

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

EFEECTO DE LET-7B-5P EN LA SENSIBILIDAD Y RESPUESTA ANTITUMORAL DE LA METFORMINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Merizalde, Erick Nicolas – LU 1119541

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. De Luca, Paola.

**Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos -
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) – CONICET**

Co-Tutor:

Dr. Parra, Federico, UADE

13 de Diciembre, 2024

UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia. A mi mamá y papá, por ser mi inspiración y ejemplo a seguir, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente en cada paso que doy para cumplir mis sueños. A mi ñaña, por ser mi alegría y motivación en los momentos más difíciles. A toda mi familia, gracias por estar siempre pendientes de mí, por su amor, su ayuda y su apoyo constante. También agradezco a Dios por ser mi guía y mi fuerza en este camino, por acompañarme en cada desafío y darme la fortaleza para seguir adelante.

Quiero también expresar mi gratitud al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) por brindarme la oportunidad de realizar esta tesina en sus instalaciones. Muchas gracias a Adriana De Siervi por abrirme las puertas del Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos. Gracias por permitirme ser parte de esta familia, llena de gente tan profesional y buena, y por mostrarme el lado apasionante y enriquecedor de la investigación. De manera muy especial, quiero agradecer a Pao, mi directora y guía en esta tesina. Gracias por recibirme con una sonrisa desde el primer hasta el último día, por compartir tus conocimientos, por tu paciencia infinita y por comprometerte plenamente para que este proyecto se concretara en los plazos establecidos. Estoy profundamente agradecido por tu confianza y tu apoyo constante. También quiero agradecer al laboratorio de Estudios de la Fisiopatología del Ovario del IBYME, liderado por la Dra. Fernanda Parborell y la Dra. Dalhia Abramovich por cedernos gentilmente la metformina para realizar los distintos ensayos de esta Tesina. Agradezco a la UADE, mi segundo hogar durante estos años, por formarme profesionalmente y por abrirme las puertas a un mundo lleno de posibilidades. A mis profesores, gracias por sus enseñanzas, consejos y por siempre transmitirme su pasión por lo que hacen.

No podría dejar de agradecer a mis amigos y amigas, quienes se han convertido en mi segunda familia. Gracias por su compañía, sus palabras de aliento y por nunca dejarme sentir solo. Siempre llevaré con cariño cada momento compartido. Por último, pero no menos importante, gracias a Argentina y a Buenos Aires. Gracias por recibirme con los brazos abiertos, por la calidez y amabilidad de su gente, y por hacerme sentir parte de esta hermosa tierra. Un pedazo de mi corazón se queda aquí, en esta ciudad que siempre recordaré con mucho cariño como “la ciudad de la furia”.

Resumen

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es un subtipo agresivo de cáncer de mama (CM) asociado a un peor pronóstico y representa entre el 15% y 20% de los casos CM diagnosticados. Debido a la falta de blancos terapéuticos específicos, su tratamiento principal es la quimioterapia, cuyo beneficio es limitado. Por otro lado, los microARNs (miARNs) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que regulan la expresión génica mediante la degradación o la represión de la traducción de ARN mensajeros (ARNm) y desempeñan un papel crucial en la oncogénesis. Previamente en el laboratorio, mediante un microarreglo de expresión y análisis bioinformáticos posteriores, se evidenció que el miARN let-7b-5p, se encontraba disminuido tanto en el plasma de mujeres con alteraciones asociadas al síndrome metabólico (AASM) como en el tejido tumoral de pacientes con CM basal-like. Esto resultó de particular interés dado que el síndrome metabólico (SM) aumenta el riesgo y agresividad del CM y presenta mayor prevalencia en el CMTN. A partir de esta información, el laboratorio estudió el rol de let-7b-5p en el desarrollo y progresión del CMTN, así como su posible potencial terapéutico. Al evaluar el efecto terapéutico de let-7b-5p en un modelo murino mediante el tratamiento con una única dosis de este miARN, se observó una disminución en el tamaño de tumores derivados de la inoculación con células tumorales mamarias 4T1. Estos resultados representaron un avance prometedor en el desarrollo de terapias para el CMTN mediante el uso de miARNs. Sin embargo, los *mimics* son moléculas sintéticas de ARN diseñadas para imitar la función de los miARNs endógenos que, en la actualidad, tienen un costo elevado. Por eso, en el laboratorio se plantearon alternativas terapéuticas, como el uso de fármacos que tengan como blanco la expresión de miARNs o el uso combinado de *mimics* con drogas de menor costo y baja toxicidad, con el objetivo de reducir la dependencia y cantidad de miARNs sintéticos necesarios en esquemas terapéuticos. Este contexto llevó al laboratorio a identificar, mediante herramientas bioinformáticas, que la metformina, una droga sintética de uso comercial, modula la expresión de let-7b-5p en modelos de cáncer de páncreas. Estos antecedentes, junto con el uso consolidado de la metformina como tratamiento para la diabetes tipo II, una condición estrechamente vinculada al síndrome metabólico (SM), abrieron nuevas líneas de investigación sobre su potencial terapéutico en CMTN. Así, el objetivo general de esta Tesina fue analizar el rol de let-7b-5p

en la sensibilidad y respuesta antitumoral de la metformina en modelos celulares de CMTN, explorando su potencial como estrategia terapéutica combinada.

Como primer abordaje, se evaluó el efecto de let-7b-5p en la línea celular de CM MDA-MB-231 para consolidar su rol de supresor tumoral en CMNT, además, se estudió su influencia modulando fenotipos relacionados con el crecimiento y progresión del CMTN determinando la expresión de un panel de genes. A su vez, se analizó el efecto de la metformina en la expresión de let-7b-5p, así como en la expresión del miR-877-5p y miR-28-3p, miARNs también identificados como alterados en el plasma de mujeres con AASM y en el tejido tumoral de pacientes con CM basal-like. Por último, se exploró el potencial terapéutico de combinar metformina y let-7b-5p, ambos tratamientos de baja toxicidad, para maximizar los beneficios antitumorales, validando previamente los efectos antitumorales de la metformina en los modelos experimentales de CMTN del laboratorio.

Los resultados de esta Tesina son consistentes con un rol supresor tumoral de let-7b-5p, al disminuir la viabilidad celular, la capacidad clonogénica y la migración de células de CMTN. Además, se evidenció que la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la expresión de E-Cadherina y aumentó la expresión de Vimentina. Sin embargo, este patrón de expresión es contrario al esperado, considerando que let-7b-5p disminuye la migración de células MDA-MB-231. No se observó una variación significativa en el caso de los demás genes estudiados, por lo que son necesarios más estudios a futuro para dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales este miARN modula el CMTN.

Por otra parte, se encontró que las dosis de metformina utilizadas no modularon la expresión de let-7b-5p, el miR-28-3 y el miR-877-5p en la población total de células de CMTN. Además, se validaron algunos de los efectos antitumorales de la metformina ya que se encontró que, a altas dosis, reduce la viabilidad, migración y capacidad clonogénica en los modelos de CMTN utilizados en el Laboratorio.

Por último, el tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p no mostró un sinergismo pero se observó un efecto aditivo en la reducción de la viabilidad de células MDA-MB-231, ya que el tratamiento conjunto con metformina 1 mM y la sobreexpresión de let-7b-5p redujo la viabilidad celular a niveles similares a los observados luego del tratamiento simple con metformina 5mM. Sin embargo, este efecto aditivo no se observó en células 4T1. Respecto a la capacidad de migración, la combinación de metformina y let-7b-5p no mostró sinergismo ni un efecto aditivo en la migración de células MDA-MB-231 y 4T1.

Finalmente, en cuanto a capacidad clonogénica, no se encontró que el tratamiento combinado resulte en una mayor disminución, por el contrario, se observó una interacción negativa significativa entre ambos tratamientos en la línea MDA-MB-231.

Los hallazgos obtenidos en esta Tesina destacan a let-7b-5p como supresor tumoral en CMTN. Por otra parte, si bien el tratamiento combinado de let-7b-5p y metformina mostró resultados alentadores en la viabilidad de las células MDA-MB-231, se requieren más estudios para explorar el beneficio de combinar estos dos compuestos. Estos resultados son un paso inicial hacia el desarrollo de terapias personalizadas que combinen *mimics* con fármacos reposicionados, reduciendo costos y toxicidad, que permitan enfrentar la resistencia a tratamientos convencionales y la alta recurrencia en este subtipo de CM.

Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype of breast cancer (BC) associated with a worse prognosis and represents between 15% and 20% of diagnosed BC cases. Due to the lack of specific therapeutic targets, its main treatment is chemotherapy, the benefit of which is limited. On the other hand, microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression by degrading or repressing the translation of mRNAs and play a crucial role in oncogenesis. Previously in the laboratory, through microarrays and subsequent bioinformatics analysis, it was shown that let-7b-5p was decreased in the plasma of women with alterations associated with metabolic syndrome (AAMS) and in the tumor tissue of patients with basal-like BC. Based on this information, the laboratory studied the role of let-7b-5p in the development and progression of TNBC, as well as its possible therapeutic potential. When evaluating the therapeutic effect of let-7b-5p in a murine model by treatment with a single dose of this miRNA, a decrease in the size of tumors derived from inoculation with 4T1 cells was observed. These results represented a promising advance in the development of therapies for TNBC using miRNAs. However, due to the high cost of mimics, synthetic RNA molecules designed to mimic the function of endogenous miRNAs. The Lab proposed other therapeutic alternatives, such as the replacement of miRNAs with drugs that target miRNAs or the combined use of mimics with lower-cost and low-toxicity drugs, with the aim of reducing the dependence and quantity of mimics needed in therapeutic regimens. This context led the laboratory to identify, through bioinformatics tools, that metformin modulates the expression of let-7b-5p in pancreatic cancer models. This background, together with the consolidated use of metformin as a treatment for type II diabetes, a condition closely linked to metabolic syndrome (MS), opened new lines of research on its therapeutic potential in TNBC. Thus, the main aim of this Thesis was to analyze the role of let-7b-5p in the sensitivity and antitumor response of metformin in cellular models of TNBC, exploring its potential as a combined therapeutic strategy.

As a first approach, the effect of let-7b-5p was evaluated in the MDA-MB-231 cell line to consolidate its role as a tumor suppressor in TNBC. In addition, its influence on modulating phenotypes related to the growth and progression of TNBC was studied by determining the expression of a panel of genes. In turn, the action of metformin on the expression of let-7b-5p and other miRNAs was studied in TNBC models. Finally, the

therapeutic potential of combining metformin and let-7b-5p, both low-toxicity treatments, was explored to maximize antitumor benefits, previously validating the antitumor effects of metformin in the experimental TNBC models in the laboratory.

The results of this thesis are consistent with a tumor suppressor role of let-7b-5p, by decreasing cell viability, clonogenic capacity and migration of TNBC cells. Furthermore, it was found that overexpression of let-7b-5p decreased the expression of E-Cadherin and increased the expression of Vimentin. However, this expression pattern is contrary to that expected considering that let-7b-5p decreases the migration of MDA-MB-231 cells. No significant variation was observed in the case of the other genes studied, so further studies are necessary to elucidate the molecular mechanisms by which this miRNA modulates TNBC.

On the other hand, it was found that the doses of metformin used did not modulate the expression of let-7b-5p, miR-28-3 and miR-877-5p in the total population of TNBC cells. In addition, some of the antitumor effects of metformin were validated since it was found to reduce viability, migration and clonogenic capacity in the TNBC models used in the Laboratory.

Finally, the combined treatment of metformin and let-7b-5p did not show synergism, an additive effect was observed in the reduction of MDA-MB-231 cell viability, as the combination of 1 mM metformin and let-7b-5p overexpression decreased cell viability to levels comparable to those achieved with 5 mM metformin alone, however, this additive effect was not observed in 4T1 cells. In relation to the migration capacity, the combination of metformin and let-7b-5p did not show synergism or an additive effect on the migration of MDA-MB-231 and 4T1 cells. Finally, regarding clonogenic capacity, the combined treatment was not found to result in a greater decrease, on the contrary, a significant negative interaction between both treatments was observed in the MDA-MB-231 line.

The findings highlight let-7b-5p as a tumor suppressor in TNBC. On the other hand, although the combined treatment of let-7b-5p and metformin gave encouraging results in the viability of MDA-MB-231 cells, further studies are needed to explore the benefit of combining these two compounds.

These results are an initial step towards the development of personalized therapies that combine miRNA mimics with repositioned drugs, reducing costs and toxicity, and allowing to address resistance to conventional treatments and high recurrence in this BC subtype.

Contenidos

Abreviaturas.....	11
Introducción.....	12
1. Cáncer de mama.....	12
1.1 Estadísticas y proyecciones a futuro.....	12
1.2 Clasificación.....	13
1.3 Tratamientos.....	15
1.4 Factores de riesgo.....	17
2. Metformina.....	20
2.1 Generalidades.....	20
2.2 Metformina en el CM.....	21
2.3 Metformina en el tratamiento del CM.....	21
2.4 Mecanismos antitumorales de la metformina en CM.....	25
3. Micro-RNAs.....	27
3.1 Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs.....	27
3.2 Rol de los miRNAs en la oncogénesis y progresión del CM.....	29
3.3 Terapias basadas en miRNAs para el tratamiento de CM.....	30
3.4 Metformina en la modulación de la expresión de miARNs.....	32
4. Antecedentes.....	33
Hipótesis.....	37
Objetivo General.....	37
Objetivos Específicos.....	37
Materiales y Métodos.....	37
1. Cultivo Celular.....	38
1.1 Líneas celulares.....	38
1.2 Condiciones de crecimiento.....	38
1.3 Cultivo de las líneas celulares.....	38
1.4 Descongelado de las líneas celulares.....	39
1.5 Conteo celular.....	39
2. Drogas.....	39
2.1 Metformina.....	39
2.2 <i>mimic</i> let-7b-5p.....	39

3. ARN.....	40
3.1 Extracción de ARN puro.....	40
3.2 Cuantificación del ARN.....	40
3.3 Análisis de la expresión de miARNs.....	41
3.4 Análisis de la expresión de ARNm.....	44
4. Ensayos in vitro.....	46
4.1 Ensayos de viabilidad celular.....	46
4.2 Ensayos de proliferación por conteo.....	46
4.3 Ensayos clonogénicos.....	46
4.4 Ensayos de migración.....	47
4.5 Ensayos de adhesión.....	47
5. Generación de células 4T1 con expresión transiente de let-7b-5p.....	48
6. Análisis estadísticos y gráficos.....	48
Resultados.....	49
Rol de let-7b-5p en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN.....	49
1. La sobreexpresión de let-7b-5p en la línea celular estable MDA-MB-231-Let-7b.....	49
2. La sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la viabilidad celular de las líneas de CMTN.....	50
3. La sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la capacidad clonogénica de células MDA-MB-231.....	51
4. La sobreexpresión de let-7b-5p no afectó la capacidad de adhesión de células CMTN.....	52
5. La sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la migración de las células MDA-MB-231....	52
Efecto de la metformina en la modulación de la expresión de miRNAs en células de CMTN.....	53
1. La metformina no moduló la expresión de let-7b-5p, mir-28-3p y mir-877-5p en líneas de CMTN.....	53
Rol de la metformina en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN.....	55
1. La metformina disminuyó la viabilidad celular y la proliferación en las líneas de CMTN.	56
2. La metformina a altas dosis disminuyó la capacidad clonogénica en la línea celular MDA-MB-231.....	57
3. La metformina no moduló la capacidad de adhesión de las células de CMTN a las dosis testeadas.....	58

4. La metformina disminuyó la migración de células 4T1, pero no en células de la línea MDA-MB-231.....	59
Respuesta en cuanto a proliferación, migración y clonogenicidad de células de CMTN del tratamiento conjunto de metformina y let-7b-5p.....	61
1. El tratamiento con metformina 1 mM y let-7b-5p disminuyó la viabilidad de MDA-MB-231 aún más que el tratamiento simple con esa dosis de metformina.....	61
2. La transfección con el <i>mimic</i> de let-7b-5p no mejoró el efecto de la metformina en la viabilidad de células 4T1.....	62
3. La metformina y let-7b-5p modulan la capacidad clonogénica de MDA-MB-231 de manera independiente.....	63
4. El tratamiento con metformina 1 mM y let-7b-5p disminuyó la migración de las células MDA-MB-231 en mayor medida que el tratamiento simple con let-7b-5p y el tratamiento simple con esa dosis de metformina.....	64
5. El tratamiento combinado no redujo el área de migración de las células 4T1 en mayor medida que el tratamiento solo con let-7b-5p o con altas dosis de metformina.....	66
Efecto de let-7b-5p en la expresión de genes relacionados con la migración, proliferación y fenotipo stem en células de CMTN.....	68
Discusión y perspectivas a futuro.....	70
Conclusiones.....	82
Bibliografía.....	84

Abreviaturas

AASM = Alteraciones asociadas al síndrome metabólico

AMPK = Proteína quinasa activada por AMP

ARNm = ARN mensajeros

BCS = Cirugía de conservación de la mama

CM = Cáncer de mama

CMTN = Cáncer de mama triple negativo

CSC = Células madre cancerosas

EMT = Transición epitelial a mesenquimatosa

ER = Receptor de estrógeno

HER2 = Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

IGF-1 = Factor de crecimiento similar a la insulina 1

MAPK = Proteína quinasa activada por mitógenos

miARNs = MicroARNs

NCEP = Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol

OncomiRs= miARNs oncogénicos

PI3K = Fosfatidilinositol-3-quinasa

PR = Receptor de progesterona

pri-miARN = miARNs primarios

REDD1 = Regulador en el daño del ADN 1

RISC= Complejo complejo de silenciamiento inducido por ARN

ROS = Especies reactivas de oxígeno

SFB = Suero fetal bovino

SM = Síndrome metabólico

TRH = Terapia de reemplazo hormonal

TsmiRs = miARNs supresores tumorales

Introducción

1. Cáncer de mama

1.1 Estadísticas y proyecciones a futuro

El cáncer de mama (CM) representa un desafío significativo para la salud mundial. En el año 2022, se registraron aproximadamente 2,3 millones de casos de CM según el Observatorio Global del Cáncer, siendo el primer cáncer en incidencia y mortalidad en mujeres en el mundo sin considerar a los cáncer de piel no melanoma (Figura 1) (Bray *et al.*, 2024).

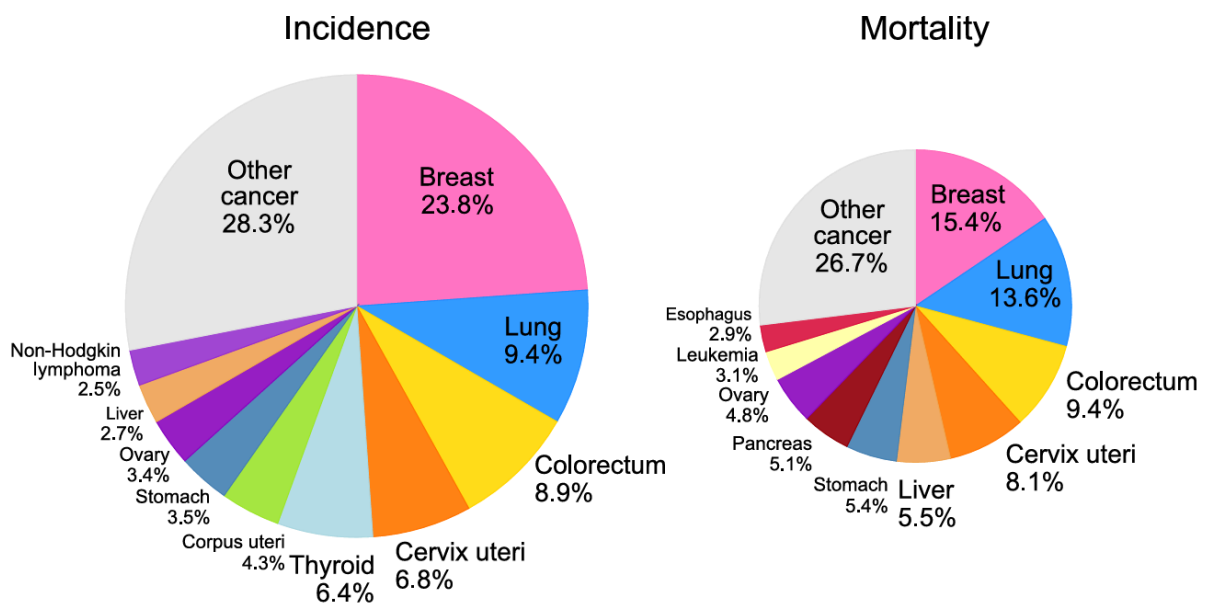


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial en mujeres en 2022. Extraída de (Bray *et al.*, 2024).

En Argentina, según datos del Instituto Nacional del Cáncer, se registraron 5.750 muertes por esta enfermedad en el año 2022, lo que equivale a una tasa bruta de 24,4 defunciones por cada 100.000 mujeres (Instituto Nacional del Cáncer, 2024). A su vez, el CM es el cáncer de mayor incidencia y mortalidad en mujeres en Argentina (Bray *et al.*, 2024).

A nivel global, para el año 2040 se prevé que los diagnósticos de CM aumenten en más del 40%, hasta alcanzar unos 3 millones de casos cada año. De igual manera, se estima que las muertes por CM aumenten más del 50%, de 685.000 en 2020 a un millón en 2040 (Figura 2) (Arnold *et al.*, 2022).

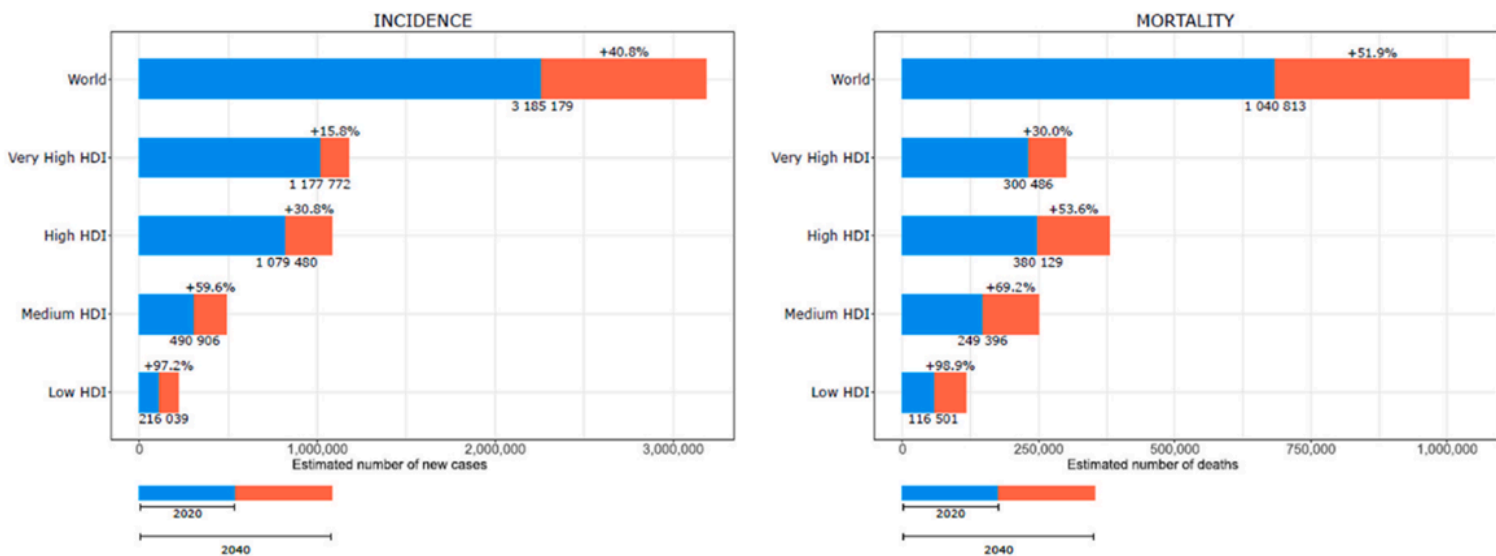


Figura 2. Proyecciones de incidencia y mortalidad por CM previstas en 2040, por nivel de Índice de Desarrollo Humano (HDI). Extraída de (Arnold *et al.*, 2022).

1.2 Clasificación

Los CM son heterogéneos, ya que presentan distintas características tanto morfológicas como biológicas, lo que resulta en comportamientos clínicos diversos y respuestas diferentes a los tratamientos (Tsang *et al.*, 2019). La primera clasificación desarrollada fue la histológica, la cual se basa en el patrón de crecimiento y las características citológicas de las células tumorales, donde los CM se clasifican en carcinoma in situ y carcinoma invasivo o infiltrante. Ambos, se subclasifican en ductal o lobulillar (Malhotra *et al.*, 2010). La clasificación histológica ha sido una valiosa herramienta durante varias décadas, sin embargo, no es capaz de mostrar la heterogeneidad en el comportamiento biológico de estos tumores ni permite predecir con precisión qué pacientes responderán mejor a las distintas opciones de tratamiento (Irigoyen *et al.*, 2011).

Debido a las limitaciones que presenta la clasificación histológica surgió la clasificación molecular, donde mediante inmunohistoquímica se evalúa la presencia de marcadores moleculares en las células tumorales. Estos marcadores son: el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador nuclear de proliferación Ki-67. En función de la presencia o ausencia de los marcadores moleculares mencionados, el CM se clasifica en cuatro subtipos (Goldhirsch *et al.*, 2013; Tsang *et al.*, 2019):

- Luminal A: ER⁺, PR⁺ ≥ 20%, HER2⁻, Ki-67 < 20%
- Luminal B: ER⁺, PR⁺ < 20% y/o HER2⁺ y/o Ki-67 ≥ 20%
- HER2 positivo: ER⁻, PR⁻ y HER2⁺
- Triple negativo: ER⁻, PR⁻ y HER2⁻

El subtipo de cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por ser agresivo y en general se asocia con un peor pronóstico en comparación con otros subtipos de CM. El CMTN comprende entre el 15 y 20% de los CM diagnosticados y los pacientes no se benefician de las terapias endocrinas y las terapias dirigidas son ineficaces debido a la ausencia de ER, PR y HER2. El tratamiento principal suele ser la quimioterapia a pesar de su limitado beneficio (Won *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2020).

Gracias a las tecnologías de alto rendimiento se ha corroborado la heterogeneidad de los CM a nivel molecular. Estudios basados en los perfiles de expresión génica de 496 genes clasificaron a los CM en cuatro subtipos intrínsecos: Luminal, HER2 positivo, basal-like (BL) y normal-like (Perou *et al.*, 2000). El subtipo luminal se caracteriza por perfiles de expresión génica que se asemejan a las células epiteliales luminales normales de la mama y poseen una alta expresión de genes asociados con la activación de ER. Mientras que, el subtipo HER2 positivo se caracteriza por la sobreexpresión de genes asociados a la señalización de HER2 y suelen seguir un curso clínico agresivo. Finalmente, los del subtipo basal-like están asociados con la expresión de genes de células basales mamarias normales y muestran sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación, pero carecen de expresión de genes relacionados con ER, PR y HER2 (Perou *et al.*, 2000). Más adelante, se desarrollaron distintas clasificaciones basadas en la detección de genes, entre ellos PAM50, MammaPrint y OncotypeDX, que permiten clasificar el CM en distintos subtipos moleculares, aportando información sobre el pronóstico y la respuesta a distintos tratamientos (Prat *et al.*, 2011). En particular, PAM50 clasifica los tumores de CM en los subtipos luminal A, luminal B, HER2 positivo y basal-like, en base al perfil de expresión de 50 genes específicos (Parker *et al.*, 2009). El subtipo intrínseco basal-like tiene una superposición del 80 % con el CMTN, según el panel de expertos de la 13th St Gallen International Breast Cancer Conference (Goldhirsch *et al.*, 2013). Asimismo, un estudio reveló que el 84 % de los casos de CMTN corresponde al subtipo PAM50 basal-like (Asleh *et al.*, 2023).

