-197-5p	-0,382454397	0,5801007	NA
hsa-miR-6798-5p	0,405423820	0,58222796	NA
hsa-miR-548ag	-0,393738311	0,58338552	NA
hsa-miR-548am-5p	-0,162679591	0,58430996	0,80107011
hsa-miR-548c-5p	-0,162679591	0,58430996	0,80107011
hsa-miR-548o-5p	-0,162679591	0,58430996	0,80107011
hsa-miR-9-3p	-0,144931959	0,58822261	0,80114063
hsa-miR-21-5p	0,057213040	0,58907399	0,80114063
hsa-miR-101-5p	0,255810634	0,59220901	NA
hsa-miR-501-5p	0,578884217	0,59238787	NA
hsa-miR-4645-3p	0,446728208	0,59242223	NA
hsa-miR-29a-5p	0,220701435	0,592424	NA
hsa-miR-191-5p	0,039468078	0,59252269	0,80245743
hsa-miR-6877-5p	-0,351847043	0,5946298	NA
hsa-miR-130b-3p	-0,092278288	0,59488195	0,80245743
hsa-miR-4659a-5p	-0,164453101	0,59685779	NA
hsa-miR-3679-5p	0,163585173	0,59712274	0,80245743
hsa-miR-1323	-0,396510497	0,59908877	NA
hsa-miR-548at-5p	-0,142121306	0,60382051	NA
hsa-miR-132-5p	0,176649848	0,60730407	NA
hsa-miR-204-5p	-0,292381738	0,6076399	NA
hsa-miR-664b-3p	0,325737368	0,60784937	NA
hsa-miR-26a-2-3p	0,264696754	0,60885675	NA
hsa-miR-296-3p	-0,273860041	0,60913576	NA
hsa-miR-20a-3p	-0,140743076	0,60933294	NA
hsa-miR-27a-3p	0,086909812	0,61044586	0,81122962
hsa-miR-27b-3p	0,086895175	0,61059161	0,81122962
hsa-miR-103a-2-5p	-0,146876163	0,61080819	0,81122962
hsa-miR-1297	-0,326822374	0,61141738	NA
hsa-miR-3124-5p	0,382084179	0,61282202	NA
hsa-miR-134-3p	0,432028205	0,61497608	NA

hsa-miR-411-3p	0,295027627	0,61543559	NA
hsa-miR-361-3p	0,096735074	0,61556849	0,81437077
hsa-miR-6503-5p	0,404618246	0,61680198	NA
hsa-miR-6892-5p	0,460616821	0,62272804	NA
hsa-miR-532-5p	0,103473004	0,62339143	0,81847153
hsa-miR-195-5p	0,106676657	0,62412084	0,81847153
hsa-miR-153-3p	-0,138877603	0,62589	0,81847153
hsa-miR-497-5p	0,171550440	0,62928456	NA
hsa-miR-548o-3p	-0,163025738	0,62950735	NA
hsa-miR-6516-5p	0,094982638	0,63115961	0,82089872
hsa-miR-579-3p	0,133348614	0,63299988	0,82089872
hsa-miR-6767-5p	-0,461763101	0,63350174	NA
hsa-miR-28-5p	-0,071465281	0,6349893	0,82089872
hsa-miR-326	0,276219558	0,63609758	NA
hsa-miR-181b-3p	0,379706810	0,63933715	NA
hsa-miR-1537-5p	0,356298709	0,64227419	NA
hsa-miR-186-5p	0,049509693	0,6445757	0,8286949
hsa-miR-142-3p	-0,056222982	0,647398	0,8286949
hsa-miR-30b-3p	-0,073668582	0,64833189	0,8286949
hsa-miR-551b-5p	-0,342362832	0,6488472	NA
hsa-miR-655-5p	-0,322062342	0,65383229	NA
hsa-miR-500a-3p	0,167800014	0,65458446	NA
hsa-miR-660-3p	0,405580423	0,65550632	NA
hsa-miR-122-5p	-0,447593886	0,65557363	0,83251987
hsa-miR-619-5p	0,250675784	0,65777308	NA
hsa-miR-140-3p	0,063817958	0,65857997	0,83251987
hsa-miR-652-5p	-0,104752060	0,65867013	0,83251987
hsa-miR-548ao-5p	-0,143986039	0,66071055	NA
hsa-miR-6832-5p	-0,283954594	0,66076174	NA
hsa-miR-16-5p	0,059749119	0,6617058	0,83325916
hsa-miR-576-5p	0,159415266	0,66292278	NA
hsa-miR-941	0,167468298	0,67041394	NA
hsa-miR-874-3p	-0,152640883	0,67071965	NA
hsa-miR-424-5p	-0,136492095	0,67319655	0,84460084
hsa-miR-130b-5p	-0,153060428	0,67325606	NA
hsa-miR-135a-5p	0,137234269	0,67385164	NA
hsa-miR-1197	0,474625539	0,67794029	NA
hsa-miR-6126	0,239908953	0,67852296	NA
hsa-miR-2278	-0,117077511	0,67952622	NA
hsa-miR-6818-5p	0,179231535	0,68181896	NA
hsa-miR-544b	0,635134956	0,68255013	NA
hsa-miR-3154	-0,292109562	0,68311055	NA
hsa-miR-497-3p	-0,208381197	0,685465	NA
hsa-miR-423-3p	-0,067838056	0,68693712	0,8586714
hsa-miR-6513-5p	0,106987706	0,68877118	NA
hsa-miR-373-3p	-0,622955681	0,694479	NA

hsa-miR-489-3p	0,527229792	0,69579895	NA
hsa-miR-4766-3p	0,174808490	0,6989173	NA
hsa-miR-548c-3p	-0,146092368	0,70021939	NA
hsa-miR-550a-5p	0,073532336	0,70185668	0,86737026
hsa-miR-1179	-0,187662176	0,70248731	NA
hsa-miR-483-5p	0,338640058	0,70320965	0,86737026
hsa-miR-421	-0,041657672	0,70340453	0,86737026
hsa-miR-214-3p	0,370959466	0,70511686	NA
hsa-miR-5586-5p	-0,127981979	0,7055574	NA
hsa-miR-144-5p	-0,195512007	0,70595372	0,86737026
hsa-miR-5010-5p	-0,087935042	0,70665165	0,86737026
hsa-miR-4748	0,197870491	0,70828013	NA
hsa-miR-137-3p	0,298551708	0,70873059	NA
hsa-miR-496	0,243305372	0,71165652	NA
hsa-miR-624-3p	0,127033080	0,7139506	0,86974985
hsa-miR-4762-5p	-0,290202432	0,71612459	NA
hsa-miR-548h-3p	0,053463658	0,71650405	0,86974985
hsa-miR-548z	0,053463658	0,71650405	0,86974985
hsa-miR-513b-5p	0,314933710	0,71871519	NA
hsa-let-7g-5p	0,031582965	0,71882267	0,86974985
hsa-miR-7705	-0,295198144	0,7189344	NA
hsa-miR-3605-5p	0,290328262	0,72019044	NA
hsa-miR-3177-3p	0,260153021	0,72042558	NA
hsa-miR-374b-3p	-0,084420456	0,72111379	NA
hsa-miR-7845-5p	-0,264647331	0,72369408	NA
hsa-miR-3161	0,668621055	0,72496381	NA
hsa-miR-185-5p	-0,035666917	0,72521124	0,87044341
hsa-let-7f-1-3p	-0,100173250	0,7262308	NA
hsa-miR-3138	-0,229985380	0,72870896	NA
hsa-miR-425-3p	0,091514451	0,72876009	0,87044341
hsa-miR-3065-3p	-0,121413950	0,72933657	NA
hsa-miR-940	0,128492098	0,72971484	0,87044341
hsa-miR-548au-5p	-0,085718115	0,72977226	0,87044341
hsa-miR-6741-5p	-0,171228772	0,73023043	NA
hsa-miR-203b-5p	0,335623728	0,73145797	NA
hsa-miR-335-3p	0,114841306	0,73219652	0,87044341
hsa-miR-6802-5p	0,311015808	0,73534953	NA
hsa-miR-1246	-0,255243476	0,73545785	NA
hsa-miR-223-3p	-0,045504691	0,73988238	0,87651571
hsa-miR-200b-3p	0,168398360	0,74316894	NA
hsa-miR-340-3p	-0,082404681	0,74334051	0,87755477
hsa-miR-4470	0,222083957	0,74555118	NA
hsa-miR-374a-5p	0,068254046	0,74615128	0,87782503
hsa-miR-182-5p	0,085139720	0,74940572	0,8786136
hsa-miR-548ap-5p	-0,147440720	0,7506968	NA
hsa-miR-4742-5p	-0,164565841	0,75279902	NA

hsa-miR-3115	-0,103950690	0,75476923	NA
hsa-miR-122b-3p	-0,301330267	0,7552973	0,88113366
hsa-miR-580-3p	0,146788583	0,75632588	NA
hsa-miR-31-5p	-0,153995645	0,75673832	0,88113366
hsa-miR-92b-3p	-0,114371861	0,75697292	NA
hsa-miR-1304-5p	-0,259139213	0,76092698	NA
hsa-miR-625-5p	-0,105457136	0,7615236	0,88258696
hsa-miR-1304-3p	-0,088796084	0,76196196	NA
hsa-miR-3928-3p	-0,078117819	0,76197838	NA
hsa-miR-3074-3p	-0,160353704	0,76249588	NA
hsa-miR-545-3p	0,063485983	0,76317814	0,88258696
hsa-miR-4659b-3p	0,147883439	0,76520405	NA
hsa-miR-210-3p	-0,112343016	0,7654511	NA
hsa-miR-6734-5p	-0,085667212	0,76598491	NA
hsa-miR-548h-5p	-0,079970586	0,76650992	NA
hsa-miR-20b-5p	-0,079005378	0,77046684	0,88799568
hsa-miR-299-5p	0,173777368	0,77074605	NA
hsa-miR-552-3p	0,191437380	0,77113188	NA
hsa-miR-4662a-5p	0,127636069	0,77238335	NA
hsa-miR-4789-3p	-0,330897180	0,77267801	NA
hsa-miR-206	0,239769248	0,77466594	NA
hsa-miR-151b	-0,038792956	0,77748584	0,89305806
hsa-miR-6721-5p	-0,176150221	0,77761033	NA
hsa-miR-219b-3p	-0,203115338	0,77765022	NA
hsa-miR-616-3p	-0,184222505	0,77804572	NA
hsa-miR-1538	-0,193987612	0,7786127	NA
hsa-miR-1255a	0,197545781	0,7819491	0,89516059
hsa-miR-5581-3p	0,214149888	0,78199989	NA
hsa-miR-7849-3p	-0,121549602	0,7858198	NA
hsa-miR-769-3p	-0,181989383	0,78691298	NA
hsa-miR-33b-5p	0,089459168	0,78719998	NA
hsa-miR-191-3p	0,042115416	0,78753525	0,89821777
hsa-miR-3157-5p	-0,112379082	0,79059165	NA
hsa-miR-181a-2-3p	0,048774665	0,79216931	0,89821777
hsa-miR-190a-3p	0,302224190	0,79401119	NA
hsa-miR-10399-5p	0,070917827	0,79496671	0,89821777
hsa-miR-3120-3p	-0,074345173	0,79518691	0,89821777
hsa-miR-151a-5p	-0,028712144	0,79874823	0,89925298
hsa-miR-125b-2-3p	-0,203665656	0,80110728	NA
hsa-miR-23b-5p	0,197607286	0,80310966	NA
hsa-miR-26a-1-3p	-0,076658606	0,80331004	0,90140401
hsa-miR-3136-5p	0,160910226	0,80607815	NA
hsa-miR-32-5p	-0,034156554	0,80693163	0,90248933
hsa-miR-4429	-0,179863708	0,80917691	NA
hsa-miR-374c-5p	-0,078079238	0,81043503	NA
hsa-miR-214-5p	-0,066599018	0,8162678	0,90993787

