



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad Cuajimalpa**

---

---

**Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería**

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL microRNA-122 EN CÉLULAS DE CÁNCER  
DE MAMA RESISTENTES A RADIOTERAPIA**

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales e  
Ingeniería

**P R E S E N T A:**

Isidro Xavier Pérez Añorve

**D I R E C T O R A D E T E S I S:**

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

**A S E S O R E S:**

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

*Ciudad de México, Marzo de 2020.*

## Índice general

---

Abreviaturas .....	8
Índice de figuras .....	11
Índice de tablas .....	13
Resumen .....	14
Abstrac.....	15
Introducción .....	16
Cáncer de mama. ....	16
Radioterapia en cáncer. ....	16
Radioresistencia en cáncer. ....	17
Mecanismos moleculares de radioresistencia en cáncer.....	18
Biogénesis de los miRNAs. ....	20
MiRNAs desregulados en cáncer: OncomiRs. ....	22
MiRNAs asociados a la radioresistencia. ....	22
Biogénesis y función del microRNA-122. ....	23
Antecedentes del trabajo .....	27
Justificación .....	33
Pregunta de investigación .....	34
Hipótesis .....	34
Objetivos.....	34
Objetivo general .....	34
Objetivos particulares .....	34
METODOLOGÍA .....	35
Resultados.....	41
Discusión .....	61
Conclusión.....	69
Conclusiones particulares .....	69
Referencias .....	71
Apéndice.....	82
Publicación del artículo.....	89

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Cuajimalpa, en la Ciudad de México.

Bajo la dirección de:

**Dra. Elena Aréchaga Ocampo**

Asesorado por:

**Dra. Claudia Haydée González de la Rosa**

**Dr. Ernesto Soto Reyes Solís**

Durante el periodo en que cursó el Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería el C. **ISIDRO XAVIER PÉREZ AÑORVE**, con número de becario 416929 y matrícula 2152800034, recibió los siguientes apoyos:

- Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en el periodo: Mayo 2015-Abril 2019 a quien agradece el otorgamiento de dicha beca.
- Por la beca otorgada por la Dra. Claudia Haydée Gonzáles de la Rosa con número de proyecto 47310619, durante el periodo de: Mayo 2019-Julio 2019 a quien agradece enormemente, no solo por el apoyo económico que ha sido de gran ayuda para poder concluir este proyecto, sino por la confianza y la atención al aceptar mi solicitud.
- Por el apoyo económico extraordinario otorgado por la Universidad Autónoma Metropolitana, en el periodo de Agosto 2019-Octubre-2019, a quien agradece el otorgamiento de dicho apoyo.

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado del 4 de Mayo de 2015 al 3 de Abril de 2019 en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias Naturales, de la DCNI.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 9 del mes de Marzo del año 2020, el que suscribe **M. en C. Isidro Xavier Pérez Añorve** alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; “**Análisis funcional del microRNA-122 en células de cáncer de mama resistentes a radioterapia**” realizada bajo la dirección de la **Dra. Elena Aréchaga Ocampo** y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [e\\_arechaga@hotmail.com](mailto:e_arechaga@hotmail.com)

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



---

Isidro Xavier Pérez Añorve

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El que suscribe **M. en C. Isidro Xavier Pérez Añorve**, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.



---

Isidro Xavier Pérez Añorve

## **DECLARACIÓN DE NO LUCRO:**

El que suscribe, **M. en C. Isidro Xavier Pérez Añorve** alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).



---

Isidro Xavier Pérez Añorve

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **Para mi Directora de Tesis:**

**Dra. Elena Aréchaga Ocampo**

Por haberme dado la oportunidad y la confianza de realizar este proyecto bajo su dirección y brindarme sus conocimientos, apoyo, experiencia, dedicación, paciencia y su tiempo valioso en la elaboración de este trabajo.

### **Para mi Comité Tutorial:**

**Dra. Claudia Haydée González de la Rosa**

**Dr. Ernesto Soto Reyes Solís**

Por estar presentes en cada seminario y por sus valiosas aportaciones, correcciones, retroalimentación y el tiempo invertido en la elaboración y enriquecimiento de este trabajo.

## **DEDICATORIAS.**

### **A Dios:**

Nuevamente gracias por darme vida y salud y esta oportunidad de culminar una meta más.

### **A mi Mamá:**

Por todo tu cariño y amor y tu gran ejemplo de fortaleza, por tu infinito apoyo y comprensión. Nuevamente te dedico esta Tesis.

### **A mi familia:**

Por todo el apoyo moral que recibí siempre de su parte en estos años de estudio y trabajo.

### **A mis amigos y compañeros:**

Gracias infinitas por su compañía y amistad durante este periodo tan importante de mi vida.

## Abreviaturas

---

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
Ago2	<i>Argonauta 2</i>
DSB	<i>Double-strand break</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
Gy	<i>Gray</i>
HR	<i>Homologous recombination</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MG	<i>Megas</i>
miRNAs	<i>MicroRNAs</i>
RNA <sub>m</sub>	<i>RNA mensajero</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
CPCNP	<i>Cáncer pulmonar de células no pequeñas</i>
PANTHER	<i>Protein analysis through evolutionary relationships</i>
pre-miRNA	<i>miRNA precursor</i>
pri-miRNA	<i>miRNA primario</i>
RI	<i>Radiación ionizante</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA pol II	<i>RNA polimerasa II</i>
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
RPM	<i>Reads per million</i>
RR	<i>Radioresistentes</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinases</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription-quantitative of Polymerase Chain Reaction</i>
SLR	<i>Supervivencia libre de recaída</i>
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TNBC	<i>Triple-negative breast cancer</i>

## Índice de figuras

---

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Interacción entre la RI y vías de señalización intracelulares relacionadas con la actividad de HER2.	19
Figura 2. Generación del modelo isogénico de células resistentes a radioterapia en células de cáncer de mama.	28
Figura 3. Caracterización del modelo de radioresistencia en células de cáncer de mama.	29
Figura 4. Expresión diferencial de miRNAs en células de cáncer de mama radioresistentes.	42
Figura 5. Efecto del aumento de miR-122 en células parentales de cáncer de mama.	43
Figura 6. La inhibición de miR-122 revierte la radioresistencia en células de cáncer de mama.	45
Figura 7. Transcriptoma de las células MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122.	46
Figura 8. Representación esquemática: miR-122 regula la transcripción de genes componentes de vías de supervivencia celular.	50
Figura 9. Evaluación del efecto de la inhibición de la expresión del miR-122 sobre el nivel de expresión de las proteínas ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS en células de cáncer de mama radioresistentes.	51
Figura 10. Evaluación del efecto de la expresión del miR-122 sobre la abundancia de las proteínas ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS en células parentales de cáncer de mama.	53
Figura 11. Validación de ZNF611 como posible blanco de miR-122.	56
Figura 12. Análisis de SLR en pacientes con cáncer de mama.	57

Figura 13. Análisis de SLR en pacientes con cáncer de mama de tipo luminal.	58
Figura 14. Análisis de SLR en pacientes con cáncer de mama de tipo TNBC.	59
Figura 15. Modelo de la función del miR-122 en células de cáncer de mama con fenotipo radioresistente.	68
Figura 16. Interacción de los genes modulados en MCF-7RR a nivel de proteína.	71

## Índice de tablas

---

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. MicroRNAs con expresión modulada en MCF-7RR	30
Tabla 2. Genes blanco de miR-122	31
Tabla 3. Ontología de genes blanco de miR-122	31
Tabla 4. Tabla 4. Genes sobreexpresados y suprimidos en MCF-7RR con miR-122 inhibido por antagomiR-122	82

## Resumen

---

La radioresistencia es una propiedad importante de los tumores malignos que da lugar a la recurrencia local y contribuye a una enfermedad progresiva en muchos pacientes. Es importante evaluar la función de los MicroRNAs (miRNAs) debido a que explican los mecanismos moleculares que subyacen a la radioresistencia adquirida en cáncer de mama y además permite identificar nuevas moléculas implicadas en este fenotipo. En este trabajo reportamos un perfil de miRNAs que se expresan diferencialmente en líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo radioresistente MCF-7RR y MDA-MB-231RR. En particular miR-122 aumentó su expresión en ambas líneas celulares de manera similar. Los análisis funcionales indicaron que miR-122 puede promover la supervivencia en las líneas celulares radioresistentes e inhibirla en las líneas celulares parentales tratadas con radioterapia. El panorama transcriptómico obtenido al inducir la pérdida de función de miR-122 en células de cáncer de mama radioresistentes mostró genes enriquecidos en procesos biológicos y vías de señalización como la vía MAPK-ERK, la vía de TNF, respuesta inflamatoria y regulación transcripcional. De manera interesante la modulación de los genes ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8, y HRAS resultó ser un factor pronóstico en pacientes de cáncer de mama tratados con radioterapia, particularmente en pacientes con cáncer de mama de tipo luminal. Nuestros datos destacan que la sobreexpresión de miR-122 promueve el aumento de la supervivencia celular en células de cáncer de mama con fenotipo de radioresistencia adquirida y sugieren que miR-122 controla de manera diferencial la respuesta a la radioterapia jugando un doble papel como miRNA supresor tumoral y como oncomiR dependiendo del fenotipo.

## Abstrac

---

Radioresistance is an important property of malignant tumors that results in local recurrence and contributes to progression of the disease in many patients. It is important to evaluate the function of the MicroRNAs (miRNAs) in order to explain the molecular mechanisms that underlie the acquired radioresistance phenotype in breast cancer, as well as to identify new molecules involved in this event. In this work, we report the profile of differentially expressed miRNAs in radioresistant breast cancer cell lines MCF-7RR and MDA-MB-231RR. In particular miR-122 was overexpressed in both cell lines. Functional analyzes indicated that miR-122 can promote survival in radioresistant cell lines, however in parental cells treated with radiotherapy, miR-122 blocks survival. The transcriptomic landscape obtained by inducing the loss of miR-122 function in radioresistant breast cancer cells was evaluated by microarrays assays. Results showed a set of genes enriched in biological processes and signaling pathways such as MAPK-ERK pathway, TNF pathway, RAS pathway, inflammatory response and transcriptional regulation. Interestingly, differential expression of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8*, and *HRAS* genes represent a potential prognostic factor in breast cancer patients treated with radiotherapy, particularly in patients with luminal breast cancer. Our data highlighted that miR-122 overexpression promotes cell survival in breast cancer cells with acquired radioresistance phenotype and suggests that miR-122 differentially controls the response to radiotherapy by playing a double role as a suppressor miRNA tumor and as oncomiR depending on the phenotype.

## Introducción

---

### **Cáncer de mama.**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente y de mayor mortalidad entre las mujeres a nivel mundial. En México la mortalidad por cáncer de mama supera a la del cáncer cervicouterino colocándose como la principal causa de muerte en mujeres por tumores malignos (Bray *et al*, 2018). Estos datos muestran que el cáncer de mama representa un importante problema de salud pública, que amenaza a las mujeres de todos los niveles socioeconómicos para el cual las instituciones de salud dedican una parte importante de su presupuesto. El 5-10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios, mientras que del 85-95% restante son esporádicos. Histológicamente el 80% son carcinomas ductales y el resto lobulillares (Puchmajerová *et al*, 2018; Brenton *et al*, 2005). En el tratamiento del cáncer de mama se emplean la cirugía, la terapia hormonal, la quimioterapia, la terapia biológica y la radioterapia. La elección del tipo de tratamiento depende de varios factores relacionados con el estado general de la paciente, la histología tumoral, el diagnóstico molecular y el grado tumoral (Ozyigit *et al*, 2014). Aproximadamente, entre el 40 y el 60% de las pacientes con cáncer de mama reciben radioterapia, sin embargo, la efectividad clínica del tratamiento difiere entre tumores individuales, aunque estos sean del mismo origen histológico y etapa clínica. Se ha observado que para las pacientes que se encuentran en etapas tempranas de la enfermedad, el mejor pronóstico de sobrevivencia se da por la cirugía y la terapia adyuvante (quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica), mientras que para etapas más avanzadas de la enfermedad, las características moleculares podrían establecer cuáles son los tratamientos más adecuados para cada paciente (Tailb and Boyages 2017; Ozyigit *et al*, 2014).

### **Radioterapia en cáncer.**

En los pacientes con cáncer, las principales aplicaciones de la radioterapia son para el tratamiento del tumor primario, la reducción del tamaño de la masa tumoral antes de la cirugía y para evitar la metástasis. La radioterapia se aplica sola o en combinación con cirugía o quimioterapia, o una combinación de los tres tratamientos. También se aplica

a los pacientes como intento paliativo para aliviar algunos síntomas de la enfermedad. La radioterapia se basa en el uso de radiación ionizante (RI) de alta energía para eliminar células cancerosas. La radiación puede administrarse de manera externa con un acelerador lineal (terapia de haz de radiación externa), o puede administrarse material radioactivo sólido que se coloca directo en las células cancerosas o cerca de ellas (terapia de radiación interna o braquiterapia) (Willers and Held 2006). Aproximadamente la mitad de los pacientes con cáncer reciben algún tipo de terapia de RI en algún momento durante el curso de su enfermedad (Lawrence 2006). La RI altera la homeostasis celular a través de múltiples mecanismos moleculares incluyendo cambios en la expresión de genes (Kaidar-Person *et al*, 2013). A nivel biológico, la RI rompe las dos cadenas del DNA (DSBs, de sus siglas en inglés, *DNA double-strand breaks*), la ruptura masiva y/o el fallo en la reparación del DNA llevan directa o indirectamente a la muerte celular (Kaidar-Person *et al*, 2013; Li *et al*, 2001; Steel 1996). La RI además genera iones intermediarios, radicales libres del oxígeno y del nitrógeno provocando pérdida de función de proteínas y peroxidación lipídica a nivel de las membranas biológicas (Graupner *et al*, 2017). La radioterapia también puede dañar células no tumorales, esto es uno de los efectos secundarios indeseables del tratamiento. Se sabe que diferentes tumores y tejidos adyacentes al tumor no son igualmente sensibles a la radiación, por lo tanto, un gran reto en el estudio del cáncer es identificar factores tumorales específicos que aumenten la radiosensibilidad (Metheetraitut *et al*, 2013).

### **Radioresistencia en cáncer.**

Un número importante de pacientes desarrollan resistencia clínica a la radiación, por lo que la respuesta adaptativa de los tumores continúa siendo un grave problema en la terapia contra el cáncer. Existen evidencias que sugieren que la radioterapia induce inestabilidad genómica, causa radioresistencia adaptativa y apoptosis (Sisakht *et al*, 2020). Después de varios estudios clínicos y experimentales de la resistencia a la radiación, el mecanismo preciso de la radioresistencia en células cancerosas permanece poco claro (Li *et al*, 2001; Steel 1996; Huber *et al*, 2013). Se sabe que las alteraciones en la abundancia de algunas proteínas citoplasmáticas y nucleares, así

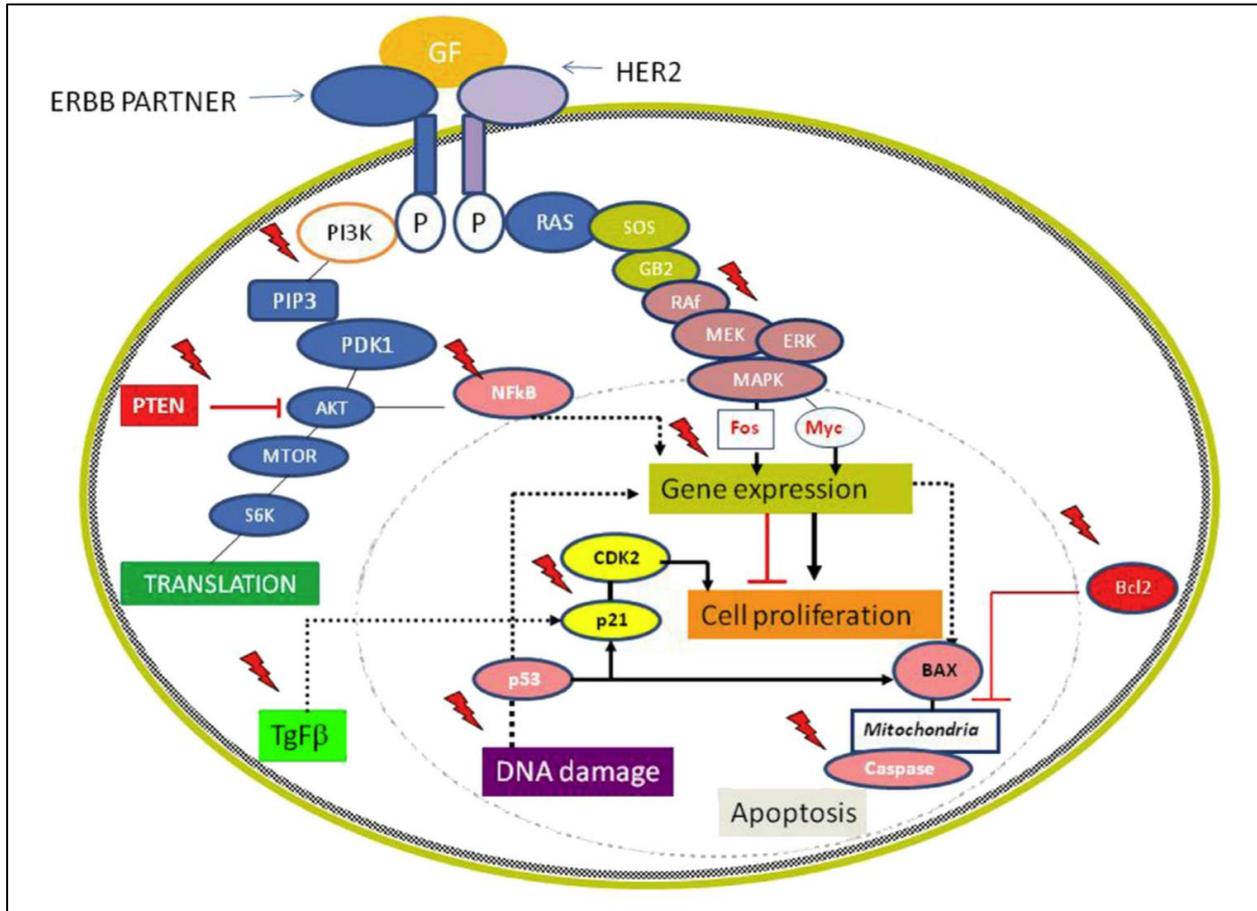
como la modificación de la expresión génica, la reparación del DNA y la disminución de muerte celular por apoptosis pueden estar involucrados en los mecanismos de protección a la radiación. La radioresistencia de la célula tumoral puede deberse a factores intrínsecos, es decir, factores genéticos y moleculares presentes antes del tratamiento, o a factores extrínsecos que son adquiridos durante la radioterapia (Li *et al*, 2001; Jameel *et al*, 2004).

### **Mecanismos moleculares de radioresistencia en cáncer.**

Se ha reportado que cuatro vías clásicas de señales de transducción representadas por PI3K/AKT, MAPK/ERK, NF- $\kappa$ B y TGF- $\beta$ , participan en la regulación de la respuesta del tumor a la radiación (Kaidar-Person *et al*, 2013). Estas rutas de señalización pueden ser moduladas directamente por la RI mediante el cambio conformacional de receptores de tipo tirosina-cinasa (RTK) como el EGFR e IGFR. Además, la RI altera el balance de fosforilación de muchas proteínas que participan en transducción de señales (Tang *et al*, 2020). Entre estas cuatro vías, PI3K/AKT, MAPK/ERK y NF- $\kappa$ B están estrechamente relacionadas con la vía de reparación del DNA por recombinación no homóloga [NHEJ (*non-homologous end joining*)], mientras que la vía de TGF- $\beta$  es necesaria para la activación de la proteína ATM que regula las vías NHEJ y recombinación homóloga [HR (*homologous recombination*)] en respuesta al daño al DNA (Kaidar-Person *et al*, 2013; Steel 1996; Jameel *et al*, 2004). Todas estas rutas de señalización finalmente afectan la expresión de genes que participan en la regulación de los procesos de reparación del DNA, ciclo celular y la apoptosis, incluyendo ATM, DNA-PK, NBS1, RAD51, BRCA1, Chk1, Chk2, CDK2, CDC25, BCL-2, BAD, BIM y MCL1 (Smith *et al*, 2010).

Por otra parte, la radioresistencia de las células tumorales también está asociada a diversos genes como P53, BCL-2 y survivina, así como a la activación del mecanismo de *checkpoint* en respuesta al daño al DNA y al incremento de la capacidad de reparación del DNA (Jameel *et al*, 2004; Lehnert *et al*, 2000). Los parámetros moleculares que determinan cómo las células llegan a ser más o menos sensibles a la radiación no han sido dilucidados, aunque se sugiere que el mecanismo de radioresistencia celular se debe a una interacción multigenética compleja. Además de lo anterior, la resistencia a la radioterapia está relacionada con la expresión de genes

asociados con la diferenciación, la adhesión y la hipoxia celular, así como con la invasión y metástasis (Kaidar-Person *et al*, 2013; Sun *et al*, 2011) (Figura 1).



**Figura 1. Interacción entre la RI y vías de señalización intracelulares relacionadas con la actividad de HER2.** Ilustración esquemática de vías de transducción de señales resultantes de la activación de HER2, PI3K-AKT, MAPK-ERK, TGFβ, apoptosis, reparación del ADN e hipoxia-perfusión. Se muestra la complejidad del comportamiento biológico tumoral de vías de señalización intracelular relacionadas con la respuesta a RI (Kaidar-Person *et al*, 2013).

La respuesta de las células cancerosas a la RI es un factor determinante que influye en la radioresistencia o la radiosensibilidad tumoral, sin embargo, en este fenómeno varios factores contribuyen con el desarrollo de un fenotipo resistente o sensible a la RI, entre ellos el componente genético, epigenético, el microambiente tumoral y la vascularidad pueden modular el comportamiento biológico del tumor alterando su respuesta fisiológica al tratamiento con RI (Newton *et al*, 2019). En este aspecto, diversos genes que son componentes de procesos fisiológicos y patológicos relacionados con la respuesta a la RI son regulados a nivel postranscripcional por los miRNAs (Van

Roosbroeck *et al*, 2017). La función de los miRNAs es principalmente regular de manera negativa la expresión global de genes y que podrían interactuar con los componentes de las vías de señalización celular que controlan la respuesta a la RI y de esta forma alterar los procesos biológicos tales como respuesta del daño al DNA, puntos de control del ciclo celular, apoptosis y vías de supervivencia. Se ha reportado que los miRNAs constituyen moduladores potenciales de la radioresistencia ya que pueden participar en la regulación negativa de la expresión de genes de supervivencia (Metheetraitur *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2013, Aréchaga-Ocampo *et al*, 2017). Sin embargo, es importante evaluar los mecanismos moleculares controlados por los miRNAs en el contexto de la radioresistencia en cáncer con el objetivo de identificar posibles marcadores pronósticos y blancos terapéuticos.

### **Biogénesis de los miRNAs.**

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes de 22 nucleótidos de longitud que están evolutivamente conservados y tienen una función importante en la regulación post-transcripcional de los genes al unirse a la región 3' no traducida (3'UTR) presente en su RNA mensajero (RNAm) blanco (Ambros, 2001). Se estima que más de la mitad de todos los transcritos celulares son blanco de los miRNAs y que cada miRNA puede potencialmente regular hasta cientos de blancos diferentes (Gurtan and Sharp, 2013). Una región 3'UTR específica puede tener diversos sitios de unión para un solo miRNA o múltiples sitios para varios miRNAs (Stark *et al*, 2003). Más de dos tercios de todos los miRNAs humanos se encuentran codificados en los intrones de los genes que codifican proteínas, así como en regiones intergénicas no codificantes y el resto son codificados en exones (Shukla *et al*, 2011). Los miRNAs tienen una función relevante en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis y se ha observado que son críticos durante la etapa de desarrollo ya que su pérdida total resulta letal (Gurtan and Sharp, 2013).

La biogénesis de los miRNAs es un proceso que comienza con la transcripción de los genes que los codifican por la RNA polimerasa II (RNA pol II). La holoenzima sintetiza inicialmente un miRNA primario (pri-miRNA) de varias kilobases de longitud que posee un *cap* en su extremo 5' y una cola de poli-A en su extremo 3'. Los pri-miRNAs son

procesados por el complejo microprocesador compuesto por la ribonucleasa Drosha y la proteína DGCR8 para producir un miRNA precursor (pre-miRNA) de 65 a 80 nucleótidos de longitud. El pre-miRNA se exporta al citoplasma por la exportina 5 y se procesa posteriormente por la enzima Dicer produciendo un miRNA maduro compuesto por un dúplex de 19 a 24 nt. Una de las hebras (cadena líder) se incorpora al complejo silenciador inducido por RNA (RISC) que contiene a las proteínas Argonauta 2 (Ago2), Dicer y TRBP, que dará origen a un miRNA maduro, mientras que la otra hebra (cadena pasajera\*) podría degradarse o bien tener una función al reconocer a los genes blancos correspondientes con su secuencia. Al incorporar un miRNA maduro en el complejo RISC, se activa el complejo de efector RISC, de esta forma el miRNA funciona como una guía para dirigir el apareamiento de bases entre el RNAm objetivo y la secuencia semilla. La secuencia “semilla” del miRNA, que se encuentra entre los nucleótidos 2 y 7, se requiere para el reconocimiento del sitio blanco. En las primeras etapas del silenciamiento génico guiado por el miRNA, el RNAm blanco todavía es estable, pero su traducción está inhibida. En etapas posteriores, los RNAm con colas cortas de poli A se degradan. Por lo tanto, el silenciamiento génico guiado por miRNA es de doble filo: promueve la inhibición traduccional y la degradación del RNAm. Tras la interacción del miRNA con su RNAm blanco, la proteína Ago2 recluta a TNR6A, una proteína que contiene múltiples repeticiones de glicina, triptófano (G, W), esta proteína contiene un dominio de unión a Ago2 y un dominio de silenciamiento que a su vez también contiene residuos de triptófano que son necesarios para la interacción de los complejos de desadenilasa ribonucleasa específica de poliA un regulador negativo de la transcripción que acorta la cola de poliA del RNAm, lo que conduce a una estimulación de la desadenilación y la degradación del RNAm. Por lo tanto, el complejo de enzimas DCP1 y DCP2, junto con varias proteínas estimuladoras, incluida la proteína DDX6, se reclutan en el extremo 5' del RNAm y elimina el 7-metilguanilato. El extremo 5' sin protección se degrada por la exoribonucleasa 5' – 3' (Ambros 2001; Treiber *et al*, 2019).

