



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Efecto de miR-30c-5p sobre los niveles de la proteína MDM4 en líneas celulares de cáncer de mama”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Francisco Zamora Maturana

Director de Tesis: Mario Párraga San Román

Codirector de Tesis: Joan Villena García

Mayo 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Efecto de miR-30c-5p sobre los niveles de la proteína MDM4 en líneas celulares de cáncer de mama”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Francisco Zamora Maturana

Director de Tesis: Mario Párraga San Román

Codirector de Tesis: Joan Villena García

Mayo 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Efecto de miR-30c-5p sobre los niveles de la proteína MDM4
en líneas celulares de cáncer de mama”

Francisco Zamora Maturana

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del PhD. Mario Párraga San Román
en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones
Biomédicas (CIB) y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Pablo Muñoz
Presidente Comisión

Dr. Manuel Valenzuela
Profesor Informante

Dr. Nelson Osses
Profesor Informante

PhD. Mario Párraga San Román
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2023**

DEDICATORIA y AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer en primer lugar a mi madre, Fanny Maturana Peña, por todo el amor e incondicional apoyo durante toda mi vida. También agradecer a mi profesor guía, Mario Párraga, por su gran calidad como persona y profesional, y por toda la paciencia, ayuda y confianza que me entregó en la elaboración de esta tesis. Agradecer también a mi profesor co-guía Joan Villena García por mostrarse siempre dispuesto a ayudarme y corregirme, y a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Camila Escobar, Karina Pino y Gloria Pino por sus consejos y buena disposición.

Quiero mencionar también a otras personas muy importantes como Miguel Ramírez Vera quien ya no está con nosotros, pero fue un pilar fundamental durante todos estos años. A mi padre Eulogio Zamora Hernández por su apoyo y motivación, mi hermana canina Elisa y a todos mis amigos que me han acompañado en este proceso.

Finalmente agradecer a todos los equipos de trabajo de los que he sido parte durante estos años, especialmente a los servicios de biología molecular y citogenética del Hospital Gustavo Fricke; al equipo de reproducción asistida de la Clínica de la Mujer, y el equipo docente de la Universidad de Valparaíso, campus San Felipe.

ABREVIATURAS

$\Delta\Delta Ct$: Diferencia entre el ΔCt de la muestra en estudio y el ΔCt de la muestra control.

ΔCt : Diferencia entre el Ct de la amplificación del transcrito del gen en estudio y el Ct del transcrito del gen normalizador.

1q32.1: Brazo largo (q) del cromosoma 1, región 3, banda 2, sub-banda 1.

3' UTR: Región no traducida "Untranslated" ubicada hacia tres prima.

3p: Indica que el miRNA maduro proviene de la hebra del dúplex con sentido 3'.

5p: Indica que el miRNA maduro proviene de la hebra del dúplex con sentido 5'.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ATCC: Colección Americana de Cultivo Tipo ("American Type Culture Collection").

ATP: Adenosin trifosfato.

cDNA: ADN complementario.

Ct: Ciclo umbral (Threshold cycle)

DEPC: Dietil pirocarbonato.

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

E3: Enzima ligasa de ubiquitina.

ER-: Negativo para receptor de estrógeno.

GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

HER2-: Negativo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano.

IDT: Integrated DNA Technologies, Inc.

Kb: Kilobases.

kDa: Kilodalton.

LB 6édium: Medio de cultivo Luria Bertani.

MDM2: Doble minuto murino 2.

MDM4: Doble minuto murino 4.

MDM4-FL: Doble minuto murino 4 longitud completa ("Full Length").

MDM4-S: Doble minuto murino 4 corta ("short").

miRNA: Micro ácido ribonucleico.

miRISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA asociado a miRNA.

MRE: Elemento de respuesta a miRNA.

MUT: Mutado.

NC: Control Negativo

nm: Nanómetros.

nM: Nanomolar.

Nt: Nucleótidos.

P1 y P2: Promotor 1 y Promotor 2.

Pb: Pares de Bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PR-: Negativo para receptor de progesterona.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa.

RLU: Unidades de Luminiscencia Relativa

RNA: Ácido ribonucleico.

RT: Transcripción Reversa.

SBF: Suero Bovino Fetal.

MCS: Sitio de Clonación Múltiple.

TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA

WT: Silvestre ("Wild-type"), no mutada

Tabla de contenido

1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 Cáncer	12
2.2 microRNAs.	13
2.3 Rol de miR-30c-5p en el cáncer.	15
2.4 Rol de MDM4 en el cáncer.....	18
2.5 Regulación de MDM4 a través de miRNAs	20
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Modelo experimental	23
6.2 Cultivo Celular.....	23
6.2.1 Cultivo Celular para el Objetivo Específico 1.	23
6.2.2 Cultivo Celular para el Objetivo Específico 2.	24
6.2.3 Cultivo Celular para el Objetivo Específico 3.	24
6.3 Metodología para la comparación de los niveles de expresión de RNA de los genes MIR-30c-5p y MDM4 a través de RT-qPCR en líneas celulares de origen mamario de fenotipo normal y tumoral (objetivo específico 1).....	24
6.3.1 Extracción de RNA.	24
6.3.2 Retrotranscripción de RNA.	25
6.3.2.1 Retrotranscripción convencional para mRNA de MDM4.	25
6.3.2.2 Retrotranscripción "Stem Loop" para miR-30c-5p.	25
6.3.3 qPCR	26
6.3.3.1 qPCR MDM4 usando SYBR Green.....	26
6.3.3.2 qPCR miR-30c-5p usando sondas TaqMan.	27
6.3.3.3 Cálculo de la expresión relativa de miR-30c-5p y MDM4.	28

6.4 Metodología para la comprobación in vitro de la interacción funcional entre miR-30c-5p y el mRNA de MDM4, a través de un ensayo dual de luciferasa (objetivo específico 2).	29
6.4.1 Diseño y síntesis de un fragmento de la 3' UTR del mRNA de MDM4.	30
6.4.2 Ligación.	32
6.4.3 Transformación de bacterias competentes.	33
6.4.4 Extracción DNA plasmídico y Secuenciación.	34
6.4.5 Transfección de células HEK-293	34
6.4.6 Ensayo dual de luciferasa y cálculo de la Intensidad de Luminiscencia Relativa (RLU).	35
6.4.6.1 Ensayo dual de luciferasa	35
6.4.6.2 Cálculo de la intensidad de luminiscencia relativa (RLU)	36
6.5 Metodología para determinar el efecto que genera el aumento o disminución de la actividad funcional de miR-30c-5p en los niveles de expresión de la proteína MDM4 en una línea celular de origen mamario con fenotipo tumoral, a través de Western Blot. (objetivo específico 3).	36
6.5.1 Transfección células MCF-7.	36
6.5.2 Extracción y cuantificación de proteínas.	37
6.5.3 Western Blot	38
6.5.3.1 Análisis densitométrico del Western Blot	39
6.6 Análisis Estadístico.	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Comparación de los niveles de expresión de RNA de los genes MIR-30c-5p y MDM4 en líneas celulares de origen mamario de fenotipo normal y tumoral (objetivo específico 1).	41
7.1.1 Expresión relativa de miR-30c-5p en líneas celulares de origen mamario..	41
7.1.2 Expresión relativa del mRNA de MDM4 en líneas celulares de origen mamario.	42
7.2 Comprobación in vitro de la interacción funcional entre miR-30c-5p sobre la 3' UTR del mRNA de MDM4.	43

7.3 Efecto que genera el aumento o disminución de la actividad funcional de miR-30c-5p en los niveles de expresión de la proteína MDM4 en una línea celular de origen mamario con fenotipo tumoral.....	44
8. DISCUSIÓN.	47
9. CONCLUSIONES	51
10. BIBLIOGRAFÍA.....	52
11. ANEXOS	61

1. RESUMEN

El cáncer engloba a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células con capacidad de diseminarse a diferentes regiones del organismo. Dentro de los variados procesos moleculares que se ven alterados en estas patologías, se encuentra la regulación génica postranscripcional, en donde los microRNAs (miRNAs) son los principales exponentes. Estudios recientes han demostrado que la desregulación en la actividad funcional de los miRNAs juega un papel clave en la progresión del cáncer. Un ejemplo de esto es miR-30c-5p, un miRNA que es descrito en la literatura como supresor tumoral, cuyos niveles de expresión se encuentran disminuidos en diferentes tipos de tumores. Un análisis *in silico* logró predecir que miR-30c-5p posee como posible objetivo el mRNA de la oncoproteína MDM4, la cual juega un papel crítico en la degradación de supresores tumorales. Según estos antecedentes el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto regulador que ejerce miR-30c-5p sobre los niveles de expresión de la proteína MDM4 en una línea celular de cáncer de mama. En primer instancia, se compararon a través de RT-qPCR los niveles de expresión de RNA de los genes *MIR-30c-5p* y *MDM4* en líneas celulares de origen mamario, fenotipo cancerígeno y normal, no hallándose diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-30c-5p, sin embargo se evidenció que la línea celular de cáncer de mama MCF-7, fue la que presentó un mayor nivel de expresión del gen *MDM4*. También se logró verificar a través de un ensayo dual de luciferasa, la interacción funcional *in vitro* de miR-30c-5p con una región de la 3'UTR del mRNA de *MDM4* predicha. Finalmente se logró evidenciar a través de un ensayo de Western Blot, que los niveles proteicos de MDM4 aumentan en células MCF-7 al disminuir la actividad funcional de miR-30c-5p. Es por esto que a través de los resultados obtenidos en este estudio, se puede barajar a miR-30c-5p como un regulador de los niveles de MDM4 a nivel celular, abriendo puertas a futuras investigaciones que busquen complementar esta vía regulación postranscripcional.

Palabras claves: Cáncer, miRNAs, miR-30c-5p, MDM4, regulación postrancricional.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

El término cáncer engloba a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células con capacidad de diseminarse a diferentes regiones del organismo, invadiendo y destruyendo estructuras normales, pudiendo ser letal en la mayoría de los casos (1). Es así como el cáncer está considerado como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, generando alrededor de 10 millones de defunciones el año 2020 (2).

La biología molecular del cáncer comprende en primera instancia una acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células tumorales sobrevivir y proliferar. Las alteraciones más características involucran mutaciones puntuales, anomalías cromosómicas, hipermetilación del DNA, modificaciones postraduccionales, entre otras que influyen en el crecimiento celular, la apoptosis y la diferenciación, además de promover la angiogénesis e invasión en etapas posteriores (3).

Los principales genes que se ven alterados en el cáncer se clasifican como proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Los primeros favorecen el crecimiento celular normal, sin embargo, cuando se ven alterados promueven la tumorigénesis y se les denomina oncogenes; por el contrario los genes supresores son capaces de inhibir el crecimiento celular y favorecer la apoptosis, por tanto cuando existe pérdida de sus funciones, se favorece el descontrol del crecimiento y la muerte celular. Los representantes más ampliamente estudiados de estos genes como TP53, K-RAS, MYC codifican para una proteína que ejerce alguna de las funciones antes descritas (4,5). Además, con el avance vertiginoso de la ciencia, se ha evidenciado que genes que transcriben para RNAs no codificantes (no se traducen a proteínas) juegan un rol fundamental en el cáncer (6), siendo los microRNAs (miRNAs) los representantes más ampliamente estudiados.

2.2 microRNAs.

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de una longitud aproximada de 19 a 30 nucleótidos, los cuales actúan uniéndose a una secuencia diana complementaria de un RNA mensajero (mRNA), promoviendo así su degradación y/o bloqueando su traducción (7). Esta función de reguladores postranscripcionales juega un rol esencial en procesos celulares normales como la proliferación, diferenciación, movilidad y muerte celular, las cuales al verse alteradas pueden desencadenar en una transformación maligna de las células, y por tanto promover el cáncer (8).

La biogénesis canónica de los microRNAs (Figura 1) comienza con la transcripción a nivel genómico de regiones intragénicas o intergénicas, a cargo de la enzima RNA polimerasa II (9), siendo el resultado de este proceso un miRNA primario (pri-miRNA), el cual es procesado a nivel nuclear por un complejo de micro procesamiento dirigido por la endoribonucleasa Drosha (10). El procesamiento nuclear origina un pre-miRNA, el cual es exportado al citoplasma a través de exportina 5 (XPO5) (11). Luego en el citoplasma una ribonucleasa llamada Dicer escinde parte de su estructura formando un miRNA dúplex (11). Este último se asocia a un complejo proteico comandado por proteínas argonautas (AGO) llamado RISC (12). En esta etapa ocurre una selección de una de las cadenas del dúplex (3p o 5p) para que permanezca en el complejo, mientras la otra generalmente queda susceptible a la degradación (13). Finalmente el miRNA maduro 5p o 3p asociado a RISC (miRISC) se une al mRNA diana logrando degradarlo o bloqueando su traducción (14).

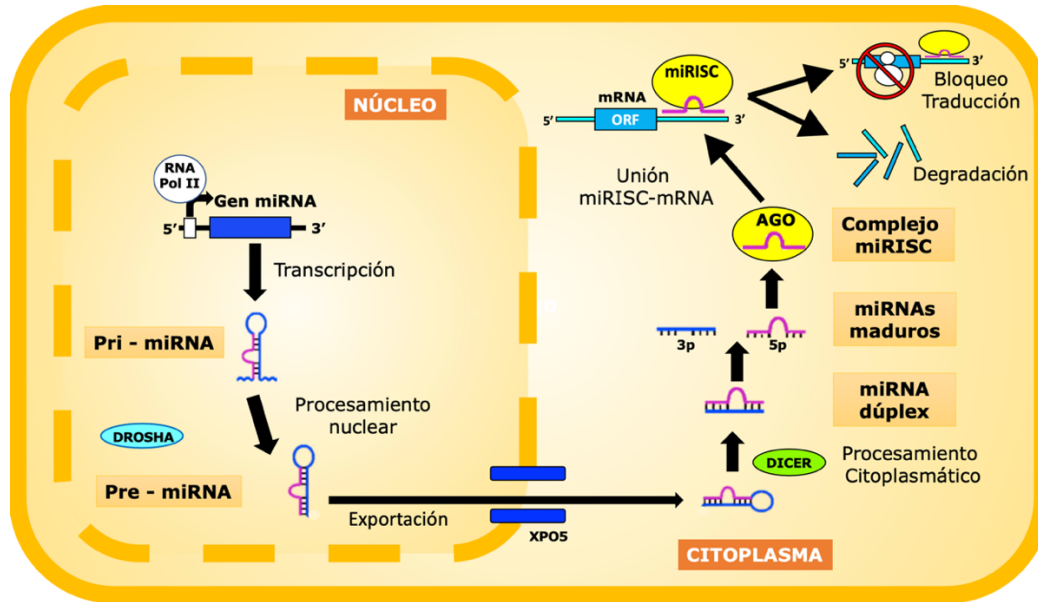


Figura 1. Esquema de la biogénesis de los miRNAs.