hsa-miR-4738-3p	0,136283069	0,81632974	NA
hsa-miR-3667-5p	-0,145038469	0,82105359	NA
hsa-miR-132-3p	-0,044427456	0,82263173	0,91403525
hsa-miR-7706	0,087118559	0,82546001	NA
hsa-miR-4665-5p	-0,064080416	0,83341784	NA
hsa-miR-6073	0,173683495	0,83405574	NA
hsa-miR-616-5p	0,242614695	0,83439744	NA
hsa-miR-499a-3p	-0,158617430	0,83798132	NA
hsa-miR-3192-5p	0,203402628	0,83969201	NA
hsa-miR-4716-3p	0,172382268	0,84040212	NA
hsa-miR-1229-3p	-0,149976208	0,84203139	NA
hsa-miR-548l	-0,069050265	0,84316682	0,93380038
hsa-miR-6838-5p	-0,161093521	0,8433633	NA
hsa-miR-6807-5p	-0,164656074	0,84752184	NA
hsa-miR-142-5p	-0,048121006	0,8499213	0,93822481
hsa-miR-98-5p	-0,022150687	0,85275296	0,93830422
hsa-miR-33b-3p	0,165436318	0,85524972	NA
hsa-miR-29b-1-5p	-0,047551711	0,86037508	NA
hsa-miR-10399-3p	0,052277030	0,86253211	NA
hsa-miR-500a-5p	0,093238806	0,86338081	NA
hsa-miR-548ae-3p	0,081566023	0,86347341	NA
hsa-miR-204-3p	0,168855339	0,86457932	NA
hsa-miR-548q	-0,136922720	0,86559127	NA
hsa-miR-6730-5p	0,118560913	0,86876357	NA
hsa-miR-548aq-3p	-0,033694446	0,87011358	0,95375997
hsa-miR-30c-2-3p	-0,078929227	0,87244471	NA
hsa-miR-1290	-0,081534536	0,87350009	0,95375997
hsa-miR-3609	-0,152117730	0,87502237	NA
hsa-miR-505-5p	0,028746329	0,87528526	0,95375997
hsa-miR-548ad-5p	-0,070085953	0,87608257	NA
hsa-miR-548ae-5p	-0,070085953	0,87608257	NA
hsa-miR-671-5p	-0,040684200	0,87841586	0,95375997
hsa-miR-933	0,147182051	0,87971664	NA
hsa-miR-532-3p	-0,036724278	0,88577031	NA
hsa-miR-25-3p	0,027327281	0,88635847	0,95375997
hsa-miR-4435	0,064469542	0,88660981	NA
hsa-miR-19a-5p	-0,109029138	0,88663612	NA
hsa-miR-223-5p	-0,019323966	0,88667819	0,95375997
hsa-miR-1285-5p	-0,125283125	0,88994473	NA
hsa-miR-3143	0,038345748	0,89075447	0,95375997
hsa-miR-3529-3p	-0,033860676	0,8920507	0,95375997
hsa-miR-7-5p	-0,033860676	0,8920507	0,95375997
hsa-miR-6513-3p	0,105875387	0,89373258	NA
hsa-miR-33a-5p	-0,030880518	0,89485126	0,95375997
hsa-let-7e-3p	-0,138418550	0,89926416	NA
hsa-miR-550a-3-5p	0,037468707	0,9011508	NA

hsa-miR-6758-5p	-0,131551001	0,90216991	NA
hsa-miR-376c-5p	0,086309498	0,90239659	NA
hsa-miR-3920	0,051940505	0,90387506	NA
hsa-miR-320d	0,031964595	0,90658319	0,95825527
hsa-miR-6502-5p	0,083607982	0,90679011	NA
hsa-miR-24-1-5p	0,061024187	0,90917527	NA
hsa-miR-1296-5p	0,066742083	0,91047664	NA
hsa-miR-885-5p	-0,132052946	0,91067034	NA
hsa-miR-548a-3p	-0,035114615	0,91083407	NA
hsa-miR-598-5p	0,087165640	0,91109162	NA
hsa-miR-7977	0,033006277	0,91272326	NA
hsa-miR-1226-3p	0,090503766	0,91505141	NA
hsa-miR-320a-3p	-0,020156479	0,91544659	0,95825527
hsa-miR-320b	-0,020104394	0,91567311	0,95825527
hsa-let-7f-5p	-0,014830662	0,91661592	0,95825527
hsa-miR-301b-3p	0,035090349	0,91716804	0,95825527
hsa-miR-6880-5p	-0,091121512	0,91762451	NA
hsa-miR-4634	-0,081992879	0,91802748	NA
hsa-miR-126-5p	-0,013009652	0,91891289	0,95825527
hsa-miR-1307-3p	-0,022982282	0,92365708	0,95825527
hsa-miR-584-3p	0,029597712	0,92432527	0,95825527
hsa-miR-548as-3p	-0,052156428	0,92878604	NA
hsa-miR-6826-5p	-0,088778584	0,92957411	NA
hsa-miR-548aj-5p	-0,016297448	0,93033664	0,95825527
hsa-miR-548g-5p	-0,016297448	0,93033664	0,95825527
hsa-miR-548x-5p	-0,016297448	0,93033664	0,95825527
hsa-miR-194-5p	0,019182951	0,93288969	0,95825527
hsa-miR-548i	0,036910964	0,93629307	NA
hsa-miR-199b-5p	0,041000491	0,93963273	NA
hsa-miR-126-3p	-0,008633359	0,94198134	0,96467968
hsa-miR-146a-3p	0,095388674	0,94989663	NA
hsa-miR-301a-5p	0,047538114	0,95205529	NA
hsa-miR-32-3p	0,019986116	0,95268703	0,96985979
hsa-miR-2355-3p	-0,012194104	0,95274462	0,96985979
hsa-miR-3611	0,024867933	0,95372741	NA
hsa-miR-25-5p	-0,056895900	0,95432987	NA
hsa-miR-625-3p	0,016030034	0,96337357	0,97775228
hsa-miR-4687-5p	0,026043824	0,96337475	NA
hsa-miR-6822-3p	-0,041953936	0,96501133	NA
hsa-miR-5187-5p	0,014900623	0,96862501	NA
hsa-miR-1537-3p	0,020377859	0,96939893	NA
hsa-miR-5583-3p	0,037764401	0,96996813	NA
hsa-miR-3174	0,013691123	0,97254394	NA
hsa-miR-6866-5p	0,020456426	0,97340043	NA
hsa-miR-6815-5p	0,039507464	0,97594967	NA
hsa-miR-26a-5p	-0,004282411	0,97609419	0,98771436

hsa-miR-6859-5p	-0,013526498	0,98079261	NA
hsa-miR-5586-3p	0,011650416	0,98582611	NA
hsa-miR-193b-3p	0,014368810	0,98664948	NA
hsa-miR-381-5p	0,010362558	0,98684323	NA
hsa-miR-3187-3p	0,005426668	0,98851002	NA
hsa-miR-152-3p	0,001902114	0,99109182	0,99904982
hsa-miR-3194-3p	0,009719112	0,99332403	NA
hsa-let-7d-3p	0,000893986	0,99846355	0,99904982
hsa-let-7a-5p	-0,000186259	0,99867563	0,99904982
hsa-let-7c-5p	-0,000133629	0,99904982	0,99904982
hsa-miR-141-3p	0,851653497	NA	NA
hsa-miR-200a-3p	1,734590415	NA	NA
hsa-miR-375-3p	2,507120422	NA	NA
hsa-miR-627-5p	-1,564627643	NA	NA

Tabla suplementaria 11: Lista de miRNAs en común entre la tabla suplementarias 9 (y la lista de miRNAs obtenidos a partir del microarreglo de expresión comparando CaM vs VS

hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-505-3p
hsa-miR-1180-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-548aj-3p
hsa-miR-193a-5p	hsa-mir-378c	hsa-miR-548p
hsa-miR-3196	hsa-mir-3960	hsa-miR-642a-5p
hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-4732-5p	hsa-miR-6511b-3p
hsa-miR-335-5p	hsa-miR-486-3p	

Tabla suplementaria 12: Lista de miRNAs en común entre la tabla suplementarias 9 (y la lista de miRNAs obtenidos a partir del microarreglo de expresión comparando ET vs VS

hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-486-3p
hsa-miR-1180-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-505-3p
hsa-miR-1268b	hsa-miR-339-5p	hsa-mir-544a
hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-548p
hsa-miR-222-3p	hsa-mir-378c	hsa-miR-642a-3p
hsa-miR-3196	hsa-miR-3960	hsa-miR-6511b-3p
hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-4732-5p	hsa-miR-96-5p

Capítulo 4 Resultados

Tabla suplementaria 13: Resumen de las métricas obtenidas a partir de modelos predictivos realizados para distintos tipos de cáncer utilizando los 11 miRNAs candidatos.