La capacidad intrínseca de los miRNAs de regular negativamente la expresión de genes les permite controlar directamente diferentes vías de señalización involucradas en el desarrollo del cáncer como la immortalización celular, proliferación, resistencia a la

muerte celular, angiogénesis y migración, por lo que la desregulación de la expresión de los miRNAs está involucrada con el desarrollo de la carcinogénesis y la respuesta del tumor a los tratamiento incluyendo la RI (Hanahan and Weinberg, 2000; Stankevicius *et al*, 2017). Recientemente se ha descubierto que la desregulación en la expresión de diversos miRNAs está fuertemente asociada al desarrollo de cáncer ya que impacta directamente en la expresión de los oncogenes y genes supresores de tumor (Svoronos *et al*, 2016). En consecuencia, los miRNAs tienen un papel fundamental en la carcinogénesis como reguladores específicos de la supervivencia, la invasión, la metástasis y la angiogénesis de las células tumorales (Krol *et al*, 2010).

### **MiRNAs desregulados en cáncer: OncomiRs.**

A los miRNAs que están implicados en el inicio y progresión del cáncer se les denomina oncomiRNAs u oncomiRs, debido a que pueden controlar negativamente la abundancia de genes fundamentales para el crecimiento, progresión y supervivencia tumoral (Volinia, *et al*, 2006; Calin *et al*, 2004; Calin *et al*, 2006; Esquela-Kerscher *et al*, 2006; Hernando 2007). La sobreexpresión de miRNAs que tienen como blanco genes supresores de tumor puede inhibir la actividad de una ruta anti-oncogénica. En contraste, la inhibición de la expresión de un miRNA que reprime la expresión de oncogenes puede dar como consecuencia el aumento de la expresión de dichas oncoproteínas y una ganancia de la actividad oncogénica (Calin *et al*, 2004; Karube *et al*, 2005).

### **MiRNAs asociados a la radioresistencia.**

La habilidad intrínseca de los miRNAs de actuar como reguladores negativos de los genes les permite influenciar vías de señalización que pueden alterar múltiples procesos, incluyendo la respuesta a la RI. Es así como los miRNAs tienen el potencial de ser usados para manipular la respuesta a la radiación en la clínica y aumentar la susceptibilidad de las células a la misma. Se ha observado que los niveles de expresión de diversos miRNAs cambian significativamente debido a la radiación, estos resultados se han reproducido entre varios tipos celulares aun variando la dosis de rayos X y rayos

y (Metheetrairut *et al*, 2013). Diversas investigaciones han correlacionado al estrés oxidativo inducido por radiación con la inhibición de la expresión de miR-155, miR-25, miR-20a y miR-15a, generando una respuesta de senescencia celular. Por otro lado, la sobreexpresión del miR-7, miR-223, miR-29b y el miR-375 inhiben el crecimiento, la proliferación, la migración y la metástasis del tumor. La radioterapia también genera la sobreexpresión del miR-21, miR-30e\* y el miR-17-5p que estimulan supervivencia y proliferación tumoral. En estadios tempranos de carcinoma laríngeo se observó que miR-296-5p se asocia con la resistencia a la radioterapia y podría ser un buen marcador para recurrencia tumoral (Maia *et al*, 2015). Por otra parte, el trabajo reportado por Qu *et al* (2015), demostró que la sobreexpresión de miR-23a aumenta la radiosensibilidad en carcinoma nasofaríngeo tanto *in vitro* como *in vivo* activando la señalización de IL8/Stat3. En células de cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) con fenotipo radioresistente se identificó un perfil de miRNAs diferencialmente expresados donde se observó que miR-29c disminuyó su expresión, esto trajo como consecuencia el aumento de la expresión de las proteínas antiapoptóticas BCL2 y MCL1, y la inhibición de la apoptosis, de esta forma favoreciendo el fenotipo radioresistente, posteriormente su restablecimiento correlacionó con una reversión de la radioresistencia y se propone como un posible biomarcador para NSCLC con fenotipo radioresistente (Aréchaga-Ocampo *et al*, 2017). Estos resultados sugieren que la expresión y la función de diversos miRNAs se modifican en respuesta a la radioterapia en tumores y líneas celulares, apoyando fuertemente la idea de que estas moléculas podrían ser una pieza clave en el control de la radioresistencia. A pesar de que se han encontrado miRNAs desregulados en respuesta a la radiación, su participación en la resistencia adquirida a la radioterapia está en constante avance y aún representa un campo poco explorado en la investigación de la función molecular de los miRNAs (Metheetrairut *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2013).

### **Biogénesis y función del microRNA-122.**

El microRNA-122 (miR-122) fue uno de los primeros ejemplos de miRNAs de tejido específico, donde se reportó altamente enriquecido en hígado, con alrededor del 72% del contenido de todos los miRNAs, y a su vez ausente o con baja expresión en otros

tejidos. Se reporta que hay aproximadamente 66,000 copias por célula en el hígado adulto (Lagos-Quintana et al, 2002; Chang et al, 2004). Se ha descrito que la secuencia madura de miR-122 se encuentra altamente conservada entre 18 especies de las cuales todas son vertebrados y no se han descrito parálogos, esto indica que la secuencia de miR-122 es de una función biológica vital (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011).

MiR-122 deriva de un solo locus genómico en el brazo largo del cromosoma 18 en humanos, la biogénesis de miR-122 es canónica, por lo cual es transcrito por la RNA polimerasa II como transcrito nuclear largo conocido como pri-miRNA de 7,5 Kb, que es escindido por Drosha para producir una horquilla de pre-miRNA de 85 nt, y que finalmente es exportado a través de exportina 5 y presenta escisión citoplasmática por Dicer para generar el miRNA maduro. El locus de miR-122 está en un exón de RNA no codificante y no pertenece a ningún grupo o *cluster*. Se aisló la región promotora de miR-122 y mostró actividad específica en funciones hepáticas, su promotor central está altamente conservado y posee elementos típicos de un promotor pol II. Contiene un sitio blanco conservado para el factor de transcripción hepático 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ), que estimula la expresión de miR-122 (Li *et al*, 2011). La transcripción de pri-miR-122 está regulada de manera circadiana en ratones debido a que muchas funciones hepáticas están sujetas a regulación circadiana, y el análisis de la expresión de miRNAs hepáticos durante este ciclo demostró un cambio en los niveles de pri y pre-miR-122 (Gatfield *et al*, 2009). Los análisis de secuenciación han revelado que las modificaciones postranscripcionales en los miRNAs, generalmente por la adición de uno o dos nucleótidos en la región 3', son eventos frecuentes. Para miR-122 la adenilación del extremo 3' es importante ya que regula la estabilidad del miRNA, de esta forma se han logrado identificar diferentes isoformas de miR-122 en hígado de ratón incluida una variante con una sola adenosina 3' añadida por la polimerasa GLD-2 (de la vía no canónica de la síntesis de poli A en los RNAm) sin embargo, en humano no se han reportado hasta el momento variantes o isoformas de miR-122 (Kato et al, 2009).

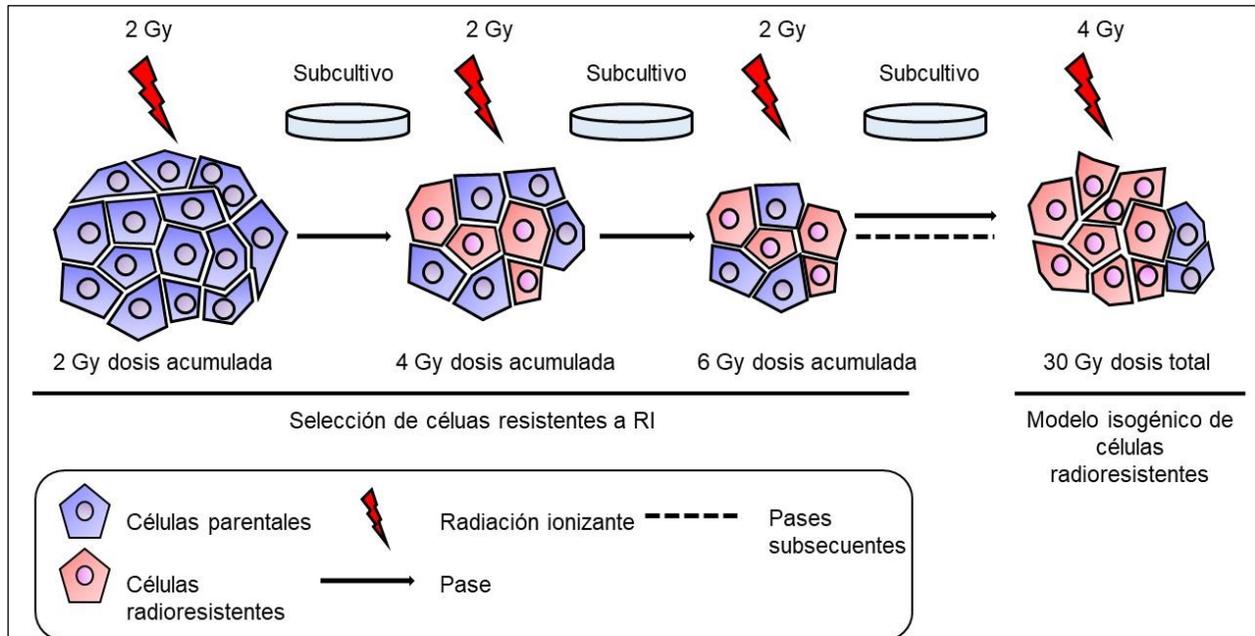
En tumores malignos la expresión de miR-122 se ha reportado disminuida y generalmente se le asocia como un miRNA-supresor tumoral (Wang *et al*, 2012; Wang *et al*, 2014). En cáncer de hígado miR-122 inhibe la expresión de la proteína MDR1 que interacciona con la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y de esta manera promueve sensibilidad al oxaliplatino (Cao and Yin, 2019). Además, miR-122 influye en la estabilidad de la proteína P53 y su restablecimiento desencadena sensibilidad y la apoptosis inducida por doxorrubicina en líneas celulares de cáncer de hígado (Fornari *et al*, 2009). Por otra parte, en muestras de glioma obtenidas de pacientes y líneas celulares derivadas de glioma, la expresión de miR-122 se encontró disminuida en comparación con tejidos cerebrales y líneas celulares de cerebro normales, por lo que expresión *in vitro* inducida de miR-122 en vectores virales, suprimió la proliferación y la clonogenicidad de células de glioma y se identificó que el mecanismo molecular implicado fue la inactivación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Wang *et al*, 2014). En cáncer de mama miR-122 tiene implicaciones biológicas determinantes, ya que se ha reportado que se regula negativamente en muestras tumorales de pacientes y en líneas celulares provenientes de cáncer de mama. Al restaurar la expresión de miR-122 a nivel *in vitro* la proliferación celular se suprimió drásticamente, conjuntamente se redujo la formación de colonias y se indujo un arresto del ciclo celular en la fase G1. Notablemente, el mecanismo molecular subyacente de estas observaciones es que miR-122 modula de forma directa a su gen blanco IGF1R, un receptor de tipo tirosina-cinasa que inicia la señalización intracelular mediante la vía de PKB, estimulando el crecimiento y la proliferación celular por activación de la vía PI3K-AKT-mTOR y tomando también una función como inhibidor potente de la apoptosis por la supresión de la proteína apoptótica BAD. La unión del ligando con el IGF1R produce una autofosforilación del receptor activándose el dominio intracelular de cinasa provocando la fosforilación de residuos de tirosina de múltiples sustratos (Wang *et al*, 2012). No obstante, en el estudio de Ęrgun *et al* en el 2015, se demostró que la disminución de miR-122 en cáncer de mama favorece la expresión de la metaloproteínasa ADAM10, posteriormente se validó como blanco de miR-122 a ADAM10. Biológicamente ADAM10 provoca la escisión del receptor HER2, de esta forma el dominio extracelular se libera y permanece un fragmento con actividad constitutiva de cinasa, esto provoca señales de supervivencia y crecimiento

independientes del ligando al interior de la célula. A nivel clínico este fenómeno se correlaciona con la resistencia al trastuzumab ya que este anticuerpo solo reconoce el dominio extracelular del receptor HER2, además esta observación se corrobora con altos niveles en circulación del dominio extracelular de HER2 en pacientes con cáncer de mama, este hallazgo se considera como mal pronóstico (Liu et al, 2006).

## Antecedentes del trabajo

---

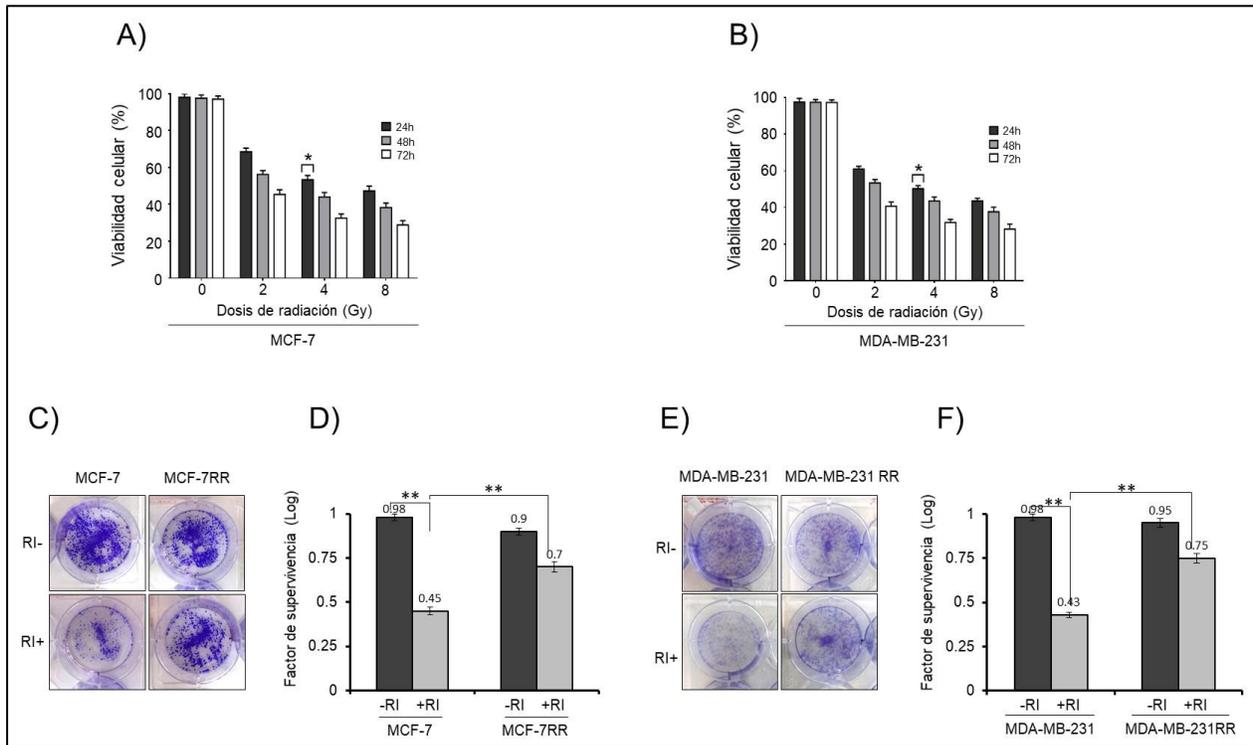
Con la finalidad de entender el papel funcional de los miRNAs en el mecanismo molecular de radioresistencia, en nuestro laboratorio generamos un sistema de resistencia a radiación en células de cáncer de mama. Como modelos de estudio se utilizaron las líneas celulares MCF-7 la cual proviene de un cáncer de mama tipo luminal A que se caracteriza por su sensibilidad al tratamiento hormonal (perfil inmunohistoquímico: ER+, PR+/-, HER2-) y MDA-MB-231 proveniente de un cáncer de mama triple negativo (TNBC) bajo en claudina (perfil inmunohistoquímico: ER-, PR-, HER2-, Ki67, bajo en: E-cadherina, claudina-3, claudinina-4 y claudinina-7), y se reporta una respuesta intermedia a la quimioterapia, es decir que este tipo de células tienen una alta tasa de heterogeneidad tumoral, debido a que algunas poblaciones de células presentan marcadores de troncalidad (CD44+/CD24-/ESA+) relacionados con la resistencia a agentes quimioterapéuticos como el paclitaxel y el 5-fluororacilo. Para la generación de líneas celulares radioresistentes, las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, adquiridas del *American Type Culture Collection* (ATCC) fueron cultivadas bajo las condiciones recomendadas por el ATCC. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en botellas de 25 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar el 80% confluencia y fueron irradiados con 2 Gy de rayos X (dosis terapéuticas) utilizando un acelerador lineal de alta energía (Clinac 600; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) con una dosis de 1.7 Gy por minuto. Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, fueron despegadas y subcultivadas. Las células fueron tratadas nuevamente con 2 Gy cuando los subcultivos alcanzaron el 60% de confluencia nuevamente. Estos procedimientos se repitieron 15 veces hasta alcanzar la dosis total de 30 Gy (Figura 2) Este proceso mimetiza un esquema clínico de radioterapia en pacientes con cáncer de mama (Pandeli *et al*, 2019).



**Figura 2. Generación del modelo isogénico de células resistentes a radioterapia en células de cáncer de mama.** Representación esquemática del protocolo de tratamiento fraccionado con RI para el establecimiento de células de cáncer de mama radioresistentes, las células fueron sembradas ( $1 \times 10^6$ ) y cuando alcanzaron el 80% de confluencia fueron irradiadas 2 Gy de RI, inmediatamente después se cambió el medio de cultivo por medio fresco y cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia fueron tripsinizadas y subcultivadas hasta alcanzar el 60% de confluencia. El procedimiento se repitió 15 veces para obtener una cantidad acumulada de radiación de 30 Gy.

Para obtener la DL50 de RI en células parentales MCF-7 y MDA-MB-231 y posteriormente corroborar el fenotipo radioresistente en las células sometidas a dosis terapéuticas fraccionadas (2 Gy), 300,000 células fueron sembradas en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> durante 24 h, posteriormente las células se irradiaron con 2, 4 y 8 Gy de RI, y como control se usaron cultivos tratados bajo las mismas condiciones, pero sin tratamiento con RI. 24 h posteriores a la radiación, se determinó la viabilidad mediante el ensayo de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. De esta forma se obtuvo que la DL50 de RI para las células parentales MCF-7 y MDA-MB-231 fue de 4 Gy (Figura 3 A-B). Para determinar la capacidad formadora de colonias de las células sometidas a RI se realizaron ensayos clonogénicos de supervivencia sembrando 1000 células viables por pozo en cajas de 6 pozos y se aplicaron 4 Gy de RI con sus respectivos controles sin tratamiento. Las células sometidas al tratamiento de dosis terapéuticas fraccionadas con RI obtuvieron un factor de supervivencia mayor a

0.5 lo cual indica que desarrollaron resistencia adquirida a la RI, las células radioresistentes generadas fueron denominadas como MCF-7RR (Figura 3 C-D) y MDA-MB-231RR (Figura 3 E-F).



**Figura 3. Caracterización del modelo de radioresistencia en células de cáncer de mama.** La viabilidad de células parentales (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231 se evaluó mediante el ensayo MTT durante 24, 48 y 72 h después de la irradiación con dosis crecientes (0, 2, 4 y 8 Gy) de RI, para obtener la DL50 para posteriormente corroborar el fenotipo radioresistente. Mediante ensayos clonogénicos de formación de colonias viables se corroboró la radioresistencia de las líneas celulares generadas obteniendo la fracción superviviente de las células irradiadas (RI+) y la imagen representativa de la formación de colonias en MCF-7RR (Figura C-D) y MDA-MB-231RR (Figura E-F) posterior a la aplicación de 4 Gy de RI (DL50). Los resultados fueron normalizados con la fracción superviviente de las células no irradiadas (RI-). Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*\*P <0.001 por prueba de *t* de Student.

Una vez caracterizado el sistema de radioresistencia celular, se obtuvo el perfil de expresión global de 667 miRNAs de la línea MCF-7RR. Los resultados mostraron que un grupo de 16 miRNAs (3 reprimidos y 13 sobreexpresados) tienen una expresión significativamente diferencial en las células RR (radioresistentes) con respecto a las células parentales control. En particular, el miR-122 aumentó su expresión 3.41 veces en las células MCF-7RR en comparación con las células MCF-7 (Tabla 1).

**Tabla 1. MicroRNAs con expresión diferencial en MCF-7RR.**

miRNA	Veces de cambio (log2)	R (Valor de P)	Cromosoma
<b>Reprimidos</b>			
hsa-miR-196b	-2.43	0.0113	7p15.2
hsa-miR-146a	-2.13	0.05	5q34
hsa-miR-181a-2*	-1.7	0.0091	9q33.3
<b>Sobreexpresados</b>			
hsa-miR-222	1.53	0.0083	Xp11.3
hsa-miR-218	1.63	0.0097	4p15.31
hsa-miR-10a	1.88	0.032	17q21.32
hsa-miR-424*	1.9	0.0375	Xq26.3
hsa-miR-449b	2.14	0.017	5q11.2
hsa-miR-411	2.34	0.0452	14q32.31
hsa-miR-184	2.64	0.017	15q25.1
hsa-miR-135b	3.23	0.0068	1q32.1
<b>hsa-miR-122</b>	<b>3.41</b>	<b>0.0282</b>	<b>18q21.31</b>
hsa-miR-222*	3.7	0.0169	Xp11.3
hsa-miR-223*	3.9	0.0014	Xq12
hsa-miR-934	7	0.0529	Xq26.3
hsa-miR-135b*	7.9	0.015	1q32.1

Se realizó un análisis bioinformático de los blancos validados y predichos del miR-122 en la base de datos MiRTarBase usando tres algoritmos (*TargetScan*, *miRDB* y *miRANDA*) para identificar los genes regulados por miR-122. Para las rutas biológicas en las que participan, se emplearon las plataformas *KEGG Pathway*, *Gene ontology* y *PANTHER Pathway*. Se encontraron 45 genes validados mediante ensayos reportero de Luciferasa (forma convencional para validar un blanco de un miRNA) y 90 genes predichos (Tabla 2).

**Tabla 2. Genes blanco de miR-122.**

miR-122	Validados	CYP7A1, WNT1, IGF1R, SRF, RAC1, RHOA, ANK2, NFATC2IP, ENTPD4, ANXA11, ALDOA, RAB6B, RAB11FIP1, FOXP1, MECP2, NCAM1, UBAP2, TBX19, AACS, DUSP2, ATP1A2, MAPK11, FUNDC2, AKT3, TPD52L2, GALNT10, G6PC3, AP3M2, SLC7A1, XPO6, FOXJ3, SLC7A11, TRIB1, EGLN3, NUMBL, ADAM17, DSTYK, FAM117B, BCL2L2, PRKAB1, ADAM10, ACVR1C, PTPN1, NT5C3A, P4HA1.
	Predichos	CD96, ATF6, GRHL2, IGFBP5, RABL6, CDA, TRPS1, PPARGC1B, SIRPB1, RIMS1, COLEC12, FOXK2, KIAA1244, DSG2, STK24, FAM117B, RAB3GAP1, GPD1L, NICN1, KIF5B, PLEKHB1, ERCC1, PRKRA, KCTD7, RIMBP2, DSTYK, CCNYL1, LTBP2, SLC52A2, KIF11, VNN1, DCLK2, BAI2, ATP6V0A2, CLIC4, SHPRH, P4HA1, SHCBP1, MTAP, NPEPPS, RBM43, CCNG1, ADAMDEC1, METTL9, PGM2L1, PLXNA2, ZNF614, NOS1, SPOCK2, SAMD5, CD40LG, OSTM1, CLIC5, C8orf86, PRLR, CALN1, PAPP, YKT6, SAMD12, DUSP4, COX16, SCN3B, C15orf53, RFXAP, LMNB2, PFKFB2, MAP3K2, ZSCAN30, GYPA, ZNF589, PELI1, OCLN, SLC7A1, TMEM87B, TNFRSF1B, STMN2, GYS1, TMX3, GATAD2B, ASAH1, SLC9A1, LRP11, SV2B, MGAT4A, HNRNPU, AP1AR, CYBRD1, BCR, SOX11, C1orf173.

Estos genes participan en procesos biológicos como proliferación, ciclo celular, apoptosis, respuesta inflamatoria, diferenciación, morfogénesis y regulación de la expresión genética (Tabla 3).

**Tabla 3. Ontología de genes blanco de miR-122.**

GO	Proceso	Genes	Valor de p
	0007165: Transducción de señales	12	0.0378212
	0006468: Fosforilación de proteínas	8	0.0154143
	0007596: Coagulación sanguínea	7	0.0361679
	0006916: Anti-apoptosis	6	0.0154771
	0005975: Metabolismo de carbohidratos	6	0.0280331
	0030336: Regulación negativa de migración celular	5	0.00257405
	0051090: Regulación de factores de transcripción	4	0.0163381
	0007166: Receptores de superficie celular en vías de señalización	4	0.0413005
	0006921: Componentes celulares involucrados en apoptosis	3	0.0275539
	0007160: Adhesión célula-matriz	3	0.0481954
	0043568: Vía de factor de crecimiento similar a insulina	2	0.0273773
	0048870: Motilidad celular	2	0.0283033
	0007162: Regulación negativa de adhesión celular	2	0.0435724
	2001111: Regulación positiva de proliferación de células epiteliales	1	0.0400662
	0072404: Transducción de señales en puntos de control del ciclo celular (G1-S)	1	0.0400662
	0006990: Regulación positiva de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II implicada en la respuesta de la proteína	1	0.0400662

desplegada		
0051389: Inactivación de la actividad MAPKK	1	0.0400662
2000002: Regulación negativa del control de daños en el DNA	1	0.0400662
0002839: Regulación positiva de la respuesta inmune a células tumorales	1	0.0400662
0032467: Regulación positiva de la citocinesis	1	0.0472631
0044336: Wnt receptor de señalización de la vía implicada en la regulación negativa de la apoptosis	1	0.0472631
0000720: Reparación del dímero de pirimidina por escisión de nucleótidos	1	0.0472631
<hr/>		
<b>KEGG</b>		
<b>Pathway</b>		
04010: MAPK vía de señalización	7	0.00245341
05200: Vías en cáncer	7	0.00546484
04520: Uniones adherentes	4	0.00449001
04910: Vía de señalización de insulina	4	0.0148203
04510: Adhesión focal	4	0.031362
04920: Vías de señalización de adipocitocinas	3	0.0154379
04370: Vía de señalización de VEGF	3	0.0179311
04514: Moléculas de adhesión celular (CAMs)	3	0.0466897
04530: Uniones estrechas	3	0.0471519
04330: Vía de señalización de Notch	2	0.0484229
<hr/>		
<b>PANTHER</b>		
<b>Pathway</b>		
P04393: Vía de Ras	5	0.000257893
P00006: Vía de señalización de Apoptosis	5	0.00108892
P00021: Vía de señalización de FGF	4	0.00787328
P00018: Vía de señalización de receptores EGF	4	0.00620598
P04398: Vías de retroalimentación 2 de p53	3	0.0100544
P00046: Respuesta a estrés oxidativo	3	0.00723262
P00059: Vía de p53	3	0.0118255
P00005: Angiogénesis	3	0.0454294
P00034: Vía de señalización de integrinas	3	0.0460315
P04397: Vía de p53 por privación de glucosa	2	0.0103546
P00030: Respuesta a hipoxia por activación de HIF	2	0.014545
P00020: Vía de señalización de FAS	2	0.0208404
P00045: Vía de señalización de Notch	2	0.0206368

Estos antecedentes sugieren fuertemente que el miR-122 puede afectar potencialmente la expresión de diversos genes involucrados en las rutas de sobrevivencia celular, apoptosis y reparación del DNA las cuales están relacionadas con el control de la radioresistencia. Por lo anterior, el miR-122 fue elegido para su análisis funcional que incluye la evaluación de su potencial acción sensibilizante a la radioterapia y la identificación molecular de sus genes blanco y rutas celulares afectadas.