Sin embargo, el costo y las complejidades técnicas limitan la aplicación de los perfiles de expresión génica en la práctica diaria, por lo que, la clasificación molecular basada en la identificación de los distintos marcadores moleculares mediante inmunohistoquímica continúa siendo la más utilizada en la clínica (Tsang *et al.*, 2019).

1.3 Tratamientos

Los tratamientos que se usan actualmente en el CM se dividen en tratamientos locales y en tratamientos sistémicos. Los tratamientos locales van dirigidos directamente al tumor mientras que los sistémicos recorren todo el organismo (American Cancer Society, *Tratamiento para el cáncer de seno*, 2024).

1.3.1 Tratamientos locales

1.3.1.1 Cirugía

La cirugía es un tratamiento común en el CM y puede tomar distintas formas en función de cada caso específico. Los dos tipos principales de cirugía para extirpar el CM son la cirugía de conservación de la mama (BCS) y la mastectomía. La BCS es una cirugía donde se extirpa el tumor y parte del tejido normal circundante. Por otro lado, la mastectomía consiste en una cirugía en la que se extirpa toda la mama, incluido todo el tejido mamario y a veces otros tejidos cercanos (American Cancer Society, *Cirugía contra el cáncer de seno*, 2024).

1.3.1.2 Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento que utiliza rayos o partículas de alta energía para eliminar las células tumorales. Dependiendo del estadio del CM y de distintos factores, la radioterapia se puede utilizar en varias situaciones, después de la BCS para evitar que el cáncer regrese en la misma mama o se disemine a los ganglios linfáticos cercanos. También se utiliza después de una mastectomía, en particular cuando el tumor se encuentra en ciertos márgenes quirúrgicos, como la piel o los músculos. La radioterapia de haz externo es el tipo de radioterapia más común para mujeres con CM. Este enfoque consiste en la aplicación de radiación desde una máquina externa al cuerpo, que se enfoca específicamente en el área afectada por el cáncer (American Cancer Society, *Radioterapia para el cáncer de seno*, 2024).

1.3.2 Tratamientos sistémicos

1.3.2.1 Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento con drogas farmacológicas citotóxicas que suelen presentar mayor selectividad contra células de rápida división, como las tumorales (Mayo Clinic, 2024). Puede administrarse por vía intravenosa u oral. Este tratamiento se puede emplear en diferentes momentos: después de la cirugía (quimioterapia adyuvante) para destruir células cancerosas residuales y reducir el riesgo de recurrencia, antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante) para disminuir el tamaño del tumor y facilitar la extracción de este y en etapas avanzadas para tratar el cáncer metastásico. Los efectos secundarios comunes incluyen caída del cabello, fatiga, diarrea, aumento de la probabilidad de infecciones entre otras (American Cancer Society, *Quimioterapia contra el cáncer de seno*, 2024).

1.3.2.2 Terapia hormonal

Las células tumorales de CM del subtipo luminal poseen los receptores hormonales ER y PR. La terapia hormonal busca bloquear esta interacción hormona-receptor para inhibir el crecimiento y la propagación del cáncer. Este tipo de tratamiento se utiliza frecuentemente como terapia adyuvante para reducir el riesgo de recurrencia o en algunos casos como terapia neoadyuvante para reducir el tamaño del tumor previo a la cirugía. Existen varios tipos de medicamentos utilizados en la terapia hormonal. Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno, como el tamoxifeno y el toremifeno, impiden que el estrógeno interactúe con los receptores en las células tumorales. Por otro lado, los inhibidores de aromatasa disminuyen la producción de estrógeno en el organismo, lo cual puede ayudar a retrasar el crecimiento tumoral o prevenir su reaparición (American Cancer Society, *Terapia hormonal contra el cáncer de seno*, 2024).

1.3.2.3 Terapia dirigida

La terapia dirigida inhibe específicamente moléculas blanco que desencadenan vías de señalización asociadas al crecimiento y supervivencia de las células tumorales. A diferencia de la quimioterapia, la terapia dirigida minimiza el daño a los tejidos sanos, lo que reduce los efectos secundarios (Ye *et al.*, 2023).

En el subtipo HER2 positivo, se utilizan anticuerpos monoclonales diseñados para adherirse al receptor HER2 de las células tumorales, bloqueando así señales que promueven la proliferación o supervivencia. En el subtipo luminal, se han desarrollado inhibidores específicos que bloquean proteínas clave en la regulación del ciclo celular, como CDK4/6 y mTOR, reduciendo así la proliferación celular tumoral (American Cancer Society, *Terapia dirigida para el cáncer de seno*, 2024).

En CMTN, se usan inhibidores de las enzimas PARP para las pacientes que presentan mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Las PARP desempeñan funciones cruciales en muchos eventos celulares, incluido el proceso de reparación del DNA, por lo que la inhibición de estas enzimas provoca la muerte de las células tumorales (Groelly *et al.*, 2023). También se utilizan conjugados anticuerpo-fármaco, éstos consisten en anticuerpos monoclonales conjugados con un medicamento quimioterapéutico. En el caso del CMTN, los anticuerpos están dirigidos específicamente contra la proteína Trop-2 llevando el fármaco quimioterapéutico a las células de este subtipo tumoral (American Cancer Society, *Terapia dirigida para el cáncer de seno*, 2024).

1.4 Factores de riesgo en CM

Existen varios factores relacionados con un mayor riesgo de desarrollar CM en mujeres, estos incluyen factores hormonales, reproductivos, genéticos, de estilo de vida, entre otros. A continuación, se describen los más importantes.

1.4.1 Factores hormonales

Numerosos estudios demostraron una asociación entre el uso de pastillas anticonceptivas orales y un mayor riesgo de desarrollar CM (Bhadoria *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2009; Laamiri *et al.*, 2015). Sin embargo, un trabajo mostró que este riesgo disminuyó entre 5 y 10 años después de suspender su uso (Zolfaroli *et al.*, 2018). Del mismo modo, un estudio epidemiológico demostró que el uso de terapia de reemplazo hormonal (TRH) aumenta el riesgo de desarrollar CM. Específicamente, se observó que el uso de hormonas sintéticas está asociado con un aumento tanto en la tasa de mortalidad como en el riesgo de desarrollar CM. Además, se evidenció que las mujeres que usan una combinación de estrógeno y progesterona tienen un mayor riesgo respecto a aquellas que usan otros métodos de TRH (Beral, 2003).

1.4.2 Factores reproductivos

Varios estudios han observado que una edad más joven durante la primera menstruación (menarquia) aumenta el riesgo de CM (Bhadoria *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Laamiri *et al.*, 2015). En particular, un estudio con casi 12 mil mujeres evidenció que una menarquia temprana se asocia con un mayor riesgo de desarrollar CM (Wu *et al.*, 2006). Asimismo, las mujeres que experimentaron una menopausia tardía (pasada los 50 años) se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar CM (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

Por otra parte, se ha demostrado una asociación entre no haber tenido hijos (nuliparidad) y un mayor riesgo de CM. La disminución de los niveles de estrógeno y progesterona o la diferenciación del tejido mamario debido al embarazo son mecanismos que se han propuesto para explicar el efecto protector del embarazo en el riesgo de desarrollar CM (Khalis *et al.*, 2018). Por otra parte, un estudio reciente demostró que la lactancia materna es un factor protector en el CM. En particular, se evidenció que la lactancia materna redujo en un 20% el riesgo de desarrollar CMTN y entre en un 22% y 50% en mujeres portadoras de mutaciones BRCA1 (Stordal, 2023).

1.4.3 Factores genéticos y familiares

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son factores de riesgo importantes en el desarrollo de CM. Un estudio evidenció que mutaciones en estos genes, que se heredan de manera autosómica dominante, son responsables de aproximadamente el 40% de los casos de CM hereditario (Cobain *et al.*, 2016). Las portadoras de la mutación BRCA1 tienen un riesgo del 55% al 65% de desarrollar CM a los 70 años, mientras que las portadoras de la mutación BRCA2 tienen un riesgo del 45% (Momenimovahed & Salehiniya, 2019). Los antecedentes familiares de CM también aumentan el riesgo a desarrollar la enfermedad, las mujeres negativas en mutaciones BRCA con antecedentes familiares de la enfermedad presentan aproximadamente 11 veces más probabilidades de desarrollar CM (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

1.4.4 Estilo de vida

El consumo en exceso de alcohol y el consumo de tabaco aumentan el riesgo de desarrollar CM (Momenimovahed & Salehiniya, 2019). En particular, un estudio demostró

que la exposición al tabaquismo pasivo aumentó el riesgo de desarrollar CM del subtipo luminal (Tong *et al.*, 2014).

Por otra parte, la obesidad y el sobrepeso, particularmente después de la menopausia, aumentan el riesgo de desarrollar CM. El exceso de tejido adiposo facilita una mayor conversión de precursores androgénicos en estrógeno, el cual puede estimular el crecimiento de células cancerosas. A su vez, los altos niveles de insulina en sangre presente en las mujeres con sobrepeso está relacionado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

Finalmente, el síndrome metabólico (SM) también representa un factor de riesgo para el desarrollo de CM. Es importante abordar este tema ya que tanto los miARNs estudiados en esta Tesina como la metformina están asociados al SM.

1.4.5 Síndrome metabólico

1.4.5.1 Definición

Existen diferentes criterios para su definición, siendo los de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) y la Federación Internacional de Diabetes los más utilizados. En particular, el NCEP, define el SM como la presencia de tres o más de los siguientes factores de riesgo en una mujer (Alberti *et al.*, 2009; «Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.», 2002):

1. **Obesidad abdominal:** Circunferencia de cintura mayor a 88 cm (35 pulgadas).
2. **Triglicéridos:** Mayor o igual a 150 mg/dL.
3. **Colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL):** Menor a 50 mg/dL.
4. **Presión arterial:** Mayor o igual a 130/85 mmHg.
5. **Glucosa en ayunas:** Mayor o igual 110 mg/dL.

1.4.5.2 Síndrome metabólico y CM

Varios estudios han reportado una asociación entre el SM y un mayor riesgo de desarrollar CM en mujeres. En especial, las mujeres posmenopáusicas que poseen SM tienen

un riesgo aún mayor a desarrollar CM (Bhandari *et al.*, 2014; Capasso *et al.*, 2010). Asimismo, en numerosos estudios se ha observado que el SM aumenta la agresividad y metástasis en CM (Bhandari *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2015; Capasso *et al.*, 2010; Cleveland *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2007). Además, un estudio retrospectivo encontró que el SM es más prevalente en mujeres con CMTN respecto a otros subtipos de CM (Maiti *et al.*, 2010).

2. Metformina

2.1 Generalidades

La metformina (1,1-dimetilbiguanida) es un medicamento oral antidiabético ampliamente prescrito, considerado de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo 2 debido a su eficacia y perfil de seguridad favorable (Nathan *et al.*, 2009). Asimismo, figura en la lista de medicamentos esenciales de la OMS, destacándose como una herramienta fundamental en la gestión de esta patología (Bailey, 2017). La metformina reduce los niveles de glucosa en sangre principalmente a través de la disminución de la gluconeogénesis hepática y el aumento de la sensibilidad a la insulina (Heckman *et al.*, 2017; Rena *et al.*, 2017).

Más allá de su impacto en la regulación de la glucosa, la metformina ha mostrado una amplia gama de efectos pleiotrópicos positivos. Se ha demostrado por ejemplo que disminuye la disfunción endotelial, reduce la morbilidad cardiovascular por insuficiencia cardíaca y presenta propiedades antiinflamatorias (Salvatore *et al.*, 2020; Salvatore *et al.*, 2021).

En 2005, se observó por primera vez que los pacientes con diabetes tipo 2 que tomaban metformina presentaban un menor riesgo de desarrollar cáncer, sugiriendo posibles propiedades antitumorales de este fármaco (Evans *et al.*, 2005). Desde entonces, múltiples estudios han informado una asociación entre el uso de metformina y una reducción en la incidencia y mortalidad por cáncer, lo que ha generado un gran interés en investigar su potencial como agente anticancerígeno (Soranna *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2017).

2.2 Metformina en el CM

2.2.1 Efecto protector de la metformina en el CM

En el caso del CM hay discrepancias acerca del efecto protector de la metformina en el riesgo y la mortalidad del CM. Algunos estudios observaron un papel preventivo de la metformina en el CM en mujeres posmenopáusicas (Col *et al.*, 2012; Chlebowski *et al.*, 2012). Estudios posteriores encontraron que no existe una reducción significativa en la incidencia de CM con el uso de metformina.

La mayoría de los estudios demuestran un impacto positivo de la metformina en la mortalidad por CM (Kim *et al.*, 2015; Tang G *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015), sin embargo, es necesario tener cuidado ya que estos estudios fueron observacionales y sus resultados son heterogéneos.

2.3 Metformina en el tratamiento de CM

2.3.1 In vitro y en modelos animales

La metformina ha demostrado potenciar algunos tratamientos quimioterapéuticos y revertir resistencia a fármacos en CM tanto en ensayos *in vitro* como en modelos animales (Cufí *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2011; Hirsch *et al.*, 2009; Lee J *et al.*, 2019).

No obstante, el efecto de la metformina sería dependiente de las dosis utilizadas. Mientras que estudios *in vitro* utilizando dosis comparables a las dosis utilizadas en humanos para el tratamiento de la diabetes tipo II (“dosis bajas”, 0,1 mM) indican que la metformina actuaría sobre la población de células madre tumorales (CSC); otros estudios evaluando dosis más altas demostraron un efecto sobre las células tumorales totales.

Así, la combinación de metformina, a “dosis bajas”, con agentes quimioterapéuticos como doxorrubicina, paclitaxel y carboplatino ha demostrado ser más eficaz que la quimioterapia sola para suprimir el crecimiento tumoral y prevenir la recaída en modelos de xenotransplantes derivados de células de CM ER-Src, BT-474, MDA-MB-231 y MCF10A ER-Src (Hirsch *et al.*, 2009; Iliopoulos *et al.*, 2011). Asimismo, estos estudios evidenciaron que la combinación de metformina con una dosis reducida de doxorrubicina (1 mg/kg) fue tan eficaz como la dosis estándar de doxorrubicina (4 mg/kg) para inhibir el crecimiento tumoral y prevenir la recaída en modelos de xenoinjerto de ratón. (Iliopoulos *et al.*, 2011). Además,

este y otros estudios evidenciaron que a “dosis bajas” la metformina actúa de manera específica sobre las CSC, en contraposición con los agentes quimioterapéuticos que suelen ser efectivos en las células tumorales totales disminuyendo su viabilidad (Hirsch *et al.*, 2009; Cufi *et al.*, 2012; Iliopoulos *et al.*, 2011). Por otra parte, el trabajo de Hirsch y colaboradores demostró que el tratamiento conjunto de “bajas dosis” de metformina junto con tamoxifeno disminuyó la capacidad de migración de células MCF10A ER-Src con respecto al tratamiento con tamoxifeno como única droga (Hirsch *et al.*, 2009).

Por otro lado, varios estudios han evaluado el efecto de altas dosis de metformina *in vitro* en distintos modelos de CM. En líneas celulares de CM HER2+ resistentes a trastuzumab, el tratamiento combinado de metformina y trastuzumab redujo significativamente la subpoblación de CSC. Además, se evidenció que en modelos *in vivo* utilizando xenoinjertos de JIMT-1, la metformina como agente único redujo significativamente el volumen tumoral en comparación con el grupo control y el grupo tratado con trastuzumab. Además, la combinación de metformina y trastuzumab resultó en una reducción aún mayor del volumen tumoral (Cufi *et al.*, 2012). Sumado a ello, la metformina también ha mostrado efectividad para superar la resistencia al cisplatino en CMTN, mediante la regulación negativa en la expresión de RAD51. En este estudio, la combinación de una dosis de 5mM de metformina y cisplatino disminuyó la viabilidad, migración e invasión de células de CMTN Hs 578T y MDA-MB-231 (Lee J *et al.*, 2019). Además, en combinación con cisplatino la metformina inhibió significativamente la migración e invasión celular en comparación con los tratamientos individuales. En un modelo murino inoculado con células 4T1, la combinación de metformina y cisplatino redujo significativamente el volumen y el peso del tumor en comparación con el cisplatino solo (Lee J *et al.*, 2019). Del mismo modo, Alimova y colaboradores estudiaron el efecto de distintas concentraciones de metformina en distintas líneas celulares de CM del subtipo luminal B (MCF-7/713 y BT-474), luminal A (MCF-7) y HER2+ (SKBR-3). Este estudio demostró que la metformina inhibe la proliferación celular y capacidad clonogénica de manera dependiente de la dosis. A una concentración de 50 mM, la metformina disminuyó la proliferación celular en un 85% en las líneas BT-474 y SKBR-3, mientras que en la línea celular MCF-7 disminuyó en un 57% en comparación con los controles no tratados. En cuanto a la capacidad clonogénica, la metformina redujo la formación de colonias a concentraciones tan bajas como 2 mM. A la

concentración de 50 mM, la formación de colonias se redujo en más del 90% en comparación con los controles (Alimova *et al.*, 2009).

A su vez, Liu y compañía estudiaron el efecto de distintas dosis de metformina en la proliferación y capacidad clonogénica en cuatro líneas celulares de CMTN (MDA-MB-468, BT20, MDA-MB-231 y BT549). En los ensayos de proliferación celular, la metformina inhibió la proliferación celular en las cuatro líneas celulares de CMTN. El IC50 fue inferior a 5 mM en tres de las cuatro líneas celulares y 10 mM en las células MDA-MB-231 (Liu B *et al.*, 2009). Este IC50 es más bajo que el reportado previamente (≥ 10 mM) en líneas celulares de CM de otros subtipos (Alimova *et al.*, 2009). En los ensayos clonogénicos, la concentración inhibitoria más baja para células de CMTN MDA-MB-468 y MDA-MB-231 fue de 1 mM (Liu B *et al.*, 2009). En conjunto, estos hallazgos demuestran el potencial de esta estrategia de un tratamiento combinado.

2.3.2 Ensayos clínicos

Un estudio observacional realizado con 2529 pacientes con CM en etapa temprana tratados con quimioterapia primaria, evaluó el impacto de la metformina en la respuesta de las pacientes a la terapia. Los resultados mostraron que los pacientes diabéticos que tomaban metformina presentaron una tasa de respuesta patológica completa mayor (24%) en comparación con los pacientes diabéticos tratados con otros antidiabéticos (8%) y los pacientes no diabéticos (16%) (Jiralerspong *et al.*, 2009). Estos resultados sugirieron el potencial de la metformina como un agente complementario en el tratamiento del CM, desencadenando estudios clínicos para evaluar su efectividad.

En el tratamiento del CM en etapa temprana, un ensayo clínico en fase II investigó la eficacia y seguridad del tratamiento neoadyuvante del trastuzumab en combinación con metformina. Si bien observaron una tendencia hacia una mayor probabilidad de respuesta completa en las pacientes tratadas con metformina, no se observaron diferencias significativas. No obstante, se demostró que la metformina en el esquema de tratamiento testeado fue bien tolerada y segura para las pacientes (Martin-Castillo *et al.*, 2018). A su vez, otro ensayo clínico de fase III, investigó el uso de metformina en mujeres no diabéticas con CM en estadio temprano en un contexto adyuvante. Los resultados mostraron que las pacientes del subtipo HER2+ tratadas con metformina experimentaron mejoras en la supervivencia libre de enfermedad y

en la supervivencia global (Goodwin, 2021). Del mismo modo, un estudio en pacientes con CM del subtipo HER2+, que no logró demostrar la superioridad de lapatinib y trastuzumab con respecto a trastuzumab como tratamiento adyuvante, encontró un efecto positivo de la metformina en la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de enfermedad a distancia y en la supervivencia global en los pacientes ER+ (Sonnenblick *et al.*, 2017).

Sin embargo, no todos los resultados han mostrado efectos positivos de la metformina, por ejemplo, un estudio que investigó la relación entre el uso de metformina y la supervivencia en pacientes diabéticos con CMTN que recibieron tratamiento adyuvante no observó impacto significativo de la metformina. Si bien los pacientes que no usaron metformina mostraron un mayor riesgo de desarrollar metástasis en comparación con el grupo que tomaba metformina, no se encontró una relación significativa entre el uso de metformina y la mortalidad específica por cáncer (Bayraktar *et al.*, 2012).

Por otro lado, en el tratamiento de CM metastásico, los ensayos clínicos realizados no observaron un efecto beneficioso de la metformina al combinarla con agentes quimioterapéuticos estándar como la doxorubicina, la ciclofosfamida o capecitabina (Nanni *et al.*, 2019; Pimentel *et al.*, 2019). Asimismo, en un ensayo clínico de fase I que combinó a la metformina con un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en pacientes con CMTN metastásico previamente tratados, no se observaron beneficios clínicos significativos (Fenn *et al.*, 2020).

A pesar de que los primeros ensayos clínicos con metformina no mostraron resultados prometedores, es fundamental continuar con su estudio debido a los hallazgos obtenidos en ensayos preclínicos, donde ha demostrado dirigirse selectivamente a las CSC. Estas células, aunque menos abundantes que las células tumorales diferenciadas, desempeñan un papel crucial en la resistencia a tratamientos y la recurrencia del cáncer, gracias a su capacidad de autorrenovarse, diferenciarse en células progenitoras tumorales y evadir terapias convencionales. La metformina ha demostrado inhibir la proliferación, autorrenovación, metástasis y EMT de las CSC, reduciendo su capacidad invasiva y metastásica. Además, puede sensibilizarlas a agentes quimioterapéuticos, revirtiendo la resistencia a estos tratamientos y mejorando su eficacia. Estos efectos posicionan a la metformina como una opción terapéutica prometedora para prevenir la recurrencia del cáncer y abordar tumores

resistentes. Actualmente, se están desarrollando varios ensayos clínicos para evaluar el potencial de la metformina en combinación con otros tratamientos, los resultados de estos ensayos podrían abrir nuevas oportunidades para el tratamiento de tumores resistentes y la prevención de la recurrencia del CM (Samuel *et al.*, 2020).

2.4 Mecanismos antitumorales de la metformina en CM

Se han propuesto numerosos mecanismos que explican la actividad antitumoral de la metformina. Estos mecanismos se pueden clasificar en términos generales en efectos directos y efectos indirectos (Figura 3):

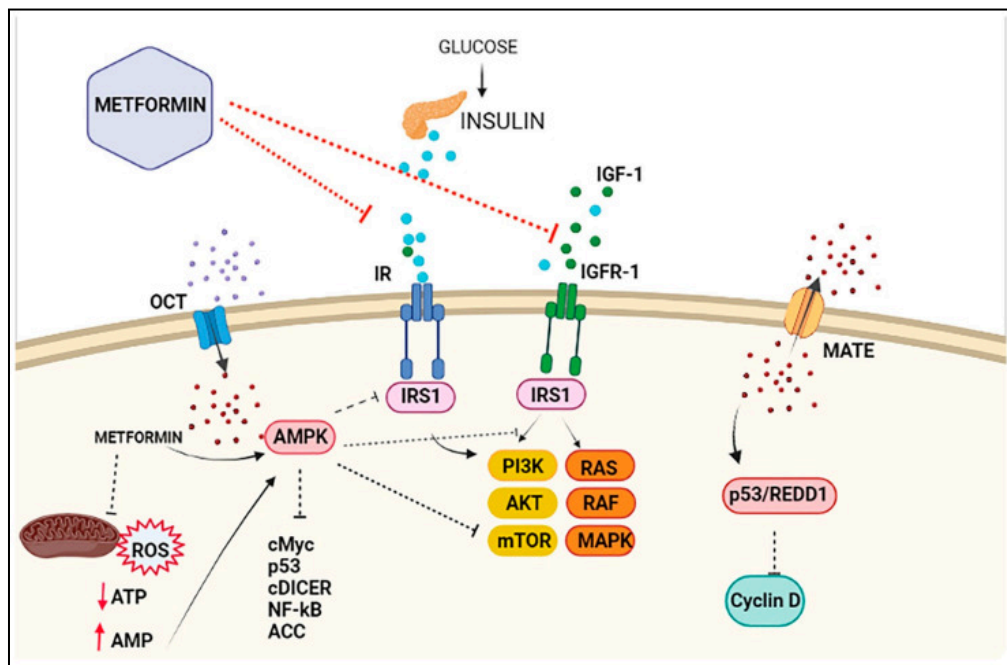


Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de la metformina en células de CM. Extraído de (Cejuela *et al.*, 2022).

2.4.1 Mecanismos indirectos

Los mecanismos indirectos de la metformina se consideran dependientes de la insulina y se basan en la reducción de los niveles sanguíneos de glucosa, insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). Estos factores son conocidos por promover el riesgo y la progresión del cáncer. Al disminuir los niveles circulantes de estos factores, la metformina inhibe las vías de señalización que estos desencadenan, entre las cuales se encuentran las vías de la Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la vía de las MAP quinasa

(MAPK), ambas críticas en la proliferación y supervivencia celular. Además, estas vías de señalización están comúnmente desreguladas en las células tumorales, promoviendo la invasión, desregulación de la transición epitelial a mesenquimatoso (EMT), angiogénesis, entre otras (Cejuela *et al.*, 2022).

Asimismo, se ha demostrado que la metformina regula negativamente otras moléculas que estimulan el crecimiento tumoral, incluyendo factores de crecimiento, hormonas sexuales y citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina-6 (Mallik & Chowdhury, 2018).

2.4.2 Mecanismos directos

Los mecanismos directos de la metformina se pueden dividir en dos: los dependientes de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y en los independientes de AMPK.

2.4.2.1 Mecanismos dependientes de AMPK

La metformina entra en las células a través de transportadores de cationes orgánicos, lo que favorece su acumulación intracelular. Mientras tanto, los transportadores de extrusión de múltiples fármacos y toxinas expulsan la metformina de la célula. Por lo tanto, se ha demostrado que los niveles de expresión de estos transportadores determina la disposición celular de la metformina (Cai *et al.*, 2019).

Una vez dentro de la célula, la metformina activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). La activación de AMPK resulta en la inhibición de vías de señalización clave, como resultado, se bloquea la actividad de proteínas efectoras como MAPK y mTOR, cruciales para la proliferación y supervivencia celular (Cejuela *et al.*, 2022).

2.4.2.2 Mecanismos Independientes de AMPK

Una vez que la metformina ingresa a la célula, puede dirigirse directamente al complejo respiratorio I de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, inhibiendo su función. Esta inhibición reduce los niveles de ATP y aumenta la relación AMP/ATP, lo que lleva a una activación indirecta de AMPK. Sin embargo, la inhibición del complejo mitocondrial I también tiene efectos independientes de AMPK, como la inducción de estrés metabólico, que incrementa los niveles endógenos de especies reactivas de oxígeno

(ROS). Este aumento provoca un estrés oxidativo que puede conducir a la muerte de células tumorales (Cejuela *et al.*, 2022).