Modelo 1									
Tipo de cáncer	Cantidad de pacientes	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUCROC	Accuracy (%)	Precision (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Tasa Falsos Positivos (%)
Mama	1272	0,436	93	90	0,96	91	90	92	10
Gástrico	1417	0,4893	82	76	0,86	79	77	81	29
Hepatocelular	345	0,5331	85	82	0,89	84	83	85	20
Ovario	320	0,536	82	84	0,9	83	84	82	21
Pulmón	1566	0,4536	85	76	0,88	81	78	83	28
Próstata	282	0,5164	68	72	0,74	70	71	69	28
Sarcoma	273	0,5025	89	90	0,95	89	90	89	10
Vejiga	100	0,468	85	79	0,89	82	80	84	27

Tabla suplementaria 14: Resumen de las métricas obtenidas a partir de modelos predictivos realizados para distintos tipos de cáncer utilizando los miRNAs miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-339-3p, miR-16-5p y miR-335-5p.

Modelo 2									
Tipo de cáncer	Cantidad de pacientes	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUCROC	Accuracy (%)	Precision (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Tasa Falsos Positivos (%)
Mama	1272	0,4495	92	90	0,96	91	90	92	10
Gástrico	1417	0,4549	83	71	0,84	77	74	81	29
Hepatocelular	345	0,508	88	80	0,89	84	81	87	20
Ovario	320	0,5091	80	79	0,87	79	79	80	21
Pulmón	1566	0,4001	87	71	0,87	79	75	85	28
Próstata	282	0,4877	60	61	0,64	60	60	60	39
Sarcoma	273	0,417	92	84	0,93	88	85	91	16
Vejiga	100	0,3912	92	73	0,88	82	77	90	27

Tabla suplementaria 15: Resumen de las métricas obtenidas a partir de modelos predictivos realizados para distintos tipos de cáncer utilizando los miRNAs miR-106a-5p, miR-150-5p, miR-339-3p, miR-339-5p y miR-16-5p.

Modelo 5									
Tipo de cáncer	Cantidad de pacientes	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUCROC	Accuracy (%)	Precision (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Tasa Falsos Positivos (%)
Mama	1272	0,4637	91	91	0,96	91	91	91	9
Gástrico	1417	0,4466	83	70	0,84	76	73	80	30
Hepatocelular	345	0,4665	90	77	0,89	84	80	89	23
Ovario	320	0,4374	86	74	0,88	80	77	84	26
Pulmón	1566	0,5191	78	80	0,87	79	79	79	20
Próstata	282	0,5032	56	66	0,64	61	62	60	34
Sarcoma	273	0,502	92	87	0,94	90	88	92	12
Vejiga	100	0,3662	93	71	0,87	82	76	91	29

REFERENCIAS

- Abe, Seiichiro, Juntaro Matsuzaki, Kazuki Sudo, Ichiro Oda, Hitoshi Katai, Ken Kato, Satoko Takizawa, et al. 2021. "A Novel Combination of Serum MicroRNAs for the Detection of Early Gastric Cancer." *Gastric Cancer* 24 (4): 835–43. <https://doi.org/10.1007/s10120-021-01161-0>.
- Agnoli, Claudia, Sara Grioni, Sabina Sieri, Carlotta Sacerdote, Fulvio Ricceri, Rosario Tumino, Graziella Frasca, et al. 2015. "Metabolic Syndrome and Breast Cancer Risk: A Case-Cohort Study Nested in a Multicentre Italian Cohort." *PLOS ONE* 10 (6): e0128891. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0128891>.
- Akram, Muhammad, Mehwish Iqbal, Muhammad Daniyal, and Asmat Ullah Khan. 2017. "Awareness and Current Knowledge of Breast Cancer." *Biological Research. Biol Res.* <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.
- Alarimo, Emma Leena, Riikka Havunen, Sergei Häyrynen, Sanna Penkki, Johanna Ketolainen, Matti Nykter, and Anne Kallioniemi. 2016. "Bone Morphogenetic Protein 4 Regulates MicroRNA Expression in Breast Cancer Cell Lines in Diverse Fashion." *Genes Chromosomes and Cancer* 55 (3): 227–36. <https://doi.org/10.1002/gcc.22324>.
- Allen-Rhoades, Wendy, Lyazat Kurenbekova, Laura Satterfield, Neha Parikh, Daniel Fuja, Ryan L. Shuck, Nino Rainusso, et al. 2015. "Cross-Species Identification of a Plasma MicroRNA Signature for Detection, Therapeutic Monitoring, and Prognosis in Osteosarcoma." *Cancer Medicine* 4 (7): 977–88. <https://doi.org/10.1002/CAM4.438>.
- Asakura, Keisuke, Tsukasa Kadota, Juntaro Matsuzaki, Yukihiro Yoshida, Yusuke Yamamoto, Kazuo Nakagawa, Satoko Takizawa, et al. 2020. "A MiRNA-Based Diagnostic Model Predicts Resectable Lung Cancer in Humans with High Accuracy." *Communications Biology* 3 (1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0863-y>.
- Asano, Naofumi, Juntaro Matsuzaki, Makiko Ichikawa, Junpei Kawauchi, Satoko Takizawa, Yoshiaki Aoki, Hiromi Sakamoto, et al. 2019. "A Serum MicroRNA Classifier for the Diagnosis of Sarcomas of Various Histological Subtypes." *Nature*

- Communications* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09143-8>.
- Ashirbekov, Yeldar, Arman Abailev, Nazgul Omarbayeva, Dauren Botbayev, Ayaz Belkozhayev, Anel Askandirova, Alena Neupokoyeva, Gulzhakhan Utegenova, Kamalidin Sharipov, and Nagima Aitkhozhina. 2020. "Combination of Circulating MiR-145-5p/MiR-191-5p as Biomarker for Breast Cancer Detection." *PeerJ* 8 (December). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.10494>.
- Banys-Paluchowski, Maggie, Natalia Krawczyk, and Tanja Fehm. 2020. "Liquid Biopsy in Breast Cancer." *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde* 80 (11): 1093–1104. <https://doi.org/10.1055/a-1124-7225>.
- Bao, Chang, Tao Liu, Lingbo Qian, Chi Xiao, Xinru Zhou, Heng Ai, Jue Wang, Weimin Fan, and Jie Pan. 2021. "Shikonin Inhibits Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition via MiR-17-5p/PTEN/Akt Pathway." *Journal of Cancer* 12 (1): 76–88. <https://doi.org/10.7150/JCA.47553>.
- Bartha, Áron, and Balázs Győrffy. 2021. "TNMplot.Com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues." *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 2622 22 (5): 2622. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052622>.
- Bassey-Archibong, B. I., J. M. Kwiecien, S. B. Milosavljevic, R. M. Hallett, L. G.A. Rayner, M. J. Erb, C. J. Crawford-Brown, et al. 2016. "Kaiso Depletion Attenuates Transforming Growth Factor- β Signaling and Metastatic Activity of Triple-Negative Breast Cancer Cells." *Oncogenesis* 5 (3). <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.17>.
- Bassey-Archibong, Blessing I., Lyndsay G.A. Rayner, Shawn M. Hercules, Craig W. Aarts, Anna Dvorkin-Gheva, Jonathan L. Bramson, John A. Hassell, and Juliet M. Daniel. 2017. "Kaiso Depletion Attenuates the Growth and Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells." *Cell Death and Disease* 8 (3). <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.92>.
- Bernardo, Gina M., and Ruth A. Keri. 2012. "FOXA1: A Transcription Factor with Parallel Functions in Development and Cancer." *Bioscience Reports* 32 (2): 113. <https://doi.org/10.1042/BSR20110046>.

- Bhandari, Ruchi, George A. Kelley, Tara A. Hartley, and Ian R. H. Rockett. 2014. "Metabolic Syndrome Is Associated with Increased Breast Cancer Risk: A Systematic Review with Meta-Analysis." *International Journal of Breast Cancer* 2014: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/189384>.
- Bhaskaran, M., and M. Mohan. 2014. "MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease." *Veterinary Pathology* 51 (4): 759–74. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>.
- Bill, Ruben, and Gerhard Christofori. 2015. "The Relevance of EMT in Breast Cancer Metastasis: Correlation or Causality?" *FEBS Letters.* FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.002>.
- Bobbili, Madhusudhan Reddy, Robert M. Mader, Johannes Grillari, and Hanna Dellago. 2017. "OncomiR-17-5p: Alarm Signal in Cancer?" *Oncotarget.* Impact Journals. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19331>.
- Bollaert, Emeline, Audrey de Rocca Serra, and Jean Baptiste Demoulin. 2019. "The HMG Box Transcription Factor HBP1: A Cell Cycle Inhibitor at the Crossroads of Cancer Signaling Pathways." *Cellular and Molecular Life Sciences.* Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03012-9>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Calvano Filho, Carlos Marino Cabral, Daniele Carvalho Calvano-Mendes, Kátia Cândido Carvalho, Gustavo Arantes Maciel, Marcos Desidério Ricci, Ana Paula Torres, José Roberto Filassi, and Edmund Chada Baracat. 2014. "Triple-Negative and Luminal A Breast Tumors: Differential Expression of MiR-18a-5p, MiR-17-5p, and MiR-20a-5p" 35 (8): 7733–41. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-014-2025-7>.
- Cao, Zhe, Chang Liu, Jianwei Xu, Lei You, Chunyou Wang, Wenhui Lou, Bei Sun, et al. 2016. "Plasma MicroRNA Panels to Diagnose Pancreatic Cancer: Results from a Multicenter Study." *Oncotarget* 7 (27): 41575–83.