## Justificación

---

Los miRNAs modulan potencialmente la expresión de genes a nivel postranscripcional y se ha establecido que su desregulación tiene implicaciones directas e indirectas con el desarrollo de la carcinogénesis. Por otra parte, una vasta evidencia de estudios sugiere que los cambios en la expresión de miRNAs se correlacionan con procesos biológicos de tipo patológicos como el aumento en las vías de supervivencia celular, inhibición de la apoptosis, reprogramación transcripcional, reprogramación metabólica, procesos inflamatorios, supresión de la respuesta inmune así como otros sellos distintivos del cáncer que en conjunto pueden conferir un fenotipo de radioresistencia adquirida a las células tumorales.

Por tal motivo, es necesario establecer la función molecular de los miRNAs en la resistencia adquirida a la radioterapia en cáncer de mama. En este sentido, proponemos evaluar la función de miR-122 en la resistencia adquirida a la RI en cáncer de mama. Existe evidencia de que la función supresora tumoral de miR-122 en cáncer de mama es determinante debido a que modula de forma directa blancos moleculares como IGF1R y ADAM10 que son críticos en la progresión y desarrollo de esta enfermedad, ya que conectan vías de supervivencia y proliferación celular. Además, existen trabajos en cáncer de mama y otras neoplasias, que proponen una función sensibilizante de miR-122 a agentes quimioterapéuticos, sin embargo, aún hay poca información que explique los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de radioresistencia adquirida en cáncer de mama. El observar un aumento de la expresión de miR-122 en células tumorales de mama con radioresistencia adquirida, abre la posibilidad de explorar un mecanismo novedoso de miR-122 con un posible rol en desarrollo de radioresistencia adquirida. Los datos que se obtengan nos permitirán entender los mecanismos moleculares asociados a la radioresistencia y evaluar la posible implicación clínica del miR-122, por lo cual su análisis molecular representa un modelo de estudio original y relevante.

## **Pregunta de investigación**

---

¿Cuál es la función de miR-122 en la radioresistencia adquirida del cáncer de mama?

## **Hipótesis**

---

El miR-122 participa en la radioresistencia de células de cáncer de mama a través de la regulación de genes blancos componentes de vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular.

## **Objetivos**

---

### **Objetivo general**

Analizar la función del miR-122 en la radioresistencia de las células MCF-7RR y MDA-MB-231RR de cáncer de mama.

### **Objetivos particulares**

1. Analizar el efecto de la sobreexpresión e inhibición del miR-122 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 parentales y radioresistentes (RR) respectivamente, sobre la resistencia a la radioterapia.
2. Identificar los genes modulados como consecuencia de la inhibición del miR-122 en las líneas celulares RR y caracterizar las vías de señalización celular con importancia en la radioresistencia.
3. Validar la modulación de un RNAm blanco del miR-122 en células MCF-7RR.
4. Determinar la expresión de la proteína codificada por el gen validado en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

## METODOLOGÍA

---

**Cultivos celulares:** Las líneas celulares provenientes de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 (perfil inmunohistoquímico: ER+, PR+/-, HER2-) y MDA-MB-231 (perfil inmunohistoquímico: ER-, PR-, HER2-, Ki67, bajo en: E-cadherina, claudina-3, claudinina-4 y claudinina-7) parentales, así como las radioresistentes que fueron establecidas como modelo de estudio denominadas como RR, se cultivaron con medio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento de los cultivos se realizaron pases cuando la confluencia alcanzó el 80%.

**Transfecciones:** Las células MCF-7 y MDA-MB-231 se transfectaron con el mimic-miR-122 (Ambion #4464066) a 10 nM, mientras que las células MCF7-RR y MDA-MB-231RR se transfectaron con antagomiR-122 (Ambion #4464084) a 30 nM. Se usó una secuencia *scramble* (30 nM) como control del experimento y como agente de transfección se usó Lipofectamina® 2000 (Invitrogen #1718582) empleando 1 µL por cada mL de volumen final de medio de cultivo. El mimic-miR-122 y el antagomiR-122 se diluyeron en Opti-Mem™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficiencia de transfección se verificó mediante RT-qPCR a las 48h posterior a la transfección y este mismo tiempo se tomó como referente para los experimentos subsecuentes.

**Extracción de RNA por el método del trizol:** Las células control y transfectadas se lavaron 2 veces con PBS 1X, se adicionó 1 mL de trizol (Gibco) y se homogenizó la suspensión durante 2 min hasta lisar las células. La suspensión celular obtenida de los cultivos se colocó en microtubos de 1.5 mL y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló con vórtex por 30 segundos, se incubó 2 min y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 17 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL. Para precipitar el RNA de la fase acuosa se agregaron 500 µL de isopropanol y se incubó durante 15 min. Después de la incubación se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 min a 4°C y se eliminó el

isopropanol, el botón formado se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Posteriormente se mezcló en un vórtex y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, el botón se resuspendió en agua libre de RNAsas. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Scientific®) y se verificó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

**RT-PCR en tiempo real:** La expresión relativa del miR-122 se evaluó en condiciones basales o a las 48 h posterior a la transfección, mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el *Stem-loop RT MicroRNA assay* para el miR-122 (Cat. #4427975, Life Technologies) y como normalizador el sn/snoRNA RNU44. Se utilizaron 100 ng de RNA total para las reacciones de transcripción reversa, que se llevó a cabo en un termociclador *2720 Thermal Cycler* de *Applied Biosystems* de la siguiente manera: 4°C por 5 min, 16°C por 30 min, 42°C por 30 min y 85°C por 5 min. El cDNA se utilizó para PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan para miR-122 y RNU44, brevemente, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, 1  $\mu\text{L}$  de sonda TaqMan, 7  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 10  $\mu\text{L}$  de *master mix* se mezclaron para obtener un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo en el equipo *7500 Real-Time PCR System* de *Applied Biosystems*, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos y una extensión de 60° C por 60 segundos. Se obtuvo el  $\Delta\Delta\text{Ct}$  comparativo al obtener la diferencia entre los Ct del control endógeno RNU44 con los de miR-122, para determinar los niveles de miR-122 el resultado del  $\Delta\Delta\text{Ct}$  se convirtió al Logaritmo -2. Este procedimiento se realizó en los ensayos de transfección del mimic miR-122 en las líneas celulares parentales y del antagomiR-122 en las líneas RR.

**Ensayo clonogénico (Análisis de radioresistencia):** El ensayo consiste en la capacidad de una célula para producir una colonia de 50 o más células después de la radiación. Se sembraron 1000 células en placas de 6 pozos y después de las 24 h fueron transfectadas como se mencionó anteriormente, 48 h posterior a la transfección fueron radiadas con un acelerador lineal (Varían 600C) con 4 Gy de RI y se incubaron

por 10-12 días en condiciones basales de cultivo, el cambio de medio se realizó cada 48 h. Posteriormente, las colonias se fijaron con metanol/ácido acético 7:1 y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Se contaron las colonias con 50 o más células, las cuales se consideraron como sobrevivientes clonogénicos y se determinó la fracción superviviente que permite cuantificar la tasa de supervivencia celular tras la aplicación de RI de acuerdo con Karube, *et al* 2005.

**Western blot:** Las células MCF-7RR y MDA-MB-231RR con una confluencia del 70-80% en cajas p60, fueron despegadas mediante un raspado con gendarme y lisadas en *buffer* de lisis que contenía Tris pH 7.5 [25 mM], NaCl [150 mM], Tritón 0.5%, EDTA 1mM e inhibidor de proteasas y fosfatasa (Roche®). Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida SDS/PAGE al 10% mediante electroforesis (80 V) empleando un *buffer* de corrida pH 8.3 (Tris [250 mM]; Glicina [1.92 M]; SDS 1%). La transferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad 0.45 µm) durante 1.5 h empleando un *buffer* de transferencia pH 8.3 (Tris [0.25 M]; Glicina [1.92 M]; Metanol 20%). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en buffer TBS (Tris [20 mM]; NaCl [150 mM]) con 0.1% *Tween* 20 (TBS-T) durante 1 h. posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces en buffer salino de Tris con *Tween* 20 (0.1%) durante 5 min y se incubaron con anticuerpos primarios específicos [ZNF611 (1:250 Abcam®); ZNF304 (1:1,000 Abcam®); RIPK1 (1:2,000 BD Transduction Laboratories™); TNFRSF21 (1:250 Santa Cruz Biotechnology); DUSP8 (1:250 Santa Cruz Biotechnology); HRAS (1:250 Abcam®); Actina (1:5,000 Cell Signaling)] durante toda la noche a 4°C. Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados con TBST durante 5 min y las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) [ZNF611, ZNF304, HRAS (1:5,000 anti-conejo Santa Cruz Biotechnology); RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 (1:5,000 anti-ratón Santa Cruz Biotechnology); Actina (anti-cabra 1:5,000 Santa Cruz Biotechnology)]. Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min y reveladas por quimioluminiscencia utilizando el *kit SuperSignal® West Femto*.

**Análisis de microarreglos:** Se obtuvo RNA total de células MCF-7RR y MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122 en concentraciones equimolares (150 ng/ $\mu$ L) de 3 experimentos independientes y se hibridó un arreglo *Affymetrix st1*<sup>®</sup> para el análisis de 29,834 genes, cada hibridación se realizó por duplicado. La intensidad de fluorescencia del arreglo fue analizada por *Expression Console* para la normalización y la expresión diferencial de genes fue obtenida de acuerdo con la significancia estadística por el programa *Transcriptome Analysis Console* (TAC) mediante la prueba ANOVA ( $p < 0.05$ ). Los genes diferencialmente expresados (sobreexpresados y suprimidos) se consideraron a partir de  $>1.3$  y  $<1.3$  veces de cambio.

**Validación de genes blanco de miR-122.** Se diseñaron oligos específicos para amplificar las regiones 3'UTR de los genes ZNF611 y ZNF304 por PCR, que fueron seleccionados como posibles blancos de miR-122, para posteriormente ser clonados en el plásmido pMIR-REPORT<sup>™</sup> Systems (AM5795), el cual es un plásmido específico para validar blancos directos de miRNAs que se basa en la actividad del gen reportero de luciferasa de luciérnaga. Este plásmido contiene un sitio *polylinker* de clonación múltiple para diferentes enzimas de restricción que permitirán insertar la secuencia blanco de interés y poder evaluar cuantitativamente la función de miR-122 sobre los genes ZNF611 y ZNF304. Para este trabajo se usarán las enzimas *SpeI* y *HindIII*, debido a que en el plásmido son las enzimas que van en el sentido de la transcripción, situándose al inicio y al final del sitio de clonación múltiple. De esta forma el inserto a clonar al ser amplificado, llevará en el oligo sentido un sitio de corte para *SpeI* y en el oligo antisentido un sitio de corte para *HindIII*. Se cultivaron las bacterias recombinantes en medio *Lysogeny Broth* (LB) adicionado con ampicilina como antibiótico de selección a una concentración de 100  $\mu$ M, posteriormente el plásmido fue purificado mediante el sistema *HiSpeed<sup>®</sup> Plasmid Midi Kit* (12643). Como controles negativos (CN) de clonación se emplearon los mismos oligos diseñados para amplificar el inserto de interés pero ahora el oligo sentido llevará un sitio de corte para *HindIII* y el oligo antisentido tendrá la secuencia de corte para *SpeI*, de tal forma que se obtendrá el mismo inserto pero quedará clonado en sentido invertido a la transcripción y de esta forma el CN ya no estaría bajo la actividad reguladora negativa de miR-122.

Se muestran los oligos correspondientes con los sitios para *SpeI* en negritas y para *HindIII* en gris:

ZNF611 Sentido: **GTACTAGT**TATGGTCATCGGTGAACTCATACTG  
ZNF611 Antisentido: CG**AAGCTT**ATTCCTGACCTCAAGTGACCTAT  
ZNF611 CN Sentido: CG**AAGCTT**ATGGTCATCGGTGAACTCATACTG  
ZNF611 CN Antisentido: GT**ACTAGT**ATTCCTGACCTCAAGTGACCTAT

ZNF304 Sentido: **GTACTAGT**ATCATGAGGTGTGTTGCACTTTG  
ZNF304 Antisentido: CG**AAGCTT**ATCTCAGAACCTAATCATGAGGGAAA  
ZNF304 CN Sentido: CG**AAGCTT**ATCATGAGGTGTGTTGCACTTTG  
ZNF304 CN Antisentido: GT**ACTAGT**ATCTCAGAACCTAATCATGAGGGAAA

La región 3'UTR de ZNF611 (489 pb) la cual contiene un sitio de unión canónico a miR-122 (CACTCCA) se amplificó por RT-PCR. Se utilizaron 100ng de RNA total, 1µL de oligo dT (0.5 µg/µL), 1µL de dNTP's (10mM) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (aforada a 20µL), para la primera reacción de RT PCR: Fase de pre-amplificación: 1 ciclo a 70°C por 10 min y 1 ciclo a 4°C de 2-4 min. Para la segunda fase de la RT-PCR se adicionaron: 4µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2µL de solución amortiguadora RT 10X (1X) y 1µL de transcriptasa inversa (15 U/µL), bajo las siguientes condiciones: Amplificación: 1 ciclo de 42°C por 60 min y 1 ciclo de 4°C por ~. El cDNA obtenido se utilizó para PCR de punto final para amplificar la región 3'UTR de ZNF611 y el control negativo. Para la PCR se adicionaron 2µL de solución amortiguadora 10X (1X), 0.6µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µL de dNTP's (1.5mM), 0.3µL de oligos sentido y antisentido para la región 3'UTR de ZNF611 (10µM), 12.3µL de agua libre de nucleasas y 0.5µL de Taq-Polimerasa recombinante (5 U/µL). La reacción se llevó a cabo en el equipo 2720 *Thermal Cycler* de *Applied Biosystems* bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 10 min/ 40 ciclos de: 95° C por 15 seg/ alineamiento a 65° C por 60 seg/ extensión de 72°C por 50 seg. El amplicón se observó mediante un gel de agarosa al 2% GelRed® (Biotium).

***Análisis in silico para determinar los elementos de respuesta en el DNA a proteínas de dedos de zinc (ZNFs).*** Utilizamos la herramienta de reconocimiento en línea para los elementos de respuesta de las proteínas con dedos de zinc Cys2Hys2 (<http://compbio.cs.princeton.edu/zf/>), para identificar en las regiones promotoras de RIPK1 y DUSP8, los elementos de respuesta a ZNF611 y ZNF304.

**El análisis de datos del Atlas del genoma del cáncer (TCGA).** A partir de la base de datos del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) se obtuvieron los datos clínicos y moleculares de pacientes con cáncer de mama, se seleccionó a un grupo de pacientes que de acuerdo con su historial clínico recibieron radioterapia durante su tratamiento. Se tomaron en cuenta los regímenes de radioterapia adyuvante, paliativa y recurrencia. En cuanto a los estados patológicos de los tumores en la población de estudio, abarcaron del estadio I al estadio IV. La clasificación molecular de los tumores en las pacientes correspondió a Luminal A, Luminal B, TNBC (Triple negativo) y HER2+. De acuerdo con los datos de expresión a nivel de RNAm analizados por la técnica de *RNAseq* y reportados en *Reads per million* (RPM), se obtuvieron los datos de expresión de miR-122, ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS. De acuerdo con la mediana de expresión en RPM se categorizó a la población en dos grupos que expresaron alto y bajo nivel de cada molécula. El periodo de tiempo durante y después del tratamiento de radioterapia fue establecido en meses, en donde se evaluó la supervivencia libre de recaída (SLR) en función de la expresión de los genes de interés. Se tomó como día 1, el día de diagnóstico de cáncer de mama y como día final el día de recaída en el caso de las pacientes que recayeron, o día del término del seguimiento en el caso de las pacientes que no presentaron recaída de la enfermedad. Se implementó la prueba de *Log Rank* para determinar la significancia estadística de los resultados obtenidos tomando como valor significativo  $P = <0.05$ .

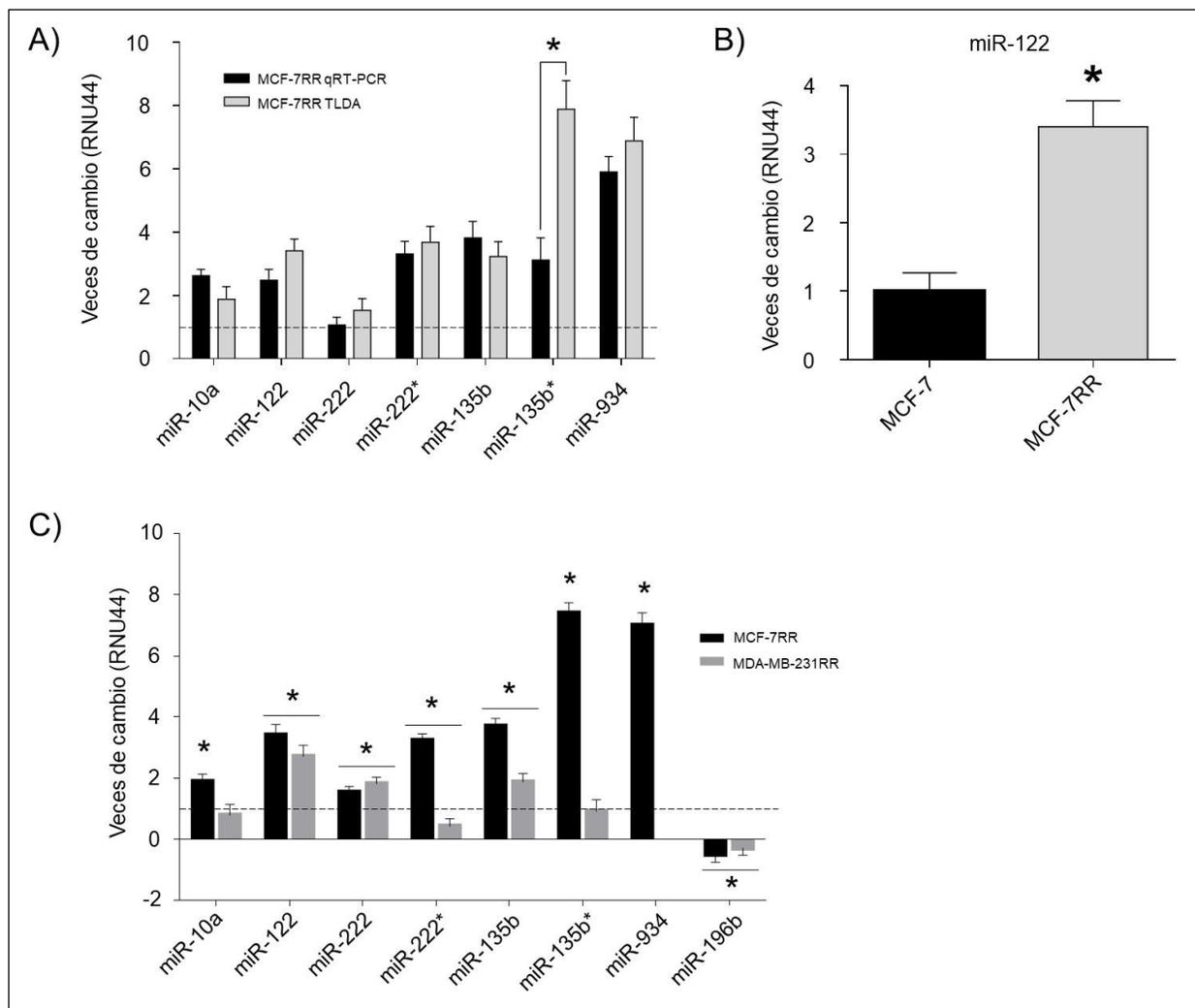
**Análisis estadístico:** Todos los resultados son derivados de tres experimentos independientes que se representaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). La comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba *t de Student* y ANOVA. Para todos los análisis, valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software estadístico SPSS 17.0

## Resultados

---

### ***Validación de la expresión diferencial de miRNAs en células MCF-7RR y MDA-MB-231RR.***

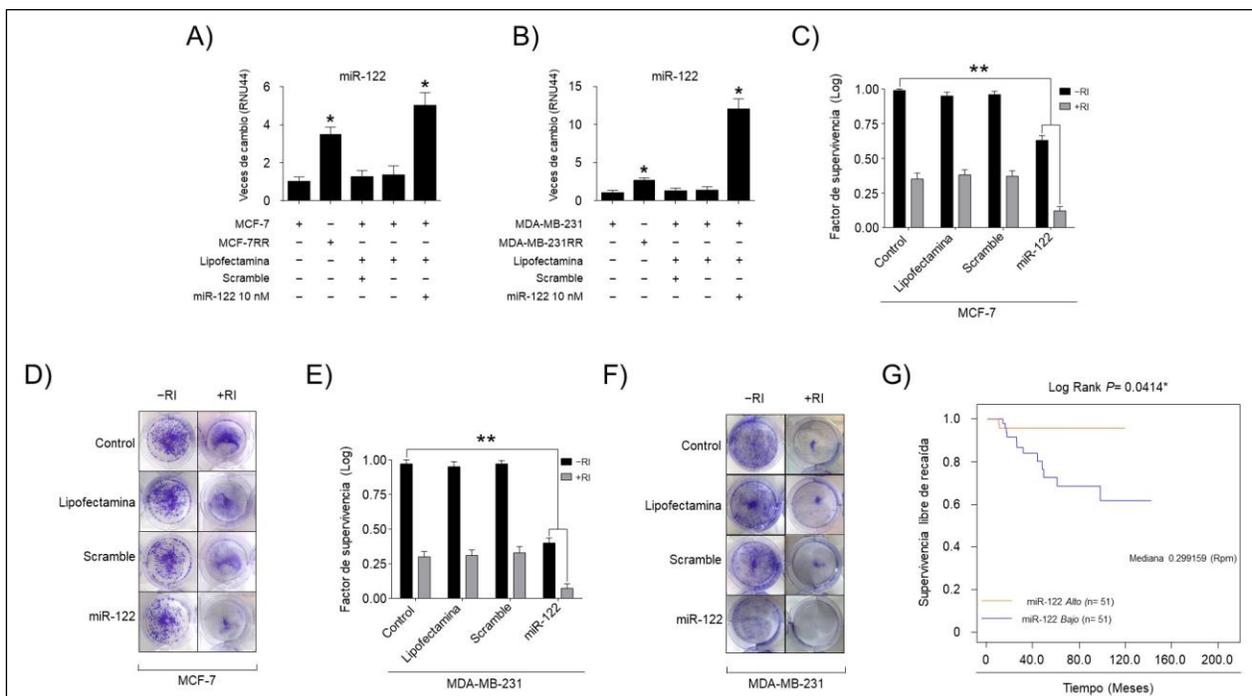
Para validar los datos obtenidos en el análisis global de miRNAs, se analizó la expresión de miR-122, miR-10a, miR-222, miR-222\*, miR135b, miR-135b\*, miR-196b y miR-934 por RT-qPCR (Figura 4A). Los resultados confirman los niveles de expresión de los miRNAs previamente observados en el análisis global. Además, se validó la expresión del miR-122 utilizando un RNA obtenido de una clona de células MCF-7RR distinta a las utilizadas en los análisis previos. Se observó que las células MCF-7RR sobreexpresan el miR-122 (Veces de cambio =  $3.2 \pm 0.5$ ) en comparación con la línea parental MCF-7 (Figura 4B). De esta forma se corroboró lo observado previamente en los antecedentes y se validó que el modelo biológico es reproducible. Para validar si los miRNAs identificados en MCF-7RR también se modulan en otra línea celular de cáncer de mama con radioresistencia, se evaluó la expresión de estos 8 miRNAs en las células MDA-MB-231RR por RT-qPCR y se comparó con la línea celular MCF-7RR (Figura 4C). Se observó que el miR-122 mantiene elevada su expresión tanto en MCF-7RR como en MDA-MB-231 RR [ $2.5 \pm 0.5$  veces de cambio (Log2)].



**Figura 4. Expresión diferencial de miRNAs en células radioresistentes.** La expresión de miR-10a, miR-122, miR-222, miR-222\*, miR-135b, miR-135b\*, miR-934 y miR-196b fue analizado por RT-qPCR (A). Se muestra la expresión diferencial de miR-122 entre células MCF-7 y MCF-7RR mediante RT-qPCR usando el RNA obtenido de una clona MCF-7RR distinta a la utilizada para el análisis global (B). Comparación de los miRNAs validados en MCF-7RR con la línea celular MDA-MB-231RR (C). Todos los experimentos de RT-qPCR se realizaron por triplicado en cada experimento y de manera independiente. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística obtenida con ANOVA \* $P < 0.05$ .