Además de su acción sobre el complejo mitocondrial I, la metformina también regula positivamente la expresión del regulador en el daño del ADN 1 (REDD1). REDD1 es un inhibidor de mTOR y su expresión aumentada por la metformina conduce a la inhibición de mTOR a través de la activación del supresor tumoral p53. Esta inhibición resulta en la detención del ciclo celular en la fase dependiente de la ciclina D (Cejuela *et al.*, 2022).

3. Micro-ARNs

3.1 Biogénesis y mecanismo de acción de los miARNs

Los microARNs (miARNs) son moléculas cortas de ARN no codificante (20 a 23 nucleótidos), que regulan la expresión génica mediante la degradación o la represión de la traducción de ARNm (Bartels & Tsongalis., 2009). Los miARNs se generan a través de una vía altamente controlada y regulada (Figura 4). Se transcriben mediante las ARN polimerasas II o III en miARNs primarios (pri-miARNs), los cuales contienen estructuras de horquillas o *stem-loop* (Borchert *et al.*, 2006; Lee Y *et al.*, 2004).

El procesamiento inicial de los pri-miARNs ocurre en el mismo núcleo y es mediado por el complejo Drosha, que está compuesto por Drosha, una ribonucleasa tipo ARNasa III, y una proteína de unión al ADN. El complejo Drosha escinde las hebras 3' y 5' de la estructura de *stem-loop* de los pri-miARNs, generando así pre-miARNs. Estos pre-miARNs conservan la estructura *stem-loop* y poseen aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, posteriormente, los pre-miARNs son exportados al citoplasma mediante la Exportina 5 (Bartels & Tsongalis., 2009).

En el citoplasma, el complejo enzimático que incluye a Dicer, una endonucleasa de tipo ARNasa III, escinde los pre-miARNs en un dúplex de miARN-miARN (Takahashi *et al.*, 2015). En el dúplex de miARNs una de las hebras se denomina -5p y la otra -3p dependiendo de en qué extremo con respecto al *stem-loop* se encuentren. Luego, una de las hebras maduras de cadena simple del dúplex de miARNs es integrada al complejo complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Cullen, 2004; Hammond, 2015; O'Brien *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2015). Qué hebra se asocia con RISC depende de varios factores, desde el contexto celular hasta su secuencia. En algunos casos, una hebra puede asociarse con mayor afinidad por RISC

mientras que la otra se degrada, sin embargo, también puede ocurrir que ambas hebras se asocien a RISC (Han *et al.*, 2006; Ro *et al.*, 2007). La selección del miARN maduro que se incorpora en el complejo RISC depende de dos factores principales: la estabilidad y la estructura del dúplex miARN-miARN. Usualmente, se selecciona el miARN maduro que presenta menor estabilidad en su extremo 5', ya que su afinidad para incorporarse al complejo RISC es mayor, lo cual facilita su posterior unión con el ARNm objetivo (Ro *et al.*, 2007).

RISC regula la expresión de genes diana, uniéndose a secuencias complementarias de los ARNs mensajeros blanco generalmente en la región 3' no traducida (UTR), ya sea mediante represión traduccional o mediante degradación del ARNm. La complementariedad perfecta o casi perfecta entre la secuencia del miARN y el ARNm blanco da como resultado la degradación de este, mientras que, la complementariedad imperfecta parcial entre el miARN y el ARNm objetivo provoca protuberancias y desajustes lo que da como resultado la inhibición de la traducción (Bartels & Tsongalis., 2009; Hutvagner *et al.*, 2012).

En contraste con el supuesto general de que los miARNs son reguladores negativos de la expresión génica a nivel post-transcripcional, existe evidencia que sugiere que algunos miARNs podrían regular positivamente la expresión génica en tipos de células y condiciones específicas (Vasudevan., 2012).

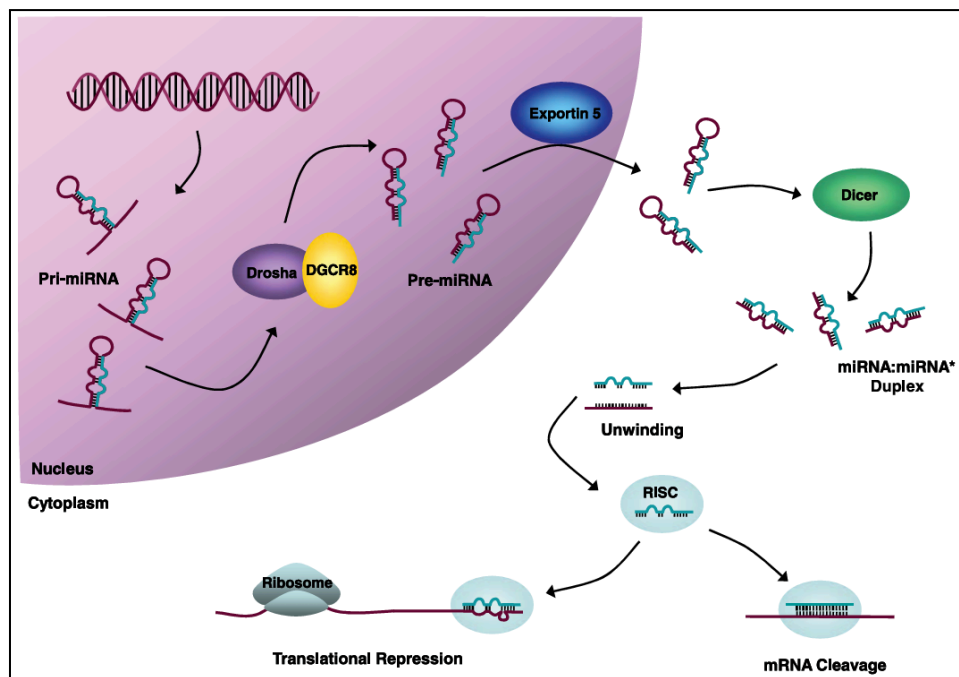


Figura 4. Descripción general de la vía de procesamiento de miARNs. Extraído de (Bartels & Tsongalis., 2009).

3.2 Rol de los miARNs en la oncogénesis y progresión del CM

Los miARNs desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica y su expresión estrictamente controlada es fundamental para diversos procesos celulares. La desregulación de miARNs se ha asociado con numerosas condiciones patológicas, incluido el cáncer (Figura 5) (Muñoz *et al.*, 2023). En el contexto del cáncer, ciertos miARNs pueden actuar como oncogenes, conocidos como oncomiRs, contribuyendo activamente al desarrollo tumoral. Los oncomiRs ejercen su función inhibiendo negativamente genes supresores de tumores y facilitando así el desarrollo del cáncer. Estos miARNs están involucrados en la regulación de la diferenciación celular o del ciclo celular, y promueven la activación de vías de señalización de proliferación, angiogénesis e invasión (Szczepanek & Tretyn, 2022; Muñoz *et al.*, 2023). Existen numerosos miARNs reportados como oncomiRs en CM, tales como el miR-10b, miR-21, miR-210, miR-155 y miR-183 (Muñoz *et al.*, 2023).

Por otro lado, algunos miARNs actúan como supresores de tumores (tsmiRs) y pueden inhibir la expresión de oncogenes que promueven la tumorigénesis. Su disminución en la expresión puede contribuir a la proliferación celular descontrolada, la resistencia a la apoptosis y la inestabilidad genómica, lo que promueve el desarrollo y la progresión del CM (Muñoz *et al.*, 2023).

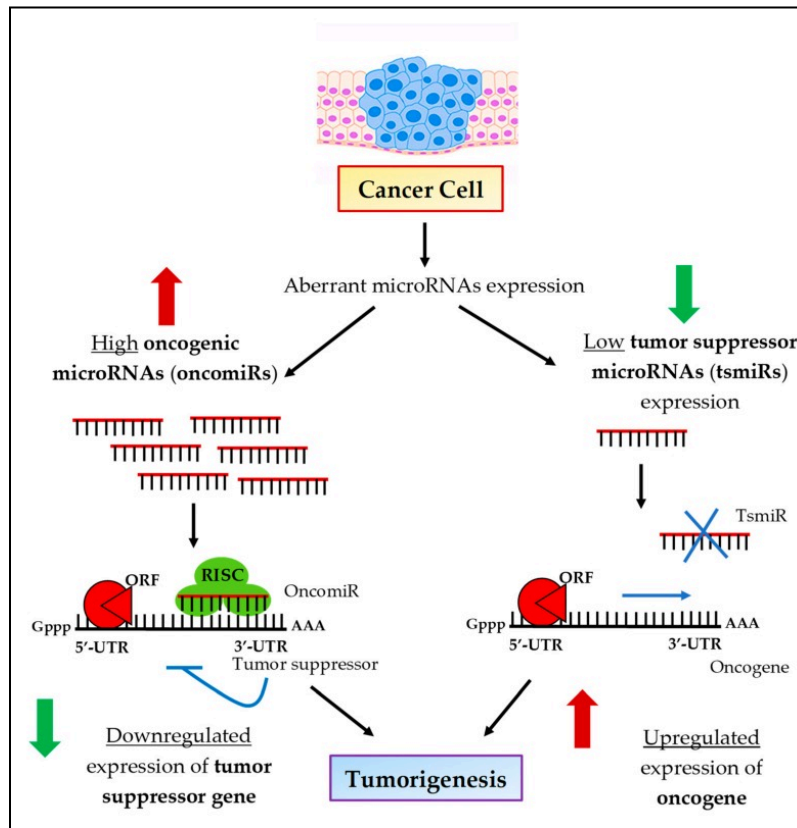


Figura 5. Mecanismos de miARNs oncogénicos y supresores de tumores. Extraído de (Loh *et al.*, 2019).

Los perfiles de expresión de miARNs pueden variar incluso dentro de los subtipos de CM, estudios han demostrado que los diferentes subtipos tumorales exhiben patrones particulares de expresión de miARNs (Muñoz *et al.*, 2018). Incluso el contexto celular es importante, ya que en modelos de CMNT el miR-125p se reportó como un inhibidor del crecimiento celular (Li Y *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el miR-125b puede actuar como oncomiRs estimulando el crecimiento tumoral en CMTN (Nie *et al.*, 2019).

3.3 Terapias basadas en miARNs para el tratamiento de CM

Las terapias convencionales, como la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia hormonal, han mejorado significativamente la supervivencia de los pacientes con CM (Costa *et al.*, 2020). Sin embargo, las respuestas a estas terapias son heterogéneas, ya que algunos pacientes se benefician significativamente mientras que otros muestran una respuesta limitada. Esta variabilidad se debe en parte a que los diferentes subtipos de CM responden de

manera diferente a cada tipo de tratamiento (Heiser *et al.*, 2012). Además de esta heterogeneidad intrínseca de los subtipos tumorales, la resistencia a los medicamentos y la recaída tumoral siguen siendo los principales desafíos que limitan la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CM. Estos desafíos destacan la necesidad urgente de desarrollar enfoques terapéuticos alternativos que aborden los factores moleculares específicos involucrados en la formación y progresión tumoral. En este contexto, los miARNs han surgido como una opción prometedora ya que pueden silenciar eficazmente genes blanco y regular simultáneamente múltiples vías genéticas implicadas en el cáncer. Esta capacidad multifuncional convierte a los miARNs en candidatos ideales para nuevas estrategias terapéuticas.

Dado que los miARNs pueden actuar tanto como oncomiRs o tsmiRs, se han propuesto varias estrategias para utilizarlos como posibles blancos terapéuticos en el tratamiento del CM (Figura 6). La inhibición de oncomiRs podría restaurar la expresión de genes supresores de tumores e inhibir vías de señalización oncogénicas, suprimiendo así el crecimiento tumoral y la metástasis (Santos-Carballal *et al.*, 2015; Tang L *et al.*, 2017). Por otro lado, los miARNs supresores de tumores pueden ser restaurados mediante el uso de imitadores de miARNs sintéticos (*miRNA mimics*). Reintroducir miARN supresores de tumores puede suprimir vías de señalización oncogénica aberrantes, lo que resulta en una reducción del crecimiento tumoral, aumento de la apoptosis y una mayor sensibilidad a la quimioterapia (Muñoz *et al.*, 2023).

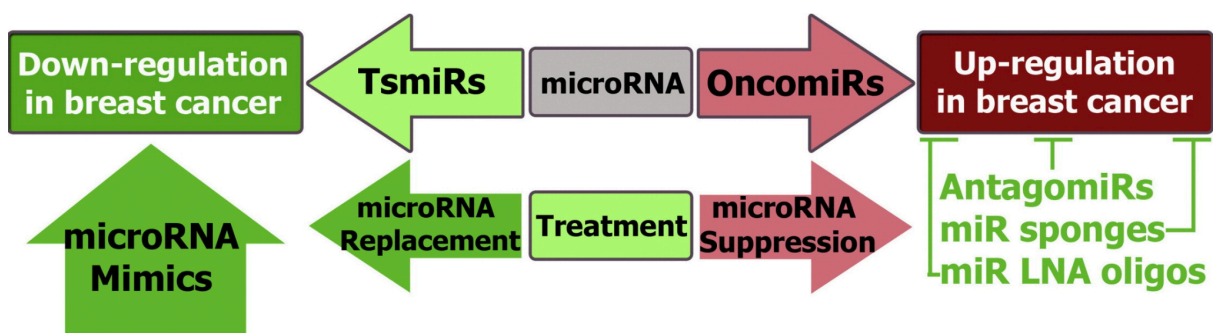


Figura 6. Estrategias terapéuticas basadas en miARNs contra el CM. Extraído de (Kaboli *et al.*, 2015).

Hoy en día las terapias candidatas con miARNs se encuentran en desarrollo preclínico o en ensayos clínicos de fase I y fase II. Sin embargo, aún no se han traducido en terapias aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

(Hanna *et al.*, 2019). Esto debido a que su aplicación clínica exitosa enfrenta varios desafíos importantes, por ejemplo, la posibilidad de que se produzcan efectos no deseados debido a la administración de los mismos. Además, la penetración de los miARNs en los tumores ha demostrado ser considerablemente ineficaz y las células tumorales exhiben una baja absorción de miARNs. Otro desafío importante es que los miARNs son inherentemente inestables y propensos a ser degradados por nucleasas en el torrente sanguíneo tras su administración al cuerpo. Para superar este desafío se están explorando varias estrategias de administración diferentes, incluidos vectores virales, nanopartículas y liposomas (Muñoz *et al.*, 2023).

3.4. Metformina en la modulación de la expresión de miARNs

Varios estudios han demostrado que la metformina puede ejercer sus efectos anticancerígenos a través de la modulación en la expresión de los miARNs, aumentando la expresión de tsmiRs o reduciendo la expresión de oncomiRs en distintos tipos de cáncer.

En líneas celulares de cáncer de páncreas, se ha encontrado que la metformina regula positivamente la expresión del miR-26a, miR-192 y let-7c. Donde la sobreexpresión de miR-26a inhibió la proliferación celular, la invasión y la migración, además de aumentar la apoptosis celular (Li W *et al.*, 2012). Otro estudio mostró que en pancreatosferas derivadas de células de cáncer de páncreas sensibles y resistentes a la gemcitabina, la metformina aumentó la expresión de let-7a, let-7b, miR-26a, miR-101, miR-200b y miR-200c, que generalmente están suprimidos en las células de cáncer de páncreas (Bao *et al.*, 2012).

Asimismo, en cáncer de pulmón de células no pequeñas, se ha observado que la metformina reduce la invasividad celular mediante la regulación positiva de miR-381, un miARN reportado como supresor tumoral en otros tipos de cáncer (Jin *et al.*, 2020).

En particular, en células de CM humano, la metformina no solo reguló positivamente la expresión de let-7a, un conocido miARN supresor de tumores, sino que también redujo la expresión de miARN-181a, un oncomiR asociado con la progresión tumoral (Oliveras-Ferraro *et al.*, 2011).

4. Antecedentes

Previamente en el Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, mediante microarreglos de expresión se identificaron 23 miARNs alterados en el plasma de mujeres con alteraciones asociadas al síndrome metabólico (AASM). Los miARNs que se encontraron alterados modulan funciones clave en el desarrollo de cáncer, como el ciclo celular, vías de señalización oncogénicas, señalización por proteoglicanos y componentes de la matriz extracelular (Moro *et al.*, 2023). Asimismo, mediante estudios bioinformáticos se encontró que el miR-28-3p y let-7b-5p, miARNs que se encuentran disminuidos en el plasma de pacientes con AASM, están también disminuidos en tumores primarios de pacientes con CM, mientras que el miR-877-5p, que se encuentra aumentado en plasma de pacientes con AASM, se encuentra también aumentado en tejido tumoral primario de pacientes con CM con respecto al tejido mamario normal. Además, la expresión del miR-877-5p se correlaciona con una menor supervivencia total de las pacientes con CM (Moro *et al.*, 2023). Al analizar la expresión del miR-877-5p y let-7b-5p en el tejido tumoral de pacientes con CM PAM50 basal-like, se observó que mientras que el primero se encuentra aumentado, el segundo se encuentra disminuido con respecto al tejido mamario normal y al tejido tumoral de los otros subtipos moleculares PAM50 (Grinpelc, 2023; Moro *et al.*, 2023).

A partir de esta información, el Laboratorio estudió el rol de let-7b-5p y miR-877-5p en el desarrollo y progresión del CMTN, así como su posible potencial terapéutico. Cabe destacar que el estudio del rol de estos dos miARNs en el CMTN es novedoso ya que existen pocos estudios que analicen su rol en CM y, en particular, en CMTN.

Así, por ejemplo, el miR-877-5p tiene un rol de supresor tumoral en cáncer hepatocelular y gástrico (Guo *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018) pero solo un trabajo analizó su función en CM. Liu y colaboradores propusieron un rol supresor tumoral para el miR-877-5p en células de CM luminal MCF-7, al dilucidar el rol de uno de sus genes blanco: cadena beta del fibrinógeno, en la proliferación, crecimiento tumoral y regulación de genes relacionados con la EMT (Liu H *et al.*, 2022). Sin embargo, en dicho estudio no se analizó el efecto directo de este miARN en dichos procesos, con lo cual debe tenerse cautela al respecto de estos resultados. Por otro lado, un estudio reveló que el ARN largo no codificante TRG-AS1, el cual actúa como esponja del miR-877-5p inhibiendo su función, se asocia con una menor incidencia de metástasis ósea, una mayor supervivencia

libre de enfermedad en pacientes con CM y una disminución en la proliferación e invasión celular en células metastásicas de CMTN, MDA-MB-231 (Zhu *et al.*, 2023).

Mientras que let-7b-5p en muestras de tejido mamario, una expresión elevada de este miARN se asocia con un mejor pronóstico clínico en pacientes con CM ER+ (Sun *et al.*, 2016). Asimismo, niveles de expresión bajos de let-7b-5p se relacionan con una menor tasa de supervivencia libre de enfermedad y una disminución en la supervivencia global en pacientes con CM subtipo basal (Ju *et al.*, 2020). Por último, recientemente se demostró que células MDA-MB-231 transfectadas con un inhibidor de let-7b-5p generaron tumores con mayor tasa de crecimiento tumoral en comparación con las células control, cuando fueron inoculadas en ratonas (Li *et al.*, 2023). No obstante, estos trabajos no estudiaron el uso de let-7b-5p como agente terapéutico para el CMTN.

En el laboratorio se realizaron ensayos de proliferación, adhesión y migración de células 4T1 de CMTN con el objetivo de estudiar el rol de estos miARNs en estos procesos. Además, se llevaron a cabo estudios *in vivo* utilizando como modelo animal ratones balb/c.

En el caso del miR-877-5p, se observó que al silenciar la expresión del miR-877-5p de manera transiente mediante la transfección de un inhibidor específico utilizando PEI, disminuyó la viabilidad y adhesión celular pero no se observaron alteraciones en la capacidad de migración. Más aún, el tratamiento con una dosis de un inhibidor del miR-877-5p indujo una disminución en el tamaño de tumores generados a partir de células 4T1, en comparación con aquellos inoculados con nanopartículas de PEI conteniendo el control negativo (Grinpelc, 2023).

Por otro lado, la sobreexpresión transiente de let-7b-5p mediante la transfección con un *mimic* de let-7b-5p, resultó en un aumento en la viabilidad de las células 4T1 (Figura 7A). Además, se demostró que su capacidad de adhesión celular aumentó (Figura 7B) y la capacidad de migración disminuyó (Figura 7C). Al evaluar el efecto terapéutico de let-7b-5p en un modelo animal mediante el tratamiento con una única dosis de este miARN, se observó una disminución en el tamaño tumoral derivado de la inoculación con células 4T1 en ratonas Balb/c (Figura 7D)(Grinpelc, 2023).

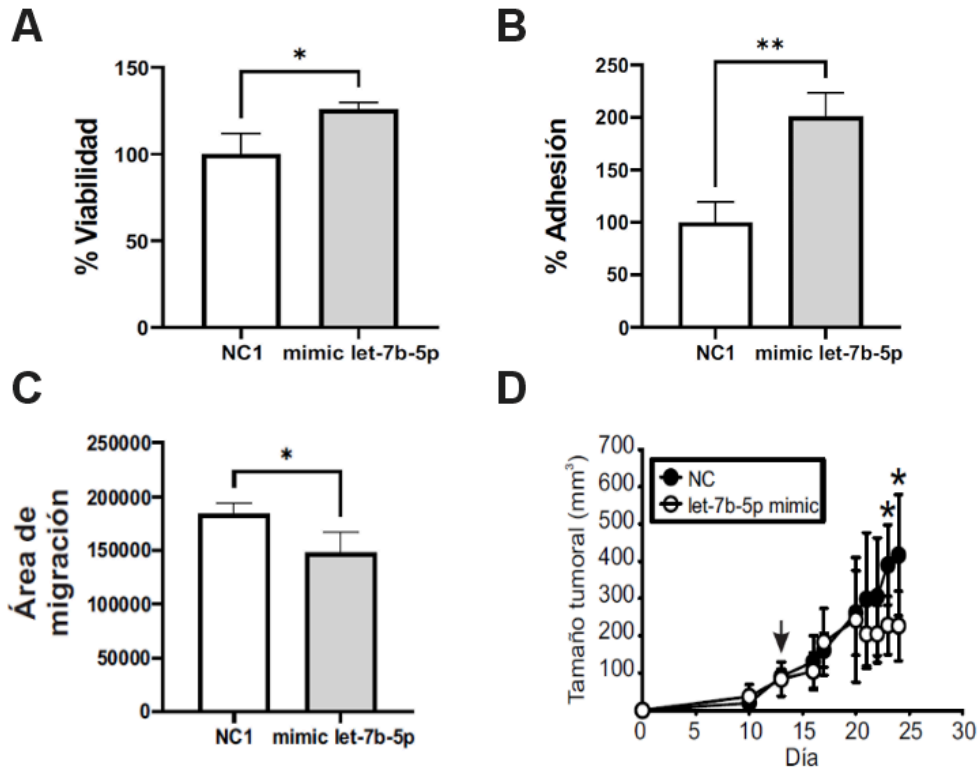


Figura 7. Rol de let-7b-5p en el CMTN. Efecto de la sobreexpresión transiente de let-7b-5p en la viabilidad celular (A), capacidad de adhesión (B) y migración de las células 4T1 (C); (D) Efecto del tratamiento con un miRNA *mimic* de let-7b-5p en el crecimiento de tumores derivados de células 4T1.

Adaptada de (Grinpelc, 2023).

Estos resultados representaron un gran avance para el laboratorio en el desarrollo de terapias para tratar el CMTN mediante el uso de miARNs *mimics* o inhibidores específicos. Sin embargo, los miARNs sintéticos siguen siendo herramientas costosas. Debido a esto, el Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos busca explorar otras alternativas terapéuticas, como por ejemplo reemplazar el uso de *mimics* por drogas cuyo blanco de acción sean los miARNs o el uso combinado de los *mimics* con drogas de menor costo pero que también tengan baja toxicidad, de modo de lograr minimizar la cantidad de *mimic* en un esquema terapéutico.

Una de esas alternativas terapéuticas es el reposicionamiento de drogas, un campo de investigación que no solo disminuye los costos, sino que también acelera el proceso de transferencia de una terapia a la clínica. Recientemente se han desarrollado herramientas que permiten identificar fármacos que pueden tener como objetivo a distintos miARNs. Por

ejemplo, la herramienta bioinformática SM2miR, registra 2925 relaciones entre 151 moléculas pequeñas y 747 miARNs de 17 especies, mediante la curación manual de aproximadamente 2000 publicaciones científicas. Utilizando esta herramienta bioinformática, el laboratorio identificó que la metformina disminuye la expresión de let-7b-5p en un modelo de cáncer de páncreas. En particular, se demostró que en pancreatosferas generadas a partir de células de cáncer pancreático, la metformina reduce la expresión de genes relacionados con el fenotipo de células madre y aumenta la expresión de varios miARNs, entre ellos let-7b-5p (Bao *et al.*, 2012). Esto resultó de gran interés para el laboratorio, ya que previamente se había demostrado que let-7b-5p está disminuido en el plasma de mujeres con AASM y en el tejido tumoral primario de pacientes con CM basal-like. Además, la metformina es un fármaco utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II, una patología que está relacionada con el SM.

A partir de estos antecedentes, surgen diversas líneas de investigación. Primero, evaluar si la metformina modula la expresión de let-7b-5p y de otros miARNs de interés en modelos de CMTN de manera similar a lo observado en cáncer de páncreas.

Por otra parte, evaluar si el efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la línea celular MDA-MB-231 es similar a lo mostrado en la línea 4T1 (Grinpelc, 2023), con el objetivo de robustecer los resultados del rol de let-7b-5p en la progresión del CMTN. Además, investigar los mecanismos moleculares por los cuales let-7b-5p modula *in vitro* fenotipos relacionados con el crecimiento y progresión del CMTN determinando la expresión de un panel de genes. De manera similar, aunque se ha demostrado que algunos miembros de la familia let-7 inhiben el fenotipo de células madre en CM (Bao *et al.*, 2012), no se ha determinado si let-7b-5p desempeña un papel similar en CMTN. Por lo tanto, resulta relevante investigar si let-7b-5p regula la expresión de genes asociados al fenotipo de células madre en CMTN.

Finalmente, otro aspecto interesante a estudiar es la posibilidad de combinar las dos terapias: metformina y let-7b-5p, ya que ambos tratamientos presentan una baja toxicidad, lo que podría ofrecer un mayor beneficio terapéutico en comparación con el uso individual de cada tratamiento. Y para ello, en primer lugar es necesario validar el efecto reportado previamente de la metformina en modelos de CMTN (Alimova *et al.*, 2009; Lee J *et al.*, 2019; Kwon *et al.*, 2019; Zakikhani *et al.* 2006; Liu *et al.*, 2009; Kawakita *et al.*, 2021) en los modelos de CMTN que son utilizados en el laboratorio.

Hipótesis

La hipótesis de este trabajo plantea que la metformina incrementa la expresión de let-7b-5p en células de CMTN. Además, se propone que let-7b-5p posee un rol de supresor tumoral en células de CMTN MDA-MB-231 modulando la expresión de genes asociados a la proliferación, adhesión, migración, invasión y fenotipo de CSC. Por último, en esta tesina se propone que el tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p resulta más efectivo como tratamiento antitumoral con respecto a cada simple tratamiento, reduciendo la proliferación, migración y la capacidad clonogénica en células de CMTN.