- [https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9491.](https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9491)
- Cha, Y. J., W. H. Jung, and J. S. Koo. 2017. "Expression of DNA Methylation-Related Proteins in Metastatic Breast Cancer." *Neoplasma* 64 (3): 412–20. https://doi.org/10.4149/NEO_2017_312.
- Chang, Jeremy T-H., Fan Wang, William Chapin, and R. Stephanie Huang. 2016. "Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas." *PLoS ONE* 11 (12): e0168284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168284>.
- Chen, Caifu, Dana A Ridzon, Adam J Broomer, Zhaohui Zhou, Danny H Lee, Julie T Nguyen, Maura Barbisin, et al. 2005. "Real-Time Quantification of MicroRNAs by Stem-Loop RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 33 (20): e179. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>.
- Chen, Kuan-Hui Ethan, Karissa Bustamante, Vi Nguyen, and Ameae M. Walker. 2017. "Involvement of MiR-106b in Tumorigenic Actions of Both Prolactin and Estradiol." *Oncotarget* 8 (22): 36368–82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16755>.
- Chen, Rui, Chaojun Jiang, Qiannan Zhu, Sainan You, Yan Li, Shuo Li, Lei Ding, et al. 2020. "Combining the Tumor Abnormal Protein Test with Tests for Carcinoembryonic Antigens, Cancer Antigen 15-3, and/or Cancer Antigen 125 Significantly Increased Their Diagnostic Sensitivity for Breast Cancer." *Medicine* 99 (29): e21231. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021231>.
- Chong, Zhi Xiong, Swee Keong Yeap, and Wan Yong Ho. 2020. "Roles of Circulating MicroRNA(s) in Human Breast Cancer." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108583>.
- Cordani, Marco, Giovanna Butera, Ilaria Dando, Margalida Torrens-Mas, Elena Butturini, Raffaella Pacchiana, Elisa Oppici, et al. 2018. "Mutant P53 Blocks SESN1/AMPK/PGC-1 α /UCP2 Axis Increasing Mitochondrial O 2^- Production in Cancer Cells." *British Journal of Cancer* 119 (8): 994–1008. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0288-2>.
- Cordani, Marco, Elisa Oppici, Ilaria Dando, Elena Butturini, Elisa Dalla Pozza, Mercedes

- Nadal-Serrano, Jordi Oliver, et al. 2016. "Mutant P53 Proteins Counteract Autophagic Mechanism Sensitizing Cancer Cells to MTOR Inhibition." *Molecular Oncology* 10 (7): 1008–29. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.001>.
- Dalton, Guillermo Nicolás, Cintia Massillo, Georgina Daniela Scalise, Rocío Duca, Juliana Porretti, Paula Lucia Farré, Kevin Gardner, et al. 2019. "CTBP1 Depletion on Prostate Tumors Derepulates MiRNA/MRNA Expression and Impairs Cancer Progression in Metabolic Syndrome Mice." *Cell Death & Disease* 10 (4): 299. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1535-z>.
- Daugaard, Iben, and Thomas Birkballe Hansen. 2017. "Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs." *Trends in Genetics : TIG* 33 (3): 208–19. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.01.003>.
- Dellago, Hanna, Madhusudhan Reddy Bobbili, and Johannes Grillari. 2017. "MicroRNA-17-5p: At the Crossroads of Cancer and Aging - A Mini-Review." *Gerontology* 63 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1159/000447773>.
- Du, Peng, Kaifeng Luo, Guoyong Li, Jisheng Zhu, Qi Xiao, Yong Li, and Xingjian Zhang. 2021. "Long Non-Coding RNA VCAN-AS1 Promotes the Malignant Behaviors of Breast Cancer by Regulating the MiR-106a-5p-Mediated STAT3/HIF-1 α Pathway." *Bioengineered* 12 (1): 5028–44. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1960774> [SUPPL_FILE/KBIE_A_1960774_SM1239.ZIP](https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1960774).
- Duca, Rocío B, Cintia Massillo, Guillermo N Dalton, Paula L Farré, Karen D Graña, Kevin Gardner, and Adriana De Siervi. 2021. "MiR-19b-3p and MiR-101-3p as Potential Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis." *American Journal of Cancer Research* 11 (6): 2802. [/pmc/articles/PMC8263646/](https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1960774).
- Ebrahimkhani, Saeideh, Fatemeh Vafaee, Susannah Hallal, Heng Wei, Maggie Yuk T. Lee, Paul E. Young, Laveniya Satgunaseelan, et al. 2018. "Deep Sequencing of Circulating Exosomal MicroRNA Allows Non-Invasive Glioblastoma Diagnosis." *NPJ Precision Oncology* 2 (1). <https://doi.org/10.1038/S41698-018-0071-0>.
- Eichhorn, Stephen W., Huili Guo, Sean E. McGeary, Ricard A. Rodriguez-Mias, Chanseok Shin, Daehyun Baek, Shu-Hao Hsu, et al. 2014. "mRNA Destabilization Is the

- Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues." *Molecular Cell* 56 (1): 104–15. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.08.028>.
- Escamilla-Powers, Julienne R., Colin J. Daniel, Amy Farrell, Karyn Taylor, Xiaoli Zhang, Sarah Byers, and Rosalie Sears. 2010. "The Tumor Suppressor Protein HBP1 Is a Novel C-Myc-Binding Protein That Negatively Regulates c-Myc Transcriptional Activity." *Journal of Biological Chemistry* 285 (7): 4847–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074856>.
- Escuin, Daniel, Laura López-Vilaró, Josefina Mora, Olga Bell, Antonio Moral, Ignacio Pérez, Cristina Arqueros, et al. 2021. "Circulating MicroRNAs in Early Breast Cancer Patients and Its Association With Lymph Node Metastases." *Frontiers in Oncology* 11 (August): 3303. [https://doi.org/10.3389/FONC.2021.627811/BIBTEX](https://doi.org/10.3389/FONC.2021.627811).
- Esposito, Katherine, Paolo Chiodini, Annalisa Capuano, Giuseppe Bellastella, Maria Ida Maiorino, Concetta Rafaniello, and Dario Giugliano. 2013a. "Metabolic Syndrome and Postmenopausal Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis." *Menopause* 20 (12): 1301–9. <https://doi.org/10.1097/GME.0b013e31828ce95d>.
- . 2013b. "Metabolic Syndrome and Postmenopausal Breast Cancer." *Menopause* 20 (12): 1301–9. <https://doi.org/10.1097/GME.0b013e31828ce95d>.
- Fang, Cheng, Yue Cao, Xiaoping Liu, Xian-Tao Zeng, Yirong Li, Cheng Fang, Yue Cao, Xiaoping Liu, Xian-Tao Zeng, and Yirong Li. 2017. "Serum CA125 Is a Predictive Marker for Breast Cancer Outcomes and Correlates with Molecular Subtypes." *Oncotarget* 8 (38): 63963–70. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19246>.
- Farré, Paula L., Georgina D. Scalise, Rocío B. Duca, Guillermo N. Dalton, Cintia Massillo, Juliana Porretti, Karen Graña, Kevin Gardner, Paola De Luca, and Adriana De Siervi. 2018. "CTBP1 and Metabolic Syndrome Induce an mRNA and MiRNA Expression Profile Critical for Breast Cancer Progression and Metastasis." *Oncotarget* 9 (17): 13848–58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24486>.
- Felekkis, Kyriacos, and Christos Papaneophytou. 2020. "Challenges in Using Circulating Micro-RNAs as Biomarkers for Cardiovascular Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 561 21 (2): 561. <https://doi.org/10.3390/ijms21020561>.

- <https://doi.org/10.3390/IJMS21020561>.
- Feng, Jing, Ti Wen, Zhi Li, Liang Feng, Lu Zhou, Zichang Yang, Lu Xu, et al. 2020. "Cross-Talk between the ER Pathway and the LncRNA MAFG-AS1/MiR-339-5p/ CDK2 Axis Promotes Progression of ER+ Breast Cancer and Confers Tamoxifen Resistance." *Aging* 12 (20): 20658–83. <https://doi.org/10.18632/AGING.103966>.
- Ferracin, Manuela, Laura Lupini, Irene Salamon, Elena Saccenti, Maria Vittoria Zanzi, Andrea Rocchi, Lucia Da Ros, et al. 2015. "Absolute Quantification of Cell-Free MicroRNAs in Cancer Patients." *Oncotarget* 6 (16): 14545–55. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3859>.
- Garcia-Elias, Anna, Leonor Alloza, Eulàlia Puigdecanet, Lara Nonell, Marta Tajes, Joao Curado, Cristina Enjuanes, et al. 2017. "Defining Quantification Methods and Optimizing Protocols for Microarray Hybridization of Circulating MicroRNAs." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08134-3>.
- Gensler, Miriam, Marcus Buschbeck, and Axel Ullrich. 2004. "Negative Regulation of HER2 Signaling by the PEST-Type Protein-Tyrosine Phosphatase BDP1." *Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12110–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309527200>.
- Goldman, Mary J., Brian Craft, Mim Hastie, Kristupas Repečka, Fran McDade, Akhil Kamath, Ayan Banerjee, et al. 2020. "Visualizing and Interpreting Cancer Genomics Data via the Xena Platform." *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>.
- Gong, C., S. Qu, B. Liu, S. Pan, Y. Jiao, Y. Nie, F. Su, Q. Liu, and E. Song. 2015. "MiR-106b Expression Determines the Proliferation Paradox of TGF-β in Breast Cancer Cells." *Oncogene* 34 (1): 84–93. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.525>.
- Goodwin, Pamela J. 2015. "Obesity, Insulin Resistance and Breast Cancer Outcomes." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24 Suppl 2 (November): S56–59. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2015.07.014>.
- Guarnieri, A. L., C. G. Towers, D. J. Drasin, M. U.J. Oliphant, Z. Andrysiak, T. J. Hotz, R. L. Vartuli, et al. 2018. "The MiR-106b-25 Cluster Mediates Breast Tumor Initiation

- through Activation of NOTCH1 via Direct Repression of NEDD4L.” *Oncogene* 37 (28): 3879–93. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0239-7>.
- Győrffy, Balázs. 2021. “Survival Analysis across the Entire Transcriptome Identifies Biomarkers with the Highest Prognostic Power in Breast Cancer.” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19 (January): 4101–9. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2021.07.014>.
- Ha, Minju, and V. Narry Kim. 2014. “Regulation of MicroRNA Biogenesis.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- Haakensen, Vilde D., Vegard Nygaard, Liliana Greger, Miriam R. Aure, Bastian Fromm, Ida R.K. Bukholm, Torben Lüders, et al. 2016. “Subtype-Specific Micro-RNA Expression Signatures in Breast Cancer Progression.” *International Journal of Cancer* 139 (5): 1117–28. <https://doi.org/10.1002/ijc.30142>.
- Haghi, Mehdi, Masoumeh F. Taha, and Arash Javeri. 2019. “Suppressive Effect of Exogenous MiR-16 and MiR-34a on Tumorigenesis of Breast Cancer Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (8): 13342–53. <https://doi.org/10.1002/jcb.28608>.
- Hammond, Scott M. 2015. “An Overview of MicroRNAs.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 87 (June): 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.05.001>.
- Hanahan, Douglas, Robert A. Weinberg, K.H. Pan, J.W. Shay, S.N. Cohen, M.B. Taylor, N.W. Clarke, et al. 2011. “Hallmarks of Cancer: The Next Generation.” *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- He, H., F. Xu, W. Huang, S. Y. Luo, Y. T. Lin, G. H. Zhang, Q. Du, and R. H. Duan. 2015. “MiR-125a-5p Expression Is Associated with the Age of Breast Cancer Patients.” *Genetics and Molecular Research : GMR* 14 (4): 17927–33. <https://doi.org/10.4238/2015.DECEMBER.22.17>.
- Herreros-Villanueva, Marta, Saray Duran-Sanchon, Ana Carmen Martín, Rosa Pérez-Palacios, Elena Vila-Navarro, María Marcuello, Mireia Diaz-Centeno, et al. 2019. “Plasma MicroRNA Signature Validation for Early Detection of Colorectal Cancer.” *Clinical and Translational Gastroenterology* 10 (1): e00003.