**Efecto de la sobreexpresión del miR-122 en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con RI.** Para determinar si la sobreexpresión del miR-122 induce radioresistencia en las células parentales, las células MCF-7 y MDA-MB-231 parentales se transfectaron con 10 nM del mimic-miR-122. La sobreexpresión de miR-122 tuvo 4.5 veces de cambio en MCF-7 (Figura 5A) y de 12.1 en MDA-MB-231 (Figura 5B) respecto al control no transfectado. Las células transfectadas se irradiaron con una dosis de 4 Gy (DL50) de

RI y la supervivencia se analizó mediante ensayos clonogénicos. Los resultados mostraron una disminución en la fracción superviviente en las células transfectadas con miR-122 (MCF-7 FS = 0.12 (Figura 5C y D); MDA-MB-231 FS = 0.0734 (Figura 5E y F)) tanto en las células transfectadas con tratamiento de RI como el control sin tratamiento radioterapéutico. Para corroborar a nivel clínico la función supresora tumoral de miR-122, realizamos una curva de Kaplan-Meier, analizando la base de datos del TCGA de pacientes con cáncer de mama que recibieron tratamiento con RI. Se seleccionó a un grupo de pacientes (n= 102) que expresaron a miR-122 y de acuerdo con la mediana de expresión (Rpm= 0.299159) se categorizaron en alta y baja expresión. El tiempo del seguimiento se tomó en meses y se analizó la SLR relacionada con la respuesta al tratamiento de RI. Nuestro hallazgo reveló que la alta expresión de miR-122 en pacientes con cáncer de mama que recibieron radioterapia correlacionó con una mejor SLR (Log Rank \*P= 0.014) de hasta 120 meses (Figura 5G). Estos datos demuestran que miR-122 tiene un papel como miRNA supresor tumoral en células MCF-7 y MDA-MB-231 como previamente se reportó por Wang *et al*, en el 2012.

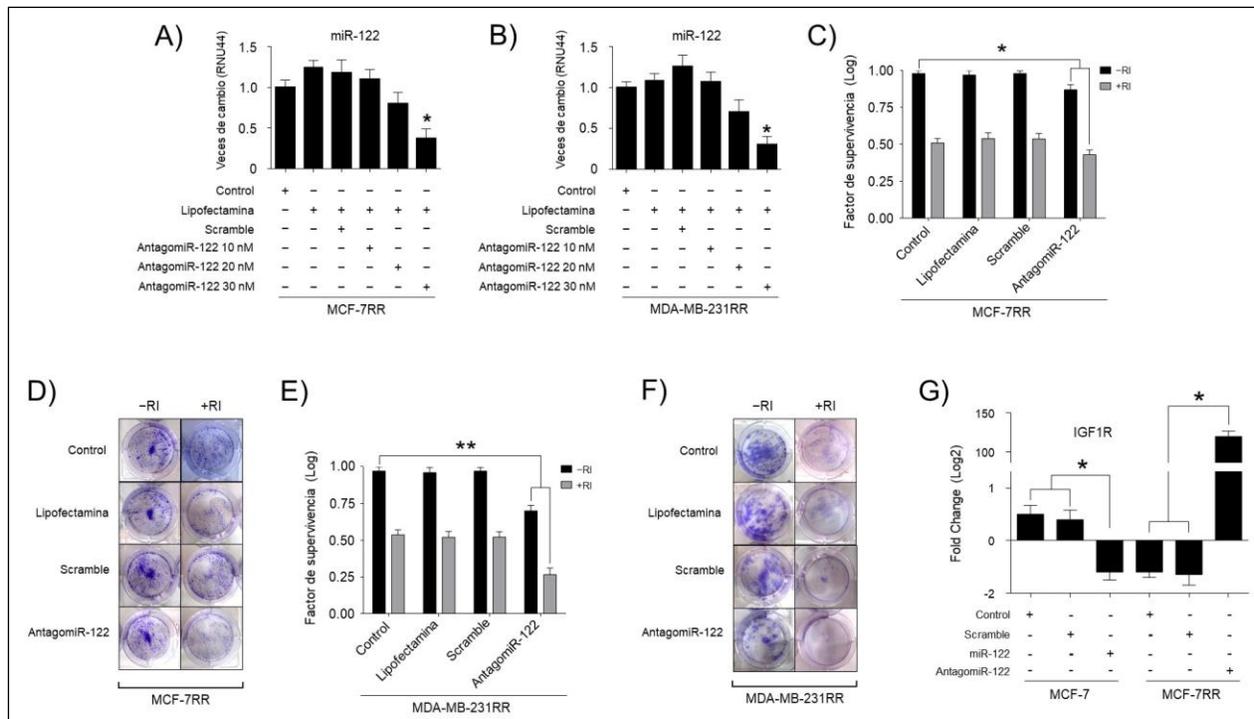


**Figura 5. Efecto del aumento de miR-122 en células parentales de cáncer de mama.** Expresión de miR-122 en células (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231 transfectadas con mimic-miR-122 a una concentración de 10 nM. Como controles se emplearon las células sin transfectar. Fracción superviviente e imagen típica de formación de colonias: células MCF-7 (C, D) y MDA-MB-231 (E, F) transfectadas previo (-RI) y

posterior (+RI) al tratamiento con 4 Gy de RI. Curva de Kaplan-Meier de SLR usando la base de datos del TCGA en pacientes con cáncer de mama (G), la línea naranja representa a las pacientes con alta expresión de miR-122 y la azul representa a las pacientes con baja expresión de miR-122, se empleó la prueba de Log Rank (\* $P$  = <0.05) para obtener la significancia estadística. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística obtenida con ANOVA \* $P$  <0.05.

### ***Modulación de la radioresistencia en células MCF-7RR y MDA-MB-231RR mediante la transfección del antagomiR-122.***

Con la finalidad de conocer la función de miR-122 en la radioresistencia adquirida en células de cáncer de mama, se inhibió la expresión de miR-122 por medio de un antagomiR (inhibidor) en MCF-7RR (Figura 6A) y MDA-MB-231RR (Figura 6B). Un antagomiR es un oligonucleótido de RNA pequeño sintético y químicamente modificado que es complementario a una secuencia de miRNA endógeno y se usa para su silenciamiento (Krützfeldt *et al*, 2005). Para evaluar la supervivencia de las células radioresistentes se hicieron ensayos clonogénicos y se observó que las células transfectadas con el antagomiR-122 tuvieron una menor supervivencia [(Fracción superviviente en MCF-7RR= 0.87 (Figura 6C y D); MDA-MB-231RR= 0.7 (Figura 6E y F)]. Cuando se aplicó RI se observó que la fracción superviviente disminuyó en ambas líneas celulares [(MCF-7RR= 0.43 (Figura 6C), MDA-MB-231RR= 0.266 (Figura 6D)]. Posteriormente evaluamos la expresión de IGF1R en células MCF-7RR al inhibir a miR-122. IGF1R es un blanco de miR-122 en células de cáncer de mama y su disminución ejercida por miR-122 inhibe la supervivencia celular. Nosotros mostramos que la expresión de IGF1R disminuye en células MCF-7 al inducir el aumento de miR-122 como se reporta en la literatura (Wang *et al*, 2012), mientras que en células MCF-7RR, la cual presenta un aumento de miR-122, la expresión de IGF1R está suprimida, pero al inhibir a miR-122 en MCF-7RR el nivel de expresión de IGF1R aumenta de manera significativa (Figura 6G). Estos resultados indican que miR-122 promueve el mantenimiento de la radioresistencia adquirida en células de cáncer de mama independientemente de la función de IGF1R y las vías de supervivencia en las que participa, de tal forma que miR-122 podría ejercer una reprogramación transcripcional en las células de cáncer de mama con radioresistencia adquirida modulando a otros genes blanco aun no reportados.

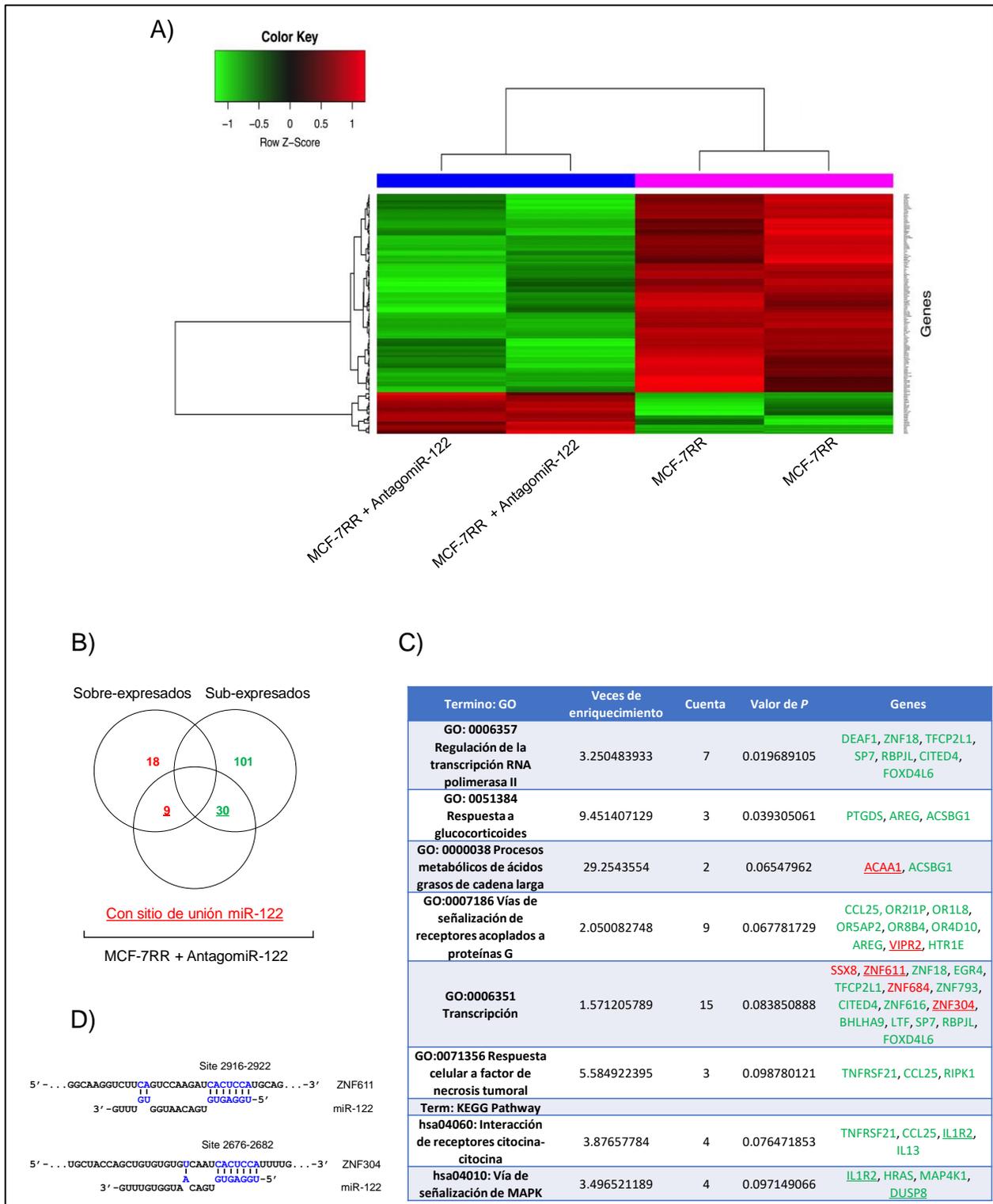


**Figura 6. La inhibición del miR-122 revierte la radioresistencia en células de cáncer de mama.** Expresión de miR-122 en células MCF-7RR (A) y MDA-MB-231RR (B) transfectadas con antagomiR-122, a una concentración de 10, 20 y 30 nM. Como controles se emplearon las células sin transfectar. Fracción superviviente e imagen típica de formación de colonias: células MCF-7RR (C, D) y MDA-MB-231RR (E, F) transfectadas previo (-RI) y posterior (+RI) al tratamiento con 4 Gy de RI. Expresión de IGF1R en células MCF-7 y MCF-7RR transfectadas con mimic y antagomiR-122 (G) respectivamente, la expresión de IGF1R fue evaluada por RT-qPCR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestra la desviación estándar y la significancia estadística obtenida con ANOVA \* $P < 0.05$ .

### **Transcriptoma de células MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122.**

Con el fin de identificar posibles nuevos blancos de miR-122 en una célula de cáncer de mama resistente a radioterapia, se analizó el transcriptoma de las células MCF-7RR transfectadas con el antagomiR-122 y se identificó un grupo de 158 genes modulados, de los cuales 27 estuvieron sobreexpresados y 131 suprimidos (Figura 7A-B; Tabla 4 sección de apéndice). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas de ontología de genes, se lograron identificar a genes modulados por miR-122 en células MCF-7RR que son componentes de vías de señalización y procesos biológicos con importancia en cáncer y con posible participación en radioresistencia, de los cuales destacan regulación transcripcional, vía de las MAPK, respuesta a TNF e interacción de receptores de citocinas (Figura 7C). De la totalidad del transcriptoma modulado en células MCF-7RR al inhibir a miR-122, 39 genes presentaron sitios de unión a miR-122,

de los cuales 9 se sobreexpresaron y 30 se suprimieron (Figura 7B). Para poder identificar blancos directos de miR-122 con una regulación de tipo canónica en la línea celular MCF-7RR, nos interesó analizar a los genes que aumentaron su expresión al inhibir a miR-122 (MCF-7+ antagomiR-122). Al realizar un análisis bioinformático de complementariedad de la región semilla de miR-122, sobre los genes que aumentaron su expresión al inhibir a miR-122 y que adicionalmente presentaron sitios de unión, identificamos que ZNF611 y ZNF304 tienen una complementariedad de 7 pares de base en la región 3'UTR de ambos genes (Figura 7D).

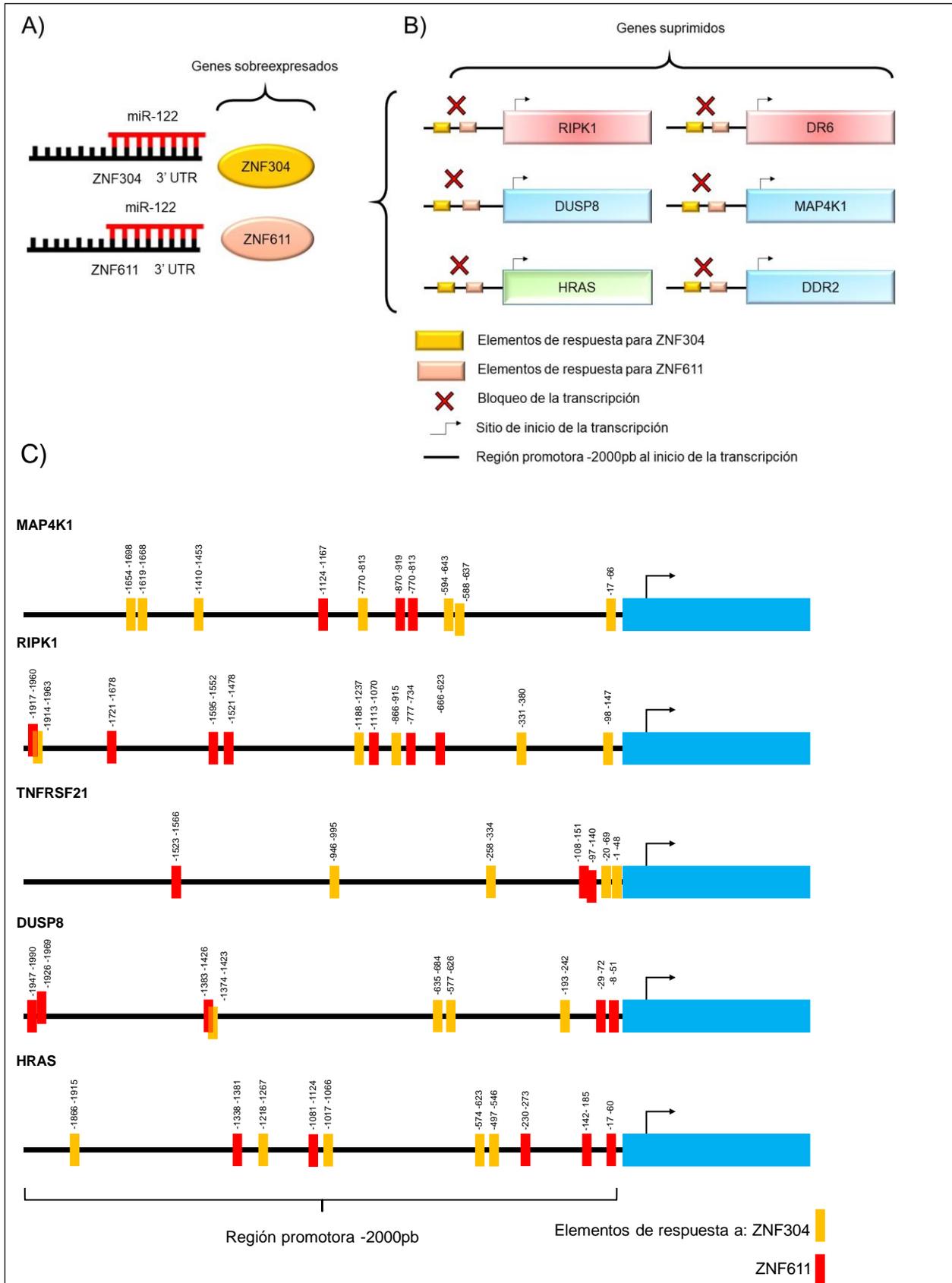


**Figura 7. Transcriptoma de las células MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122.** Mapa de calor del transcriptoma de MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122. El análisis se realizó por duplicado para obtener un valor Z, el cual indica un valor de confiabilidad de los resultados obtenidos. El dendograma de la parte superior de las columnas del mapa de calor muestra que el análisis se ejecutó de

manera no supervisada, esto indica que el analista no modificó o alteró los resultados obtenidos. El dendograma de la parte del costado izquierdo indica el agrupamiento jerárquico de los genes de acuerdo con la homología y funcionalidad. Se tomó como un cambio en la expresión cuando los genes mostraron +/- 1.3 veces de cambio y que tuvieran un valor de ANOVA con significancia estadística ( $P < 0.05$ ) (A); Diagrama de Venn de genes modulados y con sitio de unión a miR-122 de células MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122 (B); en verde se muestran los genes suprimidos y en rojo los genes sobreexpresados. Tabla de procesos biológicos y enriquecimiento de vías de genes modulados en MCF-7RR transfectadas con antagomiR-122 (C); en color rojo se muestran los genes sobreexpresados en el transcriptoma, en color verde se muestran los genes reprimidos, los genes con sitios de unión a miR-122 en su región 3'UTR se muestran subrayados. Sitios de unión canónicos en la región 3'UTR de ZNF611 y ZNF304 con la región semilla de miR-122, se muestra en color azul las bases complementarias entre miR-122 y la región 3'UTR de los genes (D). GO: *Gene ontology* (Ontología de genes).

### ***Regulación transcripcional y de vías de supervivencia ejercida por miR-122 en células MCF-7RR.***

Los resultados del análisis del transcriptoma mostraron la sobreexpresión de los represores transcripcionales ZNF304 y ZNF611, las cuales son proteínas asociadas con el silenciamiento transcripcional y que poseen sitios de unión en su región 3'UTR para miR-122 (Figura 8A). Estos factores de transcripción son potenciales blancos de miR-122 al estar aumentado su nivel de expresión cuando se inhibe a miR-122. Por otro lado, genes como MAP4K1, DUSP8 (componentes de la vía de las MAPK; HRAS de la vía de Ras); y TNFRS21 y RIPK1 (vía de TNF) disminuyeron su expresión. De acuerdo con análisis bioinformáticos de identificación de unión de proteínas de dedos de zinc (C2H2), se analizó la región promotora -2000 pb al inicio de la transcripción, dichos genes poseen elementos de respuesta a ZNF304 y ZNF611 en sus regiones promotoras (Figura 8B). En el caso de MAP4K1 se determinaron siete sitios de unión para ZNF304 y tres para ZNF611; RIPK1 posee cinco sitios de unión para ZNF304 y siete para ZNF611; TNFRS21 (DR6) tiene tres sitios para ZNF304 y tres para ZNF611; DUSP8 presentó cuatro sitios para ZNF304 y cinco para ZNF611; mientras que HRAS mostró cinco sitios para ZNF304 y cinco para ZNF611 (Figura 8C).

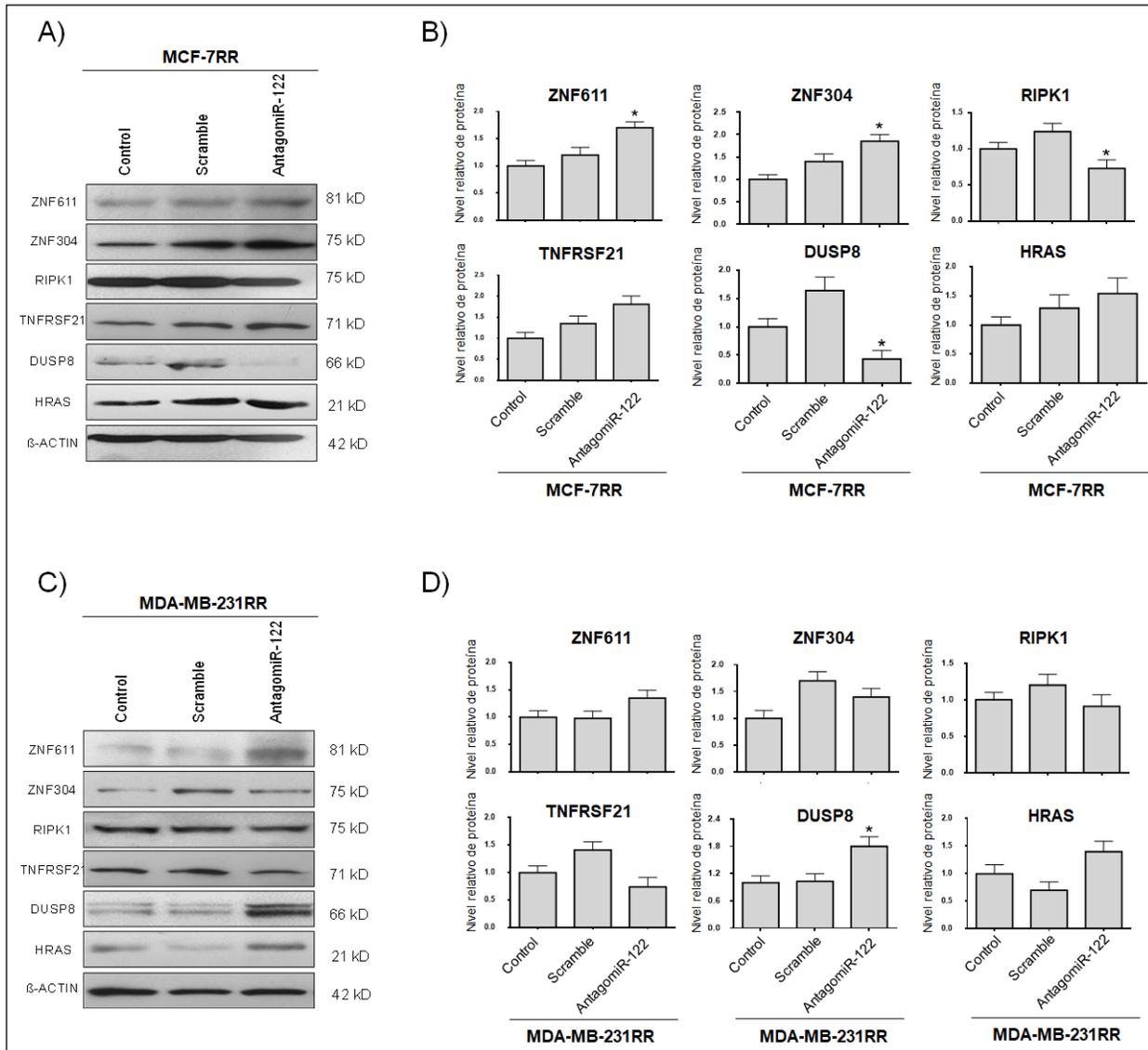


**Figura 8. Representación esquemática que muestra la posible función del miR-122 en la regulación indirecta de la transcripción de genes componentes de vías de supervivencia celular.** Aumento de la expresión de ZNF304 y ZNF611 en el transcriptoma de MCF7RR al inhibir a miR-122 y sitios de unión en la región 3'UTR de ZNF304 y ZNF611 (A). Elementos de respuesta a ZNF304 y ZNF611 en regiones promotoras a 2,000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción en los genes MAP4K1, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS que se mostraron suprimidos en MFC-7RR al inhibir a miR-122 (B) Distribución en regiones promotoras de los genes MAP4K1, RIPK1, TNFSRF21 (DR6), DUSP8 y HRAS a una longitud de -2000pb (C). La representación esquemática está basada en análisis *in silico*.

Este hallazgo sugiere que al haber un aumento de la expresión de miR-122 los factores de transcripción ZNF611 y ZNF304 son regulados negativamente debido a que poseen sitios de unión canónicos en sus regiones 3'UTR, por lo tanto la actividad de represión de la transcripción ejercida por ZNF611 y ZNF304 se encontraría disminuida y esto provocaría el aumento de la expresión de *MAP4K1*, *RIPK1*, *TNFRSF21* y *HRAS* los cuales presentan varios sitios de unión de estos factores de transcripción en sus regiones promotoras (-2000pb). Este proceso alteraría las vías de supervivencia celular relacionadas con dichos genes.