Objetivo general

Evaluar el rol de let-7b-5p en la sensibilidad y respuesta antitumoral de la metformina en células de CMTN.

Objetivos específicos

1. Determinar el rol de let-7b-5p en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN MDA-MB-231.
2. Evaluar el efecto de la metformina en la expresión de miARNs en células de CMTN.
3. Validar y analizar el efecto de metformina en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN.
4. Determinar si el tratamiento conjunto de metformina con un mimic para let-7b-5p mejora la respuesta en cuanto a proliferación, adhesión, migración y clonogenicidad de células de CMTN.
5. Determinar el efecto de let-7b-5p en la expresión de genes relacionados con la proliferación y progresión del CMTN.

Materiales y métodos

1. Cultivo celular

1.1 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares comerciales 4T1 y MDA-MB-231, ambas modelos de CMTN. La línea celular MDA-MB-231 fue establecida a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico. Por otro lado, 4T1 es una línea celular de un adenocarcinoma del tejido de la glándula mamaria derivado de una cepa de ratón BALB/c. Esta línea celular se asemeja al CMTN humano en estadio IV. También se utilizó la línea celular estable que sobreexpresa let-7b (MDA-MB-231-let-7b) y su respectiva línea control (MDA-MB-231-pSGIPX). Estas líneas fueron generadas previamente en el laboratorio mediante transducción con partículas lentivirales conteniendo el vector pSGIPX-let-7b, o bien, el vector control pLV-H1-SGIPX cedido gentilmente por el Dr. Yan Cui (Leibniz Institute on Aging, Fritz Lipmann Institute). El protocolo de transducción utilizado fue el descrito previamente por Grinpelc (Grinpelc, 2023).

1.2 Condiciones de crecimiento

Para la línea celular MDA-MB-231 y sus derivadas, se utilizó medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una mix de antibióticos compuesta por: estreptomicina (100 ug/mL), penicilina (100 U/mL) y anfotericina (0,5 ug/mL). Además, para la línea celular estable que sobreexpresa let-7b-5p (MDA-MB-231-let-7b) y su respectiva línea control (MDA-MB-231-pSGIPX), se añadió puromicina en una concentración de 4 µg/mL, como antibiótico de selección. Para la línea celular 4T1, se utilizó medio RPMI con la misma suplementación de SFB y mix de antibióticos. Todas las líneas celulares se mantuvieron en una estufa humidificada a 37°C y con 5% de CO₂.

1.3 Cultivo de las líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron en placas de 100 mm. Cuando las células llegaban a condiciones de saturación, aproximadamente un 80-90% de confluencia se procedió a subcultivar para asegurar el crecimiento de las células. Para esto, se retiró el medio de cultivo y en cada placa se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS (NaCl 137 mM; KCl

2,68 mM; Na₂HPO₄ 10,1 mM; KH₂PO₄ 1,78 mM; pH=7,4). Luego, en cada placa, se agregó 1 mL de tripsina (2,5 mg/mL y 0,5 mM de EDTA) y se incubó durante un minuto en la estufa humidificada. A continuación, se agregó 1 mL de medio de cultivo completo para neutralizar la acción de la enzima. Finalmente, se descartó el medio de cultivo necesario para diluir la concentración celular 1/4 o 1/8 y se agregó medio hasta alcanzar un volumen final de 6 mL.

1.4 Descongelado de las líneas celulares

Los criotubos fueron descongelados rápidamente a 37 °C y se transfirió el contenido a un tubo tipo falcon de 15 mL que contenía 7 mL de medio de cultivo completo. A continuación, se centrifugó a 400 g durante 5 minutos para decantar las células. Se retiró el sobrenadante por volcado y se resuspendió el pellet obtenido con 1 mL de medio de cultivo completo. Finalmente, se transfirió la suspensión celular a placas de 100 mm conteniendo 6 mL de medio de cultivo completo y se incubaron en la estufa humidificada.

1.5 Conteo celular

Para determinar la concentración de células en una suspensión celular, se utilizó el contador de células automatizado Countless II (Invitrogen). Para ello, después de cosechar las células por tripsinización, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se sembraron 10 µL en cada una de las cámaras específicas para conteo automático.

2. Drogas

2.1 Metformina

La metformina (ChemCruz) fue disuelta en agua para preparar una solución madre 1 M. A partir de esta solución madre, se realizaron distintas diluciones en medio de cultivo completo para obtener las concentraciones requeridas para los distintos experimentos: 0,1mM, 1mM, 5mM, 10mM y 20 mM.

2.2 Let-7b-5p mimic

El miRNA mimic de let-7b-5p (mirVana® miRNA mimic let-7b-5p, ThermoFisher Scientific) y su respectivo control (Scramble NC1, ThermoFisher Scientific) se disolvieron en agua libre de nucleasas a una concentración de 100 uM.

3. ARN

3.1 Extracción de ARN total

En cada placa de 60 mm, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS. Posteriormente, se añadieron 500 uL de Tri Reagent (Genbiotech) y mediante un raspador de células se recolectó por completo el lisado celular. Este lisado, se transfirió a un tubo tipo eppendorf de 1,5 mL y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 100 uL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó de 2-3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C con el objetivo de separar la fase acuosa de la fase orgánica. Posteriormente, se tomó cuidadosamente la fase acuosa (ARN) sin tocar la interfase (ADN) y se la transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL libre de ARNasas. A continuación, en cada tubo, se agregaron 250 uL de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante toda la noche con el objetivo de precipitar los miARNs. Al día siguiente, se centrifugó a 12000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron dos lavados del pellet obtenido con 1 mL de etanol 75% y se centrifugó a 7500 r.p.m durante 5 minutos a 4°C después de cada lavado. Luego, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet incubando las muestras a 60°C durante 5 minutos. Finalmente, los pellets fueron resuspendidos en 150 uL de agua libre de ARNasas y se rehidrataron incubando durante 10 minutos a 60°C. Las muestras se conservaron a -80°C.

3.2 Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN se realizó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific). Además, la pureza de las muestras se evaluó mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. La relación 260/280 se utilizó para verificar la presencia de contaminantes proteicos, mientras que la relación 260/230 se empleó para descartar la presencia de cloroformo o etanol.

3.3 Análisis de los niveles de expresión de miARNs

Para evaluar los niveles de expresión de miARNs se utilizó la técnica de *Stem-loop* RT-qPCR, conocida por su capacidad para superar los desafíos técnicos que conlleva analizar la expresión de miARNs mediante PCR (Chen *et al.*, 2005).

La técnica emplea una retrotranscripción específica que utiliza oligonucleótidos stem-loop diseñados específicamente para cada miARN. Estos oligonucleótidos stem-loop, se aparean a la región 3' de los miARNs ya que sus últimos 6 nucleótidos son complementarios al extremo 3' de cada miARN, permitiendo así su retrotranscripción específica. El ADNc resultante se cuantifica mediante qPCR donde se emplea un oligonucleótido sentido específico para cada miARN y un oligonucleótido antisentido universal, complementario a una secuencia dentro del oligonucleótido stem-loop utilizado en la retrotranscripción (Figura 1) (Chen *et al.*, 2005).

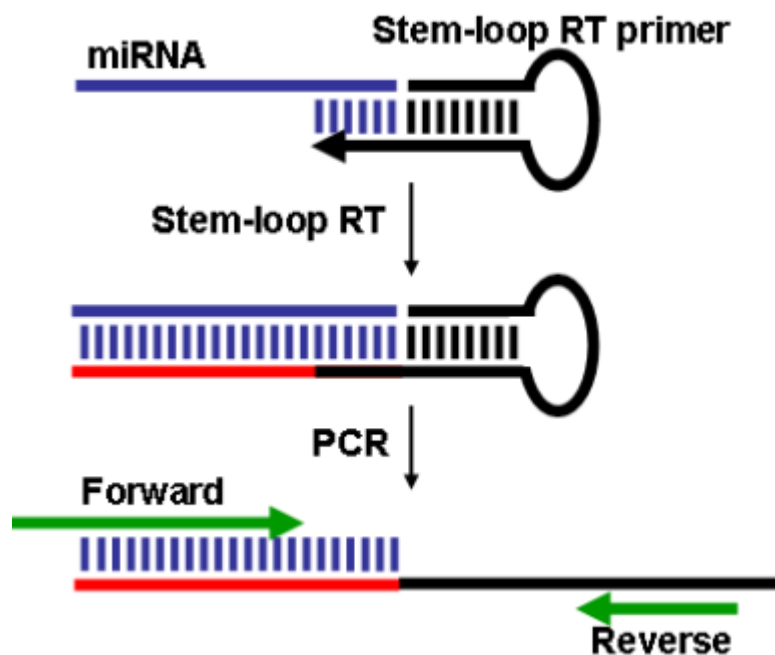


Figura 8. Técnica *Stem-loop* RT-qPCR (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

3.3.1 Retrotranscripción

Para la retrotranscripción, se utilizaron 100 ng de ARN en un volumen final de reacción de 20 μ L. La reacción incluyó: oligonucleótido stem-loop específico para cada miARN (0,05 μ M), dNTPs (0,5 mM), buffer de reacción (1X) y 200 U de la enzima M-MLV

RT de Promega. En primer lugar, el ARN junto con el oligonucleótido stem-loop específico se incubaron a 70°C durante 5 minutos en un volumen de 14 µL, con el objetivo de desnaturalizar las estructuras secundarias del ARN. Luego, se añadió la máster mix compuesta por los dNTPs, el buffer de reacción y la enzima M-MLV RT, llevando la reacción al volumen final de 20 µL. A continuación, se incubaron las muestras durante 30 minutos a 16°C, seguido de 60 minutos a 42°C y finalmente durante 2 minutos a 70°C para inactivar la enzima. Para cada línea celular se incluyó un control sin la enzima M-MLV RT, utilizando como templado un pool de ARNs de cada línea celular. Los oligonucleótidos Stem-loop utilizados en la retrotranscripción específica fueron:

miARN	Secuencia del oligonucleótido <i>Stem-loop</i>
U6	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAAAATATGG
Let-7b-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAACCAC
miR-877-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCCCTGC
mmu-miR-28a-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCCAGC
miR-28-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCCAGC

TABLA I. Oligonucleótidos Stem-loop.

3.3.2 qPCR

Para determinar la expresión de los distintos miARNs se utilizó el equipo CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). En un volumen final de reacción de 10 µL, se añadieron 1 µL de cDNA, primer sentido específico de cada miARN (0,1 µM), primer antisentido universal stem-loop (0,1 µM) y la mix de Roche FastStart Universal SYBR Green máster (1X). Los oligonucleótidos usados en la qPCR fueron:

miARN	Sentido oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Temperatura de apareamiento (°C)
Universal <i>stem-loop</i>	Anti-sentido	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	-

U6	Sentido	GGCGGCGCAAGGATGACACG	65
Let-7b-5p	Sentido	GGGCGGGTGAGGTAGTAGGTTG	60
miR-877-5p	Sentido	GGGCGGGTAGAGGAGATGGC	60
mmu-miR-28-3p	Sentido	GGCGGCACTAGATTGTGAGCT	65
miR-28-3p	Sentido	CGGGGGCACTAGATTGTGAGC	65

TABLA II. Oligonucleótidos miARNs.

Para la cuantificación de los niveles de expresión se utilizaron los valores de C_T (Cycle Threshold), que se refiere al número de ciclos de PCR necesarios para que la fluorescencia generada por el producto amplificado alcance un umbral preestablecido por el equipo, en el cual todas las curvas de amplificación se encuentran en fase exponencial. Los niveles de expresión se determinaron por el método del $\Delta\Delta C_T$ considerando una eficiencia de los oligonucleótidos del 100%. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando los niveles de expresión de U6 como control interno y con los niveles de expresión del grupo control, lo que proporcionó una referencia para evaluar los cambios en la expresión génica en las distintas condiciones experimentales.

Se utilizaron 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas. Además, en cada reacción se agregaron dos controles: uno contenía agua y otro el pool de ARNs donde no se agregó la enzima M-MLV RT durante la retrotranscripción específica. Esto con el objetivo que durante la qPCR únicamente se amplifiquen y se cuantifiquen los cDNAs de interés. El protocolo de ciclado utilizado con Bio-Rad CFX96 Real-Time System fue el siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
50	2:00
95	10:00
95	0:15
T _{annealing}	0:15
60	1:00
72	1:00
Curva de fusión	

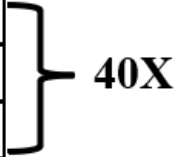


TABLA III. Protocolo de ciclado qPCR.

3.4 Análisis de los niveles de expresión de ARNm

3.4.1 Retrotranscripción

Para la retrotranscripción, se utilizó 1 µg de ARN en un volumen final de reacción de 25 µL. La reacción incluyó: Oligo dT (0,02 µg/µL), dNTPs (0,5 mM), buffer de reacción (1X) y 200 U de M-MLV RT de Promega. Previo a la adición de la máster mix, el ARN fue incubado junto con el oligo dT en un volumen de 15 µL a 70°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió la máster mix que contenía: el buffer de reacción, los dNTPs y la enzima, llevando la reacción al volumen final. A continuación, las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 42°C y una incubación final a 70°C durante 2 minutos. Además, por cada línea celular se incluyó una reacción sin la adición de la enzima M-MLV RT, utilizando como templado un pool de ARNs de cada línea celular.

3.4.2 qPCR

Para determinar la expresión de los distintos genes se utilizó el equipo CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). En un volumen final de reacción de 10uL, se añadieron 1uL de cDNA, primer forward (0,1uM), primer reverse (0,1 uM) y la mix de Roche FastStart Universal SYBR Green máster (1X). Los oligonucleótidos usados en la qPCR fueron los siguientes:

Gen	Secuencia del oligonucleótido sentido	Secuencia del oligonucleótido anti-sentido	Temperatura de apareamiento (C°)
GAPDH	CAGTCAGCCGCATC TTCTTTTG	ACCAGAGTTAAAAGC AGCCCT	60
Ciclina D	GCGGAGGAGAACA AACAGAT	TGAGGCGGTAGTAGG ACAGG	60
Fibronectina	GCTCATCCGTGGTT GTATCAGG	TGGTCTGCTTGTC AGTGTCC	58
Vimentina	GTGAAGTGGATGCC CTTAAAG	CAATAGTGCCTGGT AGTTAGC	58
Cadherina	TATCGTCCCCGTCC TGCCAATC	AGAACCACTGCCCTC GTAATCG	58
c-Myc	TCAAGAGGTGCCA CGTCTCC	TCTTGGCAGCAGGAT AGTCCTT	60
BRCA1	TGGAGATGACGAG TCAGGGATGGG	CAGGGCACAAGGGT CCGCTAGG	57
CDKN1A	CCCTTGTGCCTCGC TCAG	CGTTTGGAGTGGTAG AAATCTGTC	60
CTBP1	TGTACCATACCATC AACTGACCAG	CAGGGTGGAGTCTGC CGTTTCTTC	60

TABLA IV. Oligonucleótidos ARNm.

Al igual que en los miARNs, los niveles de expresión se determinaron por el método del $\Delta\Delta C_T$ considerando una eficiencia de los oligonucleótidos del 100%. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando los niveles de expresión de GAPDH como control interno para la línea celular MDA-MB-231. Además, se normalizó con los niveles de expresión del grupo control lo que proporcionó una referencia para evaluar los cambios en la

expresión génica en las distintas condiciones experimentales. El protocolo de ciclado fue el mencionado anteriormente (TABLA III)

4. Ensayos *in vitro*

4.1 Ensayos de viabilidad celular

Las células fueron cosechadas y se determinó la concentración celular como se mencionó anteriormente. En una placa de 96 pocillos, se plaquearon 4,000 células por pocillo en un volumen final de 150 μ L de medio de cultivo completo. Seguidamente, se incubó la placa en la estufa humidificada. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se lo reemplazó con medio de cultivo suplementado con 1% de SFB durante 72 hs, o medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina durante 48 hs, en función de las condiciones específicas establecidas para cada experimento. Después del tiempo de incubación, el medio de cultivo fue retirado cuidadosamente de cada pocillo. A continuación, en cada pocillo se añadieron 60 μ L de medio de cultivo conteniendo 10 μ L del reactivo comercial MTS (Promega). Para cada ensayo se realizaron al menos 3 réplicas biológicas con cuadruplicados técnicos. Además, se agregaron 2 pocillos que únicamente contenían esta solución que se usaron como blanco de reacción. Finalmente, se incubó la placa en la estufa entre 2 y 4 horas en oscuridad y se determinó la absorbancia a 492 nm usando el lector ELISA Multiskan FC (ThermoFisher Scientific). El cálculo de las dosis inhibitorias 50 (IC50) se realizó con el programa CombeneFit v2.02 (Di Veroli *et al.*, 2016).

4.2 Ensayo de proliferación celular por conteo de células

Se prepararon placas de 24 pocillos conteniendo 200000 células por pocillo, en un volumen final de 1 mL de medio de cultivo completo. A las 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo por medio con diferentes concentraciones de metformina. Al cabo de 48 horas, se cosecharon las células de cada pocillo mediante tripsinización y se determinó la concentración celular como se indicó anteriormente.

4.3 Ensayos clonogénicos

Se sembraron células en placas de cultivo de 60 mm y 100 mm, 360 y 1000 células, respectivamente. Las células en las placas de 60 mm se cultivaron en un volumen final de 3

mL de medio de cultivo completo, mientras que las células en las placas de 100 mm se cultivaron en un volumen final de 6 mL. En el caso de los ensayos con metformina, al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo con diferentes dosis de esta droga. Posteriormente, las placas se incubaron en la estufa humidificada realizando cambios de medio de cultivo cada 5 días aproximadamente. Las placas se incubaron en la estufa hasta que los focos de células ocuparan un campo del microscopio a un aumento 200X o fueran visibles a simple vista. Posteriormente, en cada placa, se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS, para las placas de 60 mm, o 5 mL, en el caso de las placas de 100 mm, y los focos fueron fijados por incubación con 3 mL o 5 mL de metanol puro, dependiendo del tamaño de la placa, durante 15 minutos. Seguidamente, se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS, se descartó el líquido y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, los focos formados se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,1% y metanol al 20% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó la solución de cristal violeta y se lavaron las placas con agua destilada hasta que los focos se distinguen con claridad.

4.4 Ensayos de migración

En placas de 24 pocillos, se plaquearon 300000 células por pocillo en un volumen final de 1mL de medio de cultivo completo. Cuando se alcanzó una confluencia del 100% en los pocillos, se realizó una herida uniforme raspando el fondo de los pocillos con un tip. A continuación, se descartó el medio de cultivo y en cada pocillo se realizaron 2 lavados con PBS. Luego, se agregó medio de cultivo nuevo o medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina. Posteriormente, se incubó la placa en la estufa humidificada. El proceso de migración se visualizó mediante la captura de imágenes a diferentes tiempos utilizando un microscopio acoplado a una cámara Q-Color5 Digital Camera (OLYMPUS). Se tomaron imágenes al tiempo 0 y a las 18 horas.

4.5 Ensayos de adhesión

Tras cosechar las células y determinar la concentración celular, en una placa de 96 wells, se sembraron 40000 células por pocillo en un volumen final de 150 μ L de medio de cultivo. Luego, se incubó la placa en la estufa durante 3 horas. Posteriormente, se descartó el líquido de cada pocillo y se realizaron dos lavados con 100 μ L de PBS. A continuación, las células se fijaron con 100 μ L de metanol puro y se incubó a temperatura ambiente durante 10

minutos. A partir de esta etapa, se agregaron 2 pocillos que se usaron como blanco de reacción. Seguidamente, se descartó el metanol y se realizó un lavado adicional con PBS. Las células se tiñeron agregando 100 μ L de una solución de cristal violeta al 0,5 % en metanol 20% durante 10 minutos. A continuación, se descartó el cristal violeta y se realizaron tres lavados con 100 μ L de agua destilada. El cristal violeta retenido por las células adheridas se resuspendió agregando, en cada pocillo, 60 μ L de una solución de metanol. Finalmente, se midió la absorbancia a 550 nm utilizando un lector de ELISA Multiskan FC (ThermoFisher Scientific).

5. Generación de células 4T1 con expresión transiente de let-7b-5p

Para la transfección transiente de células 4T1 con let-7b-5p (mirVana® miRNA mimic let-7b-5p, ThermoFisher Scientific) o su control negativo correspondiente (scramble NC1, ThermoFisher Scientific). Primero, se descartó el medio de cultivo de los pocillos en los cuales fueron sembradas las células y se realizaron dos lavados con PBS. A continuación, se preparó la solución transfectante. Esta contenía una concentración final, en cada pocillo, de una cantidad de oligonucleótido tal que durante la transfección tenga una concentración 30nM y PEI en una proporción de 5:1 (PEI:oligo). La solución se incubó durante 8 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó la solución transfectante en cada pocillo y se incubó durante 5 horas en la estufa. Transcurrido este tiempo, el medio fue retirado y reemplazado por medio de cultivo completo que contenía distintas concentraciones de metformina.

6. Análisis estadísticos y gráficos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SigmaPlot. Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos analizados con el fin de aplicar test estadísticos con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. En los casos donde dichos supuestos no se cumplieron se realizaron análisis estadísticos con pruebas no paramétricas. Por otro lado, los gráficos presentados en esta tesina se elaboraron utilizando el software GraphPad (versión 9.4.2). El criterio utilizado para determinar la significancia fue un $p<0,05$. En las figuras, los asteriscos indican un nivel de significancia de p , siendo * un valor de $p < 0.05$, ** un $p < 0.01$ y *** representa un $p < 0.001$.

Resultados

Rol de let-7b-5p en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN

Previamente el Laboratorio demostró que la sobreexpresión de let-7b-5p aumentó la viabilidad y adhesión de las células 4T1 y disminuyó su capacidad de migración (Grinpelc, 2023). Para robustecer los resultados y terminar de conocer el rol de let-7b-5p en CMTN, se estudió el rol de este miARN en la línea celular MDA-MB-231.

Para ello, previamente en el laboratorio se generaron líneas celulares derivadas de MDA-MB-231 con sobreexpresión de let-7b (MDA-MB-231-let-7b) o células control (MDA-MB-231-pSGIPX) mediante la transducción con partículas lentivirales conteniendo el plásmido de expresión de este miARN (pSGIPX-let-7b) o el vector control (pSGIPX) (Vera Sanchez, 2022).

1. Sobreexpresión de let-7b-5p en la línea celular estable MDA-MB-231-let-7b

En primer lugar, mediante Stem-loop-RT-qPCR se determinó los niveles de expresión de las células estables derivadas de MDA-MB-231 generadas previamente en el laboratorio. Se observó que las células MDA-MB-231-let-7b presentaron una expresión de let-7b-5p significativamente mayor respecto a las células control MDA-MB-231-pSGIPX (Figura 9).

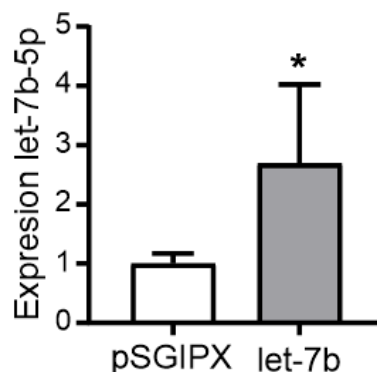


Figura 9. Sobreexpresión de let-7b-5p en células estables MDA-MB-231. Se determinó la expresión mediante Stem-loop-RT-qPCR. Los niveles de expresión se normalizaron con los niveles de expresión de U6 como control interno y con las células de la línea celular control

(MDA-MB-231-pSGIPX). Se utilizaron 3 réplicas biológicas con duplicados técnicos. Para evaluar la significancia, se realizó una prueba t paramétrica, donde * representa un $p < 0,05$.

2. La sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la viabilidad celular de las líneas de CMTN

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la viabilidad celular, se utilizaron células MDA-MB-231-let-7b y células de la línea control, en el caso de 4T1, se utilizaron células transfectadas con un *mimic* de let-7b-5p o con su respectivo control negativo NC1 (Ver *Materiales y métodos*). Las células se incubaron durante 72 horas con medio de cultivo suplementado con 1% de SFB, o bien durante 48 horas en medio completo. Posteriormente se realizó un ensayo de MTS para determinar la viabilidad celular. La sobreexpresión de let-7b-5p no afectó la viabilidad de las células MDA-MB-231 y 4T1 en condiciones de privación de suero. Sin embargo, en condiciones óptimas de cultivo, let-7b-5p disminuyó la viabilidad de las células MDA-MB-231 y 4T1 (Figura 10).

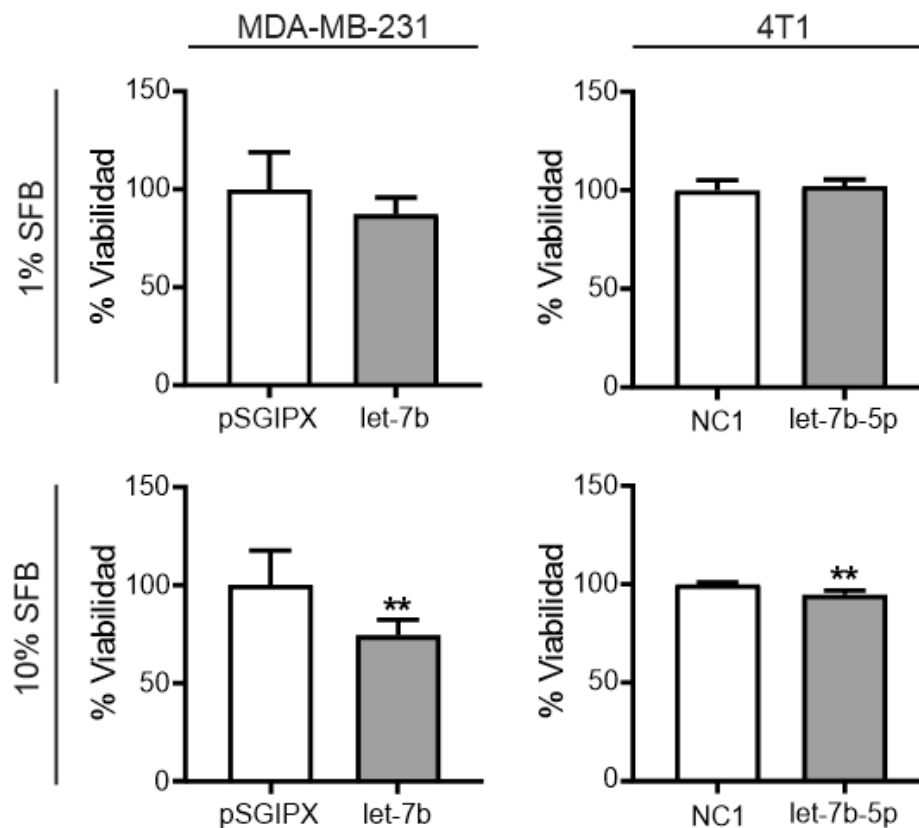


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la viabilidad de células de CMTN. Ensayos de MTS incubando a las células MDA-MB-231 y 4T1 con medio de cultivo suplementado con 1% o

10% de SFB. La figura correspondiente a la línea celular MD-MB-231 con 10% SFB corresponde al mismo experimento mostrado en la Figura 20. Los resultados se normalizaron considerando una viabilidad celular del 100% en la línea celular control (pSGIPX) para la línea MDA-MB-213 o bien las células transfectadas con el control para la línea 4T1. Se utilizaron 6 réplicas biológicas en el caso de MDA-MB-231 y 3 réplicas biológicas en 4T1, para ambos casos se hicieron cuadruplicados técnicos. Se realizó una prueba t paramétrica para evaluar la significancia, donde **indica un $p < 0,01$.