- <https://doi.org/10.14309/CTG.0000000000000003>.
- “Home - GEO - NCBI.” n.d. Accessed September 21, 2021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>.
- Hong, Hsiao Chin, Cheng Hsun Chuang, Wei Chih Huang, Shun Long Weng, Chia Hung Chen, Kuang Hsin Chang, Kuang Wen Liao, and Hsien Da Huang. 2020. “A Panel of Eight MicroRNAs Is a Good Predictive Parameter for Triple-Negative Breast Cancer Relapse.” *Theranostics* 10 (19): 8771–89. <https://doi.org/10.7150/thno.46142>.
- Hsieh, Tsung-Hua, Chia-Yi Hsu, Cheng-Fang Tsai, Cheng-Yu Long, Chee-Yin Chai, Ming-Feng Hou, Jau-Nan Lee, et al. 2014. “MiR-125a-5p Is a Prognostic Biomarker That Targets HDAC4 to Suppress Breast Tumorigenesis.” *Oncotarget* 6 (1): 494–509.
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2674>.
- Hu, Qing, Zhou Luo, Tao Xu, Jun Ying Zhang, Ying Zhu, Wei Xian Chen, Shan Liang Zhong, Jian Hua Zhao, and Jin Hai Tang. 2014. “FOXA1: A Promising Prognostic Marker in Breast Cancer.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 15 (1): 11–16.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.1.11>.
- Hu, Xiaopeng, Yun Liu, Yaying Du, Teng Cheng, and Wenfei Xia. 2019. “Long Non-Coding RNA BLACAT1 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation and Metastasis by MiR-150-5p/CCR2.” *Cell and Bioscience* 9 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13578-019-0274-2/FIGURES/6>.
- Iyengar, Neil M., Clifford A. Hudis, and Andrew J. Dannenberg. 2013. “Obesity and Inflammation: New Insights into Breast Cancer Development and Progression.” *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* 33 (33): 46–51.
https://doi.org/10.14694/EDBOOK_AM.2013.33.46.
- Jafari, Seyed Hamed, Zahra Saadatpour, Arash Salmaninejad, Fatemeh Momeni, Mojgan Mokhtari, Javid Sadri Nahand, Majid Rahmati, Hamed Mirzaei, and Mojtaba Kianmehr. 2018. “Breast Cancer Diagnosis: Imaging Techniques and Biochemical Markers.” *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26379>.

- Jansson, M. D., N. D. Damas, M. Lees, A. Jacobsen, and A. H. Lund. 2015. "MiR-339-5p Regulates the P53 Tumor-Suppressor Pathway by Targeting MDM2." *Oncogene* 34 (15): 1908–18. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.130>.
- Jia, Hongyao, Di Wu, Zhiru Zhang, and Sijie Li. 2021. "Regulatory Effect of the MAFG-AS1/MiR-150-5p/MYB Axis on the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells." *International Journal of Oncology* 58 (1): 33–44. <https://doi.org/10.3892/IJO.2020.5150/HTML>.
- Jia, Qianxin, Lanlan Ye, Shangwen Xu, Hui Xiao, Siding Xu, Zhaoxin Shi, Jinsheng Li, and Ziqian Chen. 2020. "Circular RNA 0007255 Regulates the Progression of Breast Cancer through MiR-335-5p/SIX2 Axis." *Thoracic Cancer* 11 (3): 619–30. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13306>.
- Jiang, Ming, Ni Qiu, Haoming Xia, Hongling Liang, Hongsheng Li, and Xiang Ao. 2019. "Long Non-coding RNA FOXD2-AS1/MiR-150-5p/PFN2 Axis Regulates Breast Cancer Malignancy and Tumorigenesis." *International Journal of Oncology* 54 (3): 1043–52. <https://doi.org/10.3892/IJO.2019.4671>.
- Jones, Jacqueline, Honghe Wang, Balasubramanyam Karanam, Shaniece Theodore, Windy Dean-Colomb, Danny R. Welch, William Grizzle, and Clayton Yates. 2014. "Nuclear Localization of Kaiso Promotes the Poorly Differentiated Phenotype and EMT in Infiltrating Ductal Carcinomas." *Clinical and Experimental Metastasis* 31 (5): 497–510. <https://doi.org/10.1007/s10585-014-9644-7>.
- Karagkouni, Dimitra, Maria D. Paraskevopoulou, Serafeim Chatzopoulos, Ioannis S. Vlachos, Spyros Tatsoglou, Ilias Kanellos, Dimitris Papadimitriou, et al. 2018. "DIANA-TarBase v8: A Decade-Long Collection of Experimentally Supported MiRNA-Gene Interactions." *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D239–45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>.
- Kim, Jiyoung, Xiaowei Zhang, Kimberly M. Rieger-Christ, Ian C. Summerhayes, David E. Wazer, K. Eric Paulson, and Amy S. Yee. 2006. "Suppression of Wnt Signaling by the Green Tea Compound (-)-Epigallocatechin 3-Gallate (EGCG) in Invasive Breast Cancer Cells: Requirement of the Transcriptional Repressor HBP1." *Journal of Biological Chemistry* 281 (16): 10865–75.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M513378200>.
- Kim, Sung Hun, Eun Hye Lee, Jae Kwan Jun, You Me Kim, Yun Woo Chang, Jin Hwa Lee, Hye Won Kim, and Eun Jung Choi. 2019. "Interpretive Performance and Inter-Observer Agreement on Digital Mammography Test Sets." *Korean Journal of Radiology* 20 (2): 218–24. <https://doi.org/10.3348/KJR.2018.0193>.
- Kim, Yong Chul, and Mary L. Cutler. 2020. "Microrna-Dependent Targeting of Rsu1 and the Ipp Adhesion Complex Regulates the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in Breast Cancer Cell Lines." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15): 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21155458>.
- Koh, Dong In, Haemin An, Min Young Kim, Bu Nam Jeon, Seo Hyun Choi, Sujin Susanne Hur, and Man Wook Hur. 2015. "Transcriptional Activation of APAF1 by KAISO (ZBTB33) and P53 Is Attenuated by RelA/P65." *Biochimica et Biophysica Acta* 1849 (9): 1170–78. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2015.07.008>.
- Koi, Yumiko, Yasuhiro Tsutani, Yukie Nishiyama, Daisuke Ueda, Yuta Ibuki, Shinsuke Sasada, Tomoyuki Akita, et al. 2020. "Predicting the Presence of Breast Cancer Using Circulating Small RNAs, Including Those in the Extracellular Vesicles." *Cancer Science* 111 (6): 2104. <https://doi.org/10.1111/CAS.14393>.
- Kramer, Martha F. 2011. "Stem-Loop RT-QPCR for MiRNAs." *Current Protocols in Molecular Biology* 2011. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>.
- Krishnamurthy, Arvind, Viveka Soundara, and Vijayalakshmi Ramshankar. 2016. "Preventive and Risk Reduction Strategies for Women at High Risk of Developing Breast Cancer: A Review." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.3.895>.
- Krishnan, Preethi, Sunita Ghosh, Bo Wang, Dongping Li, Ashok Narasimhan, Richard Berendt, Kathryn Graham, John R. Mackey, Olga Kovalchuk, and Sambasivarao Damaraju. 2015. "Next Generation Sequencing Profiling Identifies MiR-574-3p and MiR-660-5p as Potential Novel Prognostic Markers for Breast Cancer." *BMC Genomics* 2015 16:1 16 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1899-0>.
- Lánczky, András, Ádám Nagy, Giulia Bottai, Gyöngyi Munkácsy, András Szabó, Libero

- Santarpia, and Balázs Győrffy. 2016. "MiRpower: A Web-Tool to Validate Survival-Associated MiRNAs Utilizing Expression Data from 2178 Breast Cancer Patients." *Breast Cancer Research and Treatment* 160 (3): 439–46. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4013-7>.
- Lee, Choong Man, Il Yong Chung, Yangsoon Park, Keong Won Yun, Hwi Gyeong Jo, Hye Jin Park, Hee Jin Lee, et al. 2020. "The Impact of Androgen Receptor and Histone Deacetylase 1 Expression on the Prognosis of Ductal Carcinoma in Situ." *Journal of Breast Cancer* 23 (6): 610–21. <https://doi.org/10.4048/jbc.2020.23.e68>.
- LI, DONGMEI, LIMEI CHEN, XIAOFANG ZHANG, YANHUA WANG, CHUANSHENG HUANG, JIANGLONG LI, FEILONG HE, and WENXING HE. 2021. "MiR-125a-5p Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition and Restores Drug Sensitivity by Negatively Regulating TAFAZZIN Signaling in Breast Cancer." *Molecular Medicine Reports* 24 (5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12452>.
- Li, Hongling, Chunjing Bian, Lianming Liao, Jing Li, and Robert Chunhua Zhao. 2011. "MiR-17-5p Promotes Human Breast Cancer Cell Migration and Invasion through Suppression of HBP1." *Breast Cancer Research and Treatment* 126 (3): 565–75. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0954-4>.
- Li, Jie, Yuanhui Lai, Jieyi Ma, Yue Liu, Jiong Bi, Longjuan Zhang, Lianzhou Chen, et al. 2017. "MiR-17-5p Suppresses Cell Proliferation and Invasion by Targeting ETV1 in Triple-Negative Breast Cancer." *BMC Cancer* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/S12885-017-3674-X>.
- Li, Junxian, Luyang Liu, Ziwei Feng, Xin Wang, Yubei Huang, Hongji Dai, Liwen Zhang, et al. 2020. "Tumor Markers CA15-3, CA125, CEA and Breast Cancer Survival by Molecular Subtype: A Cohort Study." *Breast Cancer (Tokyo, Japan)* 27 (4): 621–30. <https://doi.org/10.1007/S12282-020-01058-3>.
- Li, Minghui, Yan Zhou, Tiansong Xia, Xin Zhou, Zebo Huang, Huo Zhang, Wei Zhu, Qiang Ding, and Shui Wang. 2018. "Circulating MicroRNAs from the MiR-106a-363 Cluster on Chromosome X as Novel Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 170 (2): 257–70. <https://doi.org/10.1007/S10549-018-4757-3>.