La unión canónica entre el mRNA y el miRNA (Figura 2) ocurre a través de complementariedad de bases, teniendo como requisito mínimo la unión exacta entre los nucleótidos de una región del mRNA denominada "Elemento de Reconocimiento de miRNAs" (MRE), la cual está ubicada generalmente en la región 3' UTR del mRNA, y una región del miRNA denominada región semilla, la cual corresponde a los nucleótidos del 2 al 8 en sentido 5' (12).

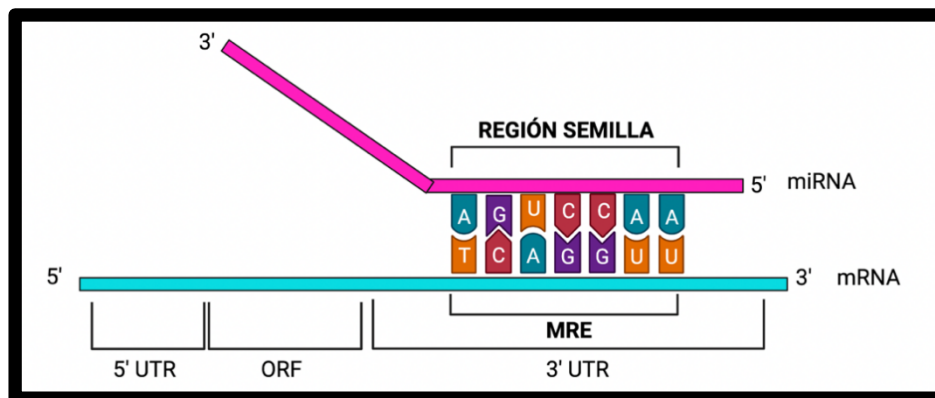


Figura 2. Representación de la unión canónica entre un miRNA y un mRNA. En rosado se esquematiza el miRNA y en celeste el mRNA diana.

La función silenciadora de los miRNAs trae como consecuencia que puedan actuar como oncogenes o supresores de tumores bajo ciertas circunstancias, dirigiéndose a mRNAs de proteínas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis y ciclo celular. Es por esto que actualmente son un objetivo de estudio relevante para ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico de cáncer (13), o como factores pronósticos e incluso blancos terapéuticos (14). La expresión alterada de los miRNAs puede deberse a diversos motivos; uno de ellos son las alteraciones genómicas como por ejemplo: deleciones, amplificaciones, mutaciones puntuales o la metilación aberrante de los genes que los producen; por otra parte la inestabilidad de sus factores de transcripción influyen en su expresión, o incluso el incorrecto funcionamiento de la maquinaria necesaria para su procesamiento, como por ejemplo, Drosha y DICER, los cuales al verse afectadas promueven la carcinogénesis (15,16).

2.3 Rol de miR-30c-5p en el cáncer.

La familia de microRNAs-30 es un grupo de miRNAs involucrados en un gran número de procesos tumorales (17). Está conformada por los miembros: miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d y miR-30e, cuyos representantes 5p a pesar de poseer regiones semilla idénticas, difieren en sus secuencias compensatorias hacia el extremo 3' (Figura 3); debido a que esta última característica juega un rol esencial en la estabilidad de la unión del miRNA con el mRNA (18), es que los miembros de la familia pueden compartir o diferir en sus dianas biológicas. Además los genes que transcriben para este grupo de miRNAs se encuentran localizados en diferentes regiones del genoma, permitiéndoles una expresión diferencial en diferentes tejidos y procesos biológicos (19). El único miembro de la familia que posee 2 copias en el genoma es miR-30c, cuyos genes se encuentran ubicados en regiones intrónicas del cromosoma 1 y el 6 (*MIR-30c* 1 y 2 respectivamente). La transcripción de estos genes da como resultado la expresión de 2 variantes 3p diferentes: miR-30c-1-3p y miR-30c-2-3p, mientras que la hebra 5p es idéntica para ambos genes (17).

Familia miR-30-5p		
miRNA	Secuencia 5'→ 3'	Ubicación del gen
miR-30a	UGUAAACA UUCCCGACUGGAAG	Cromosoma 6
miR-30b	UGUAAACA UCCUACACUCAGCU	Cromosoma 8
miR-30c	UGUAAACA UCCUACACUCUCAG	Cromosomas 1 y 6
miR-30d	UGUAAACA UCCCGACUGGAAG	Cromosoma 8
miR-30e	UGUAAACA UCCUUGACUGGAAG	Cromosoma: 1

Figura 3. Secuencias de nucleótidos de los miembros de la familia miR-30. Se destaca en amarillo cada una de las regiones semilla. En verde se destaca miR-30c-5p.

La literatura científica describe a miR-30c-5p como una molécula involucrada en diferentes procesos biológicos, como por ejemplo adipogénesis (20), remodelación cardíaca (21), respuesta inflamatoria (22), diferenciación celular (23), respuesta antioxidante, (24), entre otros, siendo los procesos tumorales los más descritos y estudiados (25). De forma específica se menciona a miR-30c-5p como un supresor tumoral que se encuentra disminuido en un gran número de cánceres como el de riñón (26), próstata (27,28), ovario (29), cavidad oral (30), vejiga (31), mieloma múltiple (32), meduloblastoma (33), glioma (34), osteosarcoma (35), entre otros.

En el cáncer de pulmón por ejemplo, Xia y Zhong et al. evidenciaron que miR-30c-5p presenta niveles de expresión disminuidos en muestras humanas de tumores malignos de células no pequeñas, en comparación con el tejido normal adyacente (36). Además evidenciaron que la sobreexpresión de este miRNA disminuye la capacidad de invasión de la línea celular tumoral A549 al tener como objetivo el mRNA de MTA1 (37). También J. McCann et al. describió que la disminución miR-30c-5p en células endoteliales favorece la angiogénesis en tumores pulmonares de ratones *in vivo* (38). Por su parte Yu-Shui Ma et al. demostró que el mRNA del oncogén TM4SF1 es una diana directa de miR-30c-5p, y por tanto su disminución promueve la proliferación de células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (39).

En el cáncer hepático S. Hu et al. demostró que este miRNA se encontraba disminuido en 4 líneas celulares tumorales en comparación de una línea no tumoral, además que aumentar los niveles de miR-30c-5p inhibe la proliferación y la invasión *in vitro* de células SNU449 de carcinoma hepatocelular (40). También Z. He et al. mostró resultados similares tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, además de plantear como vía el efecto silenciador que posee miR-30c-5p sobre el gen *RAB32* (41).

En el caso de los cánceres gastrointestinales, miR-30c-5p se ha mostrado disminuido en tumores sólidos humanos en comparación del tejido adyacente normal, tanto en cáncer de estómago como colorrectal, vinculando su efecto antitumoral al silenciamiento de dianas como *BCL9* y *ADAM19* (42–44). Es interesante comentar que también se han reportado polimorfismos en el pre-miRNA-30c, los cuales están asociados a una mayor predisposición para padecer cáncer gástrico (45).

La evidencia científica actual sobre el rol de miR-30c-5p en cáncer de mama es abundante, pero muestra algunas contradicciones; por ejemplo diversos autores han mostrado que este miRNA está disminuido en tumores mamarios humanos, y que estimular su sobreexpresión inhibe la proliferación e invasión de las células malignas (46–49), además de mejorar la susceptibilidad a la quimioterapia (50–53), apuntando como sus principales dianas a los mRNA de los genes *KRAS*, *TWF1*, *CTHRC1* y *YWHAZ* (25). Sin embargo J. Dobson et al., plantea a miR-30c-5p como un miRNA que promueve el fenotipo invasivo de las células de cáncer de mama metastásico cuando sus niveles están elevados, indicando a *NOV* como una de sus posibles dianas (54).

En su generalidad los artículos describen a miR-30c-5p como un supresor tumoral, no obstante, aún existe un gran vacío respecto a las vías de señalización en las que se ve involucrado y las dianas a las que se dirige, especialmente porque los miRNAs pueden regular múltiples vías y su expresión está sujeta a diferentes factores de transcripción. Es por esta razón que se hace indispensable investigar otras posibles rutas en donde miR-30c-5p se ve involucrado, y así evaluar de forma crítica los posibles beneficios de intervenir una vía de señalización particular con fines terapéuticos. Es por esto que se realizó un análisis *in silico* en 2 herramientas online de predicción de dianas para

microRNAs, como lo son miRBD (55) y TargetScan Human (56), en donde se logró observar que miR-30c-5p poseía una coincidencia del 100% en su región semilla con una secuencia MRE ubicada en la región 3'UTR del mRNA de MDM4 (figura 4), un proteína que ha sido ampliamente relacionada con procesos cancerígenos.

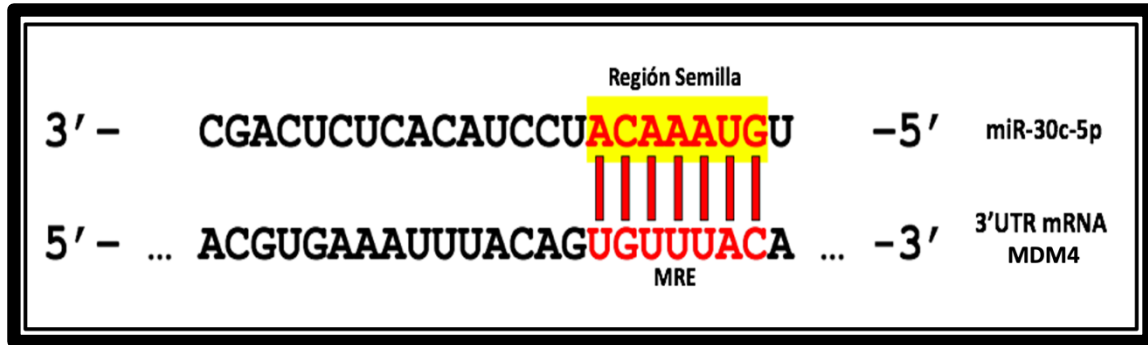


Figura 4. Esquema que muestra los resultados predichos del análisis *in silico* entre la unión de miR-30c-5p y el mRNA de MDM4. La hebra superior corresponde a la secuencia de miR-30c-5p.

2.4 Rol de MDM4 en el cáncer

La proteína “Mouse Double Minute 4” o MDM4 (anteriormente conocida como MDMX) es un regulador negativo de importantes supresores tumorales como por ejemplo P53, P21, P27 y P67 (57–60). Su ortólogo en humanos se denomina “Human Double Minute 4” (HDM4), sin embargo, por convención los artículos científicos siguen utilizando el genérico “MDM4” sin distinción de la especie con la finalidad de evitar confusiones (61,62). Se ha reportado que MDM4 se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de cánceres humanos (63), incluyendo mama (64–67), estómago (68), colorrectal (69), hepático (70), entre muchos otros.

El gen que codifica para esta proteína se encuentra ubicado en el cromosoma 1q32.1 y consta de 11 exones (61). Transcripcionalmente puede dar origen a 7 variantes de transcritos (71); dos de ellos contemplan la transcripción de todos sus exones, pero son originados desde regiones promotoras diferentes (P1 y P2) (72). El producto de la traducción de estos transcritos son las isoformas “Full Length” (FL) de 75 kDa y 76 kDa

respectivamente. Ambas poseen un efecto regulador de P53, debido a que presentan en su estructura un dominio de tipo RING finger capaz de impedir la degradación de la proteína MDM2 y promover así su actividad E3 ligasa contra la proteína P53, fomentando su degradación vía proteosoma (61) (Figura 5A). Sin embargo, la isoforma MDM4-FL de 75 kDa se considera como la forma que posee expresión constitutiva en diferentes tipos de cánceres, que a diferencia de la isoforma de 76 kDa posee activo un dominio estructural capaz de unirse directamente a P53, inhibiendo su actividad como factor de transcripción (Figura 5B); Los otros 5 transcritos son generados por procesos de empalme alternativo, y se evidencia su presencia en diferentes tipos de tejidos y líneas celulares, siendo la isoforma "Short" (S) la más estudiada. La isoforma MDM4-S surge por la omisión del exón 6 y posee un peso molecular aproximado de 27 kDa (73). Esta sigue conservando el dominio de unión a p53 y posee un mayor potencial para inhibir la capacidad transcripcional de éste (74), sin embargo los estudios recientes han revelado que es más susceptible a la degradación que la forma FL (75), por tanto su sobreexpresión no sugiere directamente un mayor riesgo cáncer (76,77), aunque se requiere de más estudios para revelar su verdadero potencial oncogénico. Es importante mencionar que todos los transcritos de MDM4 descritos hasta la fecha conservan su 3'UTR, y por tanto la MRE predicha para miR-30c-5p (Figura 4).

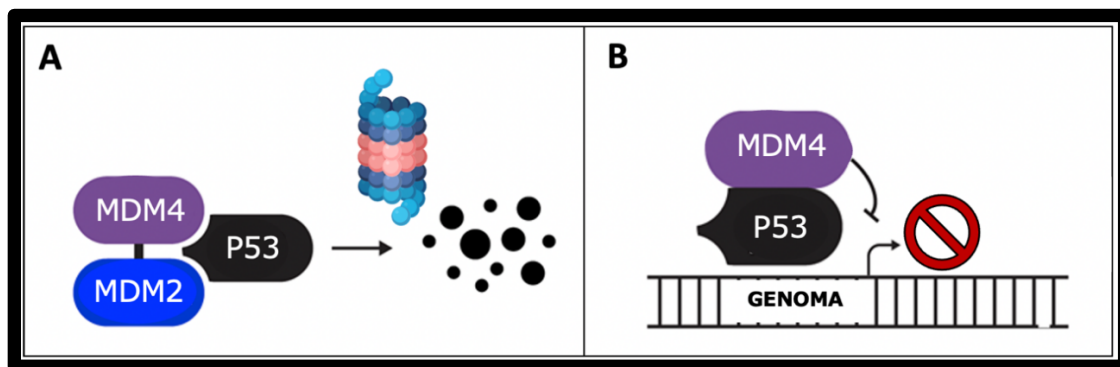


Figura 5. Representación esquemática de las funciones realizadas por la proteína MDM4. (A) Unión de MDM4 a la E3 ligasa MDM2 promueve la degradación de p53 vía proteosoma y (B) unión de MDM4 directamente a P53 inactiva su actividad transcripcional. Imagen modificada de S. Haupt et al., 2019 (61).

La función que posee *MDM4* como oncogén es de gran interés clínico, debido a que se ha encontrado un aumento del número de copias a nivel genómico en diferentes estudios realizados en tumores sólidos humanos (78,79). También se ha evidenciado que en presencia de un daño en el ADN, los niveles de MDM4 se reducen rápidamente en la célula a través de la vía ubiquitina-proteosoma, sin embargo, cuando se inhibe el proteosoma, los niveles de MDM4 aun así disminuyen (80). Esto sugiere que existe otra vía celular que permite reducir los niveles de la proteína de MDM4, siendo la regulación postranscripcional mediada por miRNAs una excelente candidata.