3. La sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la capacidad clonogénica de células MDA-MB-231

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la capacidad de formar focos de crecimiento en cultivo, se llevó a cabo un ensayo clonogénico. Brevemente, se sembraron células a baja confluencia (ver *Materiales y Métodos*) y se incubaron hasta que los focos formados fueran visibles a simple vista u ocuparan alrededor de un campo de microscopio a un aumento 200X. Luego, las células fueron fijadas y los focos formados se cuantificaron. Se observó que let-7b-5p disminuyó la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231 (Figura 11).

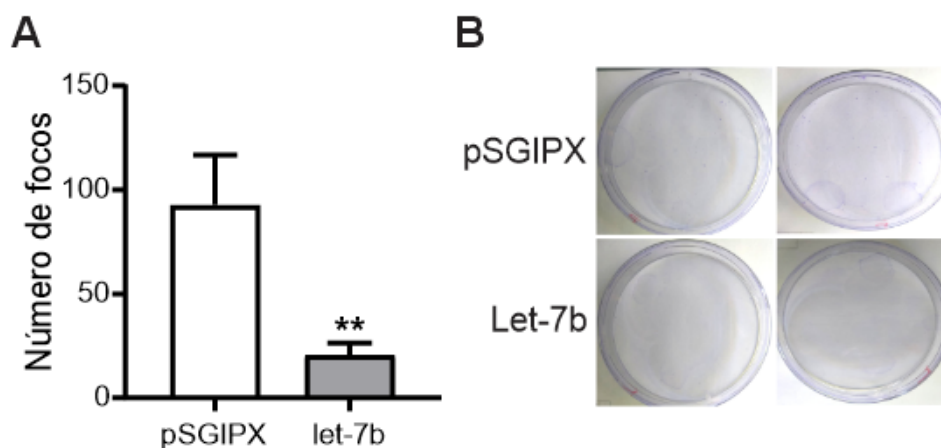


Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231. (A) Se cuantificaron los focos formados por células MDA-MB-231 con sobreexpresión de let-7b-5p o células control (pSGIPX). Se realizaron 3 réplicas biológicas con una única réplica técnica. Para evaluar la significancia se realizó una prueba t paramétrica, donde **indica un $p < 0,01$. (B) Imágenes representativas del ensayo clonogénico.

4. La sobreexpresión de let-7b-5p no afectó la capacidad de adhesión de las células MDA-MB-231

Con el objetivo de evaluar si la sobreexpresión de let-7b-5p tiene un efecto en la capacidad de adhesión de las células MDA-MB-231, se realizaron ensayos *in vitro* a partir de las células con sobreexpresión estable de let-7b-5p o control. Se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p no afectó la capacidad de adhesión de las células MDA-MB-231 (Figura 12).

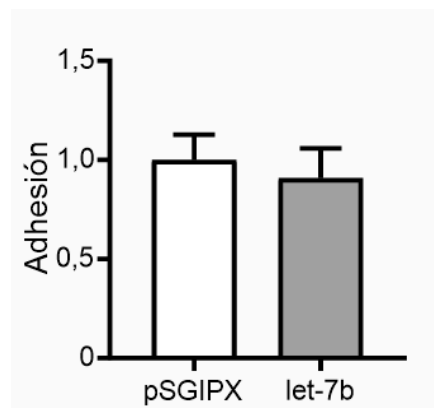


Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la capacidad de adhesión de las células MDA-MB-231. Los resultados se normalizaron respecto a las células control (pSGIPX). Se utilizaron 6 réplicas biológicas con 4 réplicas técnicas. Para evaluar la significancia se realizó una prueba t paramétrica.

5. La sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la migración de las células MDA-MB-231

Para evaluar el efecto de let-7b-5p en la migración de las células tumorales, se realizó un ensayo de cierre de herida utilizando la línea celular que sobreexpresa let-7b y su respectiva línea control. Se cuantificó el área de migración de las células mediante la captura de imágenes al tiempo 0 y después de 18 horas. Se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la migración de las células MDA-MB-231 (Figura 13).

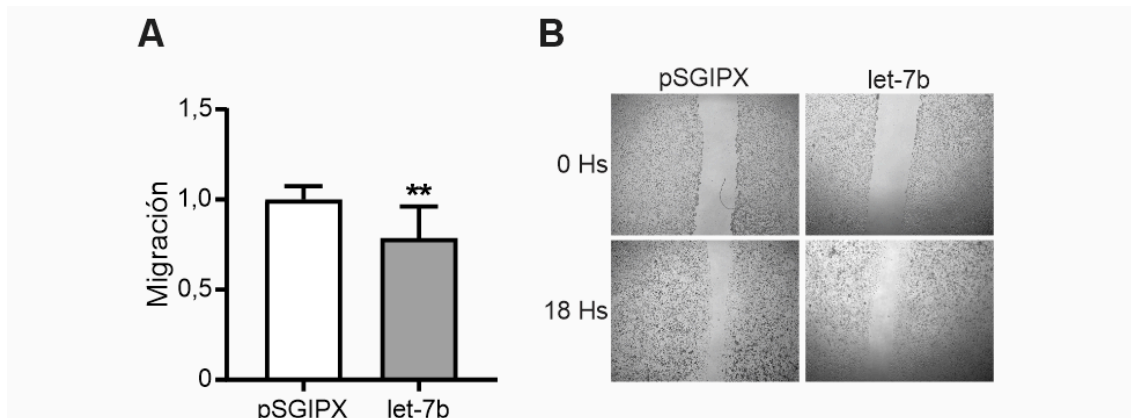


Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la migración de las células MDA-MB-231. (A) Se cuantificó el área de migración en las distintas condiciones mediante la captura de imágenes a distintos tiempos. Los resultados se normalizaron respecto a las células control (pSGIPX). Se utilizaron 6 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas cada una. Para evaluar la significancia se realizó una prueba t no paramétrica de Mann-Whitney, ** indica un $p < 0,01$. (B) Imágenes representativas del proceso de migración de ambas líneas a tiempo 0 y a las 18 horas.

Efecto de la metformina en la modulación de la expresión de miARNs en células de CMTN

1. La metformina no moduló la expresión de let-7b-5p, mir-28-3p y mir-877-5p en líneas de cáncer de mama triple negativo

Para evaluar si la metformina modula la expresión de distintos miARNs, se incubaron células MDA-MB-231 y 4T1 durante 48 horas con medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina (0,1 mM y 20mM). Luego, se extrajo el ARN total y se realizó una Stem-loop RT-qPCR para cuantificar la expresión de los distintos miARNs. Se encontró que la metformina no moduló la expresión de let-7b-5p, miR-28-3p y miR-877-5p en las líneas de CMTN (Figura 14). En la línea celular 4T1, la concentración de 20 mM resultó en la muerte de las células, por lo que, no se midió la expresión de los miARNs en esta condición.

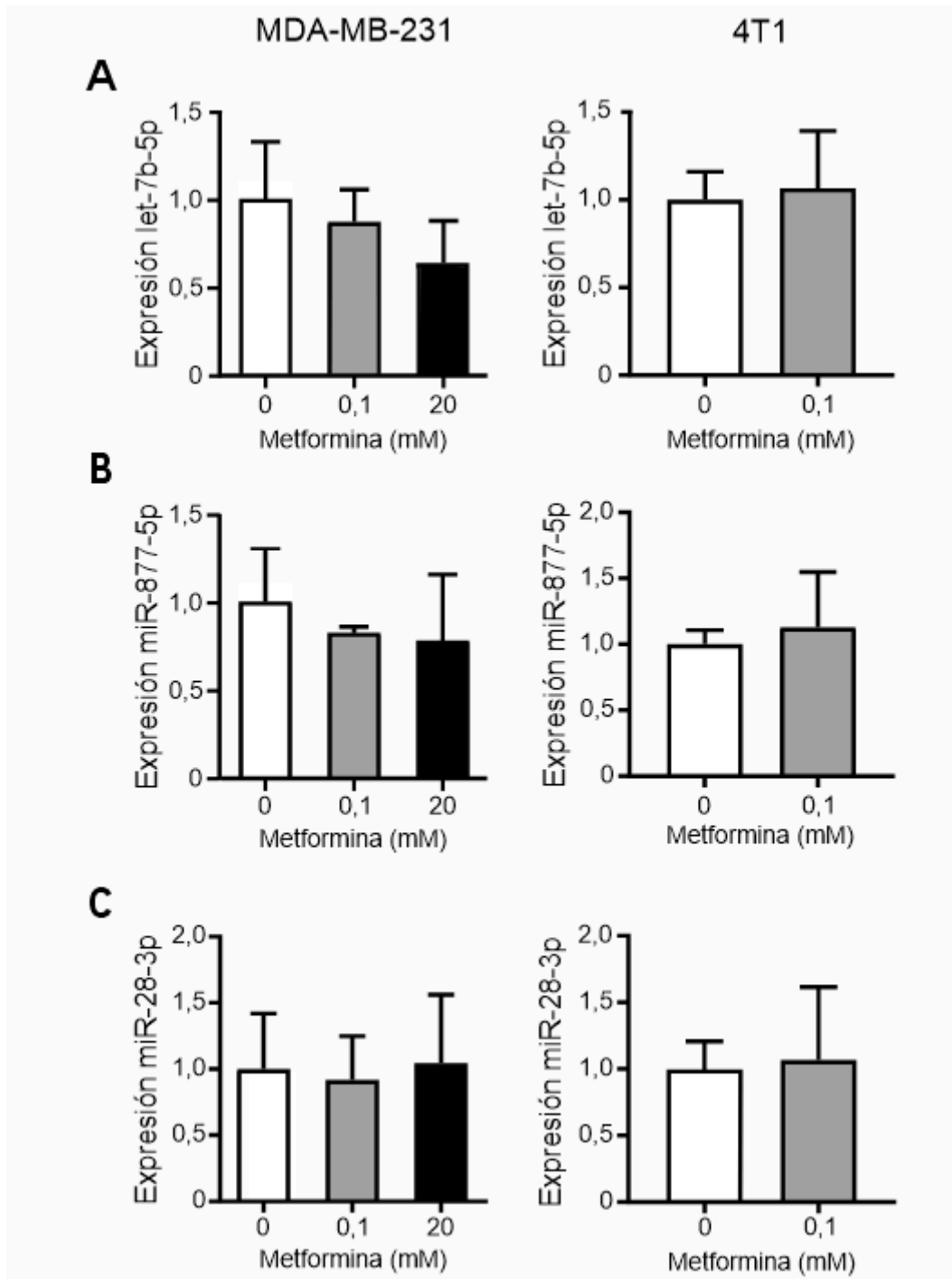


Figura 14. Efecto de la metformina en la expresión de let-7b-5p (A), miR-28-3p (B) y miR-877-5p (C) en las líneas MDA-MB-231 y 4T1. La expresión se determinó mediante la técnica Stem-loop RT-qPCR. Los niveles de expresión se normalizaron con los niveles de expresión de U6 como control interno y con las células control de cada línea celular. Se realizaron 3 réplicas biológicas con duplicados técnicos. Para evaluar la significancia, se realizó un análisis ANOVA de un factor para la línea MDA-MB-231 y una prueba t paramétrica para 4T1.

Rol de la metformina en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN

Como previamente se mencionó en la *Introducción*, existen varios trabajos previos que han reportado la acción de la metformina en la viabilidad, migración, adhesión y capacidad clonogénica en líneas celulares de CM. Estudios han mostrado que una dosis baja de metformina actuaría específicamente sobre la población de CSC en CM (Hirsch *et al.*, 2009; Cufí *et al.*, 2012; Iliopoulos *et al.*, 2011). En particular, se demostró que en la línea celular de CMTN, MDA-MB-468, una concentración de 0,1mM disminuyó significativamente las CSC después de 48 horas de exposición a la metformina (Hirsch *et al.*, 2009).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que la metformina, en concentraciones más altas, ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación, capacidad clonogénica, adhesión y migración de células tumorales en CM. En particular, se ha observado que una concentración de 20 mM reduce significativamente la viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231 y 4T1, tras 24, 48 o 72 horas de tratamiento (Alimova *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Wang & Zhao, 2024). Además, se reportó que concentraciones como 1 mM y 5 mM, disminuyeron la capacidad clonogénica en MDA-MB-231 (Liu *et al.*, 2009). Asimismo, concentraciones de 20 mM y 50 mM mostraron una reducción en la formación de focos en la línea 4T1 (Shi *et al.*, 2022). En cuanto a la migración celular, una dosis de 10 mM de metformina redujo la migración en ambas líneas de CMTN (Kawakita *et al.*, 2021). Finalmente, respecto a la adhesión celular, se observó que una dosis de 10 mM de metformina no afectó la adhesión en células MDA-MB-231 (Aftab *et al.*, 2022), sin embargo, en la línea 4T1, concentraciones de 8 mM y 16 mM disminuyeron significativamente la adhesión celular en comparación con células no tratadas (Farahi *et al.*, 2021).

Debido a este motivo, en esta Tesina elegimos las concentraciones de 0,1 mM y 20mM como punto de partida en los distintos ensayos. Es importante aclarar que el objetivo de esta parte del proyecto fue validar las dosis que íbamos a utilizar en ambos modelos de CMTN respecto a lo reportado en la bibliografía.

1. La metformina disminuyó la viabilidad celular y la proliferación en las líneas de CMTN

Para evaluar el efecto de la metformina en la viabilidad de células de CMTN, las mismas fueron incubadas durante 48 horas con medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de MTS y también por conteo de células luego de cosechar las células tras ser incubadas con metformina.

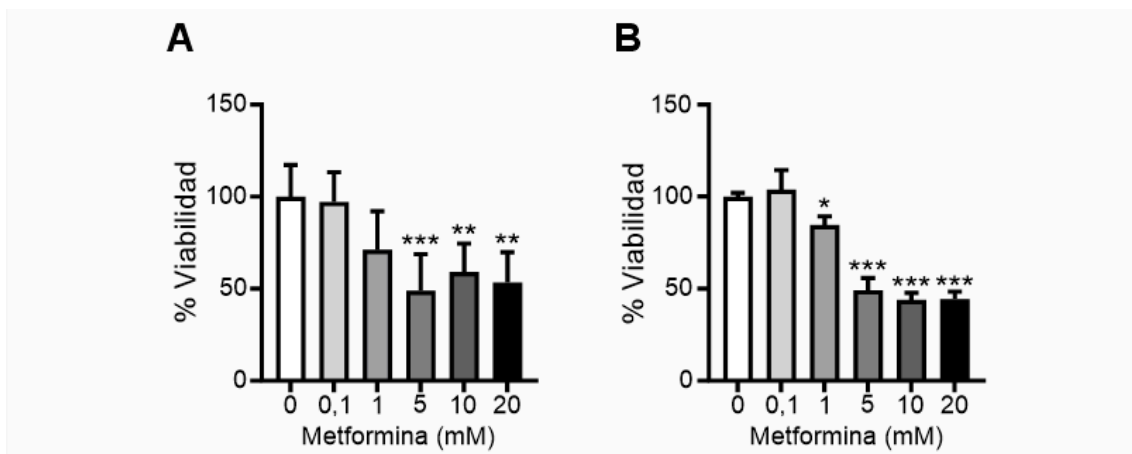


Figura 15. Efecto de la metformina en la viabilidad celular de las líneas MDA-MB-231 y 4T1. Mediante un ensayo de MTS se determinó la viabilidad celular. Los resultados se normalizaron considerando una viabilidad celular del 100% en el tratamiento control. (A) Ensayo realizado en células MDA-MB-231 empleando 6 réplicas biológicas con triplicados técnicos. (B) Ensayo de MTS con células 4T1 donde se utilizaron 3 réplicas biológicas con triplicados técnicos. Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de un factor, donde * indica un $p < 0,05$, ** representa un $p < 0,01$ y *** indica un $p < 0,001$ respecto a las células control de cada línea celular. (El experimento mostrado en (A) corresponde a las células control de la Figura 20).

Se evidenció que desde una concentración de 5 mM se redujo significativamente la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231 (Figura 15A). En la línea celular 4T1, la viabilidad celular disminuyó a partir de una concentración de 1 mM (Figura 15B). Asimismo, se observó que una concentración de 20 mM disminuyó la proliferación en ambas líneas celulares de CMTN (Figura 16).

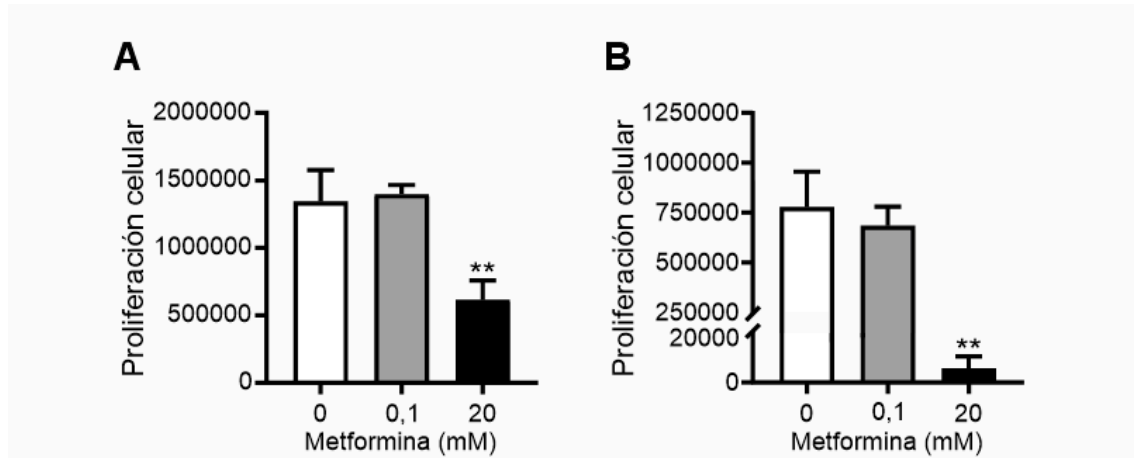


Figura 16. Efecto de la metformina en la proliferación celular en las líneas MDA-MB-231 y 4T1.

Se realizó un conteo celular de cada pocillo tras incubar las células durante 48 horas con las distintas dosis de metformina. Se utilizaron 3 réplicas biológicas con duplicados técnicos. Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de un factor, donde ** indica un $p < 0,01$ respecto al tratamiento control. (A) Ensayo realizado en MDA-MB-231. (B) Ensayo realizado en células 4T1.

2. La metformina a altas dosis disminuyó la capacidad clonogénica en la línea celular MDA-MB-231

Con el objetivo de evaluar el efecto de la metformina en la capacidad clonogénica de células de CMTN, se realizó un ensayo clonogénico en las células MDA-MB-231. Para ello, las células fueron incubadas durante 72 horas con medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina (0 mM; 0,1 mM y 20 mM). Luego, se reemplazó el medio de cultivo por medio completo sin metformina y se incubó hasta que los focos de células ocuparan un campo del microscopio a aumento 200X. Se procedió a la fijación y posterior cuantificación de los focos visualizados por tinción con cristal violeta (ver *Materiales y Métodos*). Se observó que la metformina en una concentración de 20 mM disminuyó la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231 (Figura 17).

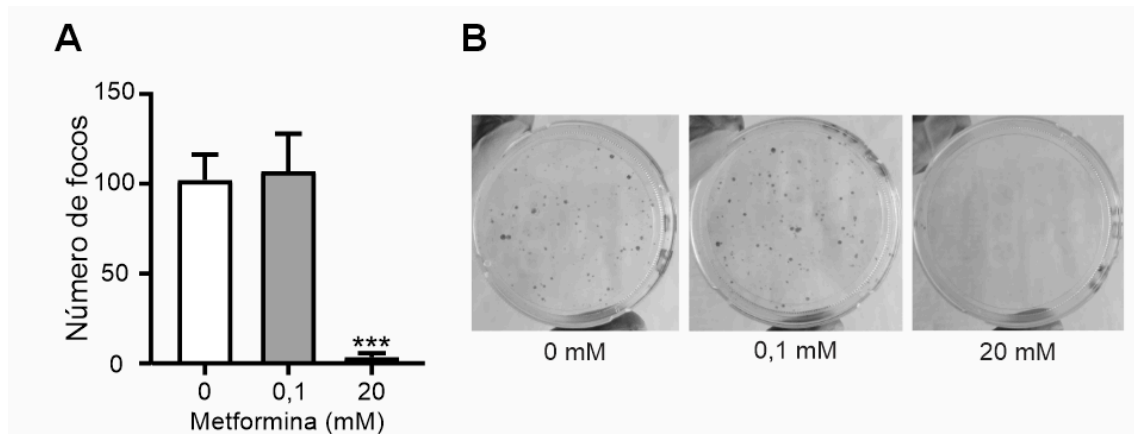


Figura 17. Efecto de la metformina en la capacidad clonogénica de las líneas de CMTN. (A) Se realizó un ensayo clonogénico en células MDA-MB-231 expuestas a las dosis indicadas de metformina durante las primeras 72hs. Se cuantificó el número de focos formados (N=3). Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de un factor, donde *** indica un $p < 0,001$ respecto a las células control. (B) Imágenes representativas de los focos formados en las distintas condiciones en MDA-MB-231.

3. La metformina no moduló la capacidad de adhesión de las células de CMTN a las dosis testeadas

Con el objetivo de evaluar el efecto de la metformina en la capacidad de adhesión de las células tumorales, se incubaron células de CMTN durante 48 horas con medio de cultivo completo con distintas dosis de metformina (0; 0,1 mM y 20mM). Posteriormente, se cosecharon las células y se realizó un ensayo de adhesión. Se encontró que la metformina no generó ningún efecto en la capacidad de adhesión de las células MDA-MB-231 y 4T1 (Figura 18). Sin embargo, es importante destacar que en el caso de las células 4T1 la concentración 20 mM de metformina resultó en una fuerte reducción de la viabilidad celular, por lo que no pudo estudiarse la adhesión celular por falta de células al momento de cosechar.

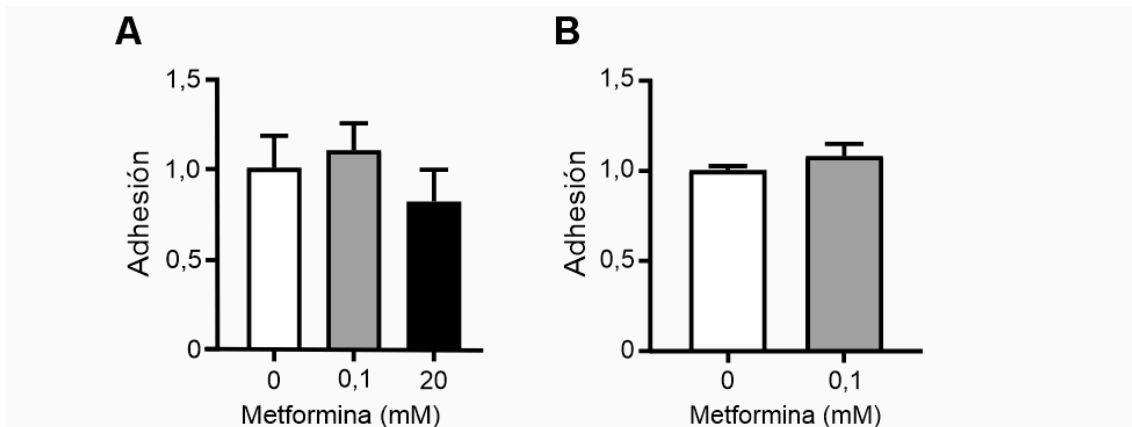


Figura 18. Efecto de la metformina en la capacidad de adhesión de las células. Se realizaron ensayos de adhesión en células MDA-MB-231 (A) y 4T1 (B) tratadas con las dosis indicadas de metformina. Los resultados se normalizaron respecto al tratamiento control. Se realizaron 3 réplicas biológicas con cuadruplicados técnicos. La significancia se evaluó mediante ANOVA de un factor para la línea MDA-MB-231 y una prueba t paramétrica para la línea 4T1.

4. La metformina disminuyó la migración de células 4T1 pero no de células MDA-MB-231

Para estudiar el efecto de la metformina en la migración de las células tumorales, se realizó un ensayo de cierre de herida. Para ello, una vez trazadas las heridas, las células fueron incubadas con distintas dosis de metformina durante 18 horas y se determinó el área de migración como la diferencia entre el área inicial de la herida y el área luego de 18 horas. Se observó que el tratamiento con metformina 0,1mM y 20mM disminuyó la migración de las células 4T1 (Figuras 19C y 19D). Mientras que en la línea MDA-MB-231, no se observaron cambios (Figuras 19A y 19B).

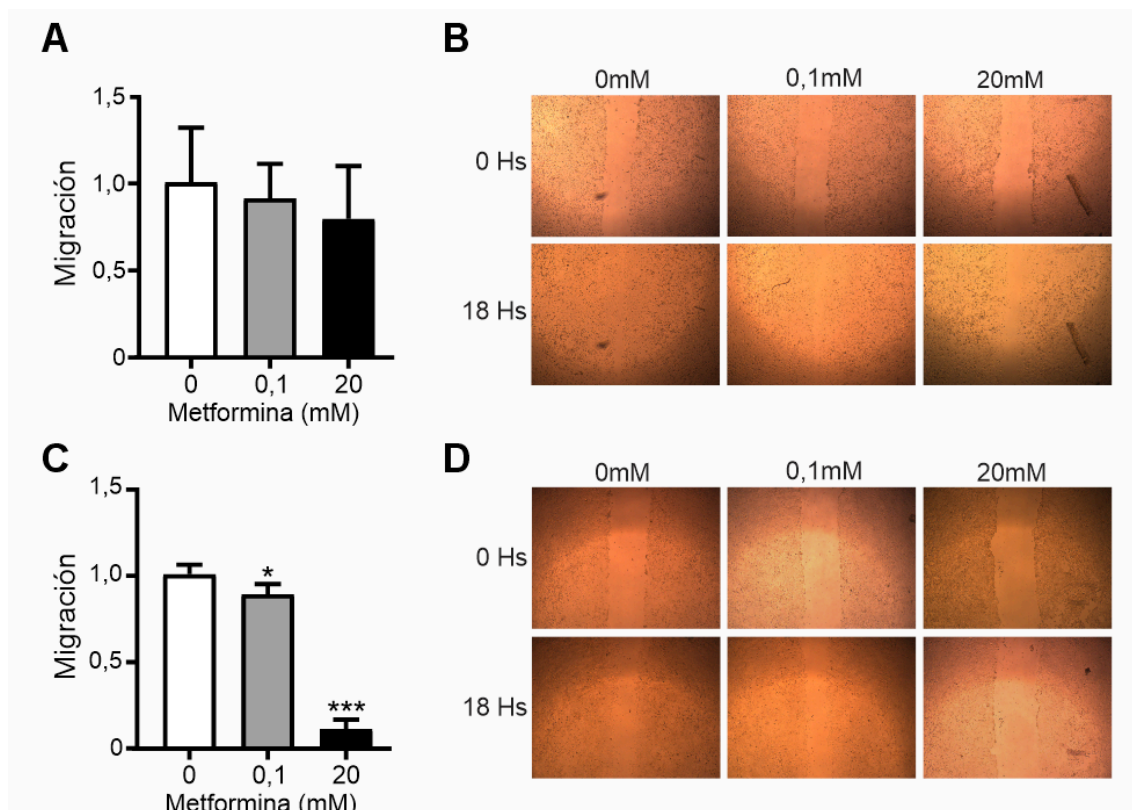


Figura 19. Efecto de la metformina en la migración de células de CMTN. Se cuantificó el área de migración de las células MDA-MB-231 (A) y 4T1 (C) en las distintas condiciones mediante la captura de imágenes al tiempo 0 y a las 18 horas. Se utilizaron 3 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas. Los resultados se normalizaron respecto al tratamiento control. Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de un factor, donde * indica un $p < 0,05$ y *** indica un $p < 0,001$ respecto a las células control de cada línea celular. Imágenes representativas de las heridas de MDA-MB-231 (B) y 4T1 (D) al tiempo 0 y a las 18 horas.