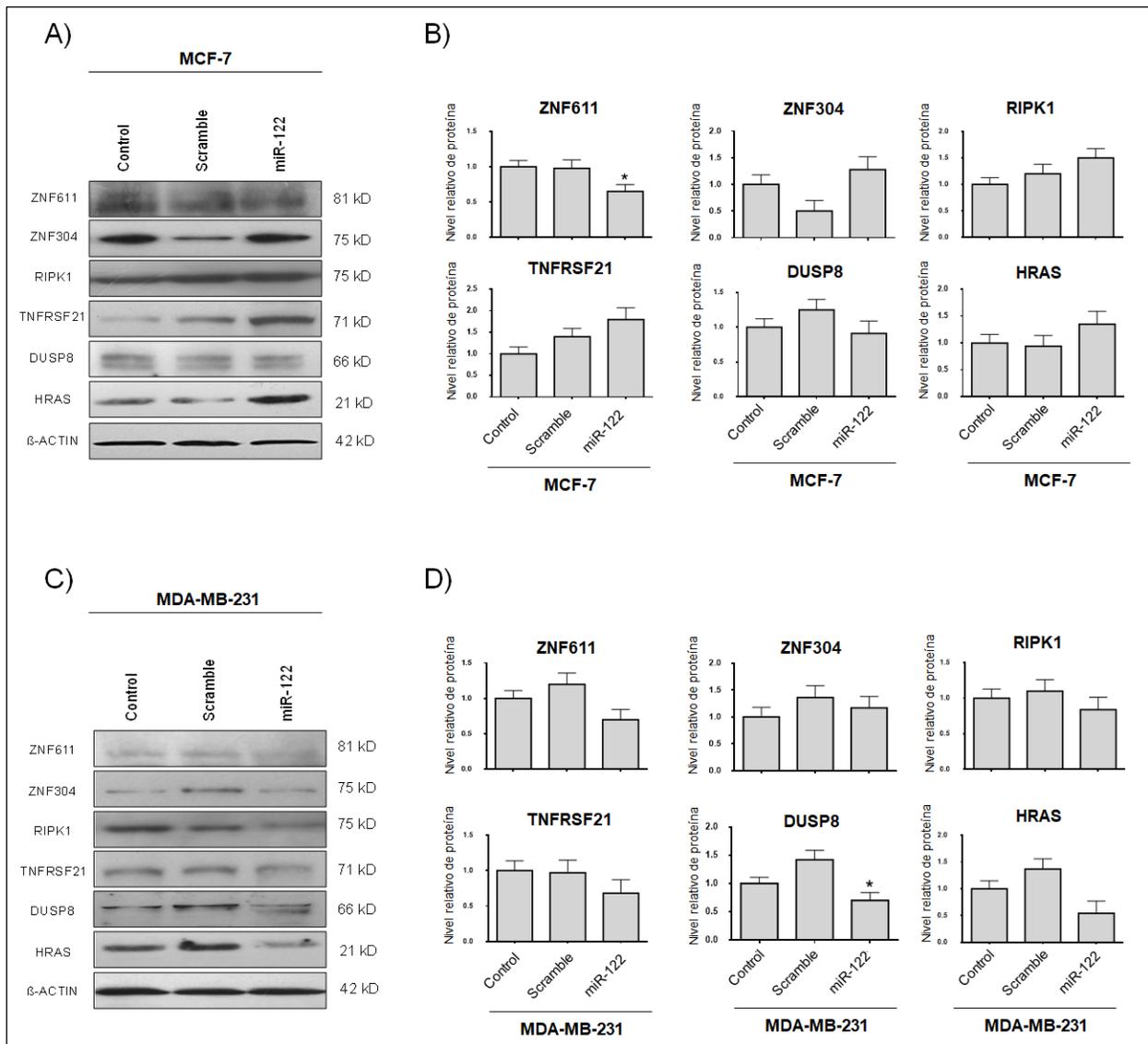
**Validación a nivel de proteína de genes modulados por miR-122 en células MCF-7RR.** Debido a que ZNF611 y ZNF304 son posibles blancos de miR-122, se validó la abundancia de sus proteínas por *Western blot* en células MCF-7RR. Así mismo, se evaluó el nivel de las proteínas RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS, de las cuales, sus genes presentan elementos de respuesta a ZNF304 y ZNF611 en sus regiones promotoras a 2,000 pb río arriba del inicio de la transcripción. En las células MCF-7RR, aumentaron las proteínas, ZNF304 y ZNF611 mientras que RIPK1 y DUSP8 disminuyeron (Figura 9A), estos datos concuerdan con lo observado en el análisis de microarreglo en células MCF-7RR al inhibir a miR-122. Las gráficas representativas de los análisis densitométricos mostraron que las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 9B). Adicionalmente, evaluamos el nivel de expresión de proteína de ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS en la línea celular MDA-MB-231RR para identificar si estos mismos genes son regulados por miR-122 en esta línea celular radioresistente. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de ZNF611, DUSP8 y HRAS se modularon por incremento en MDA-MB-231RR al inhibir a miR-122, mientras que ZNF304, RIPK1 y TNFRSF21 mostraron una disminución de la

proteína (Figura 9C-D). Estos resultados muestran que solo ZNF611 tuvo una mantuvo aumentada su expresión a nivel de proteína en las células MDA-MB-231RR. Las gráficas representativas de los análisis densitométricos mostraron que solamente hubo diferencias significativas en el aumento de la proteína DUSP8 ( $p < 0.05$ ) (Figura 9D).



**Figura 9. Evaluación del efecto de la inhibición de la expresión del miR-122 sobre el nivel de expresión de las proteínas ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS en células radioresistentes.** Análisis de *Western blot* de las proteínas ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS en células MCF-7RR (A-B) y MDA-MB-231RR (C-D) transfectadas con antagomiR-122. Se usó actina como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el *Western blot* (B, D). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, los datos fueron normalizados usando la expresión de la actina. *T de Student* \*  $P < 0.05$

Para conocer si miR-122 regula de manera directa la expresión de los genes ZNF611 y ZNF304 y si esta regulación afecta la expresión de RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS analizamos el nivel de expresión de proteína en las líneas celulares parentales MCF-7 y MDA-MB-231 al aumentar la expresión de miR-122 usando mimiciR-122. En la línea celular MCF-7 los resultados mostraron que el nivel de proteína de ZNF611 disminuyó al aumentar la expresión de miR-122, pero ZNF304, RIPK1 y DUSP8 mantuvieron su expresión estable sin ningún cambio, mientras que la expresión de la proteína HRAS mostró un aumento no significativo (Figura 10A). Los análisis densitométricos evidenciaron que solo la disminución de ZNF611 en las células MCF-7 al aumentar a miR-122 tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 10B). En la línea celular MDA-MB-231 la abundancia de proteínas de ZNF611, ZNF304, DUSP8 y HRAS mostró una disminución, mientras que para RIPK1, TNFRSF21 no se observó un cambio evidente en la expresión a nivel de proteína (Figura 10B). Las gráficas correspondientes a los análisis de densitometría indicaron que solo la inhibición de la proteína DUSP8 mostros cambios significativos (Figura 10C), sin embargo, ZNF611 mostró una tendencia que inversamente proporcional a la expresión de miR-122. Estos resultados en conjunto indican que ZNF611 podría ser un potencial blanco de regulación directa de miR-122. Además, mostramos que entre las líneas celulares radioresistentes y las líneas celulares parentales se presenta una diferencia en la regulación a nivel de proteína de ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS, cada uno de estos genes pertenece a una vía de señalización que está relacionada con la supervivencia celular, por lo que esta diferencia podría deberse a cambios en la maquinaria transcripcional de las células radioresistentes debido a proceso adaptativo a la RI, esto podría alterar vías de supervivencia celular, apoptosis, regulación transcripcional e inflamación y de esta forma contribuir al mantenimiento de un fenotipo de resistencia a la radiación en cáncer de mama.



**Figura 10. Evaluación del efecto de la expresión del miR-122 sobre la abundancia de las proteínas ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS en células parentales de cáncer de mama.** Expresión de ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 Y HRAS en células MCF-7 (A-B) y MDA-MB-231 (C-D) transfectadas con mimiciR-122. Se usó actina como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el *Western blot* (B, D). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, los datos fueron normalizados usando la expresión de la actina. *T* de *Student* \*  $P < 0.05$

Este resultado indica que ZNF611 podría ser un potencial blanco de regulación directa de miR-122. Además, mostramos que entre las líneas celulares radioresistentes y las líneas celulares parentales se presenta una diferencia en la regulación a nivel de proteína de ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS, cada uno de estos genes pertenece a una vía de señalización que está relacionada con la supervivencia

celular, por lo que esta diferencia podría deberse a una reprogramación transcripcional correspondiente al fenotipo de radioresistencia adquirida de las células de cáncer de mama.

***Estandarización de la PCR para la amplificación de la región 3' UTR de ZNF611.***

Se purificó el plásmido pMIR-REPORT™ que tiene una longitud de 6470 pb. Los sitios de restricción seleccionados para clonar el inserto correspondiente al fragmento de la región 3'UTR de ZNF611 y ZNF304 fueron *SpeI* y *HindIII* los cuales están localizados en la región de clonación múltiple (Figura 11A). Se amplificó un fragmento de 489 pb por RT-PCR correspondiente a la región 3'UTR de ZNF611 que contiene un sitio canónico putativo de unión a miR-122 (Figura 11B-C). Una vez obtenido el amplicón de la región 3'UTR de ZNF611 y su control negativo se clonaron en el plásmido pMIR-REPORT™ empleando las enzimas de restricción *SpeI* y *HindIII* para que el inserto quedara río abajo del gen de la luciferasa y posteriormente cuantificar la actividad de esta proteína reportera bajo la regulación de miR-122 (Figura 11D).

A)

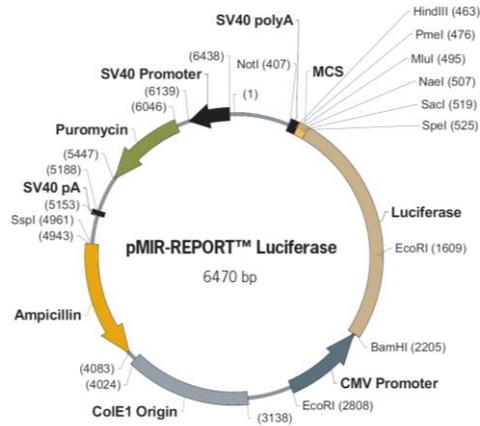


Figure 1. pMIR-REPORT Luciferase

CMV Promoter: 2210–2813	Puromycin: 5447–6046
Firefly luciferase: 540–2210	SV40 pA signal: 5153–5188
MCS: 467–539	Ampicillin: 4083–4943
SV40 Poly(A): 404–467	ColE1 Origin: 3138–4024
SV40 Promoter: 6139–6438	

B)

Primers to ZNF611 3' UTR

Forward 5'-gtactagtatGGTCATCGGTGAATCATACTG-3'  
SpeI

Reverse 5'-cgaacggttatTCCTGACCTCAAGTGACCTAT-3'  
HindIII

Primers to ZNF304 3' UTR

Forward 5'-gtactagtatCATGAGGTGTGTTGCACCTTG-3'  
SpeI

Reverse 5'-cgaacggttatCTCAGAACCCTAATCATGAGGGAAA-3'  
HindIII

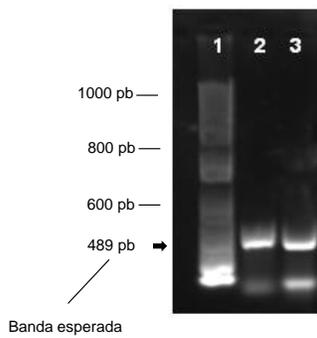
GGTCATCGGTGAATCATACTGGAGAGAAACCTTACAAATGTCATGACTGTGCCAAGGCTTCAGTCAAGC  
 TTCATCCTATGCAAAACATAGGAGAATTTATACAGGAGAGAAACCTCACAAAGTGTGATGATTGTGGCAAAG  
 CCTTTGCTTACGTTTCACACGTCATTAGACATCAGAGAATCTATACTGGACAGAAATCTTACAAATGTCAT  
 CAGTGTGGCAAGGCTTCAGTCCAAGATCACTCCAATGCAGAACATCAGAAAATTCATTTTGGATAACCG  
 TTCCCAATGAAATGAGTATAGCAAACCATCAAGCATTAAATGACATGGAGTCAATTCAGCATTGACTTGA  
 GTTTGTGTTGACTTAACATTGAGTCAAGCCTTTATTGACATTCAGTGTATTGTTAAGAGGATGGGGCC  
 AGGTGTGGTGGCTCCGACCTGTAATCCAGCACGTCGGGAGGCCAAGGCACATAGGTCACCTTGAAGTCAGG  
 A

CATGAGGTGTGTTGCACCTTTGTAAGTGTCTAGAGCTCTTGATGGAATTATA  
 TCACTGCCAGTGCCTGTGGCGGAAGCCATCTTATTGCTACCAGCTGTGTGT  
 GTCAACTCACTCCAATTTGCTCAGGGAAGGCAGACTTCTGTGCTTTCTTTCC  
 TGTTCCCTACAGGTAATCATGAATATTTTCAAGGACTTCCCCCCCCCCCCCA  
 CTTCAACCCCTACCATTGAGGGTCTCATCTTTCCCTCATGATTAGGTTCT  
 TGAG

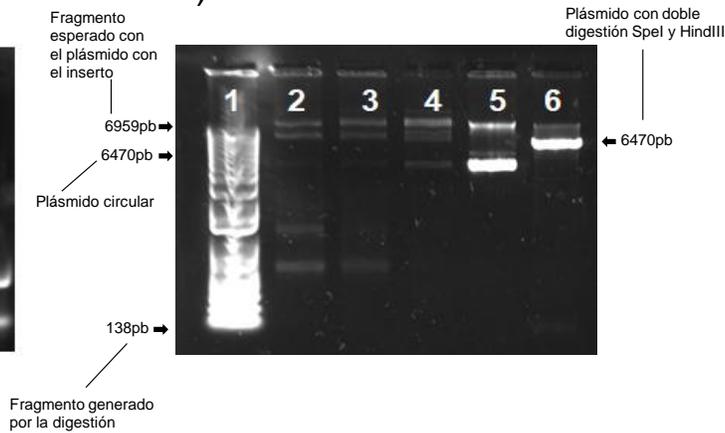
489pb

259pb

C)



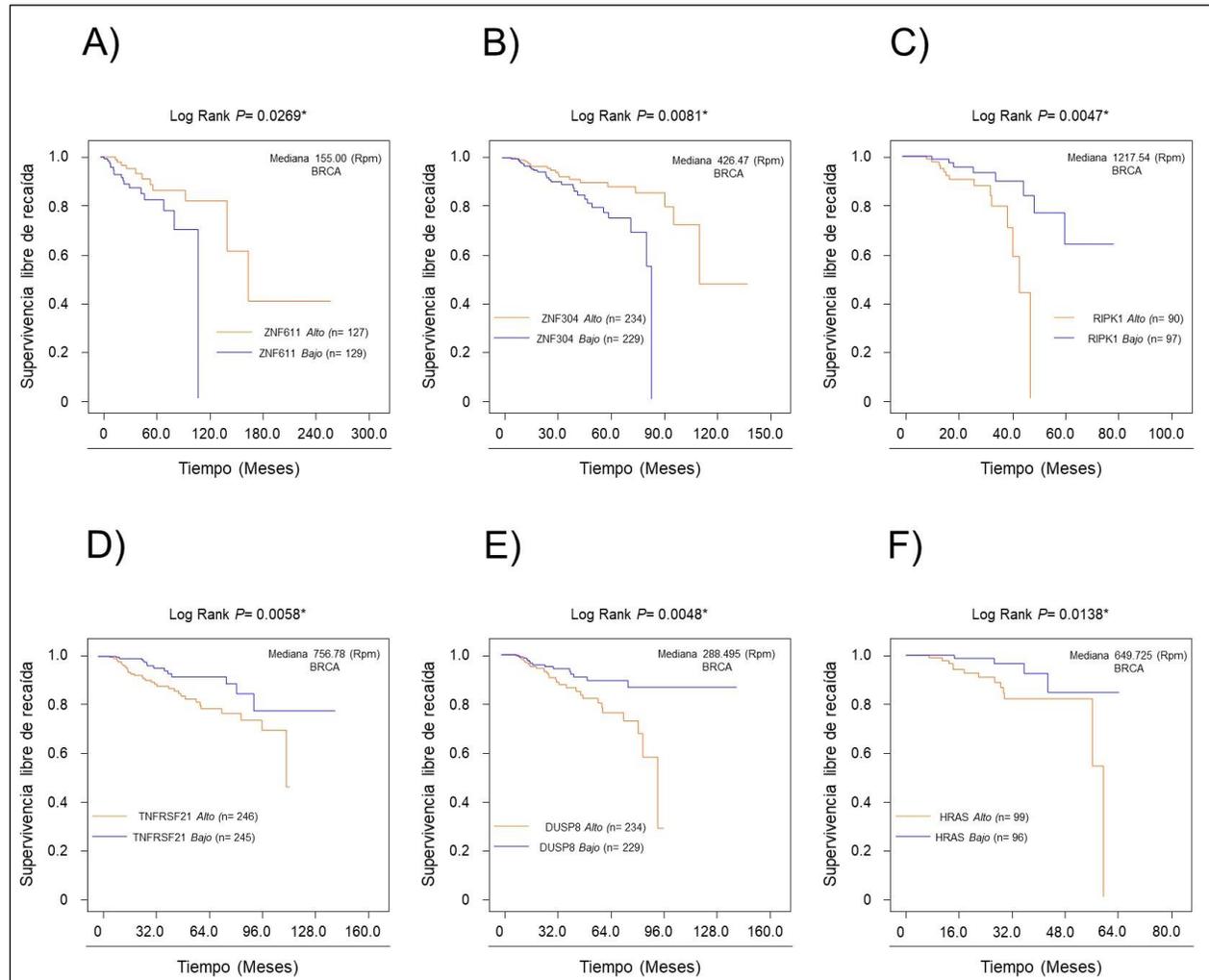
D)



**Figura 11. Estandarización de la PCR de la región 3'UTR de ZNF611.** El plásmido pMIR-REPORT™ contiene a la luciferasa de luciérnaga como gen reportero (A). Se seleccionaron a los sitios de corte de las enzimas SpeI y HindIII (color rojo) para el diseño de los oligos utilizados para la amplificación de un fragmento de 489 pb correspondiente a la región 3'UTR de ZNF611 y de 259 pb para el fragmento de la región 3' UTR de ZNF304 respectivamente (en azul se muestra el sitio de unión canónico para miR-122) (B). Amplificación de la región 3'UTR de ZNF611 por PCR (C). En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 1Kb, en el carril 2 la amplificación de la región 3'UTR de ZNF611 y en el carril 3 la amplificación del control negativo con los sitios de restricción invertidos, pero con el mismo tamaño de inserto. Ligación de los insertos ZNF611 y ZNF611 CN (D). En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 1Kb, los carriles 2 y 3 corresponden a la doble digestión con las enzimas de restricción SpeI y HindIII del plásmido pMIR-REPORT con el inserto de 489 pb correspondiente a ZNF611 y ZNF611 CN respectivamente. El carril 4 corresponde a la doble digestión con las enzimas de restricción SpeI y HindIII del plásmido p-MIR-REPORT sin insertos, pero con la reacción de ligación. En el carril 5 se observa al plásmido purificado p-MIR-REPORT en su forma circular. En el carril 6 se muestra al plásmido p-MIR-REPORT sometido solo a la doble digestión con las enzimas SpeI y HindIII.

### ***Relevancia clínica de genes modulados por miR-122 en MCF-7RR.***

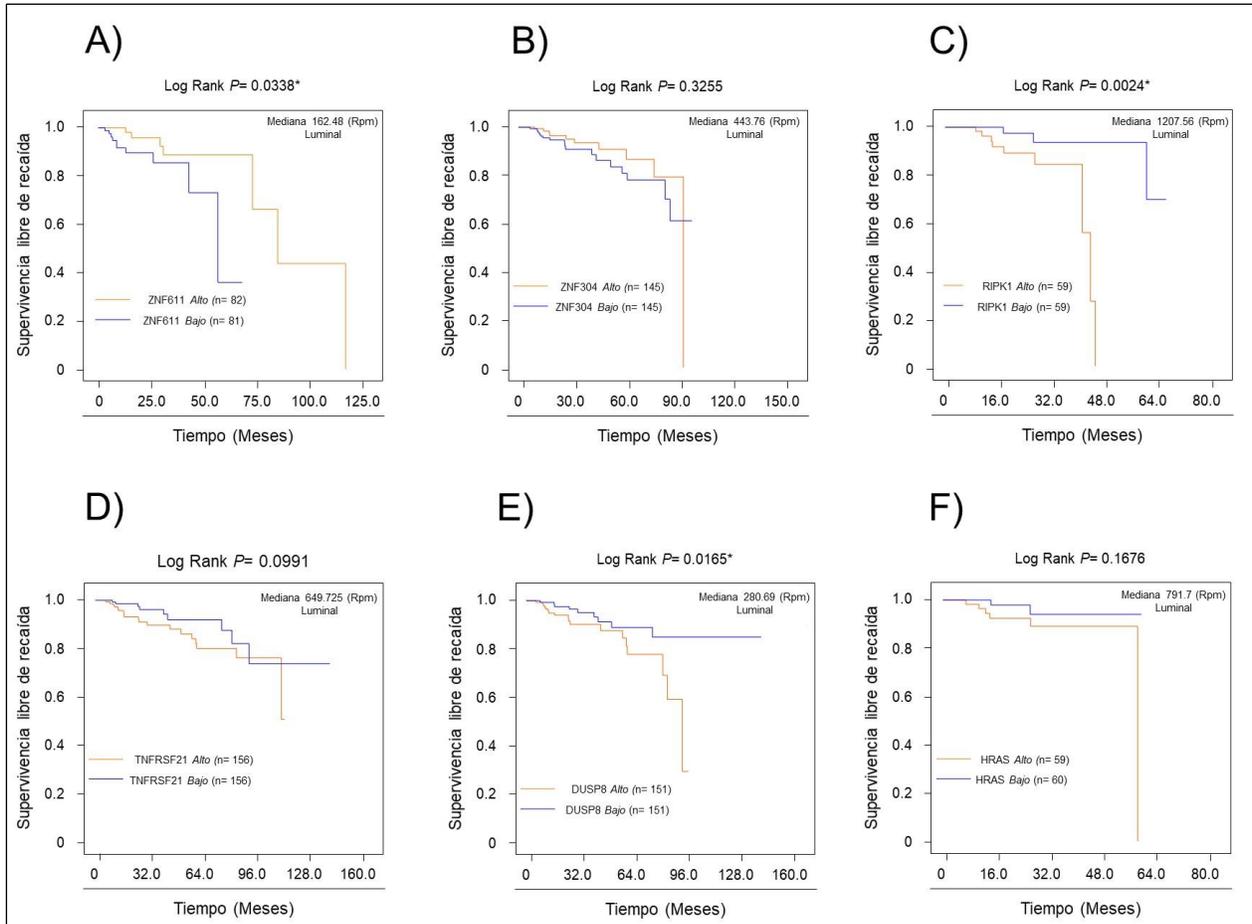
Con la finalidad de explorar a nivel clínico la importancia de los genes relacionados con la función del miR-122 y la radioresistencia en células de cáncer de mama, realizamos análisis de SLR empleando la base de datos del TCGA de pacientes con cáncer de mama. Los análisis de Kaplan-Meier mostraron que una mayor SLR se asoció significativamente con la alta expresión de ZNF611 (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ) y ZNF304 (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ) (Figura 12 A y B). En cuanto a RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS los resultados mostraron que existe una correlación entre la disminución en la expresión de RIPK1 (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ), TNFRSF21 (*Log Rank P* =  $\leq 0.01$ ), DUSP8 (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ) y HRAS (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ) con una SLR más alta en pacientes con cáncer de mama sometidas a tratamiento con RI (Figura 12C-F). Este hallazgo clínico respalda lo que se ha observado en nuestras evidencias experimentales, cuando se induce la pérdida de función de miR-122 en células de cáncer de mama radioresistentes y como consecuencia la supervivencia celular es menor. Además, esto destaca la importancia de que RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS podrían tener como componentes en las vías de señalización necesarias para la supervivencia posterior a la radioterapia en el cáncer de mama.



**Figura 12. Análisis de SLR en pacientes con cáncer de mama..** Utilizando los datos clínicos y transcriptómicos de la base de datos del TCGA se realizó un análisis de Kaplan-Meier para analizar la SLR de las pacientes con tumores de mama que recibieron radioterapia de acuerdo a la expresión de ZNF611 (A), ZNF304 (B) RIPK1 (C), TNFRSF21 (D), DUSP8 (E) y HRAS (F). (Log Rank  $P = \leq 0.05$ ); [Breast Invasive Carcinoma (BRCA)].

Para conocer cuál es la importancia en cuanto a los tipos tumorales de cáncer de mama de los genes relacionados con la función de miR-122 en pacientes que recibieron radioterapia, se realizó el análisis de SLR empleando la de datos del TCGA, pero ahora agrupando a las pacientes con tumores de tipo luminal y TNBC. Las curvas de Kaplan-Meier revelaron que, en las pacientes con cáncer de mama de tipo luminal, una mayor SLR se asoció de manera significativa con la alta expresión de ZNF611 (Log Rank  $P =$

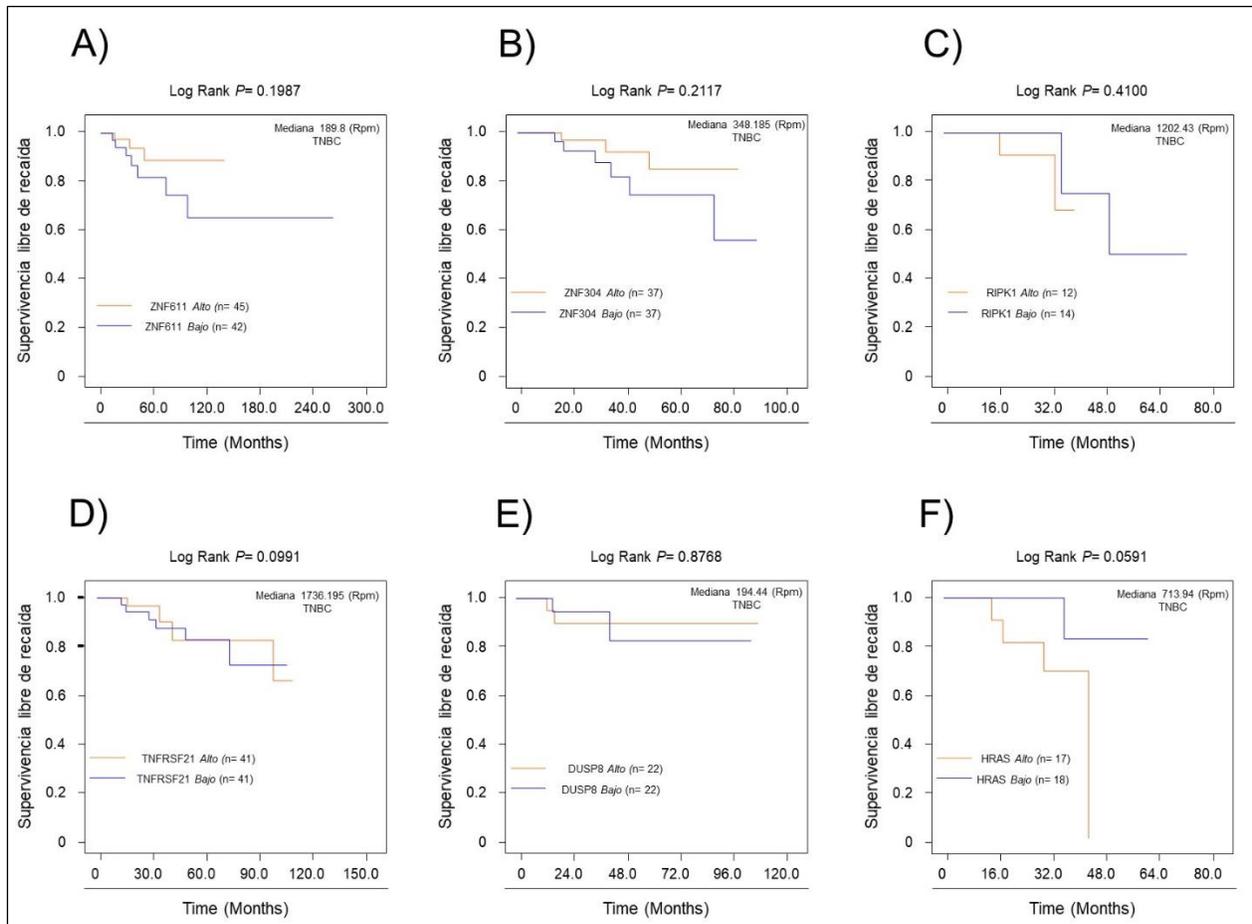
$\leq 0.05$ ) (Figura 13A). Para los genes RIPK1 y DUSP8 (Figura 13C, F) se determinó que una menor expresión de estos genes se relaciona con una SLR más favorable [RIPK1 (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ); DUSP8 (*Log Rank P* =  $\leq 0.01$ )].