2.5 Regulación de MDM4 a través de miRNAs

Actualmente existe evidencia de que ciertos miRNAs tienen como diana directa el mRNA de MDM4 en diferentes procesos celulares (81,82), disminuyendo así los niveles de esta proteína cuando es requerido. Un ejemplo es miR-23b, que su sobreexpresión favorece la proliferación de condrocitos articulares después lesiones isquémicas vía MDM4-p53 (83). Sin embargo, es en el área de las patologías oncológicas donde la regulación postranscripcional de MDM4 ha mostrado mayor interés, principalmente porque la capacidad que tienen estas moléculas de RNA de regular negativamente a MDM4 les permite ser potenciales dianas terapéuticas. Algunos ejemplos son miR-34a en una gran gama de células tumorales *in vitro* (84) y células de pacientes con leucemia linfocítica crónica (85), miR-661, miR-766-3p y miR-1307-3p en cáncer de mama (86–88), miR-885-3p en células de carcinoma escamoso (89), miR-126 y miR-150-5p en células de cáncer cervicouterino (90,91), miR-370 en cáncer de colon (92), miR-33a en cáncer renal (93), let-7 en gliomas, miR-1205 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (94) y tanto miR-191-5p como miR-887-3p en la variante de células pequeñas (95) o también miR-10a en leucemia mieloide aguda (96).

Es relevante mencionar que gran parte de los miRNAs mencionados han sido reportados en la literatura en los últimos 5 años, lo que demuestra un gran interés de la comunidad científica en la regulación postranscripcional de MDM4 como una posible terapia en diferentes tipos de cáncer. No obstante en cáncer de mama los miRNAs reportados que regulan a MDM4 han mostrado resultados contradictorios, por ejemplo; la sobreexpresión de miR-661 a pesar de inhibir el crecimiento celular, favorece los procesos de invasión (86); miR-766-3p también ha mostrado favorecer la resistencia a

la quimioterapia (97,98) y los altos niveles de miR-1307-3p están relacionados con una tasa de supervivencia más baja en usuarios con cáncer de mama (99). Es por esto, que en la búsqueda de nuevos miRNAs que poseen a MDM4 como diana y basándose en el análisis *in silico* mostrado en este estudio (Figura 4), hace que miR-30c-5p sea un candidato prometedor; sin embargo, hasta la fecha no se han publicado estudios que validen la interacción *in vitro* de miR-30c-5p y el mRNA de *MDM4*, ni como este podría interferir en sus niveles proteicos en células de cáncer de mama.

Basándose en el nuevo campo investigativo plasmado en los antecedentes, nació la siguiente pregunta ¿Qué efecto regulador ejerce miR-30c-5p sobre los niveles de la proteína MDM4 en líneas celulares de cáncer de mama ? Esto con el fin de aportar información respecto a la actividad supresora de tumores de miR-30c-5p, evaluando como posible diana a MDM4.

3. HIPÓTESIS

Según los antecedentes aportados, se plantea la siguiente hipótesis como respuesta a la pregunta de investigación: miR30c-5p interactúa funcionalmente con el mRNA de MDM4 y disminuye sus niveles en líneas celulares de cáncer de mama.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto regulador que ejerce miR-30c-5p sobre los niveles de la proteína MDM4 en líneas celulares de cáncer de mama.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-** Comparar los niveles de expresión de RNA de los genes *MIR-30c-5p* y *MDM4* en líneas celulares de origen mamario con fenotipo normal y tumoral.
- 2-** Comprobar *in vitro* la interacción funcional entre miR-30c-5p y el mRNA de MDM4.
- 3-** Describir el efecto que genera el aumento o disminución de la actividad funcional de miR-30c-5p en los niveles de la proteína MDM4 en una línea celular de origen mamario con fenotipo tumoral.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Esta investigación posee un enfoque cuantitativo, de tipo descriptivo y experimental. Los ensayos fueron realizados en un modelo *in vitro*, utilizando células adherentes establecidas en cultivo celular, adquiridas desde American Type Culture Collection (ATCC) (100). La selección del tipo de línea celular fue por conveniencia (no probabilística). Los ensayos realizados en cada objetivo específico consideraron un mínimo en 3 réplicas biológicas para cada determinación, utilizando además 3 repeticiones técnicas para cada una de ellas.

6.2 Cultivo Celular

Todas las células utilizadas en el estudio fueron manejadas bajo condiciones de esterilidad en una sala de cultivo equipada con una campana de flujo laminar (Haier Biomedical, China), una incubadora de gases (Mettler GmbH, Alemania) y un microscopio invertido de campo claro (Carl Zeiss, China). El medio de cultivo para la mantención de las células fue Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alto en glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal descomplementado (SBF) (Sigma, Alemania) y 1% Penicilina Estreptomicina 100x (Corning, Estados Unidos). Las condiciones de incubación fueron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.2.1 Cultivo Celular para el Objetivo Específico 1.

Se cultivaron las siguientes líneas de origen mamario en placas de 100 mm:

- MCF-10A (Código ATCC: CRL-10317) (101): Línea celular epitelial no cancerígena, aislada de una usuaria con enfermedad fibroquística.
- MCF-7 (Código ATCC: HTB-22) (102): Línea celular derivada de una metástasis pleural de un adenocarcinoma de mama subtipo luminal, p53 WT, con patrón inmunohistoquímico HER2+, ER+, PR+.
- MDA-MB-231 (Código ATCC: HTB-26) (103): Línea celular derivada de una metástasis pleural de un adenocarcinoma de mama subtipo basal, p53 mutado,

patrón inmunohistoquímico triple negativo (HER2-, ER-, PR-) (37).

6.2.2 Cultivo Celular para el Objetivo Específico 2.

Se cultivó la siguiente línea celular en placas de 96 pocillos:

- HEK-293 (Código ATCC: CRL-1573) (104): Línea celular epitelial aislada de un riñón de embrión humano. La elección de esta línea celular fue debido a que es recomendada para ensayos de luciferasa, por su alta eficiencia de transfección y la capacidad de traducir fielmente proteínas recombinantes (105,106).

6.2.3 Cultivo Celular para el Objetivo Específico 3.

Se cultivaron líneas celulares MCF-7 (Código ATCC: HTB-22) en placas de 6 pocillos. La elección de esta línea celular fue debido a que ha reportado una amplificación del gen *MDM4* a nivel genómico (107), lo cual también se ve reflejado en un aumento de los sus niveles de expresión. Además esta línea celular es mencionada como control positivo para el anticuerpo dirigido a MDM4 usado en este estudio.

6.3 Metodología para la comparación de los niveles de expresión de RNA de los genes MIR-30c-5p y MDM4 a través de RT-qPCR en líneas celulares de origen mamario de fenotipo normal y tumoral (objetivo específico 1).

6.3.1 Extracción de RNA.

Se extrajo el RNA total de las células mencionadas en el apartado 6.2.1, cuando estas llegaban al 80% de confluencia. Para esto se utilizó un método de extracción orgánico, basado en el compuesto químico TRIzol® (Invitrogen, Estados Unidos), según el protocolo especificado por el fabricante. El método se resume en una lisis celular con una solución fenólica de tiocianato de guanidinio y una serie de centrifugaciones a baja temperatura (4°C) con solventes orgánicos, que logran un sedimento relativamente puro de RNA, el cual es resuspendido finalmente en agua tratada con el inhibidor de RNasas DEPC.

Una vez obtenido el RNA se cuantificó a través de fluorimetría, utilizando el kit QuantiFluor RNA System™ (Promega, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante,

y se verificó su integridad a través de una electroforesis en gel de agarosa 1% desnaturizante (hipoclorito de sodio 1%) en buffer TAE 0,5X con bromuro de etidio; con la intención de corroborar que su calidad fuera la óptima para los estudios posteriores.

6.3.2 Retrotranscripción de RNA.

La retrotranscripción (RT) es una técnica utilizada para crear DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA, utilizando la actividad enzimática de una transcriptasa reversa (108). Debido a las diferentes características de los RNAs generados por los genes en estudio: mRNA para *MDM4* y miRNA para *MIR-30c-5p*, es que se utilizaron dos tecnologías diferentes para generar el cDNA.

6.3.2.1 Retrotranscripción convencional para mRNA de MDM4.

Debido a que los cebadores generados para detectar el mRNA de MDM4 flanquean zonas comunes con el DNA genómico, se procedió en primera instancia a eliminar las trazas de DNA presente en el RNA total extraído con un tratamiento de DNAsa, utilizando el kit RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, Estados Unidos), según el protocolo del fabricante. Posteriormente se purificó el RNA tratado con el kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, Estados Unidos) con la intención de eliminar las trazas de sales. Finalmente se sintetizó el cDNA utilizando 1 µg del RNA total purificado y el kit iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-rad, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador convencional modelo T100 de la misma marca.

6.3.2.2 Retrotranscripción "Stem Loop" para miR-30c-5p.

Los métodos de RT-qPCR convencionales utilizan cebadores de aproximadamente 20 nucleótidos (nt), por lo tanto, requieren una plantilla que tenga al menos dos veces la longitud de sus cebadores (~40 nt). Es por esta razón que miR-30c-5p al tener solo 22 nucleótidos es muy pequeño y requiere utilizar el método de "Stem Loop" (109).

El método "Stem Loop" consiste en la utilización de cebadores que poseen dos regiones: una específica que se une de forma complementaria a los 6 últimos nucleótidos del miRNA y una región constante en forma de horquilla que ayuda a extender su longitud. El resultado de la RT es un cDNA de aproximadamente 60 nucleótidos que permite ser amplificado posteriormente por qPCR convencional.

En este estudio se utilizó el kit MultiScribe™ (Applied Biosystem, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante, utilizando cebadores "Stem Loop" específicos para la retrotranscripción de miR-30c-5p del kit TaqMan™ Advanced miRNA Assay de la misma marca. La RT se llevó a cabo en un termociclador convencional modelo T100 (Bio-rad, Estados Unidos), utilizando 20 ng de RNA como plantilla.

6.3.3 qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es una técnica enzimática que permite amplificar segmentos de DNA y detectarlos en cada ciclo de la reacción a través de la emisión de fluorescencia. En este estudio se utilizaron 2 diferentes tecnologías para detectar y amplificar los cDNA obtenidos del paso de retrotranscripción anterior.

6.3.3.1 qPCR MDM4 usando SYBR Green.

Syber Green es un fluorocromo que se intercala selectivamente en el DNA de doble hebra, por tanto entre más DNA se amplifique mayor será la fluorescencia emitida en cada ciclo de reacción. En este estudio se utilizó el kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. El equipo utilizado para realizar la técnica fue el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de la misma marca. Los cebadores utilizados para MDM4 y los genes normalizadores se detallan en la tabla 1 y fueron sintetizados por la corporación "Integrated DNA Technologies" (IDT) (Estados Unidos).

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'
MDM4-F	TGGAAGGACGGGCCATCT
MDM4-R	TGCTATAAAAACCTTAATAACCAGCTGAA
GAPDH-F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GAPDH-R	GAAGATGGTGATGGGATTTC
RPS13-F	CCCAGTCGGCTTTACCCTATC
RPS13-R	TCTGACGACGTGAAGGAGCA

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para determinar los niveles de expresión de RNA del gen *MDM4*. En amarillo se destacan los cebadores para amplificar el cDNA del gen en estudio y en celeste los cebadores para los genes normalizadores.

6.3.3.2 qPCR miR-30c-5p usando sondas TaqMan.

Debido a que la secuencia de miR-30c-5p presenta similitud con varios otros miRNAs, por ejemplo los miembros de su misma familia (Figura 3), es que se decidió utilizar la tecnología Taqman gracias a su mayor especificidad. Esta consiste en el uso de una secuencia de ADN asociada a un reportero, denominada sonda, que es específica para el cDNA obtenido del proceso de RT. La sonda está asociada, en este caso, a un fluoróforo emisor en su extremo 5' y un quencher en su extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, el emisor y quencher están tan próximos que este último absorbe la fluorescencia del fluoróforo; sin embargo durante la PCR, la polimerasa hidroliza la sonda, separando el emisor y al quencher, permitiendo así la señal fluorescente (110). En este estudio se utilizó el kit de qPCR SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Bio-rad, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. El equipo utilizado para realizar la técnica fue el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de la misma marca. Las sondas utilizadas fueron las del kit TaqMan™ Advanced miRNA Assay (Applied Biosystem, Estados Unidos), tanto para miR-30c-5p y su normalizador (U6).

6.3.3.3 Cálculo de la expresión relativa de miR-30c-5p y MDM4.

Con el fin de poder determinar los niveles de expresión de los genes *MIR-30c-5p* y *MDM4*, se procedió a realizar una cuantificación relativa de ellos. Esta consiste en normalizar la expresión del gen en estudio con la expresión de un gen control (normalizador). Un gen normalizador es un gen que presenta expresión constitutiva en las células y presenta variaciones mínimas entre las líneas celulares utilizadas. Los genes normalizadores utilizados en este estudio fueron: U6 para la expresión de miR-30c-5p y GAPDH junto a RPS13 para la expresión de MDM4.

El cálculo de la expresión relativa se realizó a través del método “ $\Delta\Delta Ct$ ” descrito por Livak & Schmittgen (111), el cual consiste en la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

- R= Expresión relativa
- ΔCt = Diferencia (resta) entre el Ct de la amplificación del transcrito del gen en estudio - Ct de la amplificación del transcrito del gen o de los genes normalizadores.
- $\Delta\Delta Ct$ = Diferencia (resta) entre el ΔCt de la muestra en estudio (una de las 2 líneas celulares de cáncer de mama) y el ΔCt de la muestra control (línea celular no cancerígena).

Una vez obtenidos los datos de R para cada línea celular, se procedió a realizar el análisis estadístico detallado en el apartado 6.5 de la metodología.

6.4 Metodología para la comprobación *in vitro* de la interacción funcional entre miR-30c-5p y el mRNA de MDM4, a través de un ensayo dual de luciferasa (objetivo específico 2).

Un ensayo dual de luciferasa para miRNAs es una prueba que permite determinar la factibilidad *in vitro* de la unión entre un miRNA y una región del mRNA de un gen en estudio. Para esto se utiliza un plásmido que posee 2 genes que codifican para proteínas luciferasas. El primero es el gen de luciferasa de luciérnaga, al cual se le inserta al final de su región 3', una secuencia predicha como objetivo del miRNA en estudio. Por tanto, si la unión *in vitro* es verídica, esta proteína verá sus niveles disminuidos en presencia del miRNA; el segundo gen codifica para una luciferasa de renilla, cuya expresión no está condicionada, y por tanto sirve como control de normalización. Los cambios en los niveles de proteína luciferasa se evidencian a través de una reacción enzimática cuyo subproducto es una señal luminiscente que puede ser medida por un equipo llamado luminómetro.

En este estudio se utilizó el plásmido pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression (Promega, Estados Unidos) como vector reportero (imagen 6); el cual se clonó, purificó, y finalmente transfectó en células HEK-293.