Tratamiento conjunto de metformina y let-7b-5p, respuesta en cuanto a proliferación, migración y clonogenicidad de células de CMTN

1. El tratamiento con metformina 1 mM y let-7b-5p disminuyó la viabilidad de MDA-MB-231 aún más que el tratamiento simple con esa dosis de metformina

Se evaluó si el tratamiento conjunto de metformina y let-7b-5p mejora la respuesta en cuanto a la proliferación celular en la línea MDA-MB-231. Para ello células MDA-MB-231-pSGIPX y MDA-MB-231-let-7b se incubaron durante 48 horas con medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina (0,1mM, 1mM, 5mM, 10mM y 20mM). Posteriormente, se realizó un ensayo de MTS para determinar la viabilidad celular. Como se evidenció anteriormente, tanto la sobreexpresión de let-7b-5p como el tratamiento con metformina disminuyeron la viabilidad de las células MDA-MB-231. No obstante, el análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores no demostró una interacción entre estos dos tratamientos (Figura 20). La concentración inhibitoria 50 (IC50) fue de 4,0 mM, en las células MDA-MB-231-pSGIPX; en tanto que de 3,80 mM, en las células MDA-MB-231-let-7b. A pesar de ello, se observó que el tratamiento con 1 mM de metformina resultó en una menor viabilidad celular cuando se sobreexpresa let-7b.

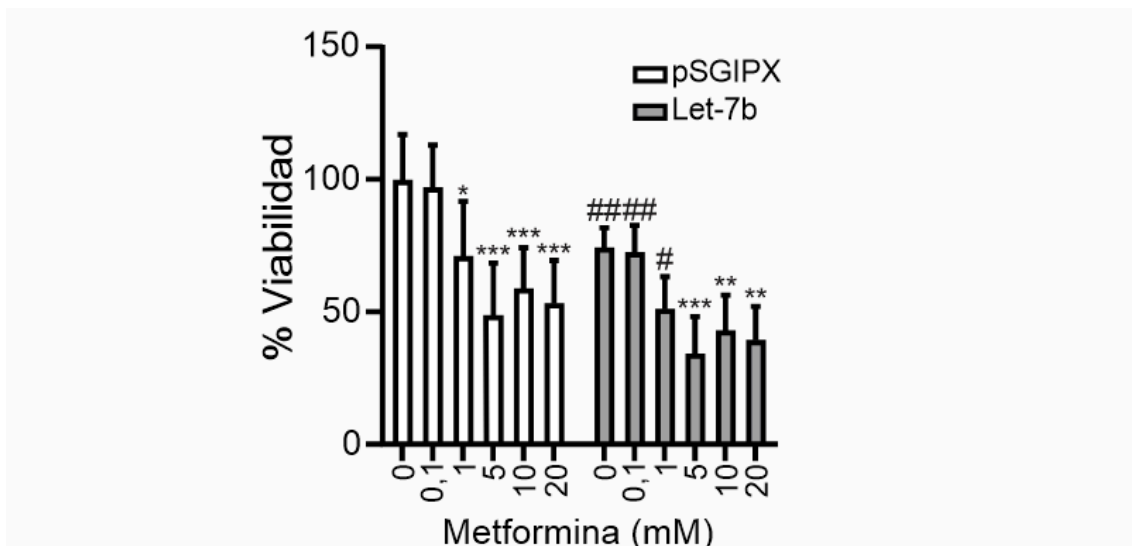


Figura 20. Efecto del tratamiento conjunto del let-7b-5p y metformina en la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de MTS. Los resultados se normalizaron considerando una viabilidad celular del 100% para las células MDA-pSGIPX tratadas con 0 mM metformina. Se utilizaron 6 réplicas biológicas con triplicados (0;

0,1; 10; 20 mM) o duplicados técnicos (1 y 5 mM). Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de dos factores y un test Holm Sidak para el análisis de los efectos simples. # indica el efecto de let-7b-5p respecto a la línea celular control MDA-pSGIPX, mientras que * representa el efecto de la metformina respecto al tratamiento control de cada línea celular (0 mM metformina). Tanto * como # representan un $p < 0,05$, ** y ## indican un $p < 0,01$ y finalmente *** y ### indican un $p < 0,001$.

2. La transfección con el *mimic* de let-7b-5p no mejoró el efecto de la metformina en la viabilidad de células 4T1

Con el objetivo de estudiar si tratamiento conjunto de metformina y un *mimic* de let-7b-5p mejora la respuesta en cuanto a la viabilidad celular en la línea 4T1, se utilizaron células transfectadas transientemente con el *mimic* let-7b-5p o con su respectivo control negativo NC1 (ver *Materiales y Métodos*). Las células se incubaron durante 48 horas con medio de cultivo completo con distintas concentraciones de metformina (0,1 mM; 1 mM; 5 mM; 10 mM y 20mM), posteriormente, mediante un ensayo de MTS se determinó la viabilidad celular. Se observó que tanto la metformina como el *mimic* de let-7b-5p disminuyeron la viabilidad de las células 4T1, sin embargo, al igual que lo observado en MDA-MB-213 no existió interacción entre ambos tratamientos. Al analizar los efectos simples, se evidenció que la metformina disminuyó la viabilidad celular a partir de la concentración 1 mM tanto en las células transfectadas con el *mimic* como las células transfectadas con el control negativo (Figura 21). Además, se observó que el *mimic* let-7b-5p disminuyó la viabilidad celular en la concentración de 0,1 mM respecto a las células transfectadas con el control negativo. Por último, el IC50 de las células 4T1-NC1 fue de 1,94 mM; en tanto que de 2,47 mM, en las células 4T1 transfectadas con el *mimic* de let-7b.

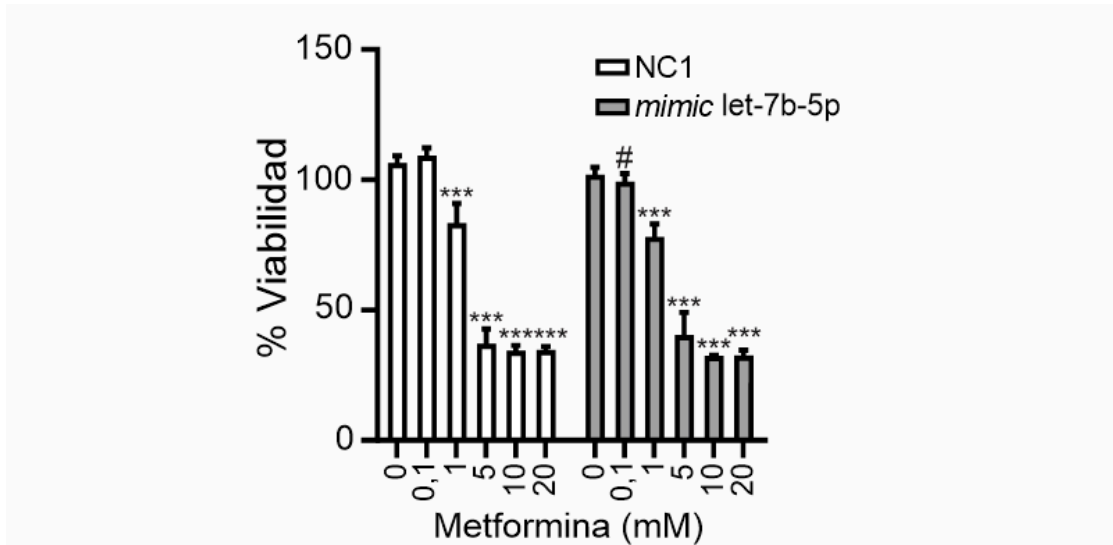


Figura 21. Efecto del tratamiento conjunto metformina y un *mimic let-7b-5p* en la viabilidad de células 4T1. Mediante un ensayo de MTS se determinó la viabilidad celular. Los resultados se normalizaron considerando una viabilidad celular del 100% en las células transfectadas con el control negativo (NC1) sin tratar con metformina. Se utilizaron 3 réplicas biológicas con triplicados (0; 0,1; 10; 20 mM) o duplicados técnicos (1 mM y 5mM). Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de dos factores seguido y un test Holm Sidak para el análisis de los efectos simples. Donde # indica el efecto del *mimic let-7b-5p* respecto a las células transfectadas con NC1. Mientras que * representa el efecto de la metformina respecto al tratamiento control de cada grupo (0 mM metformina) . Donde *** representa un $p < 0,001$ y # indica un $p < 0,05$.

3. La metformina y let-7b-5p modulan la capacidad clonogénica de MDA-MB-231 de manera independiente

Con el objetivo de evaluar si la combinación de metformina y let-7b-5p disminuye la clonogenicidad en células de la línea MDA-MB-231, se llevó a cabo un ensayo clonogénico. Células MDA-MB-231-pSGIPX y MDA-MB-231-let-7b fueron incubadas durante 72 horas en medio de cultivo completo con diferentes concentraciones de metformina, posteriormente, el medio fue sustituido por medio de cultivo completo fresco. Al finalizar, los focos formados se fijaron, se tiñeron (*ver Materiales y Métodos*) y se cuantificaron. Como se vió previamente, una concentración de 20 mM de metformina (Figura 17) y let-7b-5p (Figura 11) disminuyeron la capacidad clonogénica de las células (Figura 22). No obstante, no se encontró que el tratamiento combinado resulte en una mayor disminución en la capacidad clonogénica de las células. De hecho, se observó una interacción negativa significativa, lo que sugiere que

debido al efecto tan marcado de cada tratamiento por separado, el tratamiento combinado satura el efecto observado con cada tratamiento individual.

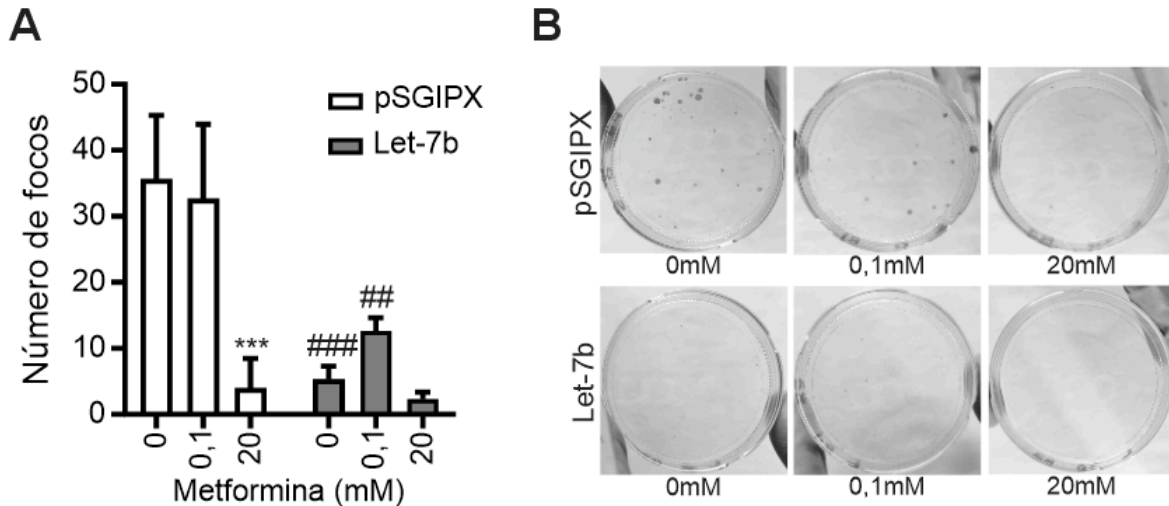


Figura 22. Efecto del tratamiento combinado en la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231. (A) Se cuantificaron los focos formados en las distintas condiciones experimentales. Se utilizaron 3 réplicas biológicas con una única réplica técnica. Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de dos factores seguido de un test Holm Sidak para el análisis de los efectos simples, donde # indica el efecto de la sobreexpresión de let-7b-5p en la clonogenicidad respecto a la línea celular control MDA-pSGIPX. Mientras que, * indica el efecto de la metformina respecto al tratamiento control de cada línea celular (0 mM metformina). ** y ## indican un $p < 0,01$, mientras que ### representa un $p < 0,001$. (B) Imágenes representativas de los focos formados.

4. La combinación de metformina con let-7b-5p no mejoró el efecto del tratamiento simple de let-7b-5p en la migración de células MDA-MB-231

Con el objetivo de estudiar si el tratamiento conjunto de metformina y let-7b-5p mejora la respuesta respecto a los tratamientos simples en cuanto a la migración de las células tumorales, se realizó un ensayo de herida y se cuantificó el área de migración de las células MDA-MB-231 en las distintas concentraciones de metformina mediante la captura de imágenes de los pocillos al tiempo 0 y después de 18 horas. Al analizar los efectos simples, se evidenció que let-7b-5p disminuyó la migración de células MDA-MB-231 en todas las dosis de metformina utilizadas respecto a las células de la línea control. Sin embargo, se observó que ninguna de las dosis utilizadas de metformina afectó la capacidad de migración de las

células MDA-MB-231 (Figura 23), tal como se observó previamente (Figura 19A). Sin embargo, no se observó sinergismo entre ambos tratamientos.

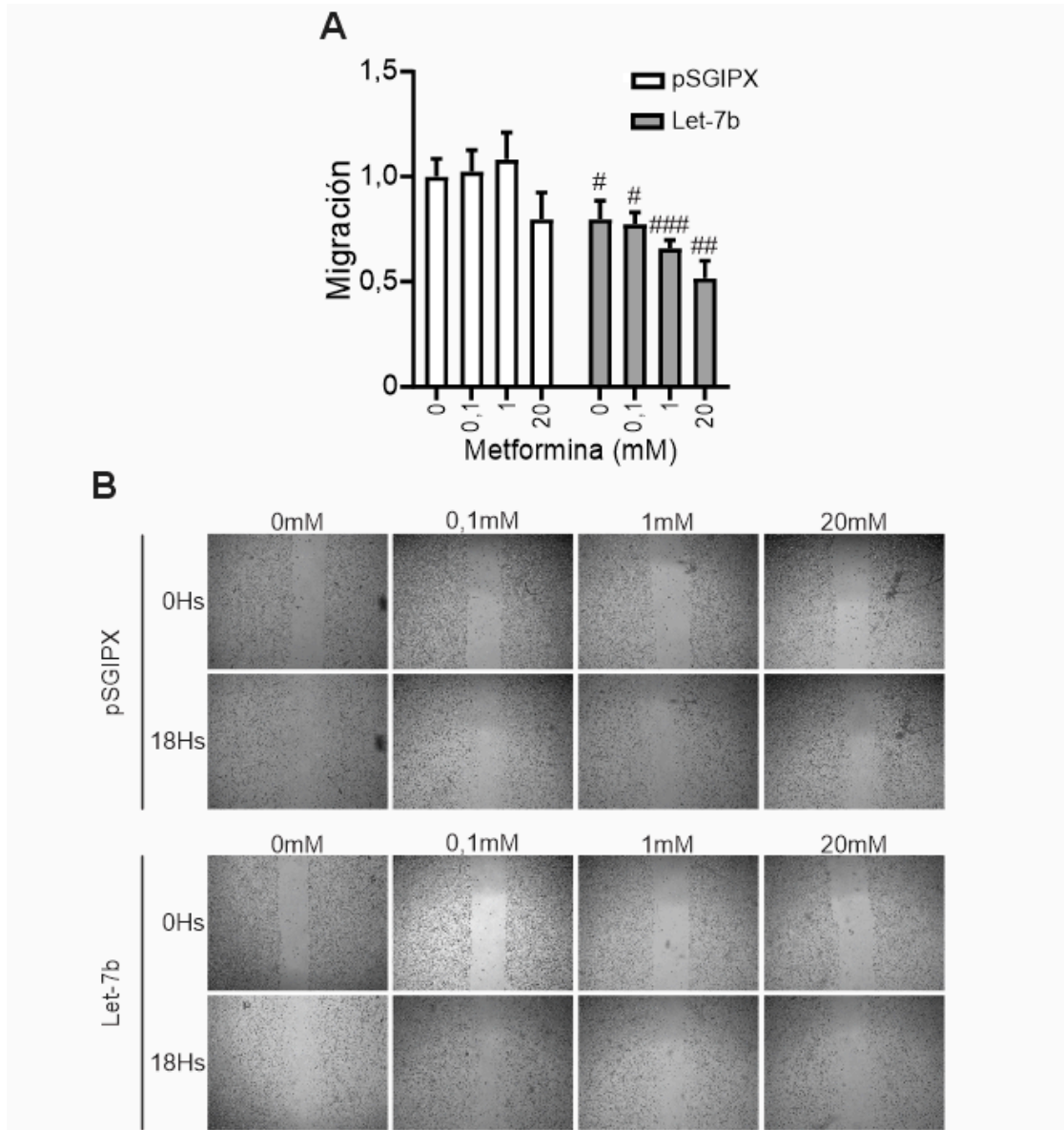


Figura 23. Efecto del tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p en la migración de células MDA-MB-231. Se cuantificó el área de migración mediante la captura de imágenes a los pocillos al tiempo 0 y después de 18 horas (A). Los resultados se normalizaron respecto a las células de la línea celular control (MDA-pSGIPX) tratadas con 0 mM metformina. Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de dos factores seguido de un test Holm Sidak para el análisis de los efectos simples, donde # indica el efecto de let-7b-5p respecto a las células de la línea

control MDA-pSGIPX. # indica un $p < 0,05$, mientras que ## representa un $p < 0,01$ y ### indica un $p < 0,001$. (B) Imágenes representativas del proceso de migración.

5. El tratamiento combinado no redujo el área de migración de las células 4T1 en mayor medida que el tratamiento solo con let-7b-5p o con altas dosis de metformina

Para evaluar si el tratamiento conjunto de metformina y un *mimic* de let-7b-5p genera una mejor respuesta en cuanto la migración de las células tumorales, se realizó un ensayo de cierre de herida. Se cuantificó el área de migración de las células 4T1 en las distintas concentraciones de metformina mediante la captura de imágenes de los pocillos al tiempo 0 y después de 8 horas. Se observó que tanto let-7b-5p y una concentración de 5mM de metformina disminuyeron el área de migración de las células tumorales en la línea 4T1. Sin embargo, se evidenció que el tratamiento conjunto no redujo el área de migración de las células 4T1 en mayor medida que el tratamiento solo con let-7b-5p o con metformina (Figura 24). Además, no se observó interacción entre los tratamientos.

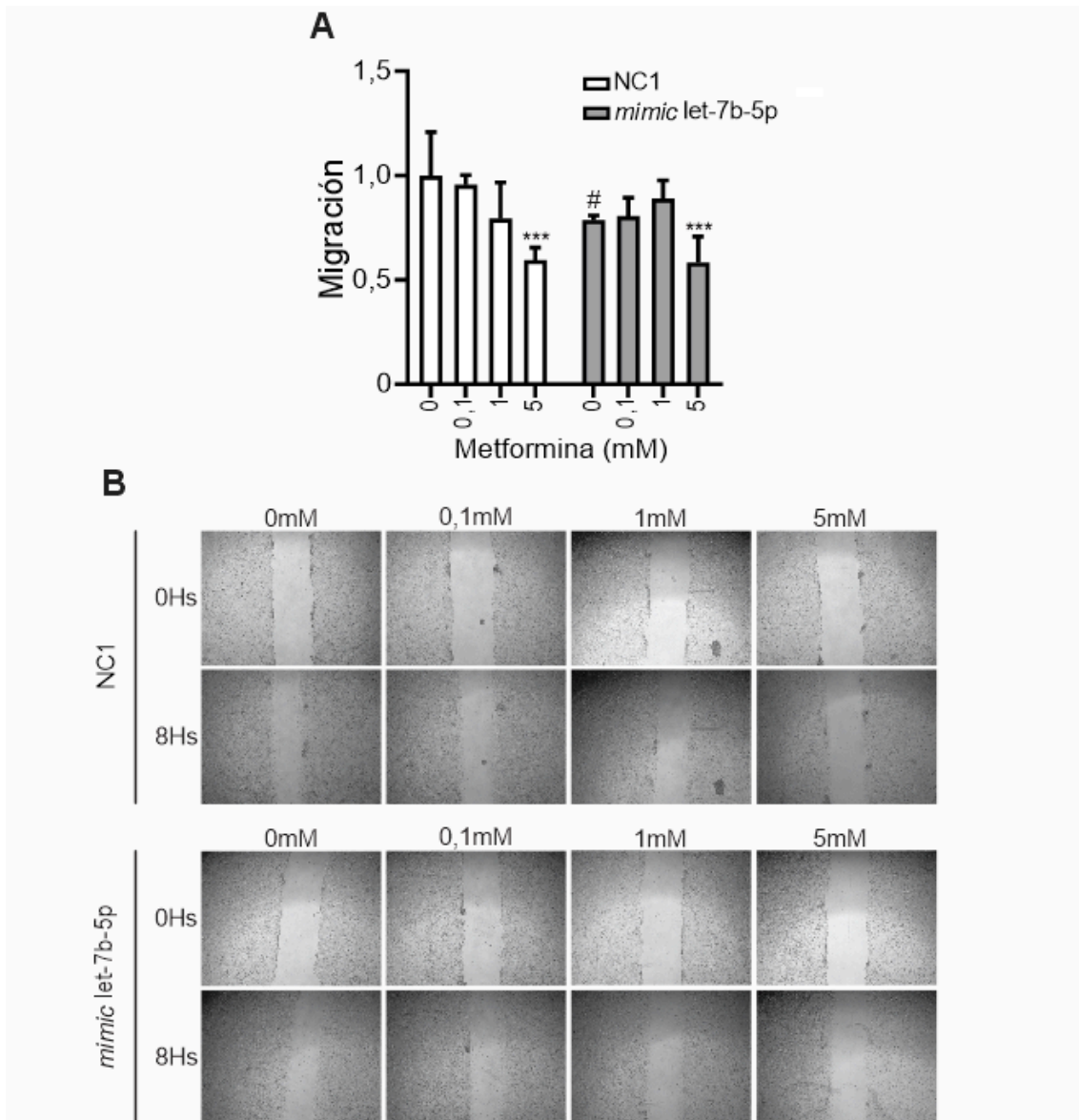


Figura 24. Efecto del tratamiento conjunto metformina y un *mimic* let-7b-5p en la migración de células 4T1. Se cuantificó el área de migración mediante la captura de imágenes a los pocillos al tiempo 0 y después de 8 horas (A). Los resultados se normalizaron respecto a las células transfectadas con el control negativo (NC1) y sin tratar con metformina (0 mM). Para evaluar la significancia se realizó un análisis ANOVA de dos factores y un test Holm Sidak para el análisis de los efectos simples, donde # indica el efecto del *mimic* de let-7b-5p respecto a las células transfectadas con el control negativo. Mientras que *, indica el efecto de la metformina respecto al tratamiento control de cada línea celular (0 mM metformina). # indica un un $p < 0,05$, mientras que *** representa un $p < 0,001$. (B) Imágenes representativas del proceso de migración.

Efecto de let-7b-5p en la expresión de genes relacionados con la proliferación, adhesión, migración y fenotipo stem en células CMTN

Con el objetivo de estudiar el efecto de let-7b-5p en la expresión de genes relacionados con proliferación (Ciclina D, CDKN1A, BRCA1, CTBP1), adhesión y migración (E-cadherina, Vimentina, Fibronectina) o fenotipo stem-cell (cMyc) en líneas de CMTN, se utilizaron ARNs previamente obtenidos en el laboratorio a partir de la línea celular estable que sobreexpresa let-7b-5p (MDA-MB-231-let-7b) y su respectiva línea control (MDA-MB-231-pSGIPX). La expresión de los distintos ARNm se cuantificó mediante RT-qPCR. Se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la expresión de E-Cadherina y aumentó la expresión de Vimentina en la línea celular MDA-MB-231, sin embargo, no se observó una variación significativa en la expresión de los otros genes estudiados. (Figura 25).

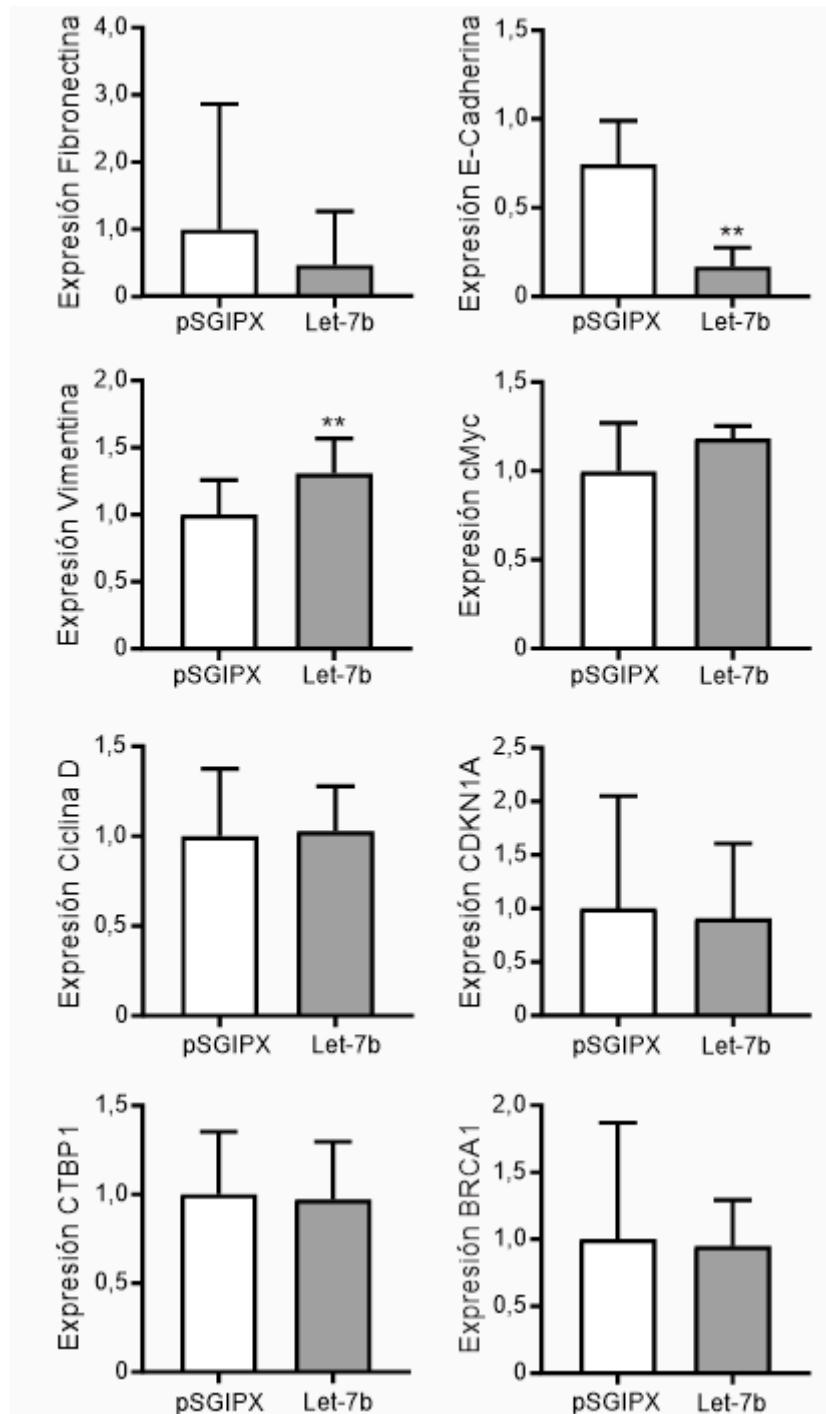


Figura 25. Efecto de let-7b-5p en la expresión de distintos ARNm en las líneas MDA-MB-231. La expresión se determinó mediante la técnica RT-qPCR. Los niveles de expresión se normalizaron con los niveles de expresión de GAPDH como control interno y con las células de la línea control (pSGIPX). Para los genes Ciclina D y cMyc se usaron 4 réplicas biológicas, para los demás genes se utilizaron 5 réplicas biológicas con duplicados técnicos. Se realizó una prueba t pareada para evaluar la significancia, en el caso de la Fibronectina y BRCA1, se realizó la prueba no paramétrica Wilcoxon. ** indica un $p < 0,01$.