- Li, Xuan, Danian Dai, Bo Chen, Hailin Tang, Xiaoming Xie, and Weidong Wei. 2018. "Clinicopathological and Prognostic Significance of Cancer Antigen 15-3 and Carcinoembryonic Antigen in Breast Cancer: A Meta-Analysis Including 12,993 Patients." *Disease Markers* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9863092>.
- Liang, Rui, and Youjia Tang. 2020. "LINC00467 Knockdown Repressed Cell Proliferation but Stimulated Cell Apoptosis in Glioblastoma via MiR-339-3p/IP6K2 Axis." *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers* 28 (2): 169–80. <https://doi.org/10.3233/CBM-190939>.
- Liang, Zhongzeng, Qunwen Pan, Zhi Zhang, Chaosheng Huang, Zeming Yan, Yuanqi Zhang, and Jianwen Li. 2019. "MicroRNA-125a-5p Controls the Proliferation, Apoptosis, Migration and PTEN/MEK1/2/ERK1/2 Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Molecular Medicine Reports* 20 (5): 4507–14. <https://doi.org/10.3892/MMR.2019.10704>.
- Liao, Xing Hua, Yuan Xiang, Cheng Xi Yu, Jia Peng Li, Hui Li, Qi Nie, Peng Hu, Jun Zhou, and Tong Cun Zhang. 2017. "STAT3 Is Required for MiR-17-5p-Mediated Sensitization to Chemotherapy-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells." *Oncotarget* 8 (9): 15763–74. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15000>.
- Libson, Shai, and Marc Lippman. 2014. "A Review of Clinical Aspects of Breast Cancer." *International Review of Psychiatry*. Int Rev Psychiatry. <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.852971>.
- Ligibel, Jennifer A., and Howard D. Strickler. 2013. "Obesity and Its Impact on Breast Cancer: Tumor Incidence, Recurrence, Survival, and Possible Interventions." *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, no. 33 (May): 52–59. https://doi.org/10.14694/EDBOOK_AM.2013.33.52.
- Liu, Fang, and Xiao Di Wang. 2019. "MiR-150-5p Represses TP53 Tumor Suppressor Gene to Promote Proliferation of Colon Adenocarcinoma." *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-43231-5>.
- Liu, He, Yanlong Liu, Ping Sun, Kaiming Leng, Yi Xu, Liqi Mei, Peng Han, et al. 2020. "Colorectal Cancer-Derived Exosomal MiR-106b-3p Promotes Metastasis by down-

- Regulating DLC-1 Expression.” *Clinical Science (London, England : 1979)* 134 (4): 419–34. <https://doi.org/10.1042/CS20191087>.
- Liu, Min, Siying Zhou, Jinyan Wang, Qian Zhang, Sujin Yang, Jifeng Feng, Bin Xu, and Shanliang Zhong. 2019. “Identification of Genes Associated with Survival of Breast Cancer Patients.” *Breast Cancer* 26 (3): 317–25. <https://doi.org/10.1007/s12282-018-0926-9>.
- Lu, Jun, Ting Tan, Ling Zhu, Huiyue Dong, and Ronghua Xian. 2020. “Hypomethylation Causes MIR21 Overexpression in Tumors.” *Molecular Therapy - Oncolytics* 18 (September): 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.05.011>.
- Lu, Qingfu, Zhaoji Guo, and Haixin Qian. 2019. “Role of MicroRNA-150-5p/SRCIN1 Axis in the Progression of Breast Cancer.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 17 (3): 2221. <https://doi.org/10.3892/ETM.2019.7206>.
- Luca, Paola De, Guillermo N. Dalton, Georgina D. Scalise, Cristian P. Moiola, Juliana Porretti, Cintia Massillo, Edith Kordon, et al. 2016. “CtBP1 Associates Metabolic Syndrome and Breast Carcinogenesis Targeting Multiple MiRNAs.” *Oncotarget* 7 (14): 18798–811. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7711>.
- Lv, Shanmei, Yizhen Wang, Wenjie Xu, and Xuejun Dong. 2020. “Serum Exosomal Mir-17-5p as a Promising Biomarker Diagnostic Biomarker for Breast Cancer.” *Clinical Laboratory* 66 (9): 1823–34. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2020.200127>.
- Mahmoudian, Mojdeh, Ehsan Razmara, Bashdar Mahmud Hussen, Mandana Simiyari, Nazanin Lotfizadeh, Hoda Motaghed, Arefeh Khazraei Monfared, Maryam Montazeri, and Sadegh Babashah. 2021. “Identification of a Six-MicroRNA Signature as a Potential Diagnostic Biomarker in Breast Cancer Tissues.” *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 00: e24010. <https://doi.org/10.1002/JCLA.24010>.
- Mango, Victoria L., Hanaa Al-Khawari, D. David Dershaw, Mona H. Ashkanani, Brenda Pennisi, Pauline Turner, Cynthia Thornton, and Elizabeth A. Morris. 2019. “Initiating a National Mammographic Screening Program: The Kuwait Experience Training With a US Cancer Center.” *Journal of the American College of Radiology* 16 (2): 202–7. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2018.07.025>.

- Marcuello, María, Saray Duran-Sanchon, Lorena Moreno, Juan José Lozano, Luis Bujanda, Antoni Castells, and Meritxell Gironella. 2019. "Analysis of A 6-Mirna Signature in Serum from Colorectal Cancer Screening Participants as Non-Invasive Biomarkers for Advanced Adenoma and Colorectal Cancer Detection." *Cancers* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11101542>.
- Marmot, Michael, D. G. Altman, D. A. Cameron, J. A. Dewar, S. G. Thompson, and Maggie Wilcox. 2012. "The Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: An Independent Review." *The Lancet* 380 (9855): 1778–86. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61611-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61611-0).
- Masoudi-Khoram, Nastaran, Parviz Abdolmaleki, Nazanin Hosseinkhan, Alireza Nikoofar, Seyed Javad Mowla, Hamideh Monfared, and Gustavo Baldassarre. 2020. "Differential MiRNAs Expression Pattern of Irradiated Breast Cancer Cell Lines Is Correlated with Radiation Sensitivity." *Scientific Reports* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65680-z>.
- Massillo, Cintia, Guillermo Nicolás Dalton, Juliana Porretti, Georgina Daniela Scalise, Paula Lucía Lucia Farré, Flavia Piccioni, Florencia Secchiari, et al. 2019. "CTBP1/CYP19A1/Estradiol Axis Together with Adipose Tissue Impacts over Prostate Cancer Growth Associated to Metabolic Syndrome." *International Journal of Cancer* 144 (5): 1115–27. <https://doi.org/10.1002/ijc.31773>.
- Massillo, Cintia, Rocío Belén Duca, Ezequiel Lacunza, Guillermo Nicolás Dalton, Paula Lucía Farré, Nicolás Taha, Flavia Piccioni, Georgina Daniela Scalise, Kevin Gardner, and Adriana De Siervi. 2020. "Adipose Tissue from Metabolic Syndrome Mice Induces an Aberrant MiRNA Signature Highly Relevant in Prostate Cancer Development." *Molecular Oncology* 14 (11): 2868–83. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12788>.
- Matamala, Nerea, María Teresa Vargas, Ricardo González-Cámpora, Rebeca Miñambres, José Ignacio Arias, Primitiva Menéndez, Eduardo Andrés-León, et al. 2015. "Tumor MicroRNA Expression Profiling Identifies Circulating MicroRNAs for Early Breast Cancer Detection." *Clinical Chemistry* 61 (8): 1098–1106. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2015.238691>.

- Medina-Villaamil, V., S. Martínez-Breijo, P. Portela-Pereira, M. Quindós-Varela, I. Santamarina-Caínzos, L. M. Antón-Aparicio, and F. Gómez-Veiga. 2014. "Circulating MicroRNAs in Blood of Patients with Prostate Cancer." *Actas Urologicas Espanolas* 38 (10): 633–39. <https://doi.org/10.1016/J.ACUCRO.2014.02.008>.
- Melnikow, Joy, Joshua J. Fenton, Evelyn P. Whitlock, Diana L. Miglioretti, Meghan S. Weyrich, Jamie H. Thompson, and Kunal Shah. 2016. "Supplemental Screening for Breast Cancer in Women With Dense Breasts: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force." *Annals of Internal Medicine* 164 (4): 268–78. <https://doi.org/10.7326/M15-1789>.
- Minini, Mirko, Alice Senni, Xingkang He, Sara Proietti, Domenico Liguoro, Angela Catizone, Alessandro Giuliani, et al. 2021. "MiR-125a-5p Impairs the Metastatic Potential in Breast Cancer via IP 6 K1 Targeting." *Cancer Letters* 520 (November): 48–56. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.07.001>.
- Moi, Line, Tonje Braaten, Khalid Al-Shibli, Eiliv Lund, and Lill Tove Rasmussen Busund. 2019. "Differential Expression of the MiR-17-92 Cluster and MiR-17 Family in Breast Cancer According to Tumor Type; Results from the Norwegian Women and Cancer (NOWAC) Study." *Journal of Translational Medicine* 17 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2086-x>.
- Moshiri, Farzaneh, Alessandro Salvi, Laura Gramantieri, Angelo Sangiovanni, Paola Guerriero, Giuseppina De Petro, Cristian Bassi, et al. 2018. "Circulating MiR-106b-3p, MiR-101-3p and MiR-1246 as Diagnostic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma." *Oncotarget* 9 (20): 15350–64. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.24601>.
- Mouradian, M., K. D. Kikawa, E. D. Johnson, K. L. Beck, and R. S. Pardini. 2014. "Key Roles for GRB2-Associated-Binding Protein 1, Phosphatidylinositol-3-Kinase, Cyclooxygenase 2, Prostaglandin E2 and Transforming Growth Factor Alpha in Linoleic Acid-Induced Upregulation of Lung and Breast Cancer Cell Growth." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 90 (4): 105–15. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.12.001>.
- New, Jacob, Sufi Mary Thomas, New J, and Thomas SM. 2019. "Autophagy-Dependent

- Secretion: Mechanism, Factors Secreted, and Disease Implications.” *Autophagy* 15 (10): 1682–93. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596479>.
- Newie, Inga, Rolf Søkilde, Helena Persson, Thiago Jacomasso, Andrej Gorbatenko, Åke Borg, Michiel De Hoon, Stine F. Pedersen, and Carlos Rovira. 2016. “HER2-Encoded Mir-4728 Forms a Receptor-Independent Circuit with MiR-21-5p through the Non-Canonical Poly(A) Polymerase PAPD5.” *Scientific Reports* 6 (October). <https://doi.org/10.1038/srep35664>.
- Niell, Bethany L., Phoebe E. Freer, Robert Jared Weinfurtner, Elizabeth Kagan Arleo, and Jennifer S. Drukeinis. 2017. “Screening for Breast Cancer.” *Radiologic Clinics of North America* 55 (6): 1145–62. <https://doi.org/10.1016/J.RCL.2017.06.004>.
- Nurzadeh, Maryam, Mahsa Naemi, and Shahrzad Sheikh Hasani. 2021. “A Comprehensive Review on Oncogenic MiRNAs in Breast Cancer.” *Journal of Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s12041-021-01265-7>.
- Ortiz-Padilla, C., D. Gallego-Ortega, B. C. Browne, F. Hochgräfe, C. E. Caldon, R. J. Lyons, D. R. Croucher, et al. 2013. “Functional Characterization of Cancer-Associated Gab1 Mutations.” *Oncogene* 32 (21): 2696–2702. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.271>.
- Paiva, R. M., D. A.G. Zauli, B. S. Neto, and I. S. Brum. 2020. “Urinary MicroRNAs Expression in Prostate Cancer Diagnosis: A Systematic Review.” *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 22 (11): 2061–73. <https://doi.org/10.1007/S12094-020-02349-Z>.
- Paulson, K. Eric, Kimberly Rieger-Christ, Michael A. McDevitt, Charlotte Kuperwasser, Jiyoung Kim, Vincent E. Unanue, Xiaowei Zhang, et al. 2007. “Alterations of the HBP1 Transcriptional Repressor Are Associated with Invasive Breast Cancer.” *Cancer Research* 67 (13): 6136–45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0567>.
- Peng, Yong, and Carlo M. Croce. 2016. “The Role of MicroRNAs in Human Cancer.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1 (November 2015): 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.