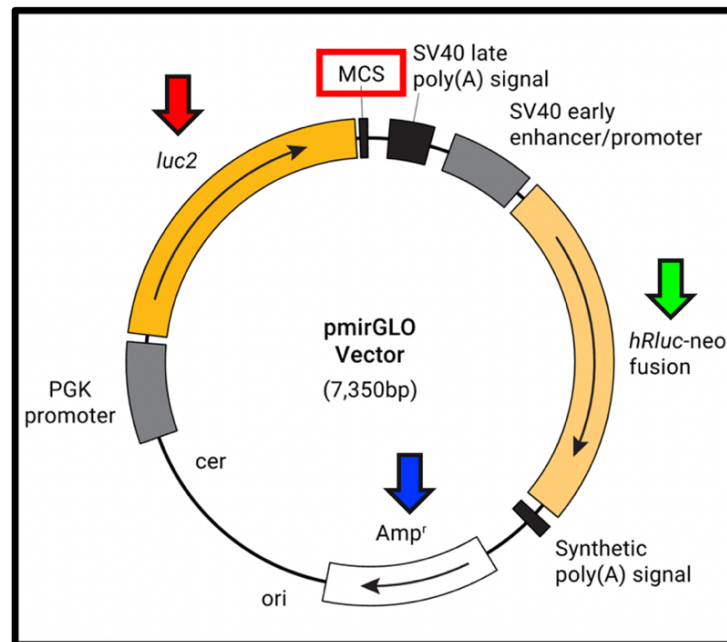


Figura 6. Representación esquemática del vector pmirGLO Dual-Luciferase. La flecha roja indica el gen que codifica para luciferasa de Luciérnaga. La flecha Verde indica el gen que codifica para luciferasa de Renilla. La flecha azul indica un gen de resistencia a la ampicilina. El cuadrado rojo indica el sitio de clonación múltiple (MCS) en donde se insertaron los oligonucleótidos diseñados (imagen 7). Imagen obtenida desde la página web de Promega Corporation (112).

6.4.1 Diseño y síntesis de un fragmento de la 3' UTR del mRNA de MDM4.

Debido al gran tamaño que posee la 3' UTR del mRNA de MDM4 (aproximadamente 9 kb), es que existen limitaciones técnicas para su síntesis por PCR convencional y posterior clonación en un vector reportero de luciferasa. Por esta razón se decidió diseñar un oligonucleótido bicatenario que contenía solo 26 pares de bases idénticas a la región de la 3' UTR del mRNA de MDM4 wild-type (WT) predicha para la unión de miR-30c-5p

(Figura 7A). Cabe destacar que este oligonucleótido WT, no posee complementariedad con ninguna región semilla de algún otro miRNA descrito y además es común para todas las variantes de transcritos del gen MDM4.

Como control de especificidad se diseñó adicionalmente un oligonucleótido cuya región MRE se encontraba mutada (MUT) (Figura 7B), por tanto dicha secuencia no debería afectar en la expresión de la luciferasa de luciérnaga. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la corporación "Integrated DNA Technologies" (IDT) (Estados Unidos).

Los oligonucleótidos diseñados contaban también en sus extremos con algunos nucleótidos complementarios a los extremos cohesivos del vector pmirGLO linearizado por las enzimas de restricción Sac1 y Sal1.

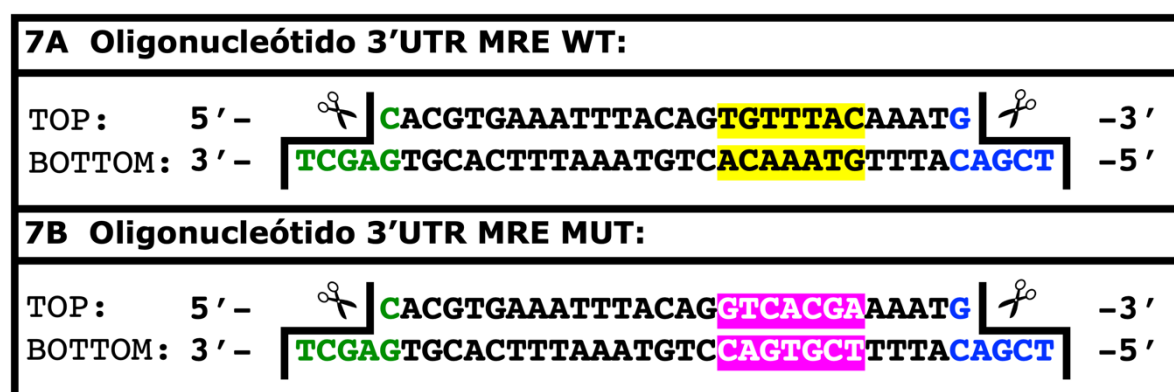


Figura 7. Esquema de los oligonucleótidos diseñados para la evaluación *in vitro* de la unión de miR-30c-5p sobre la 3' UTR del mRNA de MDM4. Los nucleótidos negros corresponden a una región idéntica de la 3' UTR del mRNA de MDM4. Los nucleótidos verdes corresponden a una región complementaria a los extremos cohesivos formados por Sac1 en el plásmido pmirGLO, mientras que los azules corresponden a una región complementaria a los extremos cohesivos formados por Sal1. (A) En amarillo se destaca la MRE WT y en rosa la MRE Mutada (MUT).

6.4.2 Ligación.

Esta técnica permite unir 2 secuencias de DNA a través de la acción de una enzima ligasa, la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre grupos fosfatos ubicados en los extremos 5' y grupos hidroxilos de los extremos 3' en presencia de ATP (113).

En este estudio para ligar los oligonucleótidos diseñados al vector reportero, se utilizó la enzima T4 ligasa (New England Biolabs, Reino Unido) según las indicaciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes generados WT y MUT, se esquematizan en la figura 8A y 8B respectivamente.

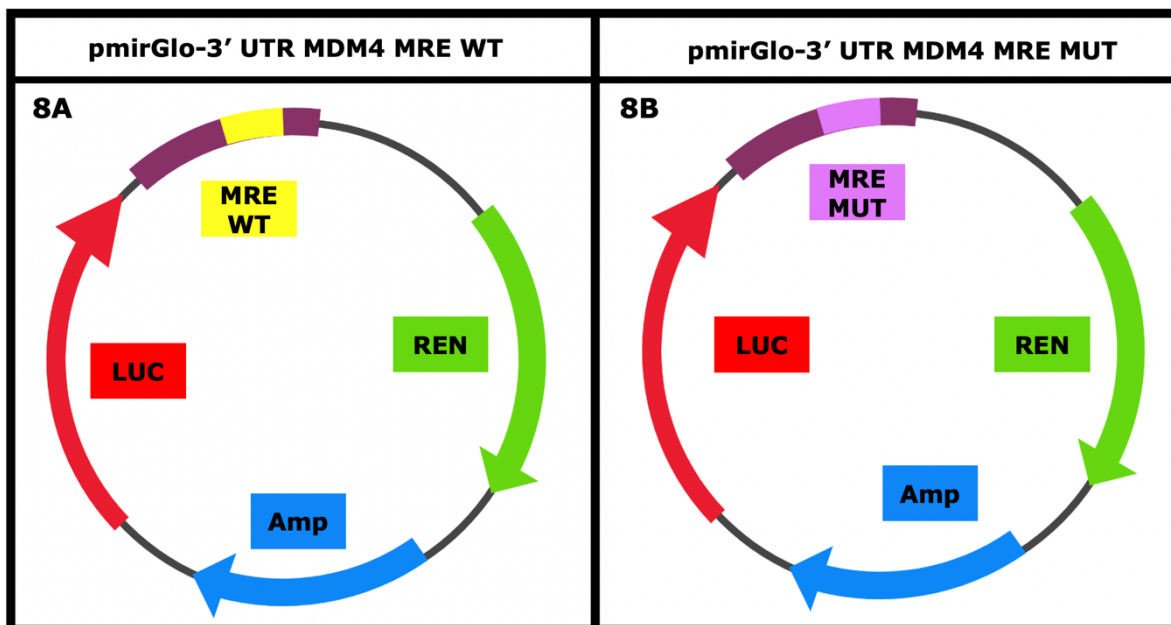


Figura 8. Representación esquemática de los plásmidos recombinantes elaborados. La flecha roja indica el gen que codifica para luciferasa de Luciérnaga. La flecha verde indica el gen que codifica para luciferasa de Renilla. La flecha azul indica un gen de resistencia a la ampicilina. La región morada corresponde a los oligonucleótidos diseñados (Figura 7). (A) Se representa en amarillo la región MRE “wild type” de MDM4 predicha para miR-30c-5p. (B) Se representa en rosado región MRE mutada.

6.4.3 Transformación de bacterias competentes.

Con la finalidad de clonar los plásmidos recombinantes creados en el paso anterior, es que se utilizaron bacterias competentes *Escherichia coli* XL1-Blue. Estas fueron transformadas a través de un método químico basado en CaCl_2 y choque térmico; lo que permite incrementar la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias para incorporar así el plásmido. Posteriormente las bacterias sometidas al proceso de transformación se hicieron crecer en placas petri de 100 mm con medio Luria-Bertani (LB) solido a 37°C durante toda la noche. Debido a que el plásmido pmirGLO posee en su secuencia un gen que confiere resistencia a la ampicilina, es que el medio de cultivo solido fue previamente suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, con la intención de favorecer solo el crecimiento de las bacterias que si incorporaron los vectores.

Al presenciar colonias de bacterias, se procedió a tomar un inóculo individual de ocho colonias transformadas con el vector MDM4-WT y 8 colonias transformadas con el vector MDM4-MUT. Los inóculos fueron depositados por separado en tubos de crecimiento bacteriano de 5 mL, que contenían medio líquido LB con ampicilina, y se dejaron creciendo toda la noche en agitación a 37°C.

Tras el crecimiento en medio líquido se comprobó la incorporación de los vectores a través de PCR convencional, utilizando el kit asociado a la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante. Los cebadores utilizados se detallan en la tabla 2 y dan como resultado un producto de amplificación de aproximadamente 200 pb. El resultado de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 0,5X teñido con bromuro de etidio; se obtuvieron más de 5 colonias correctamente transformadas por cada uno de los plásmidos recombinantes utilizados (anexo 1).

Finalmente se seleccionó un crecimiento líquido de una colonia exitosamente transformada para cada uno de los vectores utilizados y se maximizó su crecimiento en 15 mL de medio LB en matraces el Erlenmeyer, durante toda la noche a 37°C en agitación.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'
PCR_pmirGLO.Luc2 - F	TTACAACCGCCAAGAAG
Bottom 3' UTR MDM4 MRE WT- R	TCGACATTTGTAAACACTGTAAATTTACGTGAGCT
Bottom 3' UTR MDM4 MRE MUT- R	TCGACATTTTCGTGACCTGTAAATTTACGTGAGCT

Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para comprobar por PCR la incorporación de los vectores recombinantes (imagen 8) a las bacterias competentes. (F) Forward. (R) Reverse.

6.4.4 Extracción DNA plasmídico y Secuenciación.

Con la intención de extraer los vectores clonados de las bacterias competentes crecidas en medio líquido, se utilizó el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Estados Unidos). Este kit cuenta con la capacidad adicional de eliminar las endotoxinas producidas por las bacterias, otorgando un DNA plasmídico apropiado para la transfección de células eucariontes.

Una vez obtenido el DNA plasmídico purificado se cuantificó a través de fluorimetría, utilizando el kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. Finalmente las construcciones realizadas se analizaron por secuenciación (NGS), logrando corroborar su correcta clonación.

6.4.5 Transfección de células HEK-293

La transfección es una técnica de laboratorio que permite la introducción de ácidos nucleicos exógenos a células de cultivo celular. El kit utilizado en este estudio corresponde a FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. Este kit se basa en la utilización de lípidos cargados positivamente, los cuales forman complejos con ácidos nucleicos (cargados negativamente) para facilitar su entrada a la célula.

Las células HEK-293 fueron transfectadas con los tratamientos detallados en la tabla 3, cuando estas alcanzaban el 70% de confluencia. La cantidad de vector utilizada para cada uno de los tratamientos fue de 100 ng por pocillo. Los tratamientos 2, 4 y 6 se co-transfectaron además con una molécula que imita la función de miR-30c-5p llamada miR-30c-5p mímico, la cual corresponde a un RNA de doble hebra que simula un miRNA dúplex endógeno, pero que además está modificado químicamente para favorecer en este caso solo la formación del complejo miRISC con la hebra 5p. La molécula mímico utilizada en este estudio fue de la línea mirVana™ (Invitrogen, Estados Unidos), la cual fue transfectada a una concentración de 2 nM por pocillo.

Tratamiento	Moléculas Transfectadas
1	Vector pmirGLO sin 3' UTR de MDM4 insertada
2	Vector pmirGLO sin 3' UTR de MDM4 insertada + miR-30c-5p mímico
3	Vector pmirGLO-3' UTR MDM4 MRE WT
4	Vector pmirGLO-3' UTR MDM4 MRE WT + miR-30c-5p mímico
5	Vector pmirGLO-3' UTR MDM4 MRE MUT
6	Vector pmirGLO-3' UTR MDM4 MRE MUT + miR-30c-5p mímico

Tabla 3. Tratamientos de transfección utilizados para la realización del ensayo dual de luciferasa.

6.4.6 Ensayo dual de luciferasa y cálculo de la Intensidad de Luminiscencia Relativa.

6.4.6.1 Ensayo dual de luciferasa

Una vez transcurridas 48 horas postransfección, se midió la actividad enzimática de luciérnaga a través del kit Dual-GLO® Luciferase Assay System (Promega, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. El kit consiste en primer lugar en una lisis celular, acompañada de la exposición de la luciferasa de luciérnaga a su sustrato. Luego de 10 minutos se procede a medir la luminiscencia. Posteriormente se añade un reactivo que detiene la actividad enzimática de la luciferasa de luciérnaga y además sirve como sustrato para la luciferasa de renilla. Se incubó 10 minutos y luego se mide la luminiscencia de esta última.

Las mediciones se realizaron en una placa blanca de 96 pocillos, con la intención de minimizar el escape de luz, en la función luminómetro del lector de placas Synergy HT (Biotek, Estados Unidos). Se utilizaron los filtros de emisión 535-590 nm para la adquisición de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga y 520-528 nm para la luminiscencia de luciferasa de renilla.

6.4.6.2 Cálculo de la intensidad de luminiscencia relativa (RLI).

Para calcular la RLI de cada tratamiento se realizó en primera instancia una sustracción de la luminiscencia de fondo, la cual correspondía a la luminiscencia obtenida de células sin tratar expuestas a las mismas condiciones del kit Dual-GLO® Luciferase Assay System. Posteriormente se calculó la razón de luminiscencia entre luciérnaga y renilla, dividiendo los valores de luminiscencia obtenido de la reacción enzimática de la luciferasa de luciérnaga con los valores de luminiscencia obtenidos de la reacción de luciferasa de renilla. Finalmente, la razón luciérnaga/renilla calculada para cada tratamiento se dividió por la razón luciérnaga/renilla del tratamiento control (Vector pmiRGLO sin inserto).