Discusión y perspectivas a futuro

El objetivo de este trabajo de Tesina fue estudiar el rol de let-7b-5p en la sensibilidad y respuesta antitumoral de la metformina en células de CMTN. Para ello, en primer lugar, se profundizó el estudio acerca del rol de let-7b-5p en el CMTN, analizando su efecto en células MDA-MB-231, efecto que previamente había sido estudiado en el laboratorio en otra línea de CMTN, 4T1. Además, previamente el Laboratorio encontró que la metformina podría modular la expresión de let-7b-5p utilizando la herramienta bioinformática SM2miR (<http://www.jianglab.cn/SM2miR/>) que es una base de datos curada orientada al reposicionamiento de drogas, que contiene información sobre la relación entre 151 moléculas pequeñas y 747 miARNs de 17 especies. Por ello, el siguiente objetivo de esta Tesina fue estudiar si la metformina es capaz de modular la expresión de let-7b-5p en células de CMTN. También se estudió si la metformina es capaz de modular al miR-877-5p y al miR-28-3p ya que son miARNs que, al igual que let-7b-5p, el Laboratorio encontró alterados tanto en el plasma de mujeres con AASM como en el tejido tumoral mamario. Por otro lado, teniendo en cuenta que tanto la metformina como las terapias basadas en miARNs representan terapias de baja toxicidad, en el marco de esta Tesina, resultó interesante estudiar si un tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p mejora la respuesta en cuanto a proliferación, capacidad clonogénica y migración en comparación con ambos tratamientos por separado en líneas de CMTN. Para ello, primero, se validó el efecto de la metformina en estos procesos reportado previamente en bibliografía en células de cáncer de mama. Por último, para comenzar a explorar los mecanismos moleculares que gatilla let-7b-5p se estudió el efecto de let-7b-5p en la expresión de genes asociados al fenotipo *Stem*, proliferación, adhesión y migración en células de CMTN. A continuación, se discuten los resultados obtenidos de cada uno de estos estudios.

Rol de let-7b-5p en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN

Estudios previos realizados en el Laboratorio demostraron que let-7b-5p aumentó la adhesión celular y disminuyó la capacidad de migración de las células 4T1. En cuanto a la viabilidad celular, let-7b-5p pareció aumentarla, sin embargo, el protocolo utilizado no permitía descartar que el efecto observado no se viera influenciado por la capacidad de adhesión de las células. Además, la administración de una única dosis de nanopartículas conteniendo un mimic de let-7b-5p redujo significativamente el crecimiento tumoral en modelos inducidos con células 4T1 (Grinpelc, 2023). Con el objetivo de profundizar el papel de let-7b-5p en la progresión tumoral del CMTN y evaluar su potencial como tratamiento terapéutico, en esta Tesina se analizó su efecto en diferentes procesos celulares en células MDA-MB-231. Se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la viabilidad celular, la capacidad clonogénica y el área de migración en células MDA-MB-231, sin embargo, no se observaron cambios en la capacidad de adhesión celular.

En el caso de la viabilidad celular, además de analizar el efecto de este miARN en células MDA-MB-231, se profundizó el estudio en células 4T1 ya que, como se mencionó, el protocolo de ensayo de viabilidad utilizado por Grinpelc no permitía discernir si las diferencias observadas en la viabilidad estaban influenciadas por el marcado efecto de este miARN en la adhesión (Grinpelc, 2023). En particular, en esta tesina se testeó la viabilidad de células 4T1 de un modo más directo, transfectando a las células directamente en pocillos de placa de 96 y midiendo viabilidad celular por MTS, en tanto que Grinpelc plaqueaba las células en los pocillos de placa de 96 luego de transfectar a las células. Se observó una reducción en la viabilidad de ambas líneas celulares cuando las células fueron incubadas durante 48 horas en medio completo. Sin embargo, no se observaron cambios al utilizar medio suplementado con 1% SFB durante 72 horas (Figura 10). La efectividad de este miARN para inhibir la proliferación podría ser dependiente del nivel de nutrientes y factores de crecimiento disponibles en el medio. El medio completo al ofrecer un ambiente rico en nutrientes y factores de crecimiento permite una mayor tasa de proliferación celular. En estas condiciones, let-7b-5p podría ejercer un efecto inhibitorio más notable, afectando procesos como la proliferación y supervivencia celular que son más activos en presencia de abundantes nutrientes. Mientras que en un medio con privación de suero, la falta de nutrientes y factores

de crecimiento genera un ambiente de estrés, lo que podría llevar a que las células no se adhieran o entren en un estado de quiescencia y por lo tanto tengan una tasa de proliferación mucho más baja. Esto podría afectar a que las células sean menos sensibles a los efectos inhibitorios de let-7b-5p ya que su actividad metabólica y proliferativa está reducida por la restricción de nutrientes.

Por otro lado, en esta Tesina se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p redujo la capacidad para formar focos (Figura 11) y la migración (Figura 13) en células MDA-MB-231 pero no afectó su capacidad de adhesión (Figura 12).

Los resultados obtenidos coinciden con el trabajo previo realizado por Li y colaboradores, donde demostraron que la transfección transiente con un *mimic* de let-7b-5p redujo la proliferación, la capacidad clonogénica y la migración celular en la línea MDA-MB-231 (Li *et al.*, 2023). Cabe destacar que si bien, este trabajo fue realizado con anterioridad a esta Tesina de Licenciatura, nuestro resultado no solo confirma lo observado por Li y colaboradores, sino que es una herramienta invaluable para, en el futuro analizar el rol de este miARN en modelos animales. Del mismo modo, van en la misma línea de lo previamente obtenido en el Laboratorio en la línea celular 4T1. Sin embargo, como se mencionó previamente, en la línea 4T1 se observó un aumento en la adhesión celular (Grinpelc, 2023), mientras que en la línea MDA-MB-231 no se detectaron cambios. Si bien el efecto de let-7b-5p parece ser dependiente de la línea celular, el hecho de que en ambas líneas celulares let-7b-5p disminuya la adhesión celular apoya la idea de que este miARN podría tener un papel previniendo la progresión tumoral. Por lo cual a futuro sería muy importante evaluar su efecto sobre el desarrollo de metástasis en modelos animales. Además, en esta Tesina se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p aumentó la expresión de Vimentina y disminuyó la expresión de E-Cadherina en células MDA-MB-231 (Figura 25), ambos resultados van en contra del efecto de let-7b-5p en la migración celular observado en este trabajo. En futuros estudios sería interesante explorar tanto en la línea MDA-MB-231 como en la línea 4T1, la expresión de otros genes asociados a la migración que puedan explicar el mecanismo molecular involucrado en el efecto observado de este miARN en la migración de células de CMTN.

Los resultados obtenidos en esta tesina en conjunto con los resultados previos, robustecen y corroboran el rol de supresor de la proliferación y de procesos relacionados con

la progresión tumoral de let-7b-5p en líneas de CMTN y demuestran su potencial uso terapéutico en CMTN.

Efecto de la metformina en la modulación de la expresión de miARNs en células de CMTN

Utilizando la herramienta bioinformática SM2miR, el Laboratorio identificó previamente que la metformina incrementa la expresión de let-7b en un modelo de cáncer de páncreas. En particular, Bao y colaboradores demostraron que la metformina disminuyó la expresión de genes relacionados con el fenotipo CSC y moduló la expresión de algunos miARNs, entre ellos let-7b, en pancreatoesferas generadas a partir de células de páncreas. Cabe destacar que la metformina es un fármaco de uso extendido en el tratamiento de la diabetes tipo II, una patología vinculada al SM. Este hallazgo, sumado a estudios previos realizados por el Laboratorio, donde se evidenció que los miARNs let-7b-5p, miR-28-3p y miR-877-5p se encuentran alterados tanto en el plasma de mujeres con alteraciones asociadas SM como en tejidos tumorales mamarios, motivaron el análisis del efecto de la metformina sobre estos miARNs.

Al analizar la expresión de let-7b-5p, miR-28-3p y miR-877-5p, se observó que las concentraciones utilizadas de metformina (0,1 mM y 20 mM) no modularon la expresión de estos miARNs en las líneas MDA-MB-231 y 4T1 (Figura 14). Este resultado pareciera no concordar con lo observado en el trabajo previo realizado por Bao y colaboradores, donde se demostró que en pancreatoesferas derivadas de células de cáncer de páncreas sensibles y resistentes a la gemcitabina, una concentración de 20mM de metformina aumentó la expresión de let-7b y de otros miARNs (Bao *et al.*, 2012). Además, otro estudio previo reportó que la metformina reguló positivamente la expresión de miARNs de la familia let-7 en células de CM el subtipo luminal (Oliveras-Ferraros *et al.*, 2011). En particular, este trabajo demostró que concentraciones de 1 y 10 mM de metformina durante 48 horas aumentaron la expresión de let-7a en la línea MCF-7, miARN reportado como supresor tumoral en CM (Oliveras-Ferraros *et al.*, 2011). Sin embargo, la metformina podría modular la expresión de estos miARNs de forma específica en la población CSC y por lo tanto no puede verse reflejado en la población tumoral total. Tal como se observó en el trabajo realizado por Bao y colaboradores, donde se determinó la expresión de los distintos miARNs en pancreatoesferas

(enriquecidas en CSC) y no en la población total de células tumorales. Por lo que una estrategia futura, podría centrarse en analizar la expresión de estos miARNs en mamíferas generadas a partir de las líneas celulares de CMTN. Este enfoque resulta relevante, ya que la familia let-7 desempeña un rol crítico en la supresión de características asociadas a CSC en varios tipos de cáncer (Sun *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018). En particular, let-7b ha demostrado reducir la expresión de genes característicos de CSC e inhibir vías de señalización implicadas en la proliferación y autorrenovación celular (Bao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2021). Así, la restauración o aumento de la expresión de let-7b-5p en CSC mediante metformina podría ser un mecanismo terapéutico prometedor contra el CMTN.

Por otro lado, la expresión de miARNs depende mucho del contexto celular, previamente se ha reportado que el perfil de expresión de miARNs varía en función del subtipo de CM y del contexto celular específico. Este factor podría explicar por qué en la línea celular MCF-7 la metformina fue capaz de modular positivamente la expresión de miembros de la familia let-7 en la población tumoral total, mientras que en las líneas de CMTN utilizadas no se detectó dicha modulación. Además, Oliveras-Ferraro y colaboradores utilizaron concentraciones intermedias de metformina (1 y 10 mM), por lo que en un futuro podría ser relevante explorar concentraciones intermedias para ver si existe un efecto dosis-dependiente específico en las líneas de CMTN utilizadas. Por último, es posible que la metformina module la expresión de otros miARNs supresores tumorales que no fueron incluidos en este trabajo. Estudios futuros podrían ampliar el análisis a un panel más amplio de miARNs para comprender mejor el impacto de la metformina en la regulación de la expresión de miARNs en células CMTN.

Rol de la metformina en la proliferación, adhesión, migración y capacidad clonogénica de células de CMTN

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p mejora la respuesta antitumoral, inicialmente se validaron los efectos de la metformina previamente descritos en la bibliografía, utilizando las líneas celulares de CMTN empleadas en este estudio. Se evidenció que la metformina disminuyó la viabilidad celular y la proliferación en las líneas de CMTN de una manera dosis dependiente (Figura 15). Asimismo, se demostró que una concentración alta de metformina disminuyó la capacidad clonogénica

de células MDA-MB-231 (Figura 17). Sin embargo, se evidenció que las dosis utilizadas de metformina no modularon la capacidad de adhesión de las células de CMTN (Figura 18). Finalmente, concentraciones de 0,1mM y 20mM disminuyeron la migración de células 4T1, pero no de células MDA-MB-231 (Figura 19)

Al analizar la viabilidad celular tras incubar las células durante 48 horas con distintas dosis de metformina, se observó que a partir de una concentración de 5mM la viabilidad celular se redujo en la línea MDA-MB-231(Figura 15A). Esto valida lo reportado previamente por Lee y colaboradores, donde se observó que una concentración de 5mM durante 48 horas redujo la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231. Asimismo, numerosos estudios demostraron que la metformina disminuyó la viabilidad en células MDA-MB-231 tras ser incubadas con distintas concentraciones durante 72, 48 o 24 horas (Hadad *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2009; Marinello *et al.*, 2015). En la línea celular 4T1, se observó que la viabilidad celular disminuyó a partir de una concentración de 1 mM (Figura 15B), validando el trabajo realizado por Pham *et al*, donde se observó que dosis de 2 y 5 mM de metformina durante 48 horas redujeron la viabilidad de las células 4T1 (Pham *et al.*, 2023). Sin embargo, en otro trabajo se observó que la viabilidad de las células 4T1 disminuyó luego de ser incubadas con una concentración 10 mM de metformina durante 24 horas (Wang & Zhao., 2024). Las diferencias observadas se podrían deber al periodo de tiempo que las células estuvieron expuestas a las distintas concentraciones de metformina, ya que al estar expuestas durante un tiempo más prolongado a la metformina las células pudieron verse afectadas con dosis más bajas.

Del mismo modo, en esta Tesina se observó que una concentración de 20 mM durante 72 horas disminuyó notablemente la capacidad de formar focos de células en la línea MDA-MB-231, mientras que en una concentración de 0,1mM no se observaron cambios (Figura 17). Validando lo reportado previamente por varios trabajos, donde observaron que tras exponer a células MDA-MB-231 o MCF-7 durante 2 o 3 semanas a distintas dosis de metformina, concentraciones a partir de 1 mM redujeron la capacidad clonogénica y altas concentraciones de metformina (50 mM) mostraron un efecto notable reduciendo por completo el número de colonias (Liu *et al.*, 2009). El resultado también es compatible con lo observado en un trabajo previo, donde una concentración de 20 mM durante 14 días disminuyó en más del 60% la formación de focos de células 4T1 en comparación con las células control (Shi *et al.*, 2021). El efecto de la metformina sobre la capacidad clonogénica

depende tanto de la concentración de la droga como del tiempo de exposición a la misma. Dosis más bajas de metformina tienen un efecto significativo si se prolonga el tiempo de tratamiento, mientras que exposiciones más cortas (72 horas), como las realizadas en esta Tesina, pueden requerir concentraciones más altas para observar efectos notables. Estos resultados validan que la metformina disminuye considerablemente la formación de colonias a dosis elevadas; sin embargo, este efecto es menos pronunciado a bajas concentraciones.

Por otro lado, en esta Tesina se observó que las dosis de metformina utilizadas no generaron ningún efecto en la capacidad de adhesión de las células de CMTN (Figura 18). Los resultados validan lo obtenido en un trabajo previo, donde se demostró que una dosis de 10 mM de metformina durante 18 horas no alteró la capacidad de adhesión celular en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 (Aftab *et al.*, 2022). En el caso de las células 4T1, un estudio previo reportó que dosis de 8mM y 20mM de metformina disminuyeron la adhesión celular en células 4T1 cuando la exposición fue de 24 horas (Farahi *et al.*, 2021). Sin embargo, en esta tesina, una concentración 20 mM de metformina durante 48 horas resultó en una fuerte reducción de la viabilidad celular, lo que imposibilitó analizar su efecto en la adhesión. Al estar expuestas a altas dosis de metformina durante un periodo de tiempo más prolongado, la mayoría de las células murieron, por lo que no se pudo analizar el efecto directo de esta dosis en la capacidad de adhesión. Para evaluar adecuadamente si altas dosis de metformina durante tiempos prolongados afectan la adhesión celular en la línea 4T1, será necesario implementar metodologías específicas que permitan distinguir entre la pérdida de viabilidad y los efectos directos de la metformina sobre la adhesión celular. Los resultados sugieren que la metformina no altera la adhesión celular en dosis bajas en líneas de CMTN, mientras que el efecto de dosis altas está limitado por la pérdida de viabilidad celular, lo que dificulta la evaluación directa de la capacidad de adhesión.

Por último, en esta Tesina se evidenció que las concentraciones de 0,1 mM y 20mM redujeron el área de migración en la línea celular 4T1 (Figuras 19C y 19D), del mismo modo que fue reportado en un trabajo previo (Kawakita *et al.*, 2021) donde se observó que una dosis de 10 mM disminuyó la migración de células 4T1. Asimismo, el resultado valida lo observado por Pham *et al.*, donde se demostró que la metformina disminuyó la migración de células 4T1 (Pham *et al.*, 2023). En la línea MDA-MB-231, se encontró que las dosis de metformina utilizadas no generaron ningún efecto en la migración (Figuras 19A y 19B). Este resultado no concuerda con lo reportado previamente por Kawakita y colaboradores donde se demostró

que la exposición a una concentración de 10mM de metformina durante 48 horas disminuyó la migración celular. Sin embargo, otro trabajo demostró que una dosis de 5 mM de metformina durante 24 horas no redujo la migración celular en la línea MDA-MB-231 (Lee *J et al.*, 2019). Las discrepancias observadas entre resultados se pueden deber al diseño experimental que se siguió, ya que Kawakita y compañía incubaron las células durante 48 horas con metformina y posteriormente cosecharon las células para realizar el ensayo de migración, lo que pudo ocasionar que el estrés celular y los cambios en la viabilidad afecten la capacidad de migración y por lo tanto migren menos. Mientras que, Lee y colaboradores incubaron las células con medio de cultivo completo y una vez realizada la herida reemplazaron el medio de cultivo por medio de cultivo con metformina, con el cual se incubó durante 24 horas y se determinó el área de migración en ese tiempo (Lee *J et al.*, 2019). En esta Tesina se realizó un ensayo de migración parecido al de Lee *et al.*, mostrando un efecto más directo de la metformina en la migración, ya que puede verse menos afectado por otras variables como la adhesión o viabilidad de las células.

Los resultados obtenidos validan que la acción antitumoral de la metformina en CMTN es dependiente de la dosis administrada, del tiempo de exposición y del diseño experimental llevado a cabo. En esta Tesina, se evidenció que una dosis baja de metformina (0,1 mM), comparable a la utilizada en pacientes diabéticos, no muestra efectos significativos en la reducción de la proliferación, migración ni capacidad clonogénica de las células tumorales. Sin embargo, se observó que dosis más altas de metformina generan un efecto antitumoral notable al reducir estos procesos. Los resultados obtenidos validan el potencial preclínico observado de la metformina como agente terapéutico en el CMTN. En el futuro sería muy interesante estudiar el efecto de la metformina en la población de CSCs de estos modelos de CMTN.

Tratamiento conjunto de metformina y let-7b-5p en células de CMTN

Con el objetivo de estudiar el rol de let-7b-5p en la sensibilidad y respuesta antitumoral de la metformina en células de CMTN, se evaluó si el tratamiento combinado de let-7b-5p y metformina mejora la respuesta en cuanto a proliferación, migración y clonogenicidad de células de CMTN en comparación con cada terapia por separado. Esto debido a que ambos tratamientos son de baja toxicidad y la combinación de ambos podría ser una terapia prometedora. En la línea MDA-MB-231, se observó que el tratamiento

combinado disminuyó la viabilidad celular en mayor medida que el tratamiento único con metformina. En particular, se evidenció que una dosis de 1 mM y let-7b-5p redujeron notablemente la viabilidad respecto al tratamiento control (Figura 20). Estos resultados demuestran el potencial del tratamiento conjunto con let-7b-5p, ya que se observó una disminución en la concentración de metformina necesaria para observar un efecto tanto en la viabilidad como en la migración celular en esta línea de CMTN.

Por otro lado, en la línea celular 4T1, el tratamiento combinado de un *mimic* de let-7b-5p y metformina no mostró un efecto aditivo en la viabilidad celular (Figura 21), en comparación con los tratamientos individuales. La metformina redujo significativamente la viabilidad celular a partir de concentraciones de 1 mM, sin embargo, este efecto no se potenció con la adición del *mimic* de let-7b-5p.

Estos resultados sugieren, que tanto let-7b-5p como concentraciones intermedias de metformina ejercen efectos inhibitorios individuales marcados y que su combinación alcanza un límite de saturación en los procesos evaluados, impidiendo un beneficio adicional. La mayor sensibilidad a la metformina observada en la línea celular 4T1 respecto a la línea MDA-MB-231, podría explicar por qué no se observa un efecto aditivo en el tratamiento combinado.

En cuanto a la capacidad de migración, en el modelo de MDA-MB-231, no se observó un sinergismo al combinar metformina con la sobreexpresión de let-7b-5p, sino que, tal como se discutió únicamente let-7b-5p moduló la migración de estas células (Figura 23). Asimismo, en el modelo de 4T1, tampoco se observó un beneficio en combinar estos tratamientos (Figura 24).

Respecto a la capacidad clonogénica, tanto una concentración de 20 mM de metformina como la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyeron la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231. Sin embargo, el tratamiento combinado no potenció este efecto, e incluso se observó una interacción negativa significativa entre ambos tratamientos (Figura 22). Esto al igual que lo observado en la viabilidad de las células 4T1, sugiere que el efecto de ambos tratamientos por separado es tan marcado que la combinación no aporta un beneficio adicional y podría incluso reducir los beneficios de los tratamientos individuales. Estos datos sugieren que tanto la metformina y let-7b-5p actúan inhibiendo una misma vía de señalización que regula la clonogenicidad, por lo que, si ambos tratamientos inhiben fuertemente esta vía

por separado, la combinación no produciría un efecto adicional, ya que la vía ya estaría saturada.

El tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p podría ser beneficioso para personas con CMTN que también padecen SM, especialmente considerando el uso regular de metformina para controlar la hiperglucemia en estos pacientes. Sin embargo, para poder afirmar que el tratamiento combinado sería útil para estos pacientes, se necesitan estudios adicionales que exploren el efecto de la metformina y let-7b-5p observados en esta tesina en modelos animales que repliquen las condiciones del SM y el CMTN. Además, sería importante estudiar la seguridad y eficacia del tratamiento combinado y la influencia del SM en la respuesta al tratamiento con metformina y let-7b-5p.

Efecto de let-7b-5p en la expresión de genes relacionados con la proliferación, adhesión, migración y fenotipo stem en la línea MDA-MB-231

Por último, se exploraron los mecanismos moleculares por los cuales let-7b-5p podría modular la proliferación, capacidad clonogénica y migración de células de CMTN. Para ello, se evaluó el efecto de let-7b-5p en la expresión de genes asociados a la proliferación, adhesión, y migración de células de CMTN. Mediante un análisis bioinformático utilizando la herramienta Diana miRPath se encontraron varios posibles genes blancos relacionados con estos procesos y se analizó la expresión de los mismos mediante RT-qPCR. También, teniendo en cuenta trabajos previos que demuestran un efecto de let-7b-5p en la población de células madre tumorales, se intentó evaluar la expresión de genes asociados a este fenotipo. No obstante, es importante destacar que, si bien se intentó evaluar marcadores clásicos como Nanog, OCT4, Sox2 y cMyc, solo pudo evaluarse este último por problemas técnicos con los oligos utilizados para evaluar los otros marcadores.

Se encontró que la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la expresión de E-Cadherina y aumentó la expresión de Vimentina. También se observó una tendencia a disminuir la expresión de Fibronectina.

La tendencia observada hacia una disminución en la expresión de fibronectina inducida por let-7b-5p (Figura 25) está alineada con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio. En estos estudios, mediante análisis bioinformáticos la fibronectina fue identificada como un blanco validado de let-7b-5p que está aumentado en tejido tumoral mamario en comparación con tejido normal adyacente en pacientes con CM de la base de

datos de TCGA BRCA. Además, una alta expresión de fibronectina se asoció con un menor intervalo libre de progresión en estos pacientes (Farré *et al.*, 2020). Asimismo, en otro estudio previo realizado en el laboratorio, al analizar la expresión de fibronectina en la línea celular 4T1 transfectada transientemente con un *mimic* de let-7b-5p, también se observó una tendencia a una menor expresión en el grupo transfectado con miARN. Sin embargo, esta diferencia no resultó significativa (Grinpelc, 2023). En esta Tesina, la variabilidad en la expresión entre las muestras analizadas fue considerable, lo que pudo haber contribuido a la falta de significancia estadística en los resultados. Además, es importante tener en cuenta que se realizó una prueba estadística no paramétrica para evaluar la significancia, la cual, por ser más conservadora y dependiente del tamaño de la muestra, pudo haber limitado la detección de diferencias significativas. Para complementar estos resultados y validar a la fibronectina como blanco de let-7b-5p en CMTN sería importante determinar si la disminución en la expresión de fibronectina inducida por let-7b-5p se traduce a nivel proteico mediante un Western Blot.

Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p disminuyó la expresión de E-Cadherina y aumentó la expresión de Vimentina. Estos dos hallazgos van en contra del efecto de let-7b-5p sobre la migración celular observado en esta Tesina, ya que E-cadherina es un marcador de tejido epitelial, que suele ser menos invasivo, en tanto que Vimentina es un marcador de tejido mesenquimal, que suele ser menos invasivo. Además, la regulación negativa en la expresión de E-cadherina mostrada en varios tipos de cáncer se correlaciona con un comportamiento agresivo y se considera un factor pronóstico asociado con una mala supervivencia (Berx & Van Roy, 2009). Del mismo modo, la sobreexpresión de Vimentina se correlaciona con un aumento de la migración e invasión de las células de CM (Satelli & Li, 2011). Sin embargo, puede ocurrir que esta disminución o aumento en la expresión de estos genes inducido por let-7b-5p no se observe a nivel proteico, por lo que es necesario evaluar los niveles de proteína de Vimentina y E-Cadherina mediante un Western Blot para confirmar si se observa este mecanismo. Además, es crucial investigar otros marcadores relacionados con la progresión tumoral que puedan explicar el efecto de let-7b-5p en la migración celular.