- Pereira, Renato de Oliveira, Larissa Almondes da Luz, Diego Cipriano Chagas, Jefferson Rodrigues Amorim, Elmo de Jesus Nery-Júnior, Araci Castelo Branco Rodrigues Alves, Flávio Teixeira de Abreu-Neto, et al. 2020. "Evaluation of the Accuracy of Mammography, Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging in Suspect Breast Lesions" 75: 1–4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32725074/>.
- Pesapane, Filippo, Matteo Basilio Suter, Anna Rotili, Silvia Penco, Olga Nigro, Marta Cremonesi, Massimo Bellomi, Barbara Alicja Jereczek-Fossa, Graziella Pinotti, and Enrico Cassano. 2020. "Will Traditional Biopsy Be Substituted by Radiomics and Liquid Biopsy for Breast Cancer Diagnosis and Characterisation?" 37 (4): 1–18. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-020-01353-1>.
- Pierre, Christina C., Shawn M. Hercules, Clayton Yates, and Juliet M. Daniel. 2019. "Dancing from Bottoms up – Roles of the POZ-ZF Transcription Factor Kaiso in Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.10.005>.
- Ponpuak, Marisa, Michael A. Mandell, Tomonori Kimura, Santosh Chauhan, Cédric Cleyrat, Vojo Deretic, Ponpuak M, et al. 2015. "Secretory Autophagy." *Current Opinion in Cell Biology* 35 (Figure 1): 106–16. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.016>.
- Porretti, Juliana, Guillermo N. Dalton, Cintia Massillo, Georgina D. Scalise, Paula L. Farré, Randolph Elble, Esther N. Gerez, et al. 2018. "CLCA2 Epigenetic Regulation by CTBP1, HDACs, ZEB1, EP300 and MiR-196b-5p Impacts Prostate Cancer Cell Adhesion and EMT in Metabolic Syndrome Disease." *International Journal of Cancer* 143 (4): 897–906. <https://doi.org/10.1002/ijc.31379>.
- Poulet, Geoffroy, Joséphine Massias, and Valerie Taly. 2019. *Liquid Biopsy: General Concepts*. Vol. 63. Acta Cytol. <https://doi.org/10.1159/000499337>.
- Pourteimoor, Vida, Mahdi Paryan, and Samira Mohammadi-Yeganeh. 2018. "MicroRNA as a Systemic Intervention in the Specific Breast Cancer Subtypes with C-MYC Impacts; Introducing Subtype-Based Appraisal Tool." *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/jcp.26399>.
- Protani, Melinda, Michael Coory, and Jennifer H. Martin. 2010. "Effect of Obesity on

- Survival of Women with Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis." *Breast Cancer Research and Treatment* 123 (3): 627–35. <https://doi.org/10.1007/S10549-010-0990-0>.
- Qian, Biyun, Dionyssios Katsaros, Lingeng Lu, Mario Preti, Antonio Durando, Riccardo Arisio, Lina Mu, and Herbert Yu. 2009. "High MiR-21 Expression in Breast Cancer Associated with Poor Disease-Free Survival in Early Stage Disease and High TGF-B1." *Breast Cancer Research and Treatment* 117 (1): 131–40. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0219-7>.
- Qiao, Guanen, Chenguang Dai, Yang He, Junjie Shi, and Chunfang Xu. 2019. "Effects of MiR-106b-3p on Cell Proliferation and Epithelial-mesenchymal Transition, and Targeting of ZNRF3 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *International Journal of Molecular Medicine* 43 (4): 1817–29. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4107>.
- Rinaldis, Emanuele De, Patrycja Gazinska, Anca Mera, Zora Modrusan, Grazyna M Fedorowicz, Brian Burford, Cheryl Gillett, et al. 2013. "Integrated Genomic Analysis of Triple-Negative Breast Cancers Reveals Novel MicroRNAs Associated with Clinical and Molecular Phenotypes and Sheds Light on the Pathways They Control." *BMC Genomics* 14 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-643>.
- Rojas, Kristin, and Ashley Stuckey. 2016. "Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors." *Clinical Obstetrics and Gynecology* 59 (4): 651–72. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>.
- Ruan, Liwei, and Xiaojun Qian. 2019. "MIR-16-5p Inhibits Breast Cancer by Reducing AKT3 to Restrain NF-KB Pathway." *Bioscience Reports* 39 (8). <https://doi.org/10.1042/BSR20191611>.
- Sanli, Toran, Katja Linher-Melville, Theodoros Tsakiridis, and Gurmit Singh. 2012. "Sestrin2 Modulates AMPK Subunit Expression and Its Response to Ionizing Radiation in Breast Cancer Cells." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032035>.
- Schrijver, Willemijn A.M.E., Paul J. van Diest, and Cathy B. Moelans. 2017. "Unravelling Site-Specific Breast Cancer Metastasis: A MicroRNA Expression Profiling Study." *Oncotarget* 8 (2): 3111–23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13623>.

- Seely, Jean M., and T. Alhassan. 2018. "Screening for Breast Cancer in 2018—What Should We Be Doing Today?" *Current Oncology* 2018, Vol. 25, Pages 115-124 25 (s1): 115–24. <https://doi.org/10.3747/CO.25.3770>.
- She, Ji Kai, Dan Ni Fu, Dong Zhen, Guo Hua Gong, and Bin Zhang. 2020. "LINC01087 Is Highly Expressed in Breast Cancer and Regulates the Malignant Behavior of Cancer Cells Through MiR-335-5p/Rock1." *OncoTargets and Therapy* 13: 9771–83. <https://doi.org/10.2147/OTT.S255994>.
- Shimomura, Akihiko, Sho Shiino, Junpei Kawauchi, Satoko Takizawa, Hiromi Sakamoto, Juntaro Matsuzaki, Makiko Ono, et al. 2016. "Novel Combination of Serum MicroRNA for Detecting Breast Cancer in the Early Stage." *Cancer Science* 107 (3): 326–34. <https://doi.org/10.1111/cas.12880>.
- Shou, Jiafeng, Yucheng Lai, Jinming Xu, and Jian Huang. 2016. "Prognostic Value of FOXA1 in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 27 (June): 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2016.02.009>.
- Singhal, Sandeep K., Jung S. Byun, Samson Park, Tingfen Yan, Ryan Yancey, Ambar Caban, Sara Gil Hernandez, et al. 2021. "Kaiso (ZBTB33) Subcellular Partitioning Functionally Links LC3A/B, the Tumor Microenvironment, and Breast Cancer Survival." *Communications Biology* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01651-y>.
- Sorin, Vera, Yael Yagil, Ady Yosepovich, Anat Salmon, Michael Gotlieb, Osnat Halshtok Neiman, and Miri Sklair-Levy. 2018. "Contrast-Enhanced Spectral Mammography in Women With Intermediate Breast Cancer Risk and Dense Breasts." *AJR. American Journal of Roentgenology* 211 (5): W267–74. <https://doi.org/10.2214/AJR.17.19355>.
- Summerer, I., K. Unger, H. Braselmann, L. Schuettrumpf, C. Maihoefer, P. Baumeister, T. Kirchner, et al. 2015. "Circulating MicroRNAs as Prognostic Therapy Biomarkers in Head and Neck Cancer Patients." *British Journal of Cancer* 113 (1): 76–82. <https://doi.org/10.1038/BJC.2015.111>.
- Sun, Yongpan, Hong Mei, Chuan Xu, Hongjun Tang, and Wei Wei. 2018. "Circulating

- MicroRNA-339-5p and -21 in Plasma as an Early Detection Predictors of Lung Adenocarcinoma." *Pathology, Research and Practice* 214 (1): 119–25. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2017.10.011>.
- Swellam, Menha, Rasha F.K. Zahran, Hossam Abo El-Sadat Taha, Nashwa El-Khazragy, and Camelia Abdel-Malak. 2019. "Role of Some Circulating MiRNAs on Breast Cancer Diagnosis." *Archives of Physiology and Biochemistry* 125 (5): 456–64. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1482355>.
- Takahashi, Ryou U., Hiroaki Miyazaki, and Takahiro Ochiya. 2015. "The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer." *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers7020598>.
- Takaku, Motoki, Sara A. Grimm, and Paul A. Wade. 2015. "GATA3 in Breast Cancer: Tumor Suppressor or Oncogene?" *Gene Expression* 16 (4): 163. <https://doi.org/10.3727/105221615X14399878166113>.
- Tan, Weige, Gehao Liang, Xinhua Xie, Wenguo Jiang, Luyuan Tan, Andrew J. Sanders, Zihao Liu, et al. 2019. "Incorporating MicroRNA into Molecular Phenotypes of Circulating Tumor Cells Enhances the Prognostic Accuracy for Patients with Metastatic Breast Cancer." *The Oncologist* 24 (11). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0697>.
- Tay, Timothy Kwang Yong, and Puay Hoon Tan. 2021. "Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. Arch Pathol Lab Med. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0559-RA>.
- Tsang, Julia Y.S., and Gary M. Tse. 2020. "Molecular Classification of Breast Cancer." *Advances in Anatomic Pathology*. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>.
- Ujihira, T., K. Ikeda, T. Suzuki, R. Yamaga, W. Sato, K. Horie-Inoue, T. Shigekawa, et al. 2015. "MicroRNA-574-3p, Identified by MicroRNA Library-Based Functional Screening, Modulates Tamoxifen Response in Breast Cancer." *Scientific Reports* 5 (January). <https://doi.org/10.1038/SREP07641>.
- Urabe, Fumihiko, Juntaro Matsuzaki, Yusuke Yamamoto, Takahiro Kimura, Tomohiko Hara, Makiko Ichikawa, Satoko Takizawa, et al. 2019. "Large-Scale Circulating