6.5 Metodología para determinar el efecto que genera el aumento o disminución de la actividad funcional de miR-30c-5p en los niveles de expresión de la proteína MDM4 en una línea celular de origen mamario con fenotipo tumoral, a través de Western Blot. (objetivo específico 3).

6.5.1 Transfección células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron transfectadas cuando el cultivo llegó al 70% de confluencia, utilizando los tratamientos descritos en la tabla 4, a través del kit FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. La concentración de transfección para las moléculas mimico fue de 50 nM por pocillo, mientras que para las moléculas inhibidoras y el control negativo (NC) fue de 75 nM por pocillo. Las moléculas inhibidoras utilizadas en los tratamientos 4 y 5, también son llamadas antagomiR y corresponden a RNA monocatenario que presentan una secuencia complementaria al miRNA que se quiere inhibir, por lo cual una vez al interior de la célula compite con las dianas endógenas de miR-30c-5p uniéndose a este último por complementariedad de bases, logrando así una regulación negativa del miRNA en

estudio. Los inhibidores utilizados en este estudio fueron de la línea mirVana™ (Invitrogen, Estados Unidos) y son específicos para miR-30c-5p. También se incorporó un control negativo de tratamiento, para lo cual se usó un mimico que no posee target descrito en células humanas.

Tratamiento	Moléculas Transfectadas
1	Sin transfección (WT)
2	miR-30c-5p mimico (M)
3	miR-30c-5p inhibidor (I)
4	miR-30c-5p mimico + miR-30c-5p inhibidor (M+I)
5	miR-7116-5p <i>Mus musculus</i> mimico (NC)

Tabla 4. Tratamientos de transfección utilizados para la realización del ensayo dual de luciferasa. (WT) Wild-Type. (NC) Control Negativo.

6.5.2 Extracción y cuantificación de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó 24 horas postransfección. Para esto las células MCF-7 fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente desprendidas de la placa con tripsina 1X. El contenido de cada pocillo fue transferido a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL el cual contenía medio de cultivo con SBF para detener la actividad de la tripsina. Los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm para sedimentar las células y posteriormente eliminar el sobrenadante. Finalmente se lisaron las células sedimentadas con buffer RIPA ("Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer"), el cual dentro de sus componentes contiene 1% de triton X-100 como detergente y 0,1% de SDS como agente desnaturizante de proteínas. El buffer RIPA también fue complementado con un inhibidor de proteasas. El proceso de lisis fue facilitado por la sonicación de las muestras.

La cuantificación de proteínas se realizó con el kit colorimétrico BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific™, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. La cuantificación se realizó en un lector de placa tipo ELISA modelo EL808 (Biotek, Estados Unidos), a una longitud de onda de 595 nm.

6.5.3 Western Blot

La técnica de Western Blot (WB), es un inmunoensayo que permite la detección y cuantificación de proteínas de forma sensible y específica. Esta técnica consiste en primera instancia en separar un concentrado de proteínas totales a través de una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida. Posteriormente se transfieren las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Una vez que las proteínas se encuentran en la membrana se bloquea con un concentrado de proteínas para luego incubarlas con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. Terminada la incubación, la membrana se lava y se incuba con un anticuerpo secundario específico para la especie en el que fue producido el anticuerpo primario; el anticuerpo secundario está conjugado con una enzima Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) la cual en presencia de su sustrato (peróxido de hidrógeno) provoca una reacción capaz de oxidar a una molécula quimioluminiscente llamada luminol. La luz emitida en la reacción puede ser fotografiada y posteriormente cuantificada.

La electroforesis del Western Blot consideró 75 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida al 8%. El gel de alineación y separador se polimerizaron utilizando 0,1% de TEMED y 1% de persulfato de amonio (PSA). El buffer de corrida electroforética contenía 192 mM de Glicina, 25 mM de Tris y 0.1% de SDS. Las proteínas se cargaron en el gel previamente mezcladas con buffer de carga 5X que contenía beta-mercaptoetanol y desnaturizadas por choque térmico 5 minutos a 95°C. Como marcador de peso molecular se utilizó el blue prestained protein (New England Biolabs, Reino Unido) cuyo rango de peso molecular oscila entre 11 y 250 kDa. Una vez las proteínas fueron separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que poseían un tamaño de poro de 0.45 µm. El buffer de transferencia utilizado contenía 1,92 M de Glicina y 0,25 M de Tris.

La transferencia se corroboró con tinción de rojo ponceau en las membranas, las cuales luego fueron lavadas en PBS 1X con tween 20 al 0,5%. Una vez que el colorante fue eliminado completamente se procedió a bloquear las membranas con leche descremada 5% marca Svelty, diluida en buffer PBS 1X con tween 20. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con anticuerpos para la proteína MDM4 humana utilizando el

anticuerpo primario MDMX (D-4): sc-74468 (Santa Cruz, Estados Unidos), a una concentración 1:50. Este anticuerpo posee una marcación aproximada de 80 kDa según fabricante. Como proteína normalizadora se utilizó la Actina, la cual se detectó utilizando el anticuerpo primario MA1-744 (mAbGEa) (Thermo Scientific™, Estados Unidos) a una concentración de 1:8000. Este anticuerpo posee una marcación aproximada de 40 kDa según fabricante. Las incubaciones con anticuerpo primario se realizaron por una hora a 37°C en agitación (60 RPM). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón generado en cabra conjugado con HRP (Thermo Fisher, Estados Unidos), en concentraciones 1:5000 para MDM4 y 1:15.000 para la Actina. La incubación fue por una hora a temperatura ambiente en agitación.

Todos los anticuerpos utilizados se encontraban diluidos en leche descremada 5% marca Svelty, diluida en buffer PBS 1X con tween 20 (0,5%). Finalizadas las incubaciones con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó y posteriormente se incubó en una solución de revelado (peróxido de hidrogeno y luminol) del kit Clarity Max™ Western ECL Substrate (Bio-rad, Estados Unidos).

La adquisición de las imágenes se realizó en un sistema de LI-COR Biosciences (Estados Unidos), que contempla un escáner de luminiscencia C-digit asociado al software Image Studio™.

6.5.3.1 Análisis densitométrico del Western Blot

La densitometría se basa en la medición de la densidad de píxeles presentes en las bandas obtenidas de la adquisición de imágenes del Western Blot. Se acepta que la cantidad de píxeles es proporcional a la cantidad de luz emitida y recibida por el sistema, por tanto, es reflejo de la cantidad de una cierta proteína en la membrana. Es por esta razón que para comparar la densidad de píxeles de un tratamiento respecto a otro, es necesario tener un normalizador que ayude a discernir que el cambio de densidad no es debido a una diferencia en la cantidad de proteína cargada en el carril, sino más bien debido al tratamiento. Los normalizadores utilizados deben presentar una expresión constitutiva en todas las líneas celulares estudiadas y no deben variar debido los tratamiento ejecutados en ellas. En este estudio se utilizó la expresión de la proteína Actina como normalizador.

El análisis densitométrico se realizó en el programa Image Studio™ de LI-COR Biosciences. En primer lugar se calibró el contraste de forma manual en la imagen completa obtenida del escáner para mejorar la interpretación visual. Luego se utilizaron rectángulos de medición densimétricos que poseían la misma área para cada tratamiento. El software calculó la densidad de píxeles para cada tratamiento y proteína en estudio, además de sustraer automáticamente el fondo inespecífico asociado a cada inmunomarcación. Finalmente los datos de densidad se tabularon en el programa Microsoft Excel, en donde se calculó la expresión relativa de la proteína MDM4 en cada tratamiento, dividiendo la densidad obtenida de esta proteína por la densidad obtenida en la Actina.

6.6 Análisis Estadístico.

El análisis estadístico y la creación de los gráficos se realizó en el software GraphPad Prism (Dotmatics , Reino Unido). Tanto para la comparación de las expresiones relativas de los genes en estudio (objetivo específico 1), como para la comparación de la intensidad relativa de luminiscencia (objetivo 2), se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con multicomparación de Dunn's. El contraste de hipótesis de los análisis consideró un nivel de significancia de 0,05 (α), por lo tanto, las diferencias se interpretaron estadísticamente significativas con valores de $p < 0,05$. En el caso de la comparación de los niveles de proteínas relativos (objetivo específico 3), no se pudo realizar un test de hipótesis estadístico debido a que el tamaño de la muestra era muy pequeño ($n:2$). A pesar de lo mencionado, se explicita que existió una tendencia y concordancia entre los resultados obtenidos en las dos repeticiones del experimento.

7. RESULTADOS

7.1 Comparación de los niveles de expresión de RNA de los genes *MIR-30c-5p* y *MDM4* en líneas celulares de origen mamario de fenotipo normal y tumoral (objetivo específico 1).

7.1.1 Expresión relativa de miR-30c-5p en líneas celulares de origen mamario.

La determinación de la expresión relativa a través de RT-qPCR no evidenció una diferencia significativa para los niveles de miR-30c-5p entre las tres líneas celulares de mama (Figura 9).

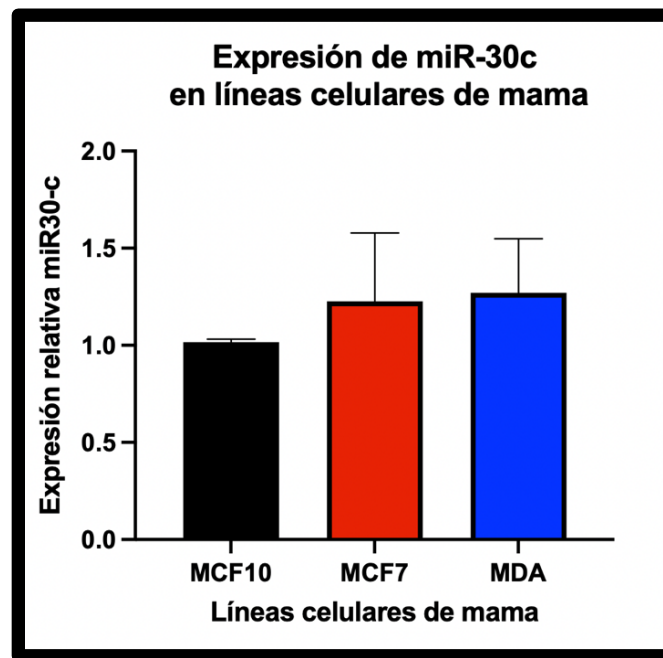


Figura 9. Niveles de expresión del gen *MIR-30c-5p* en tres líneas celulares de mama. Las barras de colores corresponden al promedio de la expresión relativa (n=4), además se grafica sobre ellas la barra de desviación estándar. La prueba estadística no arrojó una diferencia significativa ($p > 0,05$).

7.1.2 Expresión relativa del mRNA de MDM4 en líneas celulares de origen mamario.

La determinación de la expresión relativa de mRNA del gen *MDM4* a través de RT-qPCR demostró un aumento significativo en la línea celular MCF-7 ($p < 0,05$) en comparación a los niveles mostrados por la línea de fenotipo normal MCF-10 y la tumoral MDA. Por otra parte, no hay diferencia en la expresión de MDM4 en estas dos últimas ($p > 0,05$).

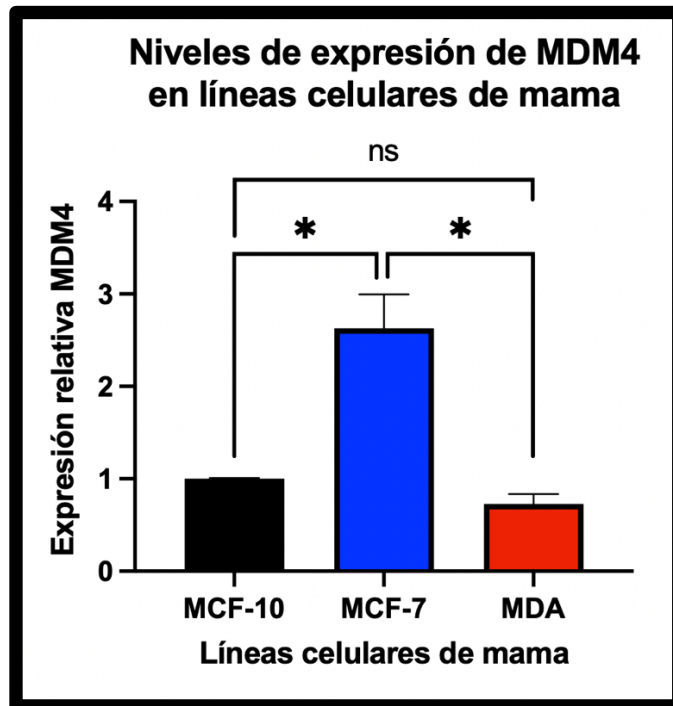


Figura 10. Niveles de expresión del gen *MDM4* en tres líneas celulares de mama. Las barras de colores corresponden al promedio de la expresión relativa ($n=4$), además se grafica sobre ellas la barra de desviación estándar. (*) diferencia significativa ($p < 0,05$), (ns) diferencia no significativa.

7.2 Comprobación *in vitro* de la interacción funcional entre miR-30c-5p sobre la 3' UTR del mRNA de MDM4.

La interacción funcional entre miR-30c-5p y el mRNA de MDM4 se comprobó a través de un ensayo dual de luciferasa utilizando las líneas celulares HEK-293. Estas fueron transfectadas con los tratamientos detallados en la tabla 3. Los resultados se detallan en la figura 11, en donde se pudo evidenciar que la incorporación de las secuencias tanto WT como MUT en el vector pmirGLO no interfieren en su actividad luciferasa, debido a que no presentan diferencias significativas con el vector sin estos insertos. También se observa que el aumento de la actividad funcional de miR-30c-5p a través de la transfección de moléculas mímicas, no afectan la actividad luciferasa del vector pmirGLO sin inserto o con la MRE mutada, ya que no presentan diferencias significativas con el tratamiento sin el mimico; sin embargo, es posible evidenciar una disminución significativa cuando el vector pmirGLO lleva inserto el segmento de la 3' UTR de MDM4 con la MRE WT predicha de manera *in silico para* miR-30c-5p. Además la especificidad del efecto se corrobora debido a que la disminución significativa evidenciada con la secuencia WT no ocurre cuando la secuencia se encuentra mutada.