Además, en esta Tesina se observó que la sobreexpresión de let-7b-5p no afectó la expresión de genes asociados con la proliferación celular, como Ciclina D1, CDKN1A y c-Myc (Figura 25). La sobreexpresión de ciclina D1 se observa en más del 50% de los casos de CM e impulsa tanto la proliferación celular como la expansión de CSC, contribuyendo a la

tumorigénesis, especialmente en tumores ER+ (Velasco-Velázquez *et al.*, 2011). A su vez, c-Myc desempeña un rol central en la progresión tumoral al modular el microambiente tumoral, promover la angiogénesis, estimular la proliferación y facilitar la evasión inmunitaria (Gao *et al.*, 2023).

Un trabajo previo demostró que la transfección con un *mimic* de let-7b disminuyó la expresión de Ciclina D1 tanto a nivel de la expresión del ARNm como a nivel proteico en CSC derivadas de líneas de CM del subtipo luminal A (Li *et al.*, 2019). Esto sugiere que let-7b-5p podría reducir la expresión de estos genes de manera específica en la subpoblación de CSC, lo cual podría explicar la falta de efecto observado en líneas no enriquecidas en estas células. Respecto a c-Myc, aunque este gen ha sido reportado como un blanco potencial de la familia let-7, no se han realizado estudios previos que validen a c-Myc como blanco de let-7b-5p en líneas celulares de CMTN, siendo esta tesis la primera en realizarlo.

Por último, se observó que let-7b-5p no afectó la expresión de CTBP1 y de BRCA1 en la línea celular MDA-MB-231. Previamente en el laboratorio, se demostró que CTBP1 presenta un rol oncogénico en modelos de CMTN (De Luca *et al.*, 2016; Farré *et al.*, 2018). A su vez, BRCA1 es una proteína supresora de tumores que participa en la reparación del DNA y en la regulación de la expresión génica, su reducción o mutación aumenta el riesgo de CM (Romagnolo *et al.*, 2015). No existen trabajos previos que hayan analizado la acción de let-7b-5p sobre la expresión de estos genes en líneas celulares de CMTN, siendo este trabajo el primero en evaluarlo.

Futuros estudios podrían enfocarse en evaluar los niveles proteicos en células tumorales para determinar si let-7b-5p regula su expresión como blanco mediante la inhibición del proceso de traducción, en lugar de provocar la degradación del ARNm. Adicionalmente, sería valioso analizar la expresión de estos genes en CSC derivadas de líneas celulares CMTN para determinar si let-7b-5p induce la degradación de estos genes solo en esa subpoblación celular. Asimismo, analizar la expresión de estos genes bajo diferentes niveles de let-7b-5p podría aportar información sobre la relación nivel de expresión-respuesta de este miARN. Finalmente, también sería muy interesante poder ampliar este estudio analizando la expresión de otros genes.

Conclusiones

En primer lugar, los resultados obtenidos en esta Tesina demuestran que let-7b-5p posee un rol de supresor tumoral en CMTN, su sobreexpresión disminuyó la viabilidad, la capacidad clonogénica y la migración en la línea celular MDA-MB-231. Estos hallazgos coinciden con los resultados previos del laboratorio en la línea 4T1 y con otros estudios que reportan a let-7b-5p como un supresor tumoral en diferentes tipos de cáncer y resaltan su posible potencial terapéutico. A su vez, el análisis de la expresión génica reveló que let-7b-5p podría modular la expresión de genes clave en la progresión del CMTN, particularmente en genes implicados en la migración celular. Ya que se observó una disminución en la expresión de E-Cadherina y una tendencia a la disminución de Fibronectina, mientras que la expresión de Vimentina se encontró aumentada.

Por otra parte, contrario a lo esperado, no se observó un efecto de la metformina en la modulación de la expresión de let-7b-5p y de otros miARNs en las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, se corroboró el efecto antitumoral de la metformina en las líneas celulares de CMTN, observando una disminución en la viabilidad, proliferación y capacidad clonogénica, validando los reportes previos de la literatura. Sin embargo, no se observó un efecto de la metformina en la adhesión celular a las dosis testeadas.

Por último, en cuanto al tratamiento combinado de metformina y let-7b-5p, se observó un efecto aditivo en la reducción de la viabilidad, ya que el tratamiento conjunto con metformina 1 mM y la sobreexpresión de let-7b-5p redujo la viabilidad celular a niveles similares a los observados luego del tratamiento simple con metformina 5mM, efecto que no se observó en la línea 4T1. Respecto al efecto del tratamiento combinado en la capacidad de migración, no se observó una interacción ni un efecto aditivo en comparación con los tratamientos simples. En cuanto a la capacidad clonogénica, el tratamiento combinado mostró una interacción negativa significativa en la línea MDA-MB-231, sin lograr una disminución superior a los tratamientos individuales.

Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado podría beneficiar a pacientes con CMTN y SM, dado el uso frecuente de metformina para controlar la hiperglucemia. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales en modelos animales, que permitan evaluar la seguridad, eficacia y el impacto del SM en la respuesta al tratamiento. Se requieren estudios adicionales para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la

interacción entre metformina y let-7b-5p. El desarrollo de terapias personalizadas que integren miRNA *mimics* con fármacos reposicionados representa una vía prometedora para abordar los desafíos asociados a la resistencia a tratamientos convencionales y la alta tasa de recurrencia, ofreciendo alternativas más efectivas, económicas y de menor toxicidad.

Bibliografía

1. AFTAB, Saira; KHALID, Zumama; SHAKOORI, Abdul Rauf. Repression of Cell-to-Matrix Adhesion by Metformin Chloride Supports Its Anti-Metastatic Potential in an In Vitro Study on Metastatic and Non-Metastatic Cancer Cells. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 2022, vol. 32, no 2.
2. ALBERTI, Kurt GMM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, 2009, vol. 120, no 16, p. 1640-1645.
3. ALIMOVA, Irina N., et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell cycle*, 2009, vol. 8, no 6, p. 909-915.
4. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Cirugía contra el cáncer de seno.[en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/cirugia-del-cancer-de-seno.html>
5. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Quimioterapia contra el cáncer de seno. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/quimioterapia-para-el-cancer-de-seno.html>
6. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Radioterapia para el cáncer de seno.[en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/radioterapia-para-el-cancer-de-seno.html>
7. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Terapia dirigida para el cáncer de seno. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-dirigida-para-el-cancer-de-seno.html>
8. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Terapia hormonal contra el cáncer de seno. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-hormonal-para-el-cancer-de-seno.html>
9. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Tratamiento para el cáncer de seno. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento.html>
10. AMERICAN CANCER SOCIETY. (2024). Tratamiento para el cáncer de seno. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento.html>
11. ARNOLD, Melina, et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 2022, vol. 66, p. 15-23.

12. ASLEH, Karama, et al. Triple-negative PAM50 non-basal breast cancer subtype predicts benefit from extended adjuvant capecitabine. *Clinical Cancer Research*, 2023, vol. 29, no 2, p. 389-400.
13. BAILEY, Clifford J. Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 2017, vol. 60, no 9, p. 1566-1576.
14. BAO, Bin, et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miARNs in pancreatic cancer cells. *Cancer prevention research*, 2012, vol. 5, no 3, p. 355-364.
15. BARTELS, Claudine L.; TSONGALIS, Gregory J. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical chemistry*, 2009, vol. 55, no 4, p. 623-631.
16. BAYRAKTAR, Soley, et al. Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer. *Cancer*, 2012, vol. 118, no 5, p. 1202-1211.
17. BERAL, Valerie, et al. Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *The Lancet*, 2003, vol. 362, no 9392, p. 1330-1331.
18. BHADORIA, A. S., et al. Reproductive factors and breast cancer: A case—control study in tertiary care hospital of North India. *Indian Journal of Cancer*, 2013, vol. 50, no 4, p. 316-321.
19. BHANDARI, Ruchi, et al. Metabolic syndrome is associated with increased breast cancer risk: a systematic review with meta-analysis. *International journal of breast cancer*, 2014, vol. 2014, no 1, p. 189384.
20. BORCHERT, Glen M.; LANIER, William; DAVIDSON, Beverly L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 2006, vol. 13, no 12, p. 1097-1101.
21. CAI, Hao; EVERETT, Ruth S.; THAKKER, Dhiren R. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. *British journal of pharmacology*, 2019, vol. 176, no 15, p. 2724-2735.
22. CAO, Li, et al. Advances in studies on metabolic syndrome and breast cancer. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese Journal of Surgery]*, 2015, vol. 53, no 12, p. 966-969.
23. CAPASSO, Immacolata, et al. Metabolic syndrome affects breast cancer risk in postmenopausal women: National Cancer Institute of Naples experience. *Cancer biology & therapy*, 2010, vol. 10, no 12, p. 1240-1243.
24. CEJUELA, Mónica, et al. Metformin and breast cancer: where are we now?. *International journal of molecular sciences*, 2022, vol. 23, no 5, p. 2705.
25. CHEN, Caifu, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*, 2005, vol. 33, no 20, p. e179-e179.
26. CHLEBOWSKI, Rowan T., et al. Diabetes, metformin, and breast cancer in postmenopausal women. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, vol. 30, no 23, p. 2844-2852.

27. CLEVELAND, Rebecca J., et al. Weight gain prior to diagnosis and survival from breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2007, vol. 16, no 9, p. 1803-1811.
28. COBAIN, Erin F.; MILLIRON, Kara J.; MERAJVER, Sofia D. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. En *Seminars in oncology*. WB Saunders, 2016. p. 528-535.
29. COL, Nananda F., et al. Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review. *Breast cancer research and treatment*, 2012, vol. 135, p. 639-646.
30. COSTA, Barbara, et al. Understanding breast cancer: From conventional therapies to repurposed drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, vol. 151, p. 105401.
31. CUFÍ, Sílvia, et al. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+ CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget*, 2012, vol. 3, no 4, p. 395.
32. CULLEN, Bryan R. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular cell*, 2004, vol. 16, no 6, p. 861-865.
33. DAI, Qiong; LIU, Bei; DU, Yukai. Meta-analysis of the risk factors of breast cancer concerning reproductive factors and oral contraceptive use. *Frontiers of Medicine in China*, 2009, vol. 3, p. 452-458.
34. DE LUCA, Paola, et al. CtBP1 associates metabolic syndrome and breast carcinogenesis targeting multiple miARNs. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no 14, p. 18798.
35. DI VEROLI, Giovanni Y., et al. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, no 18, p. 2866-2868.
36. DOWLING, Ryan JO, et al. Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast cancer research*, 2015, vol. 17, p. 1-12.
37. EVANS, Josie MM, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Bmj*, 2005, vol. 330, no 7503, p. 1304-1305.
38. FARAHI, Ali, et al. Crocin and Metformin suppress metastatic breast cancer progression via VEGF and MMP9 downregulations: in vitro and in vivo studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021, vol. 476, no 9, p. 3341-3351.
39. FARRÉ, Paula L., et al. CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis. *Oncotarget*, 2018, vol. 9, no 17, p. 13848.
40. FENN, Kathleen, et al. Phase 1 study of erlotinib and metformin in metastatic triple-negative breast cancer. *Clinical breast cancer*, 2020, vol. 20, no 1, p. 80-86.
41. GODET, Inês; GILKES, Daniele M. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative cancer science and therapeutics*, 2017, vol. 4, no 1.

42. GOLDBIRSCHE, Aron, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology*, 2013, vol. 24, no 9, p. 2206-2223.
43. GONG, Zhihong, et al. Diabetes, metformin and incidence of and death from invasive cancer in postmenopausal women: results from the women's health initiative. *International Journal of Cancer*, 2016, vol. 138, no 8, p. 1915-1927.
44. GOODWIN, Pamela J., et al. Abstract GS1-08: CCTGMA. 32, a phase III randomized double-blind placebo controlled adjuvant trial of metformin (MET) vs placebo (PLAC) in early breast cancer (BC): results of the primary efficacy analysis (clinical trials. gov NCT01101438). *Cancer Research*, 2022, vol. 82, no 4_Supplement, p. GS1-08-GS1-08.
45. GRINPELC, A. Efecto de los miR-877-5p/-3p y let-7b-5p/-3p sobre el crecimiento y progresión tumoral del cáncer de mama triple negativo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de San Martín, 2023.
46. GROELLY, Florian J., et al. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2023, vol. 23, no 2, p. 78-94.
47. HADAD, S. M., et al. Effects of metformin on breast cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle. *Clinical and Translational Oncology*, 2014, vol. 16, p. 746-752.
48. HADAD, Sirwan, et al. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. *Breast cancer research and treatment*, 2011, vol. 128, p. 783-794.
49. HAMMOND, Scott M. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 2015, vol. 87, p. 3-14.
50. HAN, Jinju, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *cell*, 2006, vol. 125, no 5, p. 887-901.
51. HANNA, Johora; HOSSAIN, Gazi S.; KOCERHA, Jannet. The potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Frontiers in genetics*, 2019, vol. 10, p. 478.
52. HECKMAN-STODDARD, Brandy M., et al. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia*, 2017, vol. 60, no 9, p. 1639-1647.
53. HEISER, Laura M., et al. Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no 8, p. 2724-2729.
54. HIRSCH, Heather A., et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer research*, 2009, vol. 69, no 19, p. 7507-7511.
55. HUANG, Xiujuan, et al. Silencing of let-7b-5p inhibits ovarian cancer cell proliferation and stemness characteristics by Asp-Glu-Ala-Asp-box helicase 19A. *Bioengineered*, 2021, vol. 12, no 1, p. 7666-7677.

56. HUTVAGNER, Gyorgy; ZAMORE, Phillip D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002, vol. 297, no 5589, p. 2056-2060.
57. ILIOPOULOS, Dimitrios; HIRSCH, Heather A.; STRUHL, Kevin. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer research*, 2011, vol. 71, no 9, p. 3196-3201.
58. INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Mortalidad por cáncer en Argentina. [en línea]. Ministerio de Salud, 2024. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad-cm>
59. IRIGOYEN, Arrechea, et al. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. En *Anales del sistema sanitario de Navarra*. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud, 2011. p. 219-233.
60. JIN, Dan, et al. Metformin-repressed miR-381-YAP-snail axis activity disrupts NSCLC growth and metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020, vol. 39, p. 1-24.
61. JIRALERSPONG, Sao, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 2009, vol. 27, no 20, p. 3297-3302.
62. JU, Zhenlin, et al. Integrative analyses of multilevel omics reveal preneoplastic breast to possess a molecular landscape that is globally shared with invasive basal-like breast cancer. *Cancers*, 2020, vol. 12, no 3, p. 722.
63. KABOLI, Parham Jabbarzadeh, et al. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacological research*, 2015, vol. 97, p. 104-121.
64. KAWAKITA, Emi, et al. Metformin mitigates DPP-4 inhibitor-induced breast cancer metastasis via suppression of mTOR signaling. *Molecular Cancer Research*, 2021, vol. 19, no 1, p. 61-73.
65. KHALIS, Mohamed, et al. Menstrual and reproductive factors and risk of breast cancer: A case-control study in the Fez region, Morocco. *PloS one*, 2018, vol. 13, no 1, p. e0191333.
66. KIM, Yeonju; YOO, Keun-Young; GOODMAN, Marc T. Differences in incidence, mortality and survival of breast cancer by regions and countries in Asia and contributing factors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015, vol. 16, no 7, p. 2857-2870.
67. KWON, Yun-Suk, et al. Metformin selectively targets 4T1 tumorspheres and enhances the antitumor effects of doxorubicin by downregulating the AKT and STAT3 signaling pathways. *Oncology letters*, 2019, vol. 17, no 2, p. 2523-2530.
68. LAAMIRI, Fatima Zahra, et al. Risk factors for breast cancer of different age groups: Moroccan data?. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2015, vol. 5, no 02, p. 79.

69. LAU, Ying-Ka Ingar, et al. Metformin and erlotinib synergize to inhibit basal breast cancer. *Oncotarget*, 2014, vol. 5, no 21, p. 10503.
70. LEE, Jung Ok, et al. Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast Cancer Research*, 2019, vol. 21, p. 1-18.
71. LEE, Yoontae, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 2004, vol. 23, no 20, p. 4051-4060.
72. LI, Ling, et al. Let-7b-5p inhibits breast cancer cell growth and metastasis via repression of hexokinase 2-mediated aerobic glycolysis. *Cell Death Discovery*, 2023, vol. 9, no 1, p. 114.
73. LI, Weiguang, et al. Metformin alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Diabetes research and clinical practice*, 2012, vol. 96, no 2, p. 187-195.
74. LI, Xiang, et al. Matrine inhibitory effect on self-renewal and re-sensitization of 5-FU resistant NSCLC stem cells were through Let-7b dependent downregulation of CCND1. *Cell Cycle*, 2020, vol. 19, no 23, p. 3249-3259.
75. LI, Yongzhen, et al. miR-125b-5p inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting KIAA1522. *Biochemical and biophysical research communications*, 2018, vol. 504, no 1, p. 277-282.
76. LIU, Bolin, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell cycle*, 2009, vol. 8, no 13, p. 2031-2040.
77. LIU, Haixia; XIANG, Lili; MEI, Yu. miR-877-5p Inhibits Epithelial Mesenchymal Transformation of Breast Cancer Cells by Targeting FGB. *Disease Markers*, 2022, vol. 2022, no 1, p. 4882375.
78. LOH, Hui-Yi, et al. The regulatory role of microRNAs in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 2019, vol. 20, no 19, p. 4940.
79. MAITI, B., et al. The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2010, vol. 121, p. 479-483.
80. MALHOTRA, Gautam K., et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 2010, vol. 10, no 10, p. 955-960.
81. MALLIK, Ritwika; CHOWDHURY, Tahseen A. Metformin in cancer. *Diabetes research and clinical practice*, 2018, vol. 143, p. 409-419.
82. MARINELLO, Poliana Camila, et al. Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1 induction. *Tumor Biology*, 2016, vol. 37, p. 5337-5346.
83. MARTIN-CASTILLO, Begoña, et al. A phase 2 trial of neoadjuvant metformin in combination with trastuzumab and chemotherapy in women with early HER2-positive breast cancer: the METTEN study. *Oncotarget*, 2018, vol. 9, no 86, p. 35687.

84. MOMENIMOVAHED, Zohre; SALEHINIYA, Hamid. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2019, p. 151-164.
85. MORO, Juana, et al. miR-877-5p as a Potential Link between Triple-Negative Breast Cancer Development and Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no 23, p. 16758.
86. MUÑOZ, Juan P., et al. The role of MicroRNAs in breast cancer and the challenges of their clinical application. *Diagnostics*, 2023, vol. 13, no 19, p. 3072.
87. Nanni, O.; Amadori, D.; De Censi, A.; Rocca, A.; Freschi, A.; Bologna, A.; Gianni, L.; Rosetti, F.; Amaducci, L.; Cavanna, L.; et al. Metformin plus chemotherapy versus chemotherapy alone in the first-line treatment of HER2-negative metastatic breast cancer. The randomized, phase 2 clinical trial. *Breast Cancer Res. Treat.* 2019, 174, 433–442. [CrossRef]
88. NIE, Jun, et al. MiR-125b regulates the proliferation and metastasis of triple negative breast cancer cells via the Wnt/ β -catenin pathway and EMT. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2019, vol. 83, no 6, p. 1062-1071.
89. NIRAULA, Saroj, et al. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast cancer research and treatment*, 2012, vol. 135, p. 821-830.
90. O'BRIEN, Jacob, et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 2018, vol. 9, p. 402.
91. OLIVERAS-FERRAROS, Cristina, et al. Micro (mi) RNA expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin: induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGF β -induced oncomiR miRNA-181a. *Cell cycle*, 2011, vol. 10, no 7, p. 1144-1151.
92. PARKER, Joel S., et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology*, 2009, vol. 27, no 8, p. 1160-1167.
93. PEROU, Charles M., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, vol. 406, no 6797, p. 747-752.
94. PHAM, Duy Khuong, et al. Combinatorial effects of metformin and glucose on the immune evasion of breast cancer 4T1 cells. *Biomedical Research and Therapy*, 2023, vol. 10, no 10, p. 5942-5952.
95. PIMENTEL, Isabel, et al. A phase II randomized clinical trial of the effect of metformin versus placebo on progression-free survival in women with metastatic breast cancer receiving standard chemotherapy. *The Breast*, 2019, vol. 48, p. 17-23.
96. PRAT, Aleix; ELLIS, Matthew J.; PEROU, Charles M. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nature reviews Clinical oncology*, 2012, vol. 9, no 1, p. 48-57.
97. REEVES, Gillian K., et al. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *Bmj*, 2007, vol. 335, no 7630, p. 1134.

98. RENA, Graham; HARDIE, D. Grahame; PEARSON, Ewan R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 2017, vol. 60, no 9, p. 1577-1585.
99. RO, Seungil, et al. Tissue-dependent paired expression of miARNs. *Nucleic acids research*, 2007, vol. 35, no 17, p. 5944-5953.
100. ROCHA, Guilherme Z., et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clinical cancer research*, 2011, vol. 17, no 12, p. 3993-4005.
101. PG ROMAGNOLO, Alberto; F ROMAGNOLO, Donato; I SELMIN, Ornella. BRCA1 as target for breast cancer prevention and therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2015, vol. 15, no 1, p. 4-14.
102. SALVATORE, Teresa, et al. Can metformin exert as an active drug on endothelial dysfunction in diabetic subjects?. *Biomedicines*, 2020, vol. 9, no 1, p. 3.
103. SALVATORE, Teresa, et al. Effects of metformin in heart failure: From pathophysiological rationale to clinical evidence. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no 12, p. 1834.
104. SAMUEL, Samson Mathews, et al. Counteracting chemoresistance with metformin in breast cancers: targeting cancer stem cells. *Cancers*, 2020, vol. 12, no 9, p. 2482.
105. SANTOS-CARBALLAL, Beatriz, et al. Physicochemical and biological characterization of chitosan-microRNA nanocomplexes for gene delivery to MCF-7 breast cancer cells. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, no 1, p. 13567.
106. SHI, Bin, et al. Metformin suppresses breast cancer growth via inhibition of cyclooxygenase-2. *Oncology Letters*, 2021, vol. 22, no 2, p. 1-14.
107. SONNENBLICK, Amir, et al. Impact of diabetes, insulin, and metformin use on the outcome of patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive primary breast cancer: analysis from the ALTO Phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, vol. 35, no 13, p. 1421-1429.
108. SORANNA, Davide, et al. Cancer risk associated with use of metformin and sulfonylurea in type 2 diabetes: a meta-analysis. *The oncologist*, 2012, vol. 17, no 6, p. 813-822.
109. STORDAL, Britta. Breastfeeding reduces the risk of breast cancer: A call for action in high-income countries with low rates of breastfeeding. *Cancer Medicine*, 2023, vol. 12, no 4, p. 4616-4625.
110. SUN, X., et al. Let-7c blocks estrogen-activated Wnt signaling in induction of self-renewal of breast cancer stem cells. *Cancer gene therapy*, 2016, vol. 23, no 4, p. 83-89.
111. SUN, Xin, et al. Breast cancer stem-like cells are sensitized to tamoxifen induction of self-renewal inhibition with enforced Let-7c dependent on Wnt blocking. *international journal of molecular medicine*, 2018, vol. 41, no 4, p. 1967-1975.

112. SZCZEPANEK, Joanna; SKORUPA, Monika; TRETYN, Andrzej. MicroRNA as a potential therapeutic molecule in cancer. *Cells*, 2022, vol. 11, no 6, p. 1008.
113. TAKAHASHI, Ryou-u; MIYAZAKI, Hiroaki; OCHIYA, Takahiro. The roles of microRNAs in breast cancer. *Cancers*, 2015, vol. 7, no 2, p. 598-616.
114. TANG, Grace H., et al. Association of metformin with breast cancer incidence and mortality in patients with type II diabetes: a GRADE-assessed systematic review and meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 2018, vol. 27, no 6, p. 627-635.
115. TANG, Li, et al. microRNA inhibitors: Natural and artificial sequestration of microRNA. *Cancer letters*, 2017, vol. 407, p. 139-147.
116. TONG, Jian-hua, et al. Passive smoking exposure from partners as a risk factor for ER+/PR+ double positive breast cancer in never-smoking Chinese urban women: a hospital-based matched case control study. *Plos one*, 2014, vol. 9, no 5, p. e97498.
117. TSANG, Julia YS; GARY, M. Tse. Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 2020, vol. 27, no 1, p. 27-35.
118. TSUKIOKI, Takahiro, et al. Influences of preoperative metformin on immunological factors in early breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2020, vol. 86, p. 55-63.
119. VARKONYI-GASIC, Erika, et al. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods*, 2007, vol. 3, p. 1-12.
120. VASUDEVAN, Shobha. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2012, vol. 3, no 3, p. 311-330.
121. WANG, Ruibin; ZHAO, Yanjie. Effects of Metformin on JNK Signaling Pathway and PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Management and Research*, 2024, p. 259-268.
122. WON, Kwang-Ai; SPRUCK, Charles. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. *International journal of oncology*, 2020, vol. 57, no 6, p. 1245-1261.
123. WU, Mei-Hsuan, et al. Hormonal and body-size factors in relation to breast cancer risk: a prospective study of 11,889 women in a low-incidence area. *Annals of epidemiology*, 2006, vol. 16, no 3, p. 223-229.
124. WU, Kun, et al. miR-877-5p suppresses gastric cancer cell proliferation through targeting FOXM1. *OncoTargets and therapy*, 2020, p. 4731-4742.
125. XIAO-DAN, G. U. O.; ZHANG, Nan; LEI, S. H. A. miR-877-5p antagonizes the promoting effect of SP on gastric cancer progression. *Neoplasma*, 2020, vol. 67, no 6.
126. XIONG, Dan-dan, et al. A circRNA-miRNA-mRNA network identification for exploring underlying pathogenesis and therapy strategy of hepatocellular carcinoma. *Journal of translational medicine*, 2018, vol. 16, p. 1-21.
127. YAN, T. H., et al. MiR-877-5p suppresses cell growth, migration and invasion by targeting cyclin dependent kinase 14 and predicts prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, vol. 22, no 10, p. 3038-3046.

128. YANG, Ting; YANG, Yuan; LIU, Shengchun. Association between metformin therapy and breast cancer incidence and mortality: evidence from a meta-analysis. *Journal of Breast Cancer*, 2015, vol. 18, no 3, p. 264-270.
129. YE, Feng, et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. *Molecular cancer*, 2023, vol. 22, no 1, p. 105.
130. YIN, Li, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 2020, vol. 22, p. 1-13.
131. YU, Fengyan, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 2007, vol. 131, no 6, p. 1109-1123.
132. ZAKIKHANI, Mahvash, et al. Metformin is an AMP kinase–dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer research*, 2006, vol. 66, no 21, p. 10269-10273.
133. ZHAO, Yannan, et al. A randomized phase II study of aromatase inhibitors plus metformin in pre-treated postmenopausal patients with hormone receptor positive metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no 48, p. 84224.
134. ZHU, Jinxiang, et al. LncRNA TRG-AS1 inhibits bone metastasis of breast cancer by the miR-877–5p/WISP2 axis. *Pathology-Research and Practice*, 2023, vol. 243, p. 154360.
135. ZOLFAROLI, Irene; TARÍN, Juan J.; CANO, Antonio. Hormonal contraceptives and breast cancer: Clinical data. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2018, vol. 230, p. 212-216.