**Figura 13. Análisis de SLR en pacientes con cáncer de mama de tipo luminal.** Utilizando los datos clínicos y transcriptómicos de la base de datos del TCGA se realizó un análisis de Kaplan-Meier para analizar la SLR de las pacientes con tumores de mama de tipo luminal que recibieron radioterapia de acuerdo a la expresión de ZNF611 (A), ZNF304 (B), RIPK1 (C), TNFRSF21 (D), DUSP8 (E) y HRAS (F). (*Log Rank P* =  $\leq 0.05$ ); [Breast Invasive Carcinoma (BRCA)].

Con el objetivo de comprender el posible impacto clínico de los genes relacionados con la función de miR-122 en células radioresistentes de cáncer de mama, se realizaron curvas de Kaplan-Meier con los datos de TCGA de cáncer de mama que recibieron radioterapia tomando solo a las pacientes con tumores de tipo TNBC. Los análisis de Kaplan-Meier revelaron una tendencia en cuanto a la alta expresión de ZNF611 (*Log Rank P* = 0.1987) (Figura 14A) y ZNF304 (*Log Rank P* = 0.2117) (Figura 14B) con una

mejor SLR en pacientes con cáncer de mama de tipo TNBC con tratamiento de radioterapia, sin embargo, el resultado no tuvo significancia estadística. En el caso de los genes RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS, solo en HRAS (Figura 14F) se mostró una tendencia muy cercana a la significancia ( $\text{Log Rank } P = 0.059$ ) estadística en cuanto a la baja expresión de este gen con una mejor SLP.



**Figura 14. Análisis de SLR en pacientes con cáncer de mama de tipo TNBC.** Utilizando los datos clínicos y transcriptómicos de la base de datos del TCGA se realizó un análisis de Kaplan-Meier para obtener la SLR de las pacientes con tumores de mama de tipo TNBC que recibieron radioterapia de acuerdo a la expresión de ZNF611(A), ZNF304 (B), RIPK1 (C), TNFRSF21 (D), DUSP8 (E) y HRAS (F). ( $\text{Log Rank } P = \leq 0.05$ ); [Triple Negative Breast Cancer (TNBC)]; [*Breast Invasive Carcinoma (BRCA)*].

Tomando en cuenta la evidencia experimental sobre el efecto de la inhibición de miR-122 en líneas celulares radioresistentes de cáncer de mama se sugiere que miR-122 podría regular negativamente la expresión de genes como ZNF304 y ZN611, los cuales

están involucrados con la regulación de la transcripción de genes. De esta forma en células radioresistentes de tipo luminal, cuando se inhibe la expresión del miR-122, ZNF304 y ZNF611 aumentan su expresión y podrían inducir el silenciamiento transcripcional de genes componentes de vías de señalización importantes para la supervivencia celular como las vías de señalización de las MAPK-Ras, TGF- $\beta$  y TNF, mientras que en células de cáncer de mama de tipo TNBC la regulación transcripcional ejercida por miR-122 de manera directa solo modularía de forma postranscripcional la expresión de ZNF611 activando una posible función de regulación transcripcional que favorecería el mantenimiento de la radioresistencia.

## Discusión

---

La radioterapia es una de las primeras opciones de tratamiento en cáncer de mama, entre el 40 al 60% de las pacientes con esta enfermedad reciben RI, pero la respuesta del paciente dependerá de la sensibilidad que el tumor presente a este tratamiento. Hasta la fecha aún se sigue investigando el mecanismo molecular por el cual las células tumorales presentan distintos comportamientos biológicos hacia el tratamiento con radiación. Los microRNAs son moléculas pequeñas que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional y que tienen importancia en procesos biológicos tales como inhibición de la apoptosis, aumento de vías de supervivencia celular, crecimiento y proliferación celular, inhibición de la respuesta inmune, procesos inflamatorios, reprogramación metabólica y regulación transcripcional que están relacionados a la carcinogénesis y la radioresistencia (Yan *et al*, 2018; Requenez-Contreras *et al*, 2017; Fong *et al*, 2015). Existen reportes que evidencian cambios significativos en la expresión de miRNAs posterior al tratamiento con RI o que relacionan cambios en la expresión de miRNAs con la radioresistencia en diferentes tipos de tumores, entre ellos laríngeo (Maia D, *et al* 2015), próstata (Liao H, *et al* 2015), nasofaríngeo (Qu JQ, *et al* 2015) y pulmón (Aréchaga-Ocampo *et al* 2017).

En nuestro estudio generamos un modelo de radioresistencia (RR) en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (Figura 2). La expresión de un grupo de miRNAs establece una firma molecular útil (Wang *et al*, 2014) para diferenciar los tumores con fenotipo radioresistente de los que no lo son, a pesar de que provengan del mismo tipo histológico. En este sentido, analizamos el miRNoma de la línea celular MCF-7RR para una mejor comprensión del mecanismo por el cual los miRNAs modulan la radioresistencia en el cáncer de mama. Encontramos que 16 miRNAs se expresan diferencialmente en MCF-7RR en comparación con su control parental, de los cuales 13 miRNAs son sobreexpresados y 3 inhibidos (Tabla 1). Entre los miRNAs sobreexpresados, identificamos a 5 de ellos reportados en la resistencia a medicamentos oncológicos en varios tipos de tumores. Se observó que miR-184 (Fang *et al*, 2017) y miR-424\* (Zhang *et al*, 2017) están asociados con la resistencia al

cisplatino en el carcinoma oral de células escamosas y el cáncer de pulmón de células no pequeñas, respectivamente. Por otro lado, miR-218 promueve la sensibilidad a la gemcitabina en el cáncer de vejiga (Wang *et al*, 2017), mientras que miR-222 induce resistencia a este fármaco en el cáncer de pulmón (Wei *et al*, 2017) y miR-10a está relacionado con la resistencia a la doxorubicina en cáncer de mama (Rong *et al*, 2016). Además, identificamos un grupo de miRNAs que actúan como oncomiRs en diferentes neoplasias, estos son: miR-135b\* en cáncer de ovario (Wang *et al*, 2014); miR-934 en adenocarcinoma de pulmón (Ju *et al*, 2017); miR-223\* en carcinoma vulvar (de Melo *et al*, 2016); miR-222\* en cáncer de mama (Camps *et al*, 2014); y miR-135b en cáncer de páncreas (Han *et al*, 2017). Acerca de los miRNAs que fueron regulados negativamente, miR-146a se dirige a la expresión de ATG12 y promueve la sensibilidad al cisplatino en el cáncer de pulmón (Yuwen *et al*, 2017), pero en el cáncer de mama se descubrió que este miRNA aumenta en los tumores HER2+ y del tipo TNBC en comparación con los luminales (Tashkandi *et al*, 2015), esto sugiere que miR-146a podría tener genes blanco que promuevan los fenotipos HER2 + y el tipo TNBC, sin embargo, se necesita más evidencia para probar esta hipótesis. Del mismo modo, la sobreexpresión de miR-181a-2\* está relacionada con un buen pronóstico en el carcinoma papilar tiroideo de variante folicular (Dettmer *et al*, 2013). Además, miR-196b actúa como un oncomiR que contribuye a la quimioresistencia en las células de cáncer colorrectal al activar la vía de señalización STAT3 (Ren *et al*, 2017). De esta manera, reportamos un miRNoma obtenido de las células MCF-7RR, este hallazgo resalta la importancia de los miRNAs en el proceso de radioresistencia adquirida, ya que las vías de señalización involucradas resistencia a RI pueden ser dirigidas por la acción de estas moléculas. Es importante destacar que estos procesos también se han descrito en la radioresistencia de varios tipos de neoplasias, incluido el cáncer de mama. Para explorar si la desregulación de los miRNAs observados en MCF-7RR se comparte con otra línea celular RR con diferente tipo histológico, seleccionamos un grupo de miRNAs con genes blancos y enriquecidos en procesos biológicos con importancia en cáncer de mama y luego medimos su expresión en la línea MDA-MB-231RR. Nuestro resultado reveló que miR-196b, miR-222 y miR-122 tienen una expresión similar en ambas líneas celulares RR (Figura 4A-B). Con respecto a miR-122, identificamos un aumento

significativo similar en su nivel de expresión en ambas líneas celulares radioresistentes (Figura 4C). Curiosamente, se sabe que miR-122 regula a IGF1R (Wang *et al*, 2012) y ADAM10 (Ergün *et al*, 2015). Actuando como un miRNA supresor tumoral en cáncer de mama, además de tener este mismo papel en los tumores de hígado y glioma donde suprime mecanismos que promueven la progresión y la supervivencia (Hsu *et al*, 2012; Wang *et al*, 2014).

Con base en estos antecedentes y nuestra evidencia experimental sobre miR-122, utilizamos herramientas bioinformáticas para conocer los blancos moleculares de miR-122 y, a través de ontología de genes, planteamos la hipótesis de que miR-122 podría potencialmente regular la radioresistencia en el cáncer de mama. En consecuencia, seleccionamos a miR-122 para su análisis funcional en la radioresistencia adquirida del cáncer de mama. Observamos la actividad supresora tumoral de miR-122 al inducir su expresión en las líneas celulares parentales (MCF-7 y MDA-MB-231) reduciendo significativamente la supervivencia al aplicar RI (Figura 5A-F). Este resultado es coherente con lo que se mencionó anteriormente sobre la función supresora de tumores de miR-122 en las células de cáncer de mama, y también muestra un potencial para la sensibilización a la RI. Para evaluar la importancia clínica de miR-122 en pacientes con cáncer de mama, analizamos los datos obtenidos de la expresión (RNA-seq) de miR-122, considerados a aquellos que recibieron tratamiento de radioterapia durante el seguimiento, aquí mostramos que la expresión de miR-122 se asoció significativamente con una SLR favorable al tratamiento de RI en comparación con aquellos que no expresaron miR-122 (Figura 5G). A nivel clínico, esto representa el papel supresor tumoral de miR-122 en un contexto fisiológico donde la resistencia a la RI aún no se ha desarrollado. Estudios anteriores han informado sobre el papel supresor tumoral de los miRNAs en diferentes tumores malignos, por ejemplo miR-29c en cáncer de pulmón (Aréchaga-Ocampo *et al*, 2017), miR-539 en cáncer de mama (Guo *et al*, 2018), miR-144 en cáncer cervical (Tao *et al*, 2017), miR-33a en cáncer de próstata (Karatas *et al*, 2107) y miR-4779 en cáncer de colon (Koo *et al*, 2018), en algunos casos, estableciéndolos como biomarcadores. Ahora, para dilucidar el papel de miR-122 en la radioresistencia, se hicieron ensayos de pérdida de función del miR-122 en ambas

líneas celulares radioresistentes (MCF-7RR y MDA-MB-231RR). Los ensayos clonogénicos de supervivencia mostraron una reducción significativa de la fracción superviviente, confirmando que la función de miR-122 es mantener RR en las células de cáncer de mama (Figura 6A-F). Sin embargo, la función de miR-122 no solo se ha reportado como supresora tumoral en cáncer de mama. Fong *et al* (2015), determinaron que miR-122 se secreta en vesículas hacia el torrente sanguíneo, y de esta manera prepara nichos pre-metastásicos a través de una reprogramación del metabolismo de glucosa en nichos de tejido pulmonar y cerebral. Aunque el mecanismo exacto no se ha elucidado, esto se podría relacionar con nuestro modelo de células radioresistente, ya que tanto MCF-7RR y MDA-MB-231RR mostraron un aumento en la expresión de miR-122. Esto implica que en la radioresistencia podría existir una reprogramación metabólica correlacionada con un estado avanzado del cáncer de mama, ya que en los hallazgos *in vitro*, la expresión de miR-122 aumenta al final del tratamiento fraccionado con RI y a su vez, podría estar secretándose en micro vesículas y permanecer en el sobrenadante de los cultivos celulares para re-introducirse a las células para incrementar su disponibilidad, sin embargo, nos falta corroborar esta hipótesis. Para conocer si el mantenimiento de la radioresistencia en el modelo isogénico de cáncer de mama se debía a un mecanismo molecular reportado previamente, evaluamos la expresión del gen IGF1R [(blanco validado de miR-122 (Wang *et al*, 2012)] en la línea celular MCF-7RR. Los resultados mostraron que la expresión de IGF1R está regulada negativamente por el miR-122 en células MCF-7RR (Figura 6G). Esta observación sugiere que el mantenimiento del fenotipo de radioresistencia adquirida a RI en las células de cáncer de mama es independiente de la función de gen IGF1R y la vía de señalización celular de la cual es componente. No obstante, nuestras evidencias indican que miR-122 es determinante en la radioresistencia mediante un mecanismo compartido entre un fenotipo luminal (MCF-7) y uno triple negativo (MDA-MB-231). Para conocer el mecanismo molecular por el cual miR-122 mantiene la radioresistencia de las células de cáncer de mama, analizamos el transcriptoma de la línea celular MCF-7RR al inducir la pérdida de función de miR-122. Nuestros datos derivados de un análisis supervisado mostraron que 158 genes estaban modulados diferencialmente, de los cuales 27 aumentaron y 131 disminuyeron (Figura 7A-B; Tabla 4). Mediante el

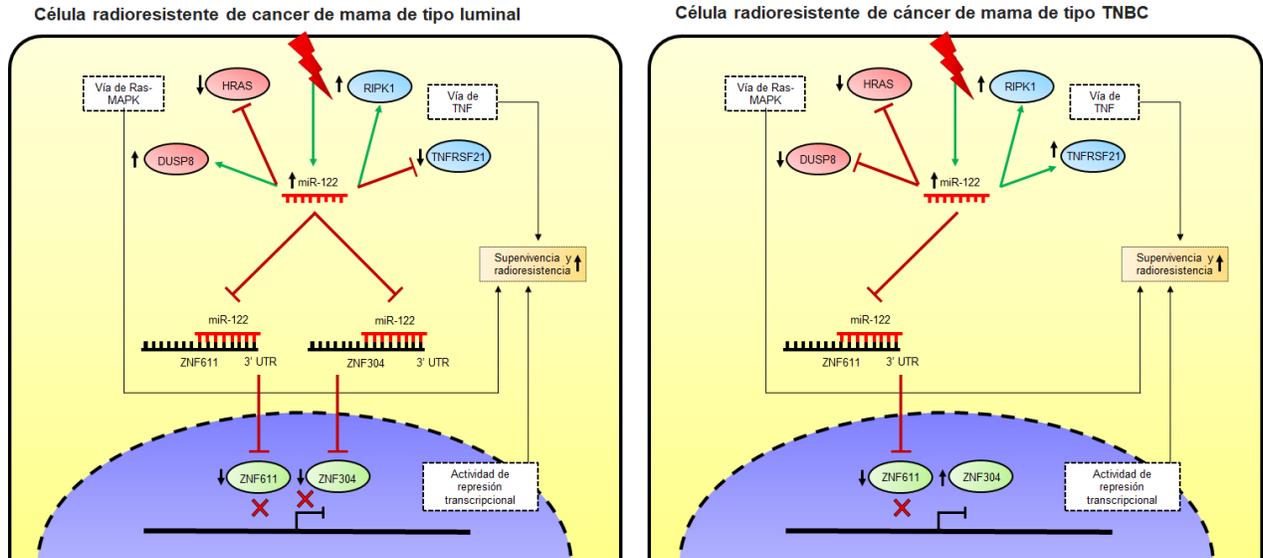
análisis GO y el enriquecimiento de la ruta, determinamos que miR-122 modula los procesos informados en RR como regulación transcripcional, señalización por receptores acoplados a proteínas G, ruta MAPK y respuesta al TNF (Figura 7C) (Kaidar-Person *et al*, 2013). Esto nos proporciona un enfoque genómico de miR-122 y su importancia en el desarrollo de resistencia adquirida a RI, además se propone que las vías de señalización reportadas en este trabajo deberían analizarse detalladamente en el futuro para explicar el mecanismo molecular implicado. De los genes sobreexpresados se identificaron a los factores de transcripción ZNF304 y ZNF611. ZNF304 se reporta como un factor de transcripción que promueve el silenciamiento transcripcional de genes a través de hiper-metilación en islas CpG de regiones promotoras de genes supresores de tumor en cáncer colorrectal (Serra *et al*, 2014), también participa como un oncogen en cáncer de ovario regulando a integrina- $\beta$ 1 y llevando a la inhibición de muerte celular por *anoikis* y promoviendo migración, invasión y proliferación (Aslan *et al*, 2015). En cuanto a ZNF611 no existen reportes que indiquen su participación en la carcinogénesis, sin embargo, al igual que ZNF304, presenta dominio asociado de Krüppel (KRAB) que se relacionan con el silenciamiento transcripcional. Además, tanto ZNF304 como ZNF611 presentan sitios de unión canónicos para miR-122 en su región 3'UTR, por lo que podrían ser blancos directos de miR-122 (Figura 7D). En el caso de los genes que estuvieron suprimidos se identificaron a genes componentes de vías de supervivencia, por ejemplo, MAP4K1 de la vía de las MAPK que es un gen marcador de progresión en cáncer de vejiga (Van der Heijden *et al*, 2016), RIPK1 un receptor de serina-treonina quinasa implicado en la transducción de señales inflamatorias y de muerte celular (necroptosis), esta proteína es un componente de la vía de TNF (Varfolomeev and Vucic 2016) y en cáncer de mama se reporta que tiene un papel dual, ya que dependiendo del contexto molecular y su estado de ubiquitinación puede favorecer la supervivencia o la muerte celular mediante la reprogramación metabólica (Shahsavari *et al*, 2016). Lo anterior sugiere que miR-122 regula la radioresistencia mediante la inhibición de ZNF304 y ZNF611 que son posibles blancos directos de miR-122, provocando la sobreexpresión de genes componentes de vías de supervivencia tales como RIPK1, MAP4K1, HRAS, TNFRS21

y DUSP8, los cuales presentan elementos de respuesta en sus regiones promotoras para ZNF304 y ZNF611 (Figura 8A-C).

Se realizaron ensayos de *Western blot* para medir la abundancia de proteínas de los genes ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS y de esta forma corroborar lo obtenido en el transcriptoma de MCF-7RR al inhibir la expresión de miR-122. Nuestros hallazgos determinaron que ZNF611, ZNF304, RIPK1 y DUSP8 mostraron un nivel de expresión acorde con lo visto en el análisis del transcriptoma de MCF-7RR al inhibir a miR-122 (Figura 9A-B). Sin embargo, al realizar el mismo análisis, pero en la línea celular MDA-MB-231RR, solo ZNF611 y DUSP8 mostraron un aumento al inhibir a miR-122 (Figura 9C-D). Para conocer si la modulación de ZNF611 se debía a una regulación directa de miR-122, realizamos los análisis de *Western blot*, en las líneas parentales MCF-7 y MDA-MB-231, tanto en su estado basal como por la expresión inducida de miR-122. Los resultados mostraron que miR-122 provoca la disminución de la expresión de ZNF611 en las líneas celulares parentales MCF-7 y MDA-MB-231 y, por lo tanto, ZNF611 podría ser un potencial blanco molecular directo de miR-122 (Figura 10A-D).

Con respecto al impacto clínico de los genes ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS, al obtener los datos del TCGA de pacientes con cáncer de mama que recibieron radioterapia, es notable que el aumento en la expresión de ZNF611 y ZNF304 correlacionara con una mejor SLR (Figura 12A-B), la función molecular de ZNF611 y ZNF304 es la represión transcripcional, esto de acuerdo con los análisis de ontología de genes, los dominios presentes en estas proteínas y los reportes de la actividad reguladora de la expresión de genes de ZNF304 a través de la hipermetilación del DNA (Serra et al, 2014). En un contexto fisiológico y molecular de células tumorales de mama que han tenido que adaptarse a un daño constante de RI, tanto a nivel *in vitro* como en pacientes, es probable se susciten cambios en la estructura y topología del genoma de estas células, algunos de estos cambios estarán relacionados con marcas bioquímicas de silenciamiento epigenético. De esta forma miR-122 al mantenerse

incrementado en las células radioresistentes tiene la capacidad de modular a una gran cantidad de genes que le confieran a la célula radioresistente mayor capacidad de adaptación a su microambiente, en este trabajo proponemos que ZNF611 y ZNF304 tienen una función vital en la viabilidad del fenotipo radioresistente, debido a que su inhibición ejercida por miR-122 tanto a nivel de RNAm y de proteína, contribuye con la supervivencia de células tumorales radioresistentes y simultáneamente en pacientes la disminución de estos genes repercute con una enfermedad progresiva en las pacientes con cáncer de mama. Es relevante que los genes RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS presente varios elementos de respuesta en sus regiones promotoras (-2000pb del inicio de la transcripción) y que a nivel de RNAm se observe una relación inversa entre el aumento de ZNF611 y ZNF304 con la disminución de RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS (Figura 12C-F). Cabe señalar que estos genes son componentes de vías de señalización involucradas con el desarrollo y mantenimiento de la carcinogénesis; RIPK1 de la vía NFκB, TNFRSF21 de la vía de TNF, DUSP8 de la vía de MAPK y HRAS de la vía de RAS (Anderton *et al*, 2018; Yang *et al*, 2016). A nivel clínico, los análisis de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer de mama que recibieron radioterapia, relacionados con este grupo de genes corroboran las evidencias *in vitro* mostradas en este trabajo, por lo que la modulación de los genes ZNF611, ZNF304, RIPK1, TNFRSF21, DUSP8 y HRAS podría ser un evento crucial en el mantenimiento de la radioresistencia de células de cáncer de mama (Figura 15).



**Figura 15. Modelo de la función del miR-122 en células de cáncer de mama con fenotipo radioresistente.** En células de cáncer de mama de tipo luminal miR-122 se sobreexpresa e inhibe la expresión de los factores de transcripción ZNF304 y ZNF611 que inducen el silenciamiento transcripcional de genes componentes de vías de supervivencia celular (MAPK, Ras y TNF) esenciales para la radioresistencia. Mientras que en células de cáncer de mama radioresistentes de tipo TNBC miR-122 solo regularía de forma directa la expresión de ZNF611. De esta forma, en cáncer de mama, miR-122 podría promover la supervivencia de las células resistentes a RI al controlar una red de regulación transcripcional que permite mantener la radioresistencia.

Sin embargo, el mecanismo detallado por el cual miR-122 promueve radioresistencia en el cáncer de mama debe ser explorado, con base en las vías de señalización y sus genes componentes aquí reportados.

En este trabajo aportamos evidencia que describe parte del comportamiento biológico de la resistencia adquirida a la radiación en el cáncer de mama, ya que describimos la expresión aberrante de varios miRNAs con un impacto en la progresión y el tratamiento del cáncer.

## Conclusión

---

En este trabajo se demostró que miR-122 presenta una función dual, debido a que en células MCF-7 y MDA-MB-231 promueve la sensibilidad a la radioterapia, mientras que en células radioresistentes MCF-7RR y MDA-MB-231RR miR-122 se comporta como un oncomiRNA, al modular genes involucrado en represión transcripcional, y vías de supervivencia celular como MAPK-RAS, respuesta a TNF y respuesta inflamatoria. Particularmente, ZNF611 podría ser un potencial blanco de regulación postranscripcional por miR-122 e indirectamente modular a productos de genes componentes de vías de supervivencia celular como RIPK1, TNFSRF21, DUSP8 y HRAS, los cuales podrían ser marcadores pronósticos de respuesta a la radioterapia.

## Conclusiones particulares

---

- ✚ En este trabajo mostramos que miR-122 actúa como un miRNA supresor tumoral en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 en respuesta a radioterapia, pero se comporta como un oncomiRNA en células MCF-7RR y MDA-MB-231RR con fenotipo de radioresistencia adquirida.
- ✚ Identificamos un transcriptoma relacionado con la modulación de miR-122 en la radioresistencia en la línea celular MCF-7RR y determinamos que las vías de señalización implicadas en este fenómeno fueron MAPK-RAS, respuesta a TNF, respuesta inflamatoria y regulación transcripcional.
- ✚ Se estableció la estandarización de amplificación para ZNF611 para la validación mediante un gen reportero.
- ✚ Se determinó la abundancia de proteínas de los genes blancos putativos ZNF611 y ZNF304 de miR-122 que correspondió con los resultados obtenidos en el transcriptoma de MCF-7RR modulado por miR-122.