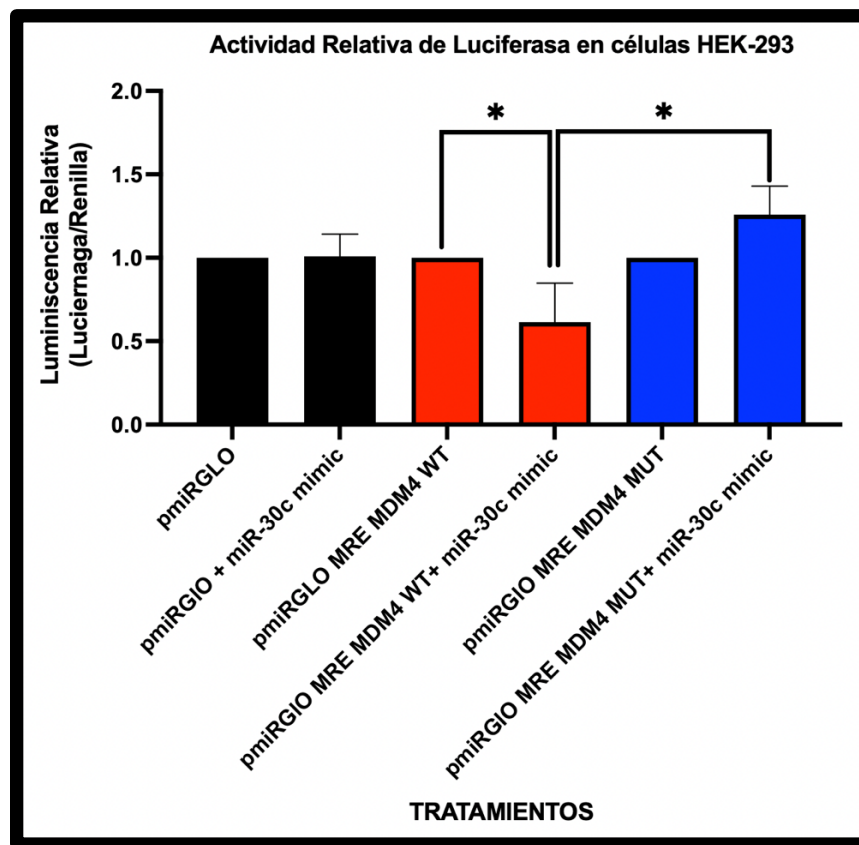


Figura 11. Actividad Relativa de Luciferasa para cada uno de los tratamientos de transfección en células HEK-293, 48 horas postransfección. Cada barra representa un promedio de RLI (n=5). Las barras negras representan el vector pmirGLO sin inserto, las barras azules al vector pmirGLO con inserto MRE WT y las rojas al vector pmirGLO con MRE mutada. Además se grafica sobre cada barra de desviación estándar y se representan las diferencias significativas ($p < 0,05$) con un asterisco.

7.3 Efecto que genera el aumento o disminución de la actividad funcional de miR-30c-5p en los niveles de la proteína MDM4 en una línea celular de origen mamario con fenotipo tumoral.

El efecto regulador de miR-30c-5p sobre los niveles de la proteína MDM4 se estudió en la línea celular MCF-7, como representante *in vitro* de cáncer de mama. Para esto se transfectaron con los tratamientos detallados en la tabla 4, para luego determinar los

niveles de la proteína a través de la técnica de Western Blot. Como se puede apreciar en la figura 12, existe una tendencia en el aumento de los niveles relativos de la proteína MDM4 en células MCF-7, 24 horas después de ser transfectadas con un inhibidor de miR-30c-5p, en comparación con las células MCF-7 sin tratamientos (WT) y tratadas con un control negativo (NC). También se ve un aumento aparente en el tratamiento que combina el uso del mimico e inhibidor de miR-30c-5p. Cabe resaltar que las diferencias mencionadas se basan en la tendencia de los resultados de 2 réplicas biológicas (en ambos experimentos se presentó un aumento de MDM4), sin embargo, la ejecución de solo 2 repeticiones del experimento imposibilita el uso de un test de hipótesis estadística para evaluar diferencias significativas, por la baja representatividad del tamaño muestral.

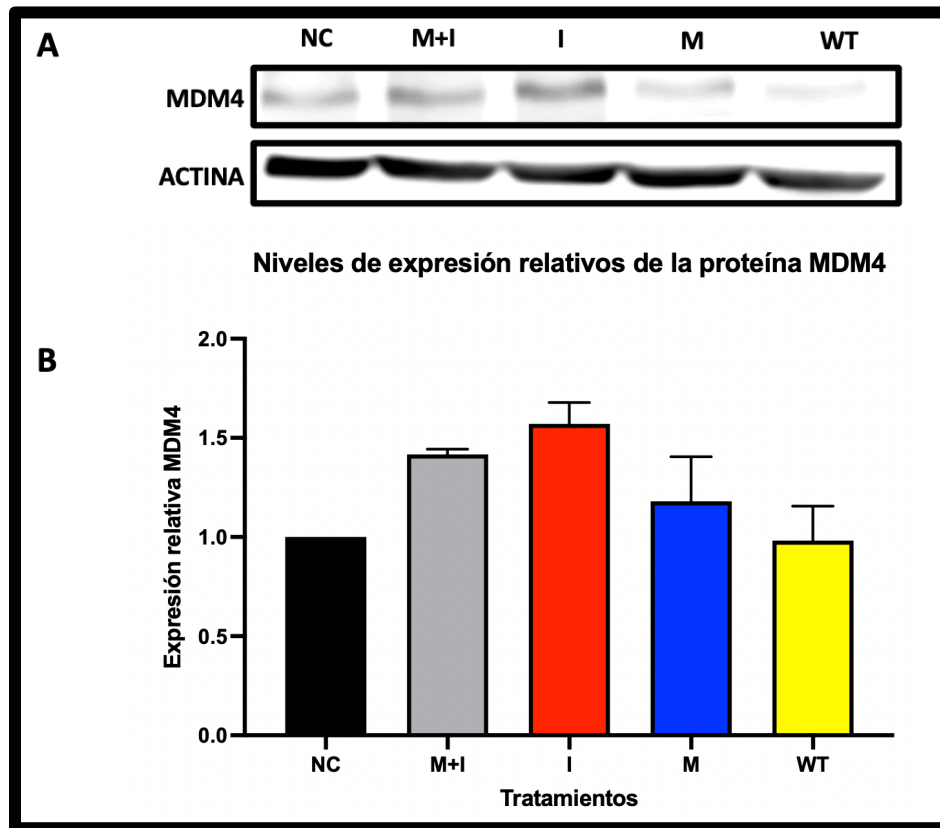


Figura 12. Niveles proteicos de MDM4 en células MCF-7, 24 horas postransfección, al utilizar los tratamientos descritos en la tabla 3. NC (control negativo), M+I (mímico miR-30c-5p + inhibidor miR-30c-5p), I (inhibidor miR-30c-5p), M (mímico miR-30c-5p) y WT (células no tratadas). (A) Western Blot de lisados proteicos, donde el panel superior muestra la expresión de la proteína MDM4, mientras que el panel inferior muestra la expresión de la proteína normalizadora Actina. (B) Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas de la técnica de Western Blot, donde cada barra representa los niveles relativos de la proteína MDM4 (n=2). Se grafica sobre cada barra la desviación estándar.

8. DISCUSIÓN.

La evidencia publicada sobre la regulación postranscripcional de genes oncogénicos a través de miRNAs cada vez es más abundante, y comienza a tomar gran importancia para barajar nuevos enfoques terapéuticos contra el cáncer (114,115). Como primer acercamiento a las intervenciones clínicas, los ensayos *in vitro* aportan evidencias que permiten su posterior uso en modelos animales, resguardando así los estándares bioéticos. En el caso de los estudios que involucran procesos neoplásicos en cáncer de mama, el uso de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 como representantes de diferentes fenotipos tumorales malignos, es de gran ayuda para poder revelar nuevas vías de señalización candidatas a ser intervenidas.

La presente investigación evidencia que las líneas celulares de cáncer de mama no presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-30c-5p con respecto a la línea no cancerígena MCF-10A (Figura 9). Este resultado es contradictorio a lo publicado por el grupo de Yuan-hui Lai et al. el año 2017, el cual describe que los niveles de miR-30c-5p se encuentran disminuidos en las líneas celulares cancerígenas MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación de MCF-10A (46). Considerando que miR-30c-5p es un miRNA cuyos niveles se ha relacionado directamente con funciones anti-proliferativas (25), es contradictorio pensar que la línea celular MCF-10A, cuya tasa de crecimiento en cultivo celular es mayor que el de sus contrapartes cancerígenas (116,117), presentase una mayor expresión de este miRNA. Además, la línea MCF-10A a pesar de ser utilizada como modelo *in vitro* no cancerígeno, sigue teniendo características tumorales, debido a que proviene de un fibroadenoma con deleciones en genes supresores de tumores como por ejemplo p16 y p14ARF (118), provocando así la sobreexpresión de oncogenes como *c-MYC* (119), lo que favorece la inmortalización y el aumento de la proliferación. Por tanto, es comprensible evidenciar que los niveles de miR-30c-5p se encuentren en niveles similares en las líneas evaluadas, debido a que las características de malignidad están asociados a la capacidad invasiva de las células, y no necesariamente a las proliferativas.

En este trabajo, tampoco se encontró una diferencia significativa en los niveles de expresión de las células MCF-7 respecto a MDA-MB-231 (Figura 9), a diferencia de lo

publicado en el 2014 por J. Dobson et al. o Y. Fang et al. los cuales sí encontraron diferencias, pero con resultados opuestos, el primero describe una mayor expresión de miR-30c-5p en MDA (54), mientras que Fang describe a MCF-7 como la línea que lo sobreexpresa (53), por tanto este es otro campo de investigación que se debe esclarecer. Lo que sí se puede decir con claridad es que ambas líneas celulares presentan un cariotipo similar, evidenciándose trisomías del cromosoma 1 y tetrasomías del cromosoma 6 (120–122), cromosomas en donde se encuentran los loci de los genes que codifican para miR-30c-5p (17), y por tanto la diferencia de expresión evidenciada por los autores mencionados, solo podría ser explicada por mecanismos moleculares y no citogenéticos.

En esta investigación se reporta por primera vez que el mRNA de *MDM4* es más abundante en la línea tumoral subtipo luminal MCF-7, en comparación de MDA-MB-231 de tipo basal y la no tumorigénica MCF-10A (Figura 10). Estos resultados pueden ser explicados en parte por la presencia de 5 copias del gen *MDM4* en el genoma de las células MCF-7 (107), sin embargo no se encontraron estudios que describan estas amplificaciones en líneas MCF-10A y MDA-MB-231. De forma concordante D. Gilkes et al. describe a MCF-7 como una línea que sobreexpresa *MDM4* tanto a nivel de mRNA y proteína en comparación de otras líneas celulares tumorales como H1299 de carcinoma de pulmón, U2OS y SJSA de osteosarcoma o las no tumorigénicas A549 de epitelio alveolar normal (123). También es importante mencionar que la línea MCF-7 presenta el gen *P53* WT a diferencia de la línea celular MDA-MB-231(124), por tanto es válido el uso de esta línea celular de tipo luminal como un buen modelo para poder estudiar más en profundidad la vía de señalización p53-MDM4 en los procesos neoplásicos de cáncer de mama, considerando además que, ya se ha reportado en la literatura que el silenciamiento del gen *MDM4* en células MCF-7 provoca la disminución de su capacidad replicativa, vía P53 (107). Por otro lado las células no cancerígenas MCF-10A que también poseen p53 de tipo WT, presentan niveles menores de esta proteína en comparación de la línea MCF-7 (124), lo que es contradictorio a lo esperado, debido a que el aumento de la expresión del gen *MDM4* reportado en esta investigación por parte de las células MCF-7, según las vías actualmente descritas, debería reflejarse en la regulación negativa del supresor tumoral; aunque una explicación podría ser que la

isoforma de MDM4 aumentada en MCF-7 podría ser una que favorezca la inactivación de p53 como factor de transcripción y no necesariamente una isoforma que facilite su degradación vía MDM2 (61).

Es relevante mencionar que los cebadores usados en este estudio para la detección del mRNA de MDM4, apuntan a todas las variantes de los transcritos del gen, por tanto, una proyección adecuada sería poder diferenciar este aumento del mRNA en células MCF-7 a través de RT-qPCR multiple, logrando determinar la variante del transcrito más abundante, lo que sería de gran interés debido a sus diferentes funciones sobre supresores tumorales como p53, p16 o p21.

Los resultados obtenidos de los niveles de expresión de los genes en estudio en las líneas celulares estudiadas, no permiten suponer que existe una regulación de MDM4 por parte de miR-30c-5p a través de la degradación de mRNA, puesto que, a pesar de que este miRNA se encuentra sin diferencias aparentes en todas las líneas de origen mamario estudiadas, sí se observa diferencia en los niveles del mRNA de MDM4, siendo mayores en MCF-7 (Figura 10). Por esta razón fue primordial la verificación *in vitro* de la interacción funcional entre estos dos RNAs.

Los resultados del ensayo dual de luciferasa presentados en esta investigación (Figura 11), permiten que este estudio sea pionero en reportar la interacción funcional *in vitro* de miR-30c-5p con una porción de la 3' UTR del mRNA de MDM4; teniendo como evidencia principal, la disminución de casi un 50% de la intensidad de luminiscencia relativa del plásmido pmirGLO que contenía dicha secuencia, una vez que se aumentara la actividad funcional de miR-30c-5p a través de moléculas mímicas. A pesar de los resultados positivos para verificar la interacción *in vitro* entre el mRNA de MDM4 y miR-30c-5p, se requirió de ensayos de western blot para revelar si dicha interacción afectaba a los niveles proteicos. Dichos estudios se realizaron en la línea celular MCF-7, debido a que sus niveles de expresión del gen MDM4 son superiores en comparación de la línea MDA-MB-231 (figura 10). Cabe mencionar que los resultados del ensayo dual de luciferasa debe ser complementado en un futuro con técnicas más sofisticadas, como por ejemplo, la inmunoprecipitación de RNA (RIP) de proteínas AGO2 (128), la cual permite comprobar directamente la unión miRNA-mRNA en las líneas tumorales en

estudio, además considerando la 3' UTR completa en estado WT del mRNA de MDM4 endógeno.

El presente estudio presenta evidencias que sugieren que al disminuir la actividad funcional de miR-30c-5p utilizando una molécula antagomiR en células MCF-7, los niveles proteicos de MDM4 tienden a aumentar en comparación a las líneas no tratadas o tratadas con un control negativo (figura 12). Este hallazgo sugiere que la actividad funcional de miR-30c-5p endógeno en células MCF-7 juega un papel clave en la regulación postranscripcional de MDM4. Sin embargo, esta regulación pareciera ser compleja, debido que no se logró evidenciar una disminución de la proteína cuando se aumentó la actividad del miR-30c-5p a través de la transfección de su mimico (figura 12). Esto podría explicarse debido a que algunos mRNA para poder ser silenciados de forma efectiva requieren de más de un miRNA uniéndose a su estructura (125,126); es por esta razón que se propone que la actividad funcional de miR-30c-5p endógeno es clave para mantener estabilizados los niveles de la proteína MDM4, no obstante, el aumento de la actividad funcional de este miRNA no es suficiente por sí solo para disminuir los niveles de la proteína, quizás porque requiere de otros miRNAs para hacer un silenciamiento efectivo, como por ejemplo los descritos por Dehua Yu et al. (127).