- MicroRNA Profiling for the Liquid Biopsy of Prostate Cancer.” *Clinical Cancer Research* 25 (10): 3016–25. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2849>.
- Usuba, Wataru, Fumihiko Urabe, Yusuke Yamamoto, Juntaro Matsuzaki, Hideo Sasaki, Makiko Ichikawa, Satoko Takizawa, et al. 2019. “Circulating MiRNA Panels for Specific and Early Detection in Bladder Cancer.” *Cancer Science* 110 (1): 408–19. <https://doi.org/10.1111/cas.13856>.
- Valihrach, Lukas, Peter Androvic, and Mikael Kubista. 2020. *Circulating MiRNA Analysis for Cancer Diagnostics and Therapy*. Vol. 72. Mol Aspects Med. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31635843/>.
- Veeraraghavan, Jamunarani, Ying Tan, Xi Xi Cao, Jin Ah Kim, Xian Wang, Gary C. Chamness, Sourindra N. Maiti, et al. 2014. “Recurrent ESR1-CCDC170 Rearrangements in an Aggressive Subset of Oestrogen Receptor-Positive Breast Cancers.” *Nature Communications* 5 (August). <https://doi.org/10.1038/ncomms5577>.
- Vermeulen, Jeroen F., Robert A.H. van de Ven, Cigdem Ercan, Petra van der Groep, Elsken van der Wall, Peter Bult, Matthias Christgen, et al. 2012. “Nuclear Kaiso Expression Is Associated with High Grade and Triple-Negative Invasive Breast Cancer.” *PLoS ONE* 7 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037864>.
- Vuong, Darina, Peter T. Simpson, Benjamin Green, Margaret C. Cummings, and Sunil R. Lakhani. 2014. “Molecular Classification of Breast Cancer.” *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>.
- Wang, Guinian, Longzi Wang, Sijing Sun, Juan Wu, and Qinglu Wang. 2015. “Quantitative Measurement of Serum MicroRNA-21 Expression in Relation to Breast Cancer Metastasis in Chinese Females.” *Annals of Laboratory Medicine* 35 (2): 226–32. <https://doi.org/10.3343/ALM.2015.35.2.226>.
- Wang, Hui, Zheqiong Tan, Hui Hu, Hongzhou Liu, Tangwei Wu, Chao Zheng, Xiuling Wang, et al. 2019. “MicroRNA-21 Promotes Breast Cancer Proliferation and Metastasis by Targeting LZTFL1.” *BMC Cancer* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5951-3>.

- Wang, Li-Bing, Liang Feng, Jing He, Bo Liu, Jian-Guang Sun, Li-Bing Wang, Liang Feng, Jing He, Bo Liu, and Jian-Guang Sun. 2019. "MiR-125a-5p Inhibits the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells and Induces Apoptosis by Targeting GAB2." *Mathematical Biosciences and Engineering* 2019 6:6923 16 (6): 6923–33. <https://doi.org/10.3934/MBE.2019347>.
- Wang, Xiao, Jing Peng, Ziqiang Yang, Pei Jie Zhou, Na An, Lianzi Wei, Helen He Zhu, Jinsong Lu, Yu Xiang Fang, and Wei Qiang Gao. 2019. "Elevated Expression of Gab1 Promotes Breast Cancer Metastasis by Dissociating the PAR Complex." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 38 (1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1025-2>.
- Wang, Yaozong, Jianjun Li, Lei Dai, Jueru Zheng, Zhanbo Yi, and Liangliang Chen. 2018. "MiR-17-5p May Serve as a Novel Predictor for Breast Cancer Recurrence." *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers* 22 (4): 721–26. <https://doi.org/10.3233/CBM-181228>.
- Wang, Yizhen, Wenjie Xu, Yanan Wang, Xiuping Xu, Shanmei Lv, and Xuejun Dong. 2019. "MiR-17-5p Promotes Migration and Invasion in Breast Cancer Cells by Repressing Netrin 4." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 12 (5): 1649. /pmc/articles/PMC6947136/.
- Wang, Zheng, Tian En Li, Mo Chen, Jun Jie Pan, and Kun Wei Shen. 2020. "MiR-106b-5p Contributes to the Lung Metastasis of Breast Cancer via Targeting CNN1 and Regulating Rho/ROCK1 Pathway." *Aging* 12 (2): 1867–87. <https://doi.org/10.18632/aging.102719>.
- Wong, Kah Keng. 2021. "DNMT1: A Key Drug Target in Triple-Negative Breast Cancer." *Seminars in Cancer Biology* 72 (July): 198–213. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2020.05.010>.
- Wu, Zheng Sheng, Qiang Wu, Chao Qun Wang, Xiao Nan Wang, Yan Wang, Jing Jing Zhao, Shan Shan Mao, Gui Hong Zhang, Nong Zhang, and Xiao Chun Xu. 2010. "MiR-339-5p Inhibits Breast Cancer Cell Migration and Invasion in Vitro and May Be a Potential Biomarker for Breast Cancer Prognosis." *BMC Cancer* 10 (October). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-542>.

- Xing, Li, Xiaolong Tang, Kaikai Wu, Xiong Huang, Yi Yi, and Jinliang Huan. 2020. "LncRNA HAND2-AS1 Suppressed the Growth of Triple Negative Breast Cancer via Reducing Secretion of MSCs Derived Exosomal MiR-106a-5p." *Aging* 13 (1): 424–36. <https://doi.org/10.18632/AGING.202148>.
- Xue, Xinying, Chen Wang, Zhiqiang Xue, Jiaxin Wen, Jun Han, Xidong Ma, Xuelei Zang, et al. 2020. "Exosomal MiRNA Profiling before and after Surgery Revealed Potential Diagnostic and Prognostic Markers for Lung Adenocarcinoma." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 52 (3): 281–93. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMZ164>.
- Yamamoto, Yusuke, Shunsuke Kondo, Juntaro Matsuzaki, Minoru Esaki, Takuji Okusaka, Kazuaki Shimada, Yoshiki Murakami, et al. 2020. "Highly Sensitive Circulating MicroRNA Panel for Accurate Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Liver Disease." *Hepatology Communications* 4 (2): 284–97. <https://doi.org/10.1002/hep4.1451>.
- Yan, Liang, Meng Chao Yu, Guang Lei Gao, Hong Wei Liang, Xin Yan Zhou, Zhou Ting Zhu, Chen Yu Zhang, Ya Bing Wang, and Xi Chen. 2018. "MiR-125a-5p Functions as a Tumour Suppressor in Breast Cancer by Downregulating BAP1." *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (11): 8773–83. <https://doi.org/10.1002/JCB.27124>.
- Yokoi, Akira, Juntaro Matsuzaki, Yusuke Yamamoto, Yutaka Yoneoka, Kenta Takahashi, Hanako Shimizu, Takashi Uehara, et al. 2018. "Integrated Extracellular MicroRNA Profiling for Ovarian Cancer Screening." *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06434-4>.
- Yu, Xiaokang, Jinsheng Liang, Jiarui Jianhua Xu, Xingsong Li, Shan Xing, Huilan Li, Wanli Liu, et al. 2018. "Identification and Validation of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Early Detection Based on Large Scale Tissue-Derived Data" 21 (4): 363–70. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30607157/>.
- Zahoor, Muhammad, and Hesso Farhan. 2018. *Crosstalk of Autophagy and the Secretory Pathway and Its Role in Diseases. International Review of Cell and Molecular Biology*. 1st ed. Vol. 337. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bsircmb.2017.12.004>.
- Zeeshan, Muhammad, Basit Salam, Qazi Saad B Khalid, Shahbaz Alam, and Raza Sayani.

2018. "Diagnostic Accuracy of Digital Mammography in the Detection of Breast Cancer." *Cureus* 10 (4). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.2448>.
- Zhang, Daoyu, Xinglan An, Hao Yu, and Ziyi Li. 2021. "The Regulatory Effect of 6-TG on LncRNA-MiRNA-MRNA CeRNA Network in Triple-Negative Breast Cancer Cell Line." *Bioscience Reports* 41 (2). <https://doi.org/10.1042/BSR20203890>.
- Zhao, Ya Jing, Xingguo Song, Limin Niu, Youyong Tang, Xianrang Song, and Li Xie. 2019. "Circulating Exosomal MiR-150-5p and MiR-99b-5p as Diagnostic Biomarkers for Colorectal Cancer." *Frontiers in Oncology* 9 (OCT). <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01129>.
- Zheng, Ruohui, Lingxiao Pan, Jin Gao, Xigang Ye, Lun Chen, Xiaoshen Zhang, Wei Tang, and Wenbo Zheng. 2015. "Prognostic Value of MiR-106b Expression in Breast Cancer Patients." *Journal of Surgical Research* 195 (1): 158–65. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.12.035>.
- Zhou, Chang, Yenxia Lu, and Xuenong Li. 2015. "MiR-339-3p Inhibits Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer." *Oncology Letters* 10 (5): 2842–48. <https://doi.org/10.3892/OL.2015.3661>.
- Zhou, Lin, Yan Zhong, Fang-hui Hui Yang, Zi-bo Bo Li, Jiang Zhou, Xie-hong Hong Liu, Min Li, and Fang Hu. 2016. "Kaiso Represses the Expression of Glucocorticoid Receptor via a Methylation-Dependent Mechanism and Attenuates the Anti-Apoptotic Activity of Glucocorticoids in Breast Cancer Cells." *BMB Reports* 49 (3): 167–72. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.3.151>.
- Zhu, C, L Wang, L B Du, J Li, J Zhang, M Dai, and J F Shi. 2016. "The accuracy of mammography screening for breast cancer: a Meta-analysis." *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* 37 (9): 1296–1305. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.09.022>.
- Zou, Xuan, Tiansong Xia, Minghui Li, Tongshan Wang, Ping Liu, Xin Zhou, Zebo Huang, and Wei Zhu. 2021. "MicroRNA Profiling in Serum: Potential Signatures for Breast Cancer Diagnosis." *Cancer Biomarkers* 30 (1): 41–53. <https://doi.org/10.3233/CBM-201547>.