## Perspectivas

---

- ✚ Analizar un panel de moléculas descritas en este trabajo en circulación de pacientes con cáncer de mama que hayan recibido radioterapia para identificar posibles marcadores de radioresistencia.
- ✚ Identificar los transcriptomas de las líneas celulares radioresistentes de cáncer de mama MCF-7RR y MDA-MB-231RR, para profundizar en el mecanismo molecular subyacente a la radioresistencia adquirida.
- ✚ Analizar los mecanismos de regulación transcripcional implicados en la radioresistencia de células de cáncer de mama que miR-122 ejerce por la modulación de ZNF611 y ZNF304.
- ✚ Obtener el transcriptoma de MDA-MB-231RR regulado por miR-122 e identificar nuevos genes blanco y rutas celulares relacionadas con la supervivencia y radioresistencia en un modelo TNBC.
- ✚ Evaluar y caracterizar la función de los miRNAs del perfil global y su impacto en la radioresistencia de cáncer de mama.

## Referencias

---

- Anderton H, Bandala-Sanchez E, Simpson DS, Rickard JA, Ng AP, Di Rago L, Hall C, Vince JE, Silke J, Liccardi G, Feltham R. RIPK1 prevents TRADD-driven, but TNFR1 independent, apoptosis during development. *Cell Death Differ.* 2019 May;26(5):877-889. doi: 10.1038/s41418-018-0166-8. Epub 2018 Sep 5. PubMed PMID: 30185824; PubMed Central PMCID: PMC6461919.
- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell.* 2001 Dec 28;107(7):823-6. Review. PubMed PMID: 11779458.
- Ahsani Z, Mohammadi-Yeganeh S, Kia V, Karimkhanloo H, Zarghami N, Paryan M. WNT1 Gene from WNT Signaling Pathway Is a Direct Target of miR-122 in Hepatocellular Carcinoma. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016 Sep 29. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27687586.
- Alvarado-Miranda A, Arrieta O, Gamboa-Vignolle C, Saavedra-Perez D, Morales-Barrera R, Bargallo-Rocha E, Zinser-Sierra J, Perez-Sanchez V, Ramirez-Ugalde T, Lara-Medina F. Concurrent chemo-radiotherapy following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Radiat Oncol.* 2009 Jul 11;4: 24. doi: 10.1186/1748-717X-4-24. PubMed PMID: 19591689; PubMed Central PMCID: PMC2716349.
- Arechaga-Ocampo E, Lopez-Camarillo C, Villegas-Sepulveda N, Gonzalez-De la Rosa CH, Perez-Añorve IX, Roldan-Perez R, Flores-Perez A, Peña-Curiel O, Angeles-Zaragoza O, Rangel Corona R, Gonzalez-Barrios JA, Bonilla-Moreno R, Del Moral-Hernandez O, Herrera LA, Garcia-Carranca A. Tumor suppressor miR-29c regulates radioresistance in lung cancer cells. *Tumour Biol.* 2017 Mar;39 (3): 1010428317695010. doi: 10.1177/1010428317695010. PubMed PMID: 28345453.
- Aslan B, Monroig P, Hsu MC, Pena GA, Rodriguez-Aguayo C, Gonzalez-Villasana V, Rupaimoole R, Nagaraja AS, Mangala S, Han HD, Yuca E, Wu SY, Ivan C, Moss TJ, Ram PT, Wang H, Gol-Chambers A, Ozkayar O, Kanlikilicer P, Fuentes-Mattei E, Kahraman N, Pradeep S, Ozpolat B, Tucker S, Hung MC, Baggerly K, Bartholomeusz G, Calin G, Sood AK, Lopez-Berestein G. The ZNF304-integrin axis protects against anoikis in cancer. *Nat Commun.* 2015 Jun 17; 6:7351. doi: 10.1038/ncomms8351. PubMed PMID: 26081979; PubMed Central PMCID: PMC4830335.
- Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol.* 2005 Oct 10;23(29):7350-60. Epub 2005 Sep 6. Review. PubMed PMID: 16145060.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov; 68 (6): 394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. PubMed PMID: 30207593.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov; 6(11): 857-66. Review. PubMed PMID: 17060945.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004. Epub 2004 Feb 18. PubMed PMID: 14973191; PubMed Central PMCID: PMC365734.
- Chen Y, Zhang F, Tsai Y, Yang X, Yang L, Duan S, Wang X, Keng P, Lee SO. IL-6 signaling promotes DNA repair and prevents apoptosis in CD133+ stem-like cells of lung cancer after radiation. *Radiat Oncol.* 2015 Nov 14; 10: 227. doi: 10.1186/s13014-015-0534-1. PubMed PMID: 26572130; PubMed Central PMCID: PMC4647293.
- Cao F, Yin LX. miR-122 enhances sensitivity of hepatocellular carcinoma to oxaliplatin via inhibiting MDR1 by targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Exp Mol Pathol.* 2019 Feb; 106:34-43. doi: 10.1016/j.yexmp.2018.10.009. Epub 2018 Oct 26. PubMed PMID: 30539797.
- Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr RNAm and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* 2004 Jul;1(2):106-13. Epub 2004 Jul 1. PubMed PMID: 17179747
- Dai J, Wan S, Zhou F, et al. Genetic Polymorphism in a VEGF-Independent Angiogenesis Gene *ANGPT1* and Overall Survival of Colorectal Cancer Patients after Surgical Resection. Kato M, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(4): e34758. doi: 10.1371/journal.pone.0034758.
- Ergün S, Ulasli M, Igci YZ, Igci M, Kirkbes S, Borazan E, Balik A, Yumrutaş Ö, Camci C, Cakmak EA, Arslan A, Oztuzcu S. The association of the expression of miR-122-5p and its target *ADAM10* with human breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2015 Feb; 42(2):497-505. doi: 10.1007/s11033-014-3793-2. PubMed PMID: 25318895.
- Escobar P, Bouclier C, Serret J, Bièche I, Brigitte M, Caicedo A, Sanchez E, Vacher S, Vignais ML, Bourin P, Geneviève D, Molina F, Jorgensen C, Lazennec G. IL-1 $\beta$  produced by aggressive breast cancer cells is one of the factors that

- dictate their interactions with mesenchymal stem cells through chemokine production. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):29034-47. doi: 10.18632/oncotarget.4732. PubMed PMID: 26362269; PubMed Central PMCID: PMC4745709.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-69. Review. PubMed PMID: 16557279.
  - Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, Veronese A, Ferracin M, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Tavolari S, Chieco P, Negrini M, Bolondi L. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5761-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4797. Epub 2009 Jul 7. PubMed PMID: 19584283.
  - Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepää AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev*. 2009 Jun 1;23(11):1313-26. doi: 10.1101/gad.1781009. PubMed PMID: 19487572; PubMed Central PMCID: PMC2701584.
  - Gaikwad S, Larionov S, Wang Y, Dannenberg H, Matozaki T, Monsonego A, Thal DR, Neumann H. Signal regulatory protein-beta1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2009 Dec; 175(6):2528-39. doi: 10.2353/ajpath.2009.090147. PubMed PMID: 19893026; PubMed Central PMCID: PMC2789620.
  - Graupner A, Eide DM, Brede DA, Ellender M, Lindbo Hansen E, Oughton DH, Bouffler SD, Brunborg G, Olsen AK. Genotoxic effects of high dose rate X-ray and low dose rate gamma radiation in *Apc(Min/+)* mice. *Environ Mol Mutagen*. 2017 Oct;58(8):560-569. doi: 10.1002/em.22121. Epub 2017 Aug 30. PubMed PMID: 28856770; PubMed Central PMCID: PMC5656900.
  - Grünwald B, Vandooren J, Gerg M, Ahomaa K, Hunger A, Berchtold S, Akbareian S, Schaten S, Knolle P, Edwards DR, Opdenakker G, Krüger A. Systemic Ablation of MMP-9 Triggers Invasive Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer via Dereglulation of IL6 Expression in the Bone Marrow. *Mol Cancer Res*. 2016 Nov;14(11):1147-1158. PubMed PMID: 27489361.
  - Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol*. 2013 Oct 9;425(19):3582-600. doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.007. Epub 2013 Mar 13. Review. PubMed PMID: 23500488; PubMed Central PMCID: PMC3757117.

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review. PubMed PMID: 10647931.
- Hernando E. microRNAs and cancer: role in tumorigenesis, patient classification and therapy. *Clin Transl Oncol*. 2007 Mar; 9(3):155-60. Review. PubMed PMID: 17403626.
- Ho JY, Hsu RJ, Liu JM, Chen SC, Liao GS, Gao HW, Yu CP. MicroRNA-382-5p aggravates breast cancer progression by regulating the RERG/Ras/ERK signaling axis. *Oncotarget*. 2016 Sep 29. doi: 10.18632/oncotarget.12338. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27705918.
- Huber SM, Butz L, Stegen B, Klumpp D, Braun N, Ruth P, Eckert F. Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. *Front Physiol*. 2013 Aug 14;4: 212. doi: 10.3389/fphys.2013.00212. eCollection 2013. PubMed PMID: 23966948; PubMed Central PMCID: PMC3743404.
- Jameel JK, Rao VS, Cawkwell L, Drew PJ. Radioresistance in carcinoma of the breast. *Breast*. 2004 Dec;13(6):452-60. Review. PubMed PMID: 15563851.
- Jia H, Zhang Z, Zou D, Wang B, Yan Y, Luo M, Dong L, Yin H, Gong B, Li Z, Wang F, Song W, Liu C, Ma Y, Zhang J, Zhao H, Li J, Yu J. MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1): e88057. doi: 10.1371/journal.pone.0088057. eCollection 2014. PubMed PMID: 24498243; PubMed Central PMCID: PMC3909310.
- Kaidar-Person O, Lai C, Kuten A, Belkacemi Y; AROME. "The Infinite Maze" of breast cancer, signaling pathways and radioresistance. *Breast*. 2013 Aug;22(4):411-8. doi: 10.1016/j.breast.2013.04.003. Epub 2013 May 1. Review. PubMed PMID: 23642528.
- Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005 Feb; 96(2):111-5. PubMed PMID: 15723655.
- Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S, Baba T, Suzuki T. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev*. 2009 Feb 15;23(4):433-8. doi: 10.1101/gad.1761509. PubMed PMID: 19240131; PubMed Central PMCID: PMC2648654.

- Keshava S, Sahoo S, Tucker TA, Idell S, Rao LV, Pendurthi UR. Endothelial cell protein C receptor opposes mesothelioma growth driven by tissue factor. *Cancer Res.* 2013 Jul 1;73(13):3963-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1690. PubMed PMID: 23539451; PubMed Central PMCID: PMC3702650.
- Khan S, Wall D, Curran C, Newell J, Kerin MJ, Dwyer RM. MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid. *BMC Cancer.* 2015 May 2;15: 345. doi: 10.1186/s12885-015-1374-y. PubMed PMID: 25934412; PubMed Central PMCID: PMC4425901.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D152-7. doi: 10.1093/nar/gkq1027. Epub 2010 Oct 30. PubMed PMID: 21037258; PubMed Central PMCID: PMC3013655.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010 Sep;11(9):597-610. doi: 10.1038/nrg2843. Epub 2010 Jul 27. Review. PubMed PMID: 20661255.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005 Dec 1;438(7068):685-9. Epub 2005 Oct 30. PubMed PMID: 16258535.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002 Apr 30;12(9):735-9. PubMed PMID: 12007417.
- Lawrence TS. Radiotherapy for intrahepatic cancers: the promise of emerging sophisticated techniques. *J Support Oncol.* 2008 Jan;6(1):14-5. PubMed PMID: 18257396.
- Lee JH, Kim JY, Kim SY, Choi SI, Kim KC, Cho EW, Kim IG. APBB1 reinforces cancer stem cell and epithelial-to-mesenchymal transition by regulating the IGF1R signaling pathway in non-small-cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Nov 9. pii: S0006-291X (16) 31885-X. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.030. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27836546.
- Lei Sun, Stephanie M Cabarcas and William L Farrar\*. Radioresistance and Cancer Stem Cells: Survival of the Fittest. Cancer Stem Cell Section, Laboratory of Cancer Prevention, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederick 2011, 1050 Boyles Street, Building 560, Room 21-81, Frederick, MD 21702, USA.

- Lehnert S. Prediction of tumor response to therapy: molecular markers and the microenvironment. Apoptosis and chips: an overview of the proceedings. *Radiat Res.* 2000 Aug;154(2): 121-4. PubMed PMID: 10950686.
- Li L, Story M, Legerski RJ. Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Mar 15;49(4):1157-62. PubMed PMID: 11240259.
- Li ZY, Xi Y, Zhu WN, Zeng C, Zhang ZQ, Guo ZC, Hao DL, Liu G, Feng L, Chen HZ, Chen F, Lv X, Liu DP, Liang CC. Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4 $\alpha$ . *J Hepatol.* 2011 Sep;55(3):602-611. doi: 10.1016/j.jhep.2010.12.023. Epub 2011 Jan 15. PubMed PMID: 21241755.
- Liao H, Xiao Y, Hu Y, Xiao Y, Yin Z, Liu L. microRNA-32 induces radioresistance by targeting DAB2IP and regulating autophagy in prostate cancer cells. *Oncol Lett* 2015; 10:2055-2062.
- Lim S, Yoo BK, Kim HS, Gilmore HL, Lee Y, Lee HP, Kim SJ, Letterio J, Lee HG. Amyloid- $\beta$  precursor protein promotes cell proliferation and motility of advanced. Breast cancer. *BMC Cancer.* 2014 Dec 10;14:928. doi: 10.1186/1471-2407-14-928. PubMed PMID: 25491510; PubMed Central PMCID: PMC4295427.
- Liu PC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R, Hillman M, Yang G, Ellis D, Marando C, Katiyar K, Bradley J, Abremski K, Stow M, Rupa M, Zhuo J, Li YL, Lin Q, Burns D, Xu M, Zhang C, Qian DQ, He C, Sharief V, Weng L, Agrios C, Shi E, Metcalf B, Newton R, Friedman S, Yao W, Scherle P, Hollis G, Burn TC. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2006 Jun;5(6):657-64. Epub 2006 Jun 14. PubMed PMID: 16627989.
- Lv X, Zhao F, Huo X, Tang W, Hu B, Gong X, Yang J, Shen Q, Qin W. Neuropeptide Y1 receptor inhibits cell growth through inactivating mitogen-activated protein kinase signal pathway in human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2016 Jul;33(7):70. doi: 10.1007/s12032-016-0785-1. PubMed PMID: 27262566.
- Maia D, de Carvalho AC, Horst MA, Carvalho AL, Scapulato Neto C, Vettore AL. Expression of miR-296-5p as predictive marker for radiotherapy resistance in early-stage laryngeal carcinoma. *J Transl Med* 2015;13: 262.
- Metheerairut C, Slack FJ. MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy. *Curr Opin Genet Dev.* 2013 Feb;23(1):12-9. doi: 10.1016/j.gde.2013.01.002. Epub 2013 Feb 28. Review. PubMed PMID: 23453900; PubMed Central PMCID: PMC3617065.

- Newton JM, Hanoteau A, Liu HC, Gaspero A, Parikh F, Gartrell-Corrado RD, Hart TD, Laoui D, Van Ginderachter JA, Dharmaraj N, Spanos WC, Saenger Y, Young S, Sikora AG. Immune microenvironment modulation unmasks therapeutic benefit of radiotherapy and checkpoint inhibition. *J Immunother Cancer*. 2019 Aug 13;7(1):216. doi: 10.1186/s40425-019-0698-6. PubMed PMID: 31409394; PubMed Central PMCID: PMC6693252.
  - Ocasio CA, Rajasekaran MB, Walker S, Le Grand D, Spencer J, Pearl FM, Ward SE, Savic V, Pearl LH, Hochegger H, Oliver AW. A first-generation inhibitor of human Greatwall kinase, enabled by structural and functional characterisation of a minimal kinase domain construct. *Oncotarget*. 2016 Aug 22. doi: 10.18632/oncotarget.11511. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27563826.
- Ozyigit G, Gultekin M. Current role of modern radiotherapy techniques in the management of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 Aug 10;5(3):425-39. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.425. Review. PubMed PMID: 25114857; PubMed Central PMCID: PMC4127613.
- Pandeli C, Smyth LML, David S, See AW. Dose reduction to organs at risk with deep-inspiration breath-hold during right breast radiotherapy: a treatment planning study. *Radiat Oncol*. 2019 Dec 10;14(1):223. doi: 10.1186/s13014-019-1430-x. PubMed PMID: 31822293; PubMed Central PMCID: PMC6905024.
  - Piasecka D, Kitowska K, Czaplinska D, Mieczkowski K, Mieszkowska M, Turczyk L, Skladanowski AC, Zaczek AJ, Biernat W, Kordek R, Romanska HM, Sadej R. Fibroblast growth factor signalling induces loss of progesterone receptor in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Nov 12. doi: 10.18632/oncotarget.13322. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27852068.
  - Puchmajerová A, Tornikidis J, Mrňa L, Havlovicová M, Vlčková M, Chrudimská J, Macek M Jr, Hoch J. [Hereditary breast cancer: genetic etiology and current possibilities of prevention and surgical treatment]. *Cas Lek Cesk*. Spring 2018;157 (2): 90-95. Czech. PubMed PMID: 29790359.
  - Qu JQ, Yi HM, Ye X, Li LN, Zhu JF, Xiao T, et al. MiR-23a sensitizes nasopharyngeal carcinoma to irradiation by targeting IL-8/Stat3 pathway. *Oncotarget* 2015; 6:28341-56.
  - Requenez-Contreras JL, López-Castillejos ES, Hernández-Flores R, Moreno-Eutimio MA, Granados-Riveron JT, Martinez-Ruiz GU, Aquino-Jarquin G. MiR-138 indirectly regulates the MDR1 promoter by NF-κB/p65 silencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar 11;484(3):648-655. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.168. Epub 2017 Jan 31. PubMed PMID: 28153721.
  - Rigoutsos I. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res*. 2009 Apr

15;69(8):3245-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0352. Review. PubMed PMID: 19351814.

- Rong Y, Yuan CH, Qu Z, Zhou H, Guan Q, Yang N, Leng XH, Bu L, Wu K, Wang FB. Doxorubicin resistant cancer cells activate myeloid-derived suppressor cells by releasing PGE2. *Sci Rep*. 2016 Apr 1;6: 23824. doi: 10.1038/srep23824. PubMed PMID: 27032536; PubMed Central PMCID: PMC4817121.
- Serra RW, Fang M, Park SM, Hutchinson L, Green MR. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife*. 2014 Mar 12;3: e02313. doi: 10.7554/eLife.02313. PubMed PMID: 24623306; PubMed Central PMCID: PMC3949416.
- Sisakht M, Darabian M, Mahmoodzadeh A, Bazi A, Shafiee SM, Mokarram P, Khoshdel Z. The role of radiation induced oxidative stress as a regulator of radio-adaptive responses. *Int J Radiat Biol*. 2020 Feb 7:1-16. doi: 10.1080/09553002.2020.1721597. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31976798.
- Shahsavari Z, Karami-Tehrani F, Salami S, Ghasemzadeh M. RIP1K and RIP3K provoked by shikonin induce cell cycle arrest in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-468: necroptosis as a desperate programmed suicide pathway. *Tumour Biol*. 2016 Apr;37(4):4479-91. doi: 10.1007/s13277-015-4258-5. Epub 2015 Oct 26. PubMed PMID: 26496737.
- Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):83-92. PubMed PMID: 22468167; PubMed Central PMCID: PMC3315687.
- Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*. 2010; 108:73-112. doi: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0. Review. PubMed PMID: 21034966.
- Stankevicius V, Kuodyte K, Schweigert D, Bulotiene D, Paulauskas T, Daniunaite K, Suziedelis K. Gene and miRNA expression profiles of mouse Lewis lung carcinoma LLC1 cells following single or fractionated dose irradiation. *Oncol Lett*. 2017 Jun;13(6):4190-4200. doi: 10.3892/ol.2017.5877. Epub 2017 Mar 20. PubMed PMID: 28599420; PubMed Central PMCID: PMC5453008.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of Drosophila MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2003 Dec;1(3):E60. Epub 2003 Oct 13. PubMed PMID: 14691535; PubMed Central PMCID: PMC270017.

- Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* 2016 Jul 1;76(13):3666-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359. Epub 2016 Jun 20. Review. PubMed PMID: 27325641; PubMed Central PMCID: PMC4930690.
- Steel GG. From targets to genes: a brief history of radiosensitivity. *Phys Med Biol.* 1996 Feb;41(2):205-22. Review. PubMed PMID: 8746105.
- Tailby E, Boyages Am J. Conservation surgery and radiation therapy in early breast cancer - An update. *Aust Fam Physician.* 2017;46(4):214-219. PubMed PMID: 28376574.
- Tang S, Li Z, Yang L, Shen L, Wang Y. A potential new role of ATM inhibitor in radiotherapy: suppressing ionizing Radiation-Activated EGFR. *Int J Radiat Biol.* 2020 Jan 8:1-8. doi: 10.1080/09553002.2020.1707325. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31859574.
- Teresa Pinto A, Laranjeiro Pinto M, Patrícia Cardoso A, Monteiro C, Teixeira Pinto M, Filipe Maia A, Castro P, Figueira R, Monteiro A, Marques M, Mareel M, Dos Santos SG, Seruca R, Adolfo Barbosa M, Rocha S, José Oliveira M. Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Sci Rep.* 2016 Jan 6; 6:18765. doi: 10.1038/srep18765. PubMed PMID: 26735768; PubMed Central PMCID: PMC4702523.
- Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther.* 2015;15(2):142-50. Review. PubMed PMID: 25537773; PubMed Central PMCID: PMC4439190.
- Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan;20(1):5-20. doi: 10.1038/s41580-018-0059-1. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Dec;19(12):808. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 May;20(5):321. PubMed PMID: 30228348.
- Van der Heijden AG, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Ribal MJ, Fernández PL, Oosterwijk E, Schalken JA, Alcaraz A, Witjes JA. A five-gene expression signature to predict progression in T1G3 bladder cancer. *Eur J Cancer.* 2016 Sep; 64:127-36. doi: 10.1016/j.ejca.2016.06.003. Epub 2016 Jul 11. PubMed PMID: 27414486.

- Van Roosbroeck K, Calin GA. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. *Adv Cancer Res.* 2017;135:119-149. doi: 10.1016/bs.acr.2017.06.002. Epub 2017 Aug 12. Review. PubMed PMID: 28882220.
- Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine.* 2016 Sep 9. pii: S1043-4666(16)30489-6. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27623350.
- Visani M, de Biase D, Marucci G, Cerasoli S, Nigrisoli E, Bacchi Reggiani ML, Albani F, Baruzzi A, Pession A; PERNO study group. Expression of 19 microRNAs in glioblastoma and comparison with other brain neoplasia of grades I-III. *Mol Oncol.* 2014 Mar;8(2):417-30. doi: 10.1016/j.molonc.2013.12.010. Erratum in: *Mol Oncol.* 2015 Jan;9(1):334. PubMed PMID: 24412053.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61. Epub 2006 Feb 3. PubMed PMID: 16461460; PubMed Central PMCID: PMC1413718.
- Wang B, Wang H, Yang Z. MiR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R. *PLoS One.* 2012;7(10):e47053. doi: 10.1371/journal.pone.0047053. PubMed PMID: 23056576; PubMed Central PMCID: PMC3466252.
- Wang G, Zhao Y, Zheng Y. MiR-122/Wnt/ $\beta$ -catenin regulatory circuitry sustains glioma progression. *Tumour Biol.* 2014 Sep;35(9):8565-72. doi: 10.1007/s13277-014-2089-4. PubMed PMID: 24863942.
- Wang W, Liu WB, Huang da B, Jia W, Ji CS, Hu B. Targeting PCDH20 gene by microRNA-122 confers 5-FU resistance in hepatic carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2016 Aug 1;6(8):1681-94. PubMed PMID: 27648358; PubMed Central PMCID: PMC5004072.
- Willers H, Held KD. Introduction to clinical radiation biology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2006 Feb;20(1):1-24. Review. PubMed PMID: 16580554.
- Xia Y, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Li X, Manyam GC, Murty V, Bhagat G, Zhang S, Pasqualucci L, Visco C, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Møller MB, Parsons BM, Winter JN, Piris MA, Westin J, Fowler N, Miranda RN, Ok CY, Li Y,

- Li J, Medeiros LJ, Young KH. Loss of PRDM1/BLIMP-1 function contributes to poor prognosis of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2016 Sep 30. doi: 10.1038/leu.2016.243. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27568520.
- Yan W, Wu X, Zhou W, Fong MY, Cao M, Liu J, Liu X, Chen CH, Fadare O, Pizzo DP, Wu J, Liu L, Liu X, Chin AR, Ren X, Chen Y, Locasale JW, Wang SE. Cancer-cell-secreted exosomal miR-105 promotes tumour growth through the MYC-dependent metabolic reprogramming of stromal cells. *Nat Cell Biol*. 2018 May;20(5):597-609. doi: 10.1038/s41556-018-0083-6. Epub 2018 Apr 16. PubMed PMID: 29662176; PubMed Central PMCID: PMC5920728.
  - Yang X, Shi B, Li L, Xu Z, Ge Y, Shi J, Liu Y, Zheng D. Death receptor 6 (DR6) is required for mouse B16 tumor angiogenesis via the NF- $\kappa$ B, P38 MAPK and STAT3 pathways. *Oncogenesis*. 2016 Mar 7;5:e206. doi: 10.1038/oncsis.2016.9. PubMed PMID: 26950598; PubMed Central PMCID: PMC4815052.
  - Yan Y, Luo YC, Wan HY, Wang J, Zhang PP, Liu M, Li X, Li S, Tang H. MicroRNA-10a is involved in the metastatic process by regulating Eph tyrosine kinase receptor A4-mediated epithelial-mesenchymal transition and adhesion in hepatoma cells. *Hepatology*. 2013 Feb;57(2):667-77. doi: 10.1002/hep.26071. PubMed PMID: 22996586.
  - Zhao L, Lu X, Cao Y. MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response. *Cell Signal*. 2013 Jul;25(7):1625-34. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.04.004. Epub 2013 Apr 17. Review. PubMed PMID: 23602933; PubMed Central PMCID: PMC3713775.
  - Zhu H, Fang J, Zhang J, Zhao Z, Liu L, Wang J, Xi Q, Gu M. miR-182 targets CHL1 and controls tumor growth and invasion in papillary thyroid carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jul 18;450 (1): 857-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.073. PubMed PMID: 24971532.
  - Zhu Y, Shi LY, Lei YM, Bao YH, Li ZY, Ding F, Zhu GT, Wang QQ, Huang CX. Radiosensitization effect of hsa-miR-138-2-3p on human laryngeal cancer stem cells. *PeerJ*. 2017 May 16;5: e3233. doi: 10.7717/peerj.3233. eCollection 2017. PubMed PMID: 28533948; PubMed Central PMCID: PMC5436573.
  - Zou D, Zhou Q, Wang D, Guan L, Yuan L, Li S. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. *Oncol Res*. 2016;24(2):99-108. doi: 10.3727/096504016X14611963142173. PubMed PMID: 27296950.