Una proyección apropiada sería realizar pruebas para comprobar la eficiencia de transfección de las moléculas mímicas de miR-30c-5p en líneas celulares MCF-7, porque podría existir la posibilidad de que el efecto no observado en la disminución de la proteína MDM4 al aumentar la actividad funcional del miRNA, fuese producto de una baja eficiencia de transfección de estas moléculas de RNA pequeñas de doble hebra. Además se considera fundamental lograr aumentar el tamaño muestral en los ensayos de Western Blot, debido a que esta investigación solo considero un n:2, imposibilitando un correcto análisis estadístico que confirme que la tendencia observada sea realmente significativa. La falta de repeticiones experimentales en ese ensayo se debió principalmente a la inconsistencia en los lotes de anticuerpo MDMX (D-4): sc-74468 de Santa Cruz, los que provocaron varias veces ausencia de marcación en todos los tratamientos y controles.

Finalmente es importante mencionar que a través de los resultados obtenidos en este estudio, se puede barajar a miR-30c-5p como un regulador de los niveles de MDM4 a nivel celular, abriendo puertas a futuras investigaciones que busquen complementar la ruta de señalización apuntando por ejemplo a p53. Además sería interesante seguir indagando en la regulación postranscripcional de MDM4 por parte de miR-30c-5p en otras líneas celulares o un modelo animal.

9. CONCLUSIONES

- 1- No se evidencian diferencias significativas en los niveles de expresión del gen MIR-30c-5p en las líneas celulares MCF10A, MCF-7, y MDA-MB-231.
- 2- La línea celular de origen mamario con fenotipo tumoral: MCF-7, presenta un mayor nivel de expresión del gen MDM4 en comparación con la línea celular MDA-MB-231.
- 3- miR-30c-5p interacciona funcionalmente *in vitro* con la región de la 3'UTR de MDM4 predicha en los análisis *in silico*.
- 4- Se sugiere que los niveles proteicos de MDM4 aumentan en células MCF-7 al disminuir la actividad funcional de miR-30c-5p.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar V, Abbas A, Aster A. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 10ª Edition. Elsevier; 2021.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mayo de 2021;71(3):209–49.
3. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract.* 1 de diciembre de 2017;4(4):127–9.
4. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* febrero de 2019;26(2):199–212.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 5ª Edición. Omega; 2007.
6. Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer.* enero de 2018;18(1):5–18.
7. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2019;20(1):21–37.
8. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S, Oliveto S, Mancino M, et al. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem.* 2017;8(1):45–56.
9. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 13 de octubre de 2004;23(20):4051–60.
10. Kadener S, Rodriguez J, Abruzzi KC, Khodor YL, Sugino K, Marr MT, et al. Genome-wide identification of targets of the drosha–pasha/DGCR8 complex. *RNA.* abril de 2009;15(4):537–45.
11. Wu K, He J, Pu W, Peng Y. The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* abril de 2018;16(2):120–6.
12. Chipman LB, Pasquinelli AE. MiRNA Targeting – Growing Beyond the Seed. *Trends Genet TIG.* marzo de 2019;35(3):215–22.
13. Filipów S, Łaczmański Ł. Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response. *Front Genet.* 11 de marzo de 2019;10:169.
14. Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet.* 1 de junio de 2022;38(6):613–26.
15. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer | PNAS [Internet]. [citado 21 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0508889103>
16. Czubak K, Lewandowska MA, Klonowska K, Roszkowski K, Kowalewski J, Figlerowicz M, et al. High copy number variation of cancer-related microRNA genes and frequent amplification of DICER1 and DROSHA in lung cancer. *Oncotarget.* 22 de junio de 2015;6(27):23399–416.
17. Mao L, Liu S, Hu L, Jia L, Wang H, Guo M, et al. miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *BioMed Res Int.* 29 de mayo de 2018;2018:e9623412.
18. Hibio N, Hino K, Shimizu E, Nagata Y, Ui-Tei K. Stability of miRNA 5' terminal and seed regions is correlated with experimentally observed miRNA-mediated silencing efficacy. *Sci Rep.* 18 de diciembre de 2012;2(1):996.
19. Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, et al. About miRNAs,

- miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget*. 9 de noviembre de 2017;8(63):107167–75.
20. Hu F, Wang M, Xiao T, Yin B, He L, Meng W, et al. miR-30 Promotes Thermogenesis and the Development of Beige Fat by Targeting RIP140. *Diabetes*. junio de 2015;64(6):2056–68.
 21. Ceolotto G, Giannella A, Albiero M, Kuppusamy M, Radu C, Simioni P, et al. miR-30c-5p regulates macrophage-mediated inflammation and pro-atherosclerosis pathways. *Cardiovasc Res*. 1 de noviembre de 2017;113(13):1627–38.
 22. Jin Y, Yao G, Wang Y, Teng L, Wang Y, Chen H, et al. MiR-30c-5p mediates inflammatory responses and promotes microglia survival by targeting eIF2 α during *Cryptococcus neoformans* infection. *Microb Pathog*. abril de 2020;141:103959.
 23. Zhang Q, Chen T, Zhang Y, Lyu L, Zhang B, Huang C, et al. MiR-30c-5p regulates adventitial progenitor cells differentiation to vascular smooth muscle cells through targeting OPG. *Stem Cell Res Ther*. 19 de enero de 2021;12(1):67.
 24. Wang X, Zhang Y, Han S, Chen H, Chen C, Ji L, et al. Overexpression of miR-30c-5p reduces cellular cytotoxicity and inhibits the formation of kidney stones through ATG5. *Int J Mol Med*. febrero de 2020;45(2):375–84.
 25. Han W, Cui H, Liang J, Su X. Role of MicroRNA-30c in cancer progression. *J Cancer*. 14 de febrero de 2020;11(9):2593–601.
 26. Expression of micro-RNA hsa-miR-30c-5p and hsa-miR-138-1 in renal cell carcinoma | *Experimental oncology* [Internet]. [citado 23 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://exp-oncology.com.ua/article/14632/expression-of-micro-rna-hsa-mir-30c-5p-and-hsa-mir-138-1-in-renal-cell-carcinoma>
 27. Ling X hui, Han Z dong, Xia D, He H chan, Jiang F neng, Lin Z yuan, et al. MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer. *Mol Biol Rep*. mayo de 2014;41(5):2779–88.
 28. Zhao Z, Weickmann S, Jung M, Lein M, Kilic E, Stephan C, et al. A Novel Predictor Tool of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy Based on a Five-MicroRNA Tissue Signature. *Cancers*. 21 de octubre de 2019;11(10):1603.
 29. Jia W, Eneh JO, Ratnaparkhe S, Altman MK, Murph MM. MicroRNA-30c-2* expressed in ovarian cancer cells suppresses growth factor-induced cellular proliferation and downregulates the oncogene BCL9. *Mol Cancer Res MCR*. diciembre de 2011;9(12):1732–45.
 30. Mehterov N, Vladimirov B, Sacconi A, Pulito C, Rucinski M, Blandino G, et al. Salivary miR-30c-5p as Potential Biomarker for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines*. 24 de agosto de 2021;9(9):1079.
 31. Wang G, Zhang H, He H, Tong W, Wang B, Liao G, et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. *Int Urol Nephrol*. marzo de 2010;42(1):95–102.
 32. Zhao JJ, Lin J, Zhu D, Wang X, Brooks D, Chen M, et al. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/ β -catenin/BCL9 pathway. *Cancer Res*. 15 de marzo de 2014;74(6):1801–13.
 33. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MSB, et al. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer*. 1 de febrero de 2009;124(3):568–77.
 34. Yuan LQ, Zhang T, Xu L, Han H, Liu SH. miR-30c-5p inhibits glioma proliferation and invasion via targeting Bcl2. *Transl Cancer Res*. enero de 2021;10(1):337–48.
 35. He H, Ding M, Li T, Zhao W, Zhang L, Yin P, et al. Bone mesenchymal stem cell-

- derived extracellular vesicles containing NORAD promote osteosarcoma by miR-30c-5p. *Lab Invest.* agosto de 2022;102(8):826–37.
36. Zhong Z, Xia Y, Wang P, Liu B, Chen Y. Low expression of microRNA-30c promotes invasion by inducing epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep.* noviembre de 2014;10(5):2575–9.
 37. Xia Y, Chen Q, Zhong Z, Xu C, Wu C, Liu B, et al. Down-Regulation of MiR-30c Promotes the Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting MTA1. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(2):476–85.
 38. McCann JV, Xiao L, Kim DJ, Khan OF, Kowalski PS, Anderson DG, et al. Endothelial miR-30c suppresses tumor growth via inhibition of TGF- β -induced Serpine1. *J Clin Invest.* 129(4):1654–70.
 39. Ma YS, Yu F, Zhong XM, Lu GX, Cong XL, Xue SB, et al. miR-30 Family Reduction Maintains Self-Renewal and Promotes Tumorigenesis in NSCLC-Initiating Cells by Targeting Oncogene TM4SF1. *Mol Ther.* 5 de diciembre de 2018;26(12):2751–65.
 40. Hu S, Zhang J, Fang X, Guo G, Dai J, Sheng Z, et al. Identification of microRNA hsa-miR-30c-5p as an inhibitory factor in the progression of hepatocellular carcinoma and investigation of its regulatory network via comprehensive analysis. *Bioengineered.* 1 de enero de 2021;12(1):7154–66.
 41. He Z, Tian M, Fu X. Reduced expression of miR-30c-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting RAB32. *Mol Ther - Nucleic Acids.* diciembre de 2021;26:603–12.
 42. gianni. MiR-30c exerts tumor suppressive functions in colorectal carcinoma by directly targeting BCL9 [Internet]. *European Review.* 2019 [citado 23 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.europeanreview.org/article/17696>
 43. Han W, Mu Y, Zhang Z, Su X. Expression of miR-30c and BCL-9 in gastric carcinoma tissues and their function in the development of gastric cancer. *Oncol Lett.* agosto de 2018;16(2):2416–26.
 44. Hu S, Liu H, Zhang J, Li S, Zhou H, Gao Y. Effects and prognostic values of miR-30c-5p target genes in gastric cancer via a comprehensive analysis using bioinformatics. *Sci Rep.* 18 de octubre de 2021;11:20584.
 45. Mu Y ping, Su X lan. Polymorphism in pre-miR-30c contributes to gastric cancer risk in a Chinese population. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* septiembre de 2012;29(3):1723–32.
 46. Lai Y hui, Chen J, Wang X ping, Wu Y qing, Peng H tao, Lin X hong, et al. Collagen triple helix repeat containing-1 negatively regulated by microRNA-30c promotes cell proliferation and metastasis and indicates poor prognosis in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 12 de julio de 2017;36:92.
 47. Bockhorn J, Yee K, Chang YF, Prat A, Huo D, Nwachukwu C, et al. MicroRNA-30c Targets Cytoskeleton Genes Involved in Breast Cancer Cell Invasion. *Breast Cancer Res Treat.* enero de 2013;137(2):373–82.
 48. Pei B, Li T, Qian Q, Fan W, He X, Zhu Y, et al. Downregulation of microRNA-30c-5p was responsible for cell migration and tumor metastasis via COTL1-mediated microfilament arrangement in breast cancer. *Gland Surg.* junio de 2020;9(3):74758–74758.
 49. Elhelbawy NG, Zaid IF, Khalifa AA, Gohar SF, Fouda EA. miRNA-148a and miRNA-30c expressions as potential biomarkers in breast cancer patients. *Biochem Biophys Rep.* 21 de junio de 2021;27:101060.

50. Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K, et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nat Commun.* 2013;4:1393.
51. Poudel S, Song J, Jin EJ, Song K. Sulfuretin-induced miR-30C selectively downregulates cyclin D1 and D2 and triggers cell death in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 de febrero de 2013;431(3):572–8.
52. Rodríguez-González FG, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, Meijer-van Gelder ME, de Weerd V, et al. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* mayo de 2011;127(1):43–51.
53. Fang Y, Shen H, Cao Y, Li H, Qin R, Chen Q, et al. Involvement of miR-30c in resistance to doxorubicin by regulating YWHAZ in breast cancer cells. *Braz J Med Biol Res.* enero de 2014;47:60–9.
54. Dobson JR, Taipaleenmäki H, Hu YJ, Hong D, van Wijnen AJ, Stein JL, et al. hsa-mir-30c promotes the invasive phenotype of metastatic breast cancer cells by targeting NOV/CCN3. *Cancer Cell Int.* 2 de agosto de 2014;14:73.
55. miRDB Search Result Details [Internet]. [citado 23 de febrero de 2023]. Disponible en: https://mirdb.org/cgi-bin/target_detail.cgi?targetID=1440097
56. TargetScanHuman 7.1 predicted targeting of Human MDM4 [Internet]. [citado 23 de febrero de 2023]. Disponible en: https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/view_gene.cgi?rs=ENST00000391947.2&taxid=9606&members=miR-30-5p&showcnc=0&shownc=0&subset=1
57. Zdzalik M, Pustelny K, Kedracka-Krok S, Huben K, Pecak A, Wladyka B, et al. Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 de noviembre de 2010;9(22):4584–91.
58. Miranda PJ, Buckley D, Raghu D, Pang JMB, Takano EA, Vijayakumaran R, et al. MDM4 is a rational target for treating breast cancers with mutant p53. *J Pathol.* 2017;241(5):661–70.
59. Toledo F, Wahl GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(7–8):1476–82.
60. Jin Y, Zeng SX, Sun XX, Lee H, Blattner C, Xiao Z, et al. MDMX Promotes Proteasomal Turnover of p21 at G1 and Early S Phases Independently of, but in Cooperation with, MDM2. *Mol Cell Biol.* febrero de 2008;28(4):1218–29.
61. Haupt S, Mejía-Hernández JO, Vijayakumaran R, Keam SP, Haupt Y. The long and the short of it: the MDM4 tail so far. *J Mol Cell Biol.* 1 de marzo de 2019;11(3):231–44.
62. Tan BX, Liew HP, Chua JS, Ghadessy FJ, Tan YS, Lane DP, et al. Anatomy of Mdm2 and Mdm4 in evolution. *J Mol Cell Biol.* febrero de 2017;9(1):3–15.
63. Yu DH, Xu ZY, Mo S, Yuan L, Cheng XD, Qin JJ. Targeting MDMX for Cancer Therapy: Rationale, Strategies, and Challenges. *Front Oncol* [Internet]. 2020 [citado 24 de febrero de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01389>
64. Haupt S, Vijayakumaran R, Miranda PJ, Burgess A, Lim E, Haupt Y. The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention. *J Mol Cell Biol.* 1 de febrero de 2017;9(1):53–61.
65. Yu Q, Li Y, Mu K, Li Z, Meng Q, Wu X, et al. Amplification of Mdmx and overexpression of MDM2 contribute to mammary carcinogenesis by substituting for p53 mutations. *Diagn Pathol.* 25 de marzo de 2014;9:71.

66. Haupt S, Buckley D, Pang JMB, Panimaya J, Paul PJ, Gamell C, et al. Targeting Mdmx to treat breast cancers with wild-type p53. *Cell Death Dis.* 16 de julio de 2015;6(7):e1821.
67. Gao C, Xiao G, Piersigilli A, Gou J, Ogunwobi O, Bargonetti J. Context-dependent roles of MDMX (MDM4) and MDM2 in breast cancer proliferation and circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 14 de enero de 2019;21(1):5.
68. Bao J, Nanding A, Song H, Xu R, Qu G, Xue Y. The overexpression of MDM4: an effective and novel predictor of gastric adenocarcinoma lymph node metastasis. *Oncotarget.* 12 de septiembre de 2016;7(41):67212–22.
69. Suda T, Yoshihara M, Nakamura Y, Sekiguchi H, Godai TI, Sugano N, et al. Rare MDM4 gene amplification in colorectal cancer: The principle of a mutually exclusive relationship between MDM alteration and TP53 inactivation is not applicable. *Oncol Rep.* 1 de julio de 2011;26(1):49–54.
70. Woodfield SE, Shi Y, Patel RH, Chen Z, Shah AP, Srivastava RK, et al. MDM4 inhibition: a novel therapeutic strategy to reactivate p53 in hepatoblastoma. *Sci Rep.* 3 de febrero de 2021;11(1):2967.
71. Mancini F, Conza GD, Moretti F. MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. *Curr Genomics.* marzo de 2009;10(1):42–50.
72. Phillips A, Teunisse A, Lam S, Lodder K, Darley M, Emaduddin M, et al. HDMX-L Is Expressed from a Functional p53-responsive Promoter in the First Intron of the HDMX Gene and Participates in an Autoregulatory Feedback Loop to Control p53 Activity. *J Biol Chem.* 17 de septiembre de 2010;285:29111–27.
73. Rallapalli R, Strachan G, Cho B, Mercer WE, Hall DJ. A Novel MDMX Transcript Expressed in a Variety of Transformed Cell Lines Encodes a Truncated Protein with Potent p53 Repressive Activity *. *J Biol Chem.* 19 de marzo de 1999;274(12):8299–308.
74. Rallapalli R, Strachan G, Tuan RS, Hall DJ. Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 1 de junio de 2003;89(3):563–75.
75. Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, Bezzi M, Teo SX, Low DHP, et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest.* enero de 2016;126(1):68–84.
76. Bardot B, Toledo F. Targeting MDM4 Splicing in Cancers. *Genes.* febrero de 2017;8(2):82.
77. Bardot B, Bouarich-Bourimi R, Leemput J, Lejour V, Hamon A, Plancke L, et al. Mice engineered for an obligatory Mdm4 exon skipping express higher levels of the Mdm4-S isoform but exhibit increased p53 activity. *Oncogene.* 28 de mayo de 2015;34(22):2943–8.
78. Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, et al. Amplification of Mdmx (or Mdm4) Directly Contributes to Tumor Formation by Inhibiting p53 Tumor Suppressor Activity. *Mol Cell Biol.* julio de 2004;24(13):5835–43.
79. Li Q, Lozano G. Molecular Pathways: Targeting Mdm2 and Mdm4 in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de enero de 2013;19(1):34–41.
80. Markey M, Berberich S. Full-length hdmX transcripts decrease following genotoxic stress. *Oncogene.* 6 de noviembre de 2008;27(52):6657–66.
81. Hoffman Y, Pilpel Y, Oren M. microRNAs and Alu elements in the p53–Mdm2–Mdm4 regulatory network. *J Mol Cell Biol.* junio de 2014;6(3):192–7.

82. Klein AM, Queiroz RM de, Venkatesh D, Prives C. The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53. *Genes Dev.* 5 de enero de 2021;35(9-10):575-601.
83. Zhao Z, Guan JZ, Wu M, Lai GH, Zhu ZL. Downregulation of microRNA-23b protects against ischemia-reperfusion injury via p53 signaling pathway by upregulating MDM4 in rats. *J Cell Biochem.* 2019;120(3):4599-612.
84. Mandke P, Wyatt N, Fraser J, Bates B, Berberich SJ, Markey MP. MicroRNA-34a Modulates MDM4 Expression via a Target Site in the Open Reading Frame. *PLoS ONE.* 1 de agosto de 2012;7(8):e42034.
85. Cao L, Liu Y, Lu JB, Miao Y, Du XY, Wang R, et al. A feedback circuit of miR-34a/MDM4/p53 regulates apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Transl Cancer Res.* octubre de 2020;9(10):6143-53.
86. Hoffman Y, Bublik DR, Pilpel Y, Oren M. miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53. *Cell Death Differ.* febrero de 2014;21(2):302-9.
87. Wang Q, Selth LA, Callen DF. MiR-766 induces p53 accumulation and G2/M arrest by directly targeting MDM4. *Oncotarget.* 20 de febrero de 2017;8(18):29914-24.
88. Wang X, Zhu J. Mir-1307 regulates cisplatin resistance by targeting Mdm4 in breast cancer expressing wild type P53. *Thorac Cancer.* 2018;9(6):676-83.
89. Huang Y, Chuang AY, Ratovitski EA. Phospho- Δ Np63 α /miR-885-3p axis in tumor cell life and cell death upon cisplatin exposure. *Cell Cycle.* 15 de noviembre de 2011;10(22):3938-47.
90. Tian Y, Xu Z, Fu J. CircularRNA-9119 promotes the proliferation of cervical cancer cells by sponging miR-126/MDM4. *Mol Cell Biochem.* 1 de julio de 2020;470(1):53-62.
91. Cai H, Zhang P, Xu M, Yan L, Liu N, Wu X. Circular RNA hsa_circ_0000263 participates in cervical cancer development by regulating target gene of miR-150-5p. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):11391-400.
92. Shen X, Zuo X, Zhang W, Bai Y, Qin X, Hou N. MiR-370 promotes apoptosis in colon cancer by directly targeting MDM4. *Oncol Lett.* 1 de febrero de 2018;15(2):1673-9.
93. Jiang K, Sun F, Zhu J, Luo G, Ban Y, Zhang P. miR-33a inhibits cell growth in renal cancer by downregulation of MDM4 expression. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(8):e833.
94. MiR-1205 functions as a tumor suppressor by disconnecting the synergy between KRAS and MDM4/E2F1 in non-small cell lung cancer - PMC [Internet]. [citado 25 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6405972/>
95. Gao F, Xiong X, Pan W, Yang X, Zhou C, Yuan Q, et al. A Regulatory MDM4 Genetic Variant Locating in the Binding Sequence of Multiple MicroRNAs Contributes to Susceptibility of Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE.* 14 de agosto de 2015;10(8):e0135647.
96. Ovcharenko D, Stölzel F, Poitz D, Fierro F, Schaich M, Neubauer A, et al. miR-10a overexpression is associated with NPM1 mutations and MDM4 downregulation in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 1 de octubre de 2011;39(10):1030-1042.e7.
97. Shibata T, Cao DY, Dar TB, Ahmed F, Bhat SA, Veiras LC, et al. miR766-3p and miR124-3p Dictate Drug Resistance and Clinical Outcome in HNSCC. *Cancers.* 27 de

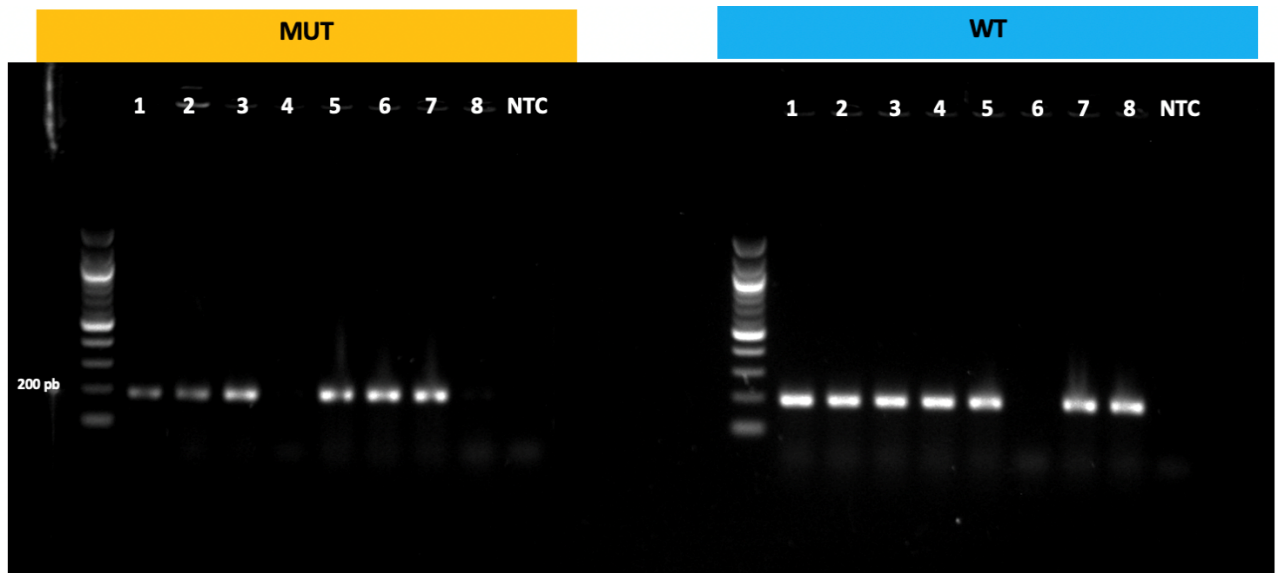
octubre de 2022;14(21):5273.

98. Duan X, Liu X, Cao Y, Li Y, Silayiding A, Zhang L, et al. Effect of MicroRNA-766 Promotes Proliferation, Chemoresistance, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells. *Clin Breast Cancer*. 1 de febrero de 2021;21(1):e1–17.
99. Han S, Zou H, Lee JW, Han J, Kim HC, Cheol JJ, et al. miR-1307-3p Stimulates Breast Cancer Development and Progression by Targeting SMYD4. *J Cancer*. 1 de enero de 2019;10(2):441–8.
100. ATCC: American Type Culture Collection [Internet]. [citado 26 de febrero de 2023]. Disponible en: https://webstore.ansi.org/sdo/atcc?gclid=Cj0KCQiAo-yfBhD_ARIsANr56g4dtNmxF6ccIQA3pWdev6rOn2YG9Xcl6xeANwnq17bO37kZ97NQdSQaApe2EALw_wcB
101. MCF 10A - CRL-10317 | ATCC [Internet]. [citado 26 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-10317>
102. MCF7 - HTB-22 | ATCC [Internet]. [citado 26 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/htb-22>
103. MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC [Internet]. [citado 26 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/htb-26>
104. 293 [HEK-293] - CRL-1573 | ATCC [Internet]. [citado 26 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-1573>
105. Ooi A, Wong A, Esau L, Lemtiri-Chlieh F, Gehring C. A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization. *Front Physiol* [Internet]. 2016 [citado 26 de febrero de 2023];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2016.00300>
106. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187–200.
107. Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, et al. Amplification of Mdmx (or Mdm4) Directly Contributes to Tumor Formation by Inhibiting p53 Tumor Suppressor Activity. *Mol Cell Biol*. julio de 2004;24(13):5835–43.
108. Martín-Alonso S, Frutos-Beltrán E, Menéndez-Arias L. Reverse Transcriptase: From Transcriptomics to Genome Editing. *Trends Biotechnol*. 1 de febrero de 2021;39(2):194–210.
109. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol*. julio de 2011;Chapter 15:Unit 15.10.
110. Bidault A, Richard GG, Bris CL, Paillard C. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ*. 22 de diciembre de 2015;3:e1484.
111. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif*. diciembre de 2001;25(4):402–8.
112. Promega. pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector [Internet]. [citado 4 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/es-es/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/pmirglo-dual-luciferase-mirna-target-expression-vector/>
113. Gj L, S T, Nm N. DNA ligases. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. abril de 2011 [citado 2 de marzo de 2023];Chapter 3. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21472697/>
114. Ho PTB, Clark IM, Le LTT. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci*. 28 de junio de 2022;23(13):7167.

115. Jain CK, Srivastava P, Pandey AK, Singh N, Kumar RS. miRNA therapeutics in precision oncology: a natural premium to nurture. *Explor Target Anti-Tumor Ther*. 2022;3(4):511–32.
116. Wang Y, Jeong Y, Jhiang SM, Yu L, Menq CH. Quantitative Characterization of Cell Behaviors through Cell Cycle Progression via Automated Cell Tracking. *PLoS ONE*. 9 de junio de 2014;9(6):e98762.
117. Corbin EA, Adeniba OO, Cangellaris OV, King WP, Bashir R. Evidence of differential mass change rates between human breast cancer cell lines in culture. *Biomed Microdevices*. marzo de 2017;19(1):10.
118. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 6 de julio de 2015;10(7):e0131285.
119. Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR. p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature*. 7 de octubre de 2004;431(7009):712–7.
120. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep*. diciembre de 2004;24(6):631–9.
121. Bahia H, Ashman JNE, Cawkwell L, Lind M, Monson JRT, Drew PJ, et al. Karyotypic variation between independently cultured strains of the cell line MCF-7 identified by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Int J Oncol*. 1 de marzo de 2002;20(3):489–94.
122. Watson M, Greenman J, Drew P, Lind M. Variation between independently cultured strains of the MDA-MB-231 breast cancer cell line identified by multicolour fluorescence in situ hybridisation. 1 de enero de 2004;2.
123. Gilkes DM, Pan Y, Coppola D, Yeatman T, Reuther GW, Chen J. Regulation of MDMX Expression by Mitogenic Signaling. *Mol Cell Biol*. 15 de marzo de 2008;28(6):1999–2010.
124. Lim LY, Vidnovic N, Ellisen LW, Leong CO. Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Br J Cancer*. noviembre de 2009;101(9):1606–12.
125. Bracken CP. “Crowd-control” by RNA: a pervasive theme in biology. *RNA*. julio de 2023;29(7):885–8.
126. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*. abril de 2010;29(15):2161–4.
127. Yu D, Xu Z, Cheng X, Qin J. The role of miRNAs in MDMX-p53 interplay. *J Evid-Based Med*. 2021;14(2):152–60.
128. Tan LP, Seinen E, Duns G, de Jong D, Sibon OCM, Poppema S, et al. A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res*. 1 de noviembre de 2009;37(20):e137.
129. Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic AV, Lai M, Knight S, Sabouri-Ghomi M, et al. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front Genet [Internet]*. 2015 [citado 20 de agosto de 2023];6. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00340>
130. Thomson DW, Bracken CP, Szubert JM, Goodall GJ. On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors. *PLoS ONE*. 24 de enero de 2013;8(1):e55214.

11. ANEXOS

Anexo 1: Comprobación de la clonación por PCR.



Anexo 1. Gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio (agarosa 2%). Los carriles del 1 al 8 corresponden los resultados de la reacción de PCR para comprobar la clonación adecuada de del plásmido. Se utilizó como molde el DNA plasmídico obtenido de las extracciones realizadas a las colonias bacterianas transformadas. Los cebadores utilizados apuntaban al oligonucleótido clonado (MUT o WT) y una región específica del plásmido pmiRGlo. (MUT) colonias mutadas. (WT) "Wild-type", colonias no mutadas. NTC (control sin templado).