## Apéndice

Se muestra la lista completa de los genes identificados en los análisis de microarreglos, correspondientes a MCF-7RR al inhibir la expresión de miR-122.

**Tabla 4. Genes sobreexpresados y suprimidos en MCF-7RR con miR-122 inhibido por antagoniR-122.**

Número	Genes sobreexpresados (Símbolo)	Veces de cambio	Valor de <i>P</i> (ANOVA)
1	ADCY10P1	2.69	0.049564
2	SNORA62	2.44	0.014568
3	IGLON5	1.9	0.01885
4	FAM60A	1.87	0.004694
5	NUP62CL	1.64	0.045428
6	RNU6-345P	1.63	0.048881
7	ZNF684	1.53	0.009666
8	RNA5SP331	1.49	0.003956
9	ACAA1	1.48	0.002431
10	KLHL5	1.46	0.012182
11	RNU2-59P	1.43	0.023233
12	C20orf203	1.43	0.028087
13	FBXO48	1.39	0.03828
14	ZNF304	1.37	0.009024
15	RNU6-1143P	1.37	0.033611
16	SPATA41	1.36	0.038323
17	DOCK11	1.35	0.004651
18	VIPR2	1.35	0.027337
19	CATSPER2	1.35	0.049917
20	SSX8	1.34	0.000942
21	RBP7	1.34	0.015545
22	MORC4	1.33	0.002719
23	CCDC127	1.33	0.008499
24	KCND3	1.33	0.026191
25	MIR15A	1.33	0.041146
26	C21orf128	1.32	0.043775
27	ZNF611	1.31	0.037283

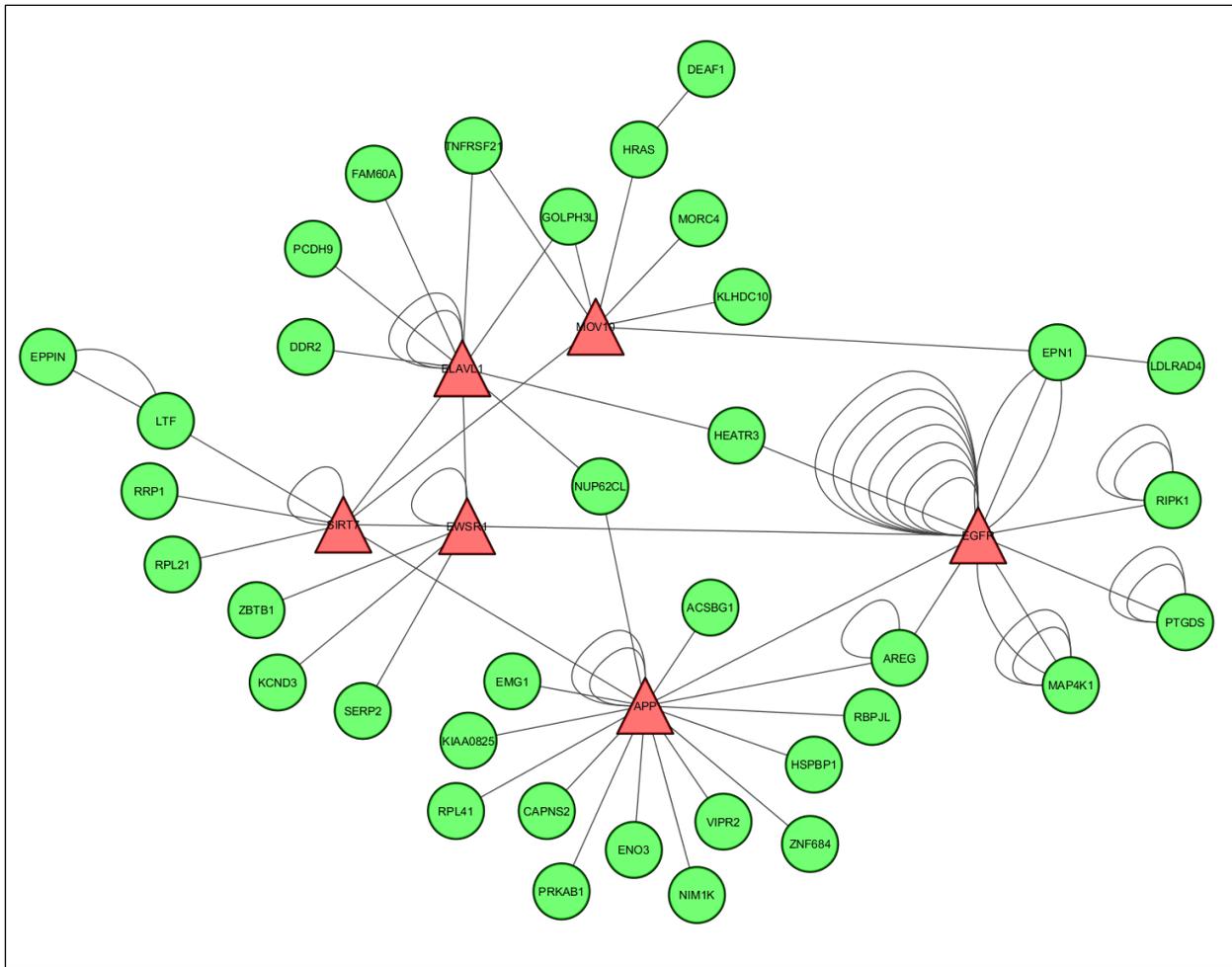
Número	Genes suprimidos (Símbolo)	Veces de cambio	Valor de <i>P</i> (ANOVA)
1	RNA5SP22	-2.57	0.030472
2	TERF1P2	-1.72	0.037845
3	FLJ45832	-1.63	0.04764
4	SPRR2D	-1.61	0.035229
5	TMEM229A	-1.59	0.015536
6	KLHDC10	-1.58	0.039493
7	MMP26	-1.57	0.028751
8	AKR7L	-1.56	0.033014
9	RNU2-11P	-1.56	0.048154
10	OR7E105P	-1.55	0.01292
11	LCE2C	-1.55	0.01932
12	SNORD116-14	-1.53	0.01283
13	PRH2	-1.52	0.005957
14	FAM207A	-1.52	0.033463
15	LOC613206	-1.52	0.039117
16	RAB40AL	-1.5	0.020366
17	RN7SL799P	-1.49	0.008577
18	SEMA5A	-1.49	0.029573
19	MICAL2	-1.49	0.049496
20	SLC25A18	-1.47	0.001157
21	WFDC13	-1.47	0.003924
22	LOC280665	-1.47	0.008293
23	PODNL1	-1.46	0.027996
24	BHLHA9	-1.46	0.033995
25	RN7SL845P	-1.45	0.008744
26	RNA5SP260	-1.45	0.010754
27	LOC100288160	-1.44	0.000338
28	CXorf65	-1.44	0.025288
29	EMG1	-1.44	0.030918
30	SERP2	-1.44	0.03894
31	IGKV6-21	-1.44	0.048681
32	RNA5SP490	-1.43	0.009165
33	MXRA5P1	-1.43	0.016998
34	DUSP8	-1.43	0.023616

35	OR10U1P	-1.43	0.02384
36	RNU6-1244P	-1.43	0.024489
37	RNU6-759P	-1.42	0.001643
38	OR4D10	-1.42	0.002016
39	RN7SL404P	-1.42	0.021392
40	LOC100128035	-1.42	0.025242
41	HTR1E	-1.42	0.026313
42	RNU6-531P	-1.42	0.046175
43	ZNF616	-1.41	0.006054
44	DDR2	-1.4	0.00064
45	IFNL2	-1.4	0.008158
46	RNA5SP43	-1.4	0.008372
47	ACSBG1	-1.4	0.0115
48	OR8B4	-1.4	0.021526
49	LOC100131496	-1.4	0.022992
50	LOC400661	-1.4	0.025557
51	RN7SL708P	-1.4	0.037978
52	TOMM20L	-1.39	0.013789
53	C2CD4A	-1.39	0.027881
54	OR10T1P	-1.39	0.03235
55	KIAA0825	-1.38	0.016549
56	FAM90A27P	-1.38	0.025368
57	C6orf163	-1.38	0.041046
58	ZNF793	-1.38	0.047813
59	MAGEB6P1	-1.38	0.047823
60	DLX4	-1.37	0.001749
61	CD1E	-1.37	0.008049
62	C21orf88	-1.37	0.012189
63	RPL41	-1.37	0.015128
64	FOXD4L6	-1.37	0.015801
65	SNAI1P1	-1.36	0.002469
66	OR2I1P	-1.36	0.004014
67	TFCP2L1	-1.36	0.004789
68	OR1L8	-1.36	0.007069
69	SP7	-1.36	0.009316
70	LIN28A	-1.36	0.047703

71	RNA5SP185	-1.36	0.049989
72	RBPJL	-1.35	0.009438
73	CIDCEP	-1.35	0.00976
74	CITED4	-1.35	0.017309
75	LTF	-1.35	0.021755
76	RSPO3	-1.35	0.022451
77	MAP4K1	-1.35	0.023296
78	HRAS	-1.35	0.040605
79	RN7SL307P	-1.34	0.001091
80	TRPM1	-1.34	0.01183
81	IL13	-1.34	0.013097
82	FOXD4L6	-1.34	0.026787
83	FOXD4L6	-1.34	0.026787
84	TNFRSF21	-1.34	0.027477
85	LOC440896	-1.34	0.031084
86	RNU1-94P	-1.34	0.033078
87	KRTAP17-1	-1.34	0.033586
88	SNORD50B	-1.34	0.045892
89	PLA2G10	-1.34	0.047254
90	TTLL13	-1.33	0.00097
91	TMEM194B	-1.33	0.001236
92	PPAPDC3	-1.33	0.012636
93	ZNF18	-1.33	0.016243
94	C17orf47	-1.33	0.02108
95	CAPNS2	-1.33	0.027407
96	PTGDS	-1.33	0.027725
97	IL1R2	-1.33	0.038964
98	RNU6-302P	-1.33	0.040819
99	OR5AP2	-1.32	0.000289
100	VEPH1	-1.32	0.001466
101	DKFZp779M0652	-1.32	0.010157
102	LOC439951	-1.32	0.011456
103	CCL25	-1.32	0.016893
104	SNORD102	-1.32	0.01967
105	SLC10A4	-1.32	0.020593
106	USP20	-1.32	0.0222

107	OR4A13P	-1.32	0.022998
108	TMEM176A	-1.32	0.024448
109	RNU6-561P	-1.32	0.024723
110	ENO3	-1.31	0.002357
111	MB	-1.31	0.002957
112	SLC45A1	-1.31	0.002967
113	RN7SL378P	-1.31	0.005099
114	RIPK1	-1.31	0.005897
115	CNIH3	-1.31	0.006585
116	HEATR3	-1.31	0.008933
117	DTX2	-1.31	0.011503
118	SENP8	-1.31	0.013735
119	ACTA2-AS1	-1.31	0.01574
120	KRT77	-1.31	0.01621
121	C20orf181	-1.31	0.01732
122	EGR4	-1.31	0.018921
123	AREG	-1.31	0.023358
124	ARHGAP23	-1.31	0.024504
125	RN7SL518P	-1.31	0.025984
126	HSPBP1	-1.31	0.030718
127	EPPIN	-1.31	0.032784
128	NUB1	-1.31	0.03411
129	LOC54944	-1.31	0.037601
130	DEAF1	-1.31	0.038737
131	C4B	-1.31	0.03882

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se obtuvieron datos adicionales correspondientes a la interacción de los genes que se modulan al inhibir a miR-122 en MCF-7RR. En este trabajo reportamos un transcriptoma de la línea celular MCF-7RR al inhibir a miR-122 con el objetivo de identificar posibles genes blanco que permiten el mantenimiento de la radioresistencia en cáncer de mama. No obstante, el transcriptoma que se modula por la función de miR-122 también interacciona con otros genes que pueden o no estar influenciados por miR-122, y que podrían formar parte de una red de regulación genética, epigenética o molecular que también contribuye a la radioresistencia en cáncer de mama. En ese sentido, realizamos análisis bioinformáticos enfocados a estudiar las interacciones moleculares presentes en el transcriptoma de MCF-7RR con miR-122 inhibido con otros genes a nivel de proteína. Esto nos brinda un panorama adicional sobre la función de miR-122 en el contexto fisiológico y molecular de MCF-7RR. Se analizaron las interacciones a nivel de proteína de dichos genes mediante *Key Pathway Miner*. Esta herramienta permite incorporar a genes que no se mostraron desregulados en el transcriptoma (*outliers*), pero que podrían jugar un papel en la resistencia a la RI en células de cáncer de mama y de esta forma podrían contribuir a mantener en fenotipo de resistencia a la RI (Figura 16).



**Figura 16. Interacción de los genes modulados en MCF-7RR a nivel de proteína.** En la figura se muestran en color verde los genes que se modularon en el transcriptoma de MCF-7RR al inhibir a miR-122, en rojo se muestran los genes que el programa adiciona en función de los reportes que existen sobre interacción a nivel de proteína basándose en *BrioGRID Data Base*.

Se identificaron a los genes; EGFR ya reportado en respuesta a la radiación (Lee *et al*, 2011); MOV10 relacionado con el silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores (El Messaoudi-Aubert *et al*, 2010); ELAVL1 reportado en la radioresistencia del cáncer de mama (Mehta *et al*, 2016); SIRT7 que contribuye con la resistencia a fármacos (Chen *et al*, 2017) y a la radioterapia (Tang *et al*, 2017) de diferentes tumores; APP que participa en la proliferación del cáncer de mama (Lim *et al*, 2014) y EWSR1 con actividad represora transcripcional relacionada a la carcinogénesis de varios tumores malignos (Susuki *et al*, 2012).

## New insights into radioresistance in breast cancer identify a dual function of miR-122 as a tumor suppressor and oncomiR

Isidro X. Perez-Añorve<sup>1,2</sup>, Claudia H. Gonzalez-De la Rosa<sup>2</sup>, Ernesto Soto-Reyes<sup>2</sup>, Fredy O. Beltran-Anaya<sup>3</sup>, Oscar Del Moral-Hernandez<sup>4</sup>, Marisol Salgado-Albarran<sup>2</sup>, Oscar Angeles-Zaragoza<sup>5</sup>, Juan A. Gonzalez-Barrios<sup>6</sup>, Daniel A. Landero-Huerta<sup>1,2,7</sup>, Margarita Chavez-Saldaña<sup>7</sup>, Alejandro Garcia-Carranca<sup>8</sup>, Nicolas Villegas-Sepulveda<sup>9</sup> and Elena Arechaga-Ocampo<sup>2</sup>

1 Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Division de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autonoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

2 Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autonoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Mexico City, Mexico

3 Laboratorio de Genomica del Cancer, Instituto Nacional de Medicina Genomica, Mexico City, Mexico

4 Laboratorio de Virologia y Epigenetica del Cancer, Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Universidad Autonoma de Guerrero, Chilpancingo, Mexico

5 Unidad de Radioterapia, Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico City, Mexico

6 Laboratorio de Medicina Genomica, Hospital Regional "1° de Octubre", Mexico City, Mexico

7 Laboratorio de Biologia de la Reproduccion, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

8 Unidad de Investigacion Biomedica en Cancer-Laboratorio de Virus y Cancer, Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico City, Mexico

9 Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Mexico City, Mexico

### Keywords

breast cancer; microRNAs; miR-122; radioresistance

### Correspondence

E. Arechaga-Ocampo, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autonoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa de Morelos, D.F. C.P. 05348, Mexico City, Mexico  
Tel: +52 5558146500  
E-mails: earechaga@correo.cua.uam.mx; e.arechaga@dcniuamc.com

(Received 31 October 2018, revised 10 February 2019, accepted 13 March 2019)

doi:10.1002/1878-0261.12483

Radioresistance of tumor cells gives rise to local recurrence and disease progression in many patients. MicroRNAs (miRNAs) are master regulators of gene expression that control oncogenic pathways to modulate the radiotherapy response of cells. In the present study, differential expression profiling assays identified 16 deregulated miRNAs in acquired radioresistant breast cancer cells, of which miR-122 was observed to be up-regulated. Functional analysis revealed that miR-122 has a role as a tumor suppressor in parental cells by decreasing survival and promoting radiosensitivity. However, in radioresistant cells, miR-122 functions as an oncomiR by promoting survival. The transcriptomic landscape resulting from knockdown of miR-122 in radioresistant cells showed modulation of the *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *HRAS*, *DUSP8* and *TNFRSF21* genes. Moreover, miR-122 and the set of affected genes were prognostic factors in breast cancer patients treated with radiotherapy. Our data indicate that up-regulation of miR-122 promotes cell survival in acquired radioresistant breast cancer and also suggest that miR-122 differentially controls the response to radiotherapy by a dual function as a tumor suppressor and oncomiR dependent on cell phenotype.

### Abbreviations

GO, Gene Ontology; miRNAs, microRNAs; oncomiRs, oncogenic miRNAs; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RFS, relapse-free survival; SF, surviving fraction; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TLDA, TaqMan low-density arrays; TNBC, triple-negative breast cancer.

## 1. Introduction

Radiotherapy, in addition to surgery and chemotherapy, remains the core of the current clinical management of breast cancer. Although radiotherapy is effective in most patients, some of them will develop recurrent disease because of radioresistant tumor cells (Jameel *et al.*, 2004). Radiotherapy is an extrinsic factor that affects the behavior of the breast cancer cells themselves. When cells avoid the effect cytotoxic of radiation, cell growth is induced and spreads, resulting in a progression or recurrence of tumors in patients (Moran and Haffty, 2002; Torres-Roca *et al.*, 2015). To overcome this problem, it is necessary to determine the mechanisms of resistance to radiotherapy. Several studies have demonstrated that tumor recurrence and progression as a consequence of radioresistance can be regulated by microRNAs (miRNAs) (Arechaga-Ocampo *et al.*, 2017; Methetrairut and Slack, 2013). miRNAs are master regulators of gene expression; moreover, they have a role in the regulation of carcinogenesis and the control of response to chemo- and radiotherapy in breast cancer (Zhang *et al.*, 2014). miRNAs are short, 18–25 nucleotides in length, non-coding RNA molecules that regulate gene expression by suppressing mRNA translation and reducing mRNA stability, usually via imperfect complementary base pairing to the 3'-UTR (Bartel, 2004). miRNAs in cancer are classically categorized as either tumor suppressive or oncogenic. Generally, oncogenic miRNAs (oncomiRs) are overexpressed in tumors, whereas tumor-suppressive miRNAs are repressed. When these tumor-suppressor miRNAs or oncomiRs are stimulated or inhibited, respectively, cancer cell growth, proliferation, metastasis and survival may be significantly reduced via the control of pro-oncogenic factors (Svoronos *et al.*, 2016). miR-122 is frequently down-regulated in breast cancer and has been related to tumor suppressor activity in breast cancer. Up-regulation of miR-122 suppressed cell growth and cell-cycle progression in breast cancer cell lines and suppressed tumorigenesis *in vivo* by targeting *IGF1R* and regulating the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway (Wang *et al.*, 2012). However, the crucial roles and underlying the mechanisms of miR-122 with respect to radioresistance of breast cancer remain unclear. In the present study, we report the generation of an isogenic model of acquired radioresistant human breast cancer cells, as well as functional approaches aiming to identify the molecular changes in miRNAs that may explain this phenotype. We demonstrate that miR-122 has a dual function in breast cancer because it has tumor

suppressor activity as a result of sensitizing parental cells to radiation, although it functions as an oncomiR in radioresistant breast cancer cells by promoting cell survival.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell lines

Human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were obtained from the ATCC (Manassas, VA, USA) (# HTB-22 and HTB-26). MCF-7, MCF-7RR, MDA-MB-231 and MDA-MB-231RR cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU·mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 2.2. Establishment of radioresistant breast cancer cells

MCF-7RR and MDA-MB-231RR cell lines were established from their parental MCF-7 and MDA-MB-231 cells. 1 × 10<sup>6</sup> parental cells were irradiated with a linear accelerator (Clinac 600; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) available at the National Institute of Cancer in Mexico City. Cells received 15 sequential fractions of 2 Gy·week<sup>-1</sup>, allowing irradiated cell populations a period of recovery between exposures. Non-irradiated controls were handled identically to the irradiate cells without radiation exposure. All of the experiments were performed within 4–10 passages after the final irradiation.

### 2.3. Clonogenic survival assay

About 3 × 10<sup>5</sup> cells were irradiated and, after 24 h of radiation, 1000 cells per well were seeded in six-well tissue culture plates. The cells were cultured for 10–12 days. Colonies were fixed with 7 : 1 methanol/acetic acid, stained with 0.05% crystal violet and counted. The surviving fraction (SF) was calculated according to Franken *et al.* (2006). The SF of cells was plotted on a log scale.

### 2.4. miRNAs expression profile analysis

Expression of 667 miRNAs was analyzed by a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the Megaplex TaqMan Low-Density Arrays (TLDA), version 2.0, system

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, 100 ng of total RNA was retro-transcribed using stem-loop primers and a pre-amplification step was added so that the minimum amounts of miRNAs were detected. qPCR assays were performed using GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems).

### 2.5. qRT-PCR

The expression of individual miRNAs was evaluated via qRT-PCR using the Stem-loop RT miRNA assay (Applied Biosystems). About 100 ng of total RNA was retro-transcribed using the looped RT primer (Applied Biosystems) in accordance with the manufacturer's protocol. Detection for miR-122, miR-10a, miR-222, miR-222\*, miR135b, miR-135b\*, miR-196b and miR-934 was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). qPCR was carried out in 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The expression of miRNA was determined using the comparative  $C_t$  ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method. RNU44 was used as a control for normalization of data.

### 2.6. Transfections

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were transfected with mimic-miR122 (Ambion, Austin, TX, USA) 10 nM, whereas MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells were transfected with antagomiR-122 (Ambion) 30 nM. Mimic-miR122 and antagomiR-122 were diluted in Opti-Mem (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), scramble sequence was used as a control and Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used as transfection agent. The expression of miR-122 was evaluated 48 h post-transfection by qRT-PCR. After transfection, cells were irradiated with 4 Gy of irradiation. The subsequent clonogenic assay was performed as described previously in the section 2.3.

### 2.7. Microarray processing and data analysis

Total RNA was obtained from MCF-7RR and MCF-7RR cells transfected with antagomiR-122. Equimolar concentrations of total RNA from three independent experiments were mixed and the transcriptional profiles were analyzed using the Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST array (Affmetrix, Santa Clara, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Arrays were scanned using a Genechip Scanner 3000 7G (Affmetrix). The data were analyzed with the Robust Multichip Analysis algorithm using the default analysis settings (Affmetrix) and global scaling as the normalization method. To define the

differential expression profile, TRANSCRIPTOME ANALYSIS CONSOLE software (Affmetrix) was used. Genes with fold change  $> 1.3$  or  $< -1.3$  and with  $P < 0.05$  by ANOVA were considered significantly altered between the conditions (MCF-7RR and MCF-7RR cells transfected with antagomiR-122). Microarray raw data tables have been deposited at the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE120171>).

### 2.8. Bioinformatic analysis

Verified miRNAs targets were obtained by miR-TarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) and predicted miRNAs targets from the miWalk database (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>). Only miRNA-target interactions identified by at least three algorithms were considered. DAVID, version 6.7 (<https://david-d.ncifcrf.gov>) and PANTHER PATHWAY (<http://www.pantherdb.org/pathway>) were used to identify components of signaling pathways and Gene Ontology (GO) for biological processes or molecular functions. The analysis of biological network enrichment of the modulated genes obtained by microarrays assays was performed by CYTOSCAPE (<https://cytoscape.org>) using the Key Pathway Miner App (Alcaraz *et al.*, 2014). In this analysis, a value of  $K = 6$  was used.

### 2.9. The Cancer Genome Atlas (TCGA) data analysis

The RNA sequencing data from samples of 491 breast cancer patients were downloaded from the TCGA database (<https://portal.gdc.cancer.gov>). First-line treatment and/or additional radiotherapy, tumor status and follow-up days were considered. Total population was stratified according to low or high expression of miR-122, *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8* and *HRAS*. Kaplan–Meier analysis was used for relapse-free survival (RFS) curves and log-rank tests were employed to analyze the differences between curves. The results were confirmed by Cox proportional-Hazard regression analyses.

### 2.10. Western blot assays

Following cell transfection, total protein was extracted, separated on SDS/PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were probed with specific primary antibodies [*ZNF611* (Abcam, Cambridge, MA, USA); *ZNF304*

(Abcam); RIPK1 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KT, USA); DUSP8 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); HRAS (Abcam); TNFR21 (Santa Cruz); and  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)], followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies anti-mouse (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) or anti-rabbit (Zymed). Immunodetection was by chemiluminescence (Super Signal<sup>®</sup> West Femto; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Densitometry analysis was performed using IMAGEJ, version 1.45 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

### 2.11. Statistical analysis

All results were derived from three independent experiments, which were plotted as the mean  $\pm$  SD. The comparison between the groups was performed using ANOVA for all analyzes.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using spss, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 3. Results

### 3.1. Establishment of radioresistant MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells

To determine a mean lethal dose of irradiation, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were evaluated by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] and clonogenic assays following increased radiation dose (2–8 Gy). The results showed that cell proliferation was significantly reduced at different time points (0, 24, 48 and 72 h) and at increased radiation doses (0, 2, 4, 8 Gy) compared to control cells. Proliferation diminished to  $53 \pm 0.07\%$  in MCF-7 (Fig. 1A) and  $58 \pm 0.05\%$  in MDA-MB-231 (Fig. 1B) cells at 4 Gy at 48 h. The results from clonogenic assays showed a significant reduction in survival (Fig. 1C) of MCF-7 ( $0.48 \pm 0.005$ ) and MDA-MB-231 ( $0.44 \pm 0.005$ ) cells at 4 Gy compared to non-irradiated cells. These results indicated that 4 Gy of radiation represents a mean lethal dose for MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells. Therefore, a radiation dose of 4 Gy was used for all subsequent experiments. To establish the isogenic model of radioresistance, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were exposed to 2 Gy-fractionated irradiations to a cumulative dose of 30 Gy (Fig. 1D). At the end of this process, radioresistance of the resulting cell population, designated as MCF-7RR and MDA-MB-231RR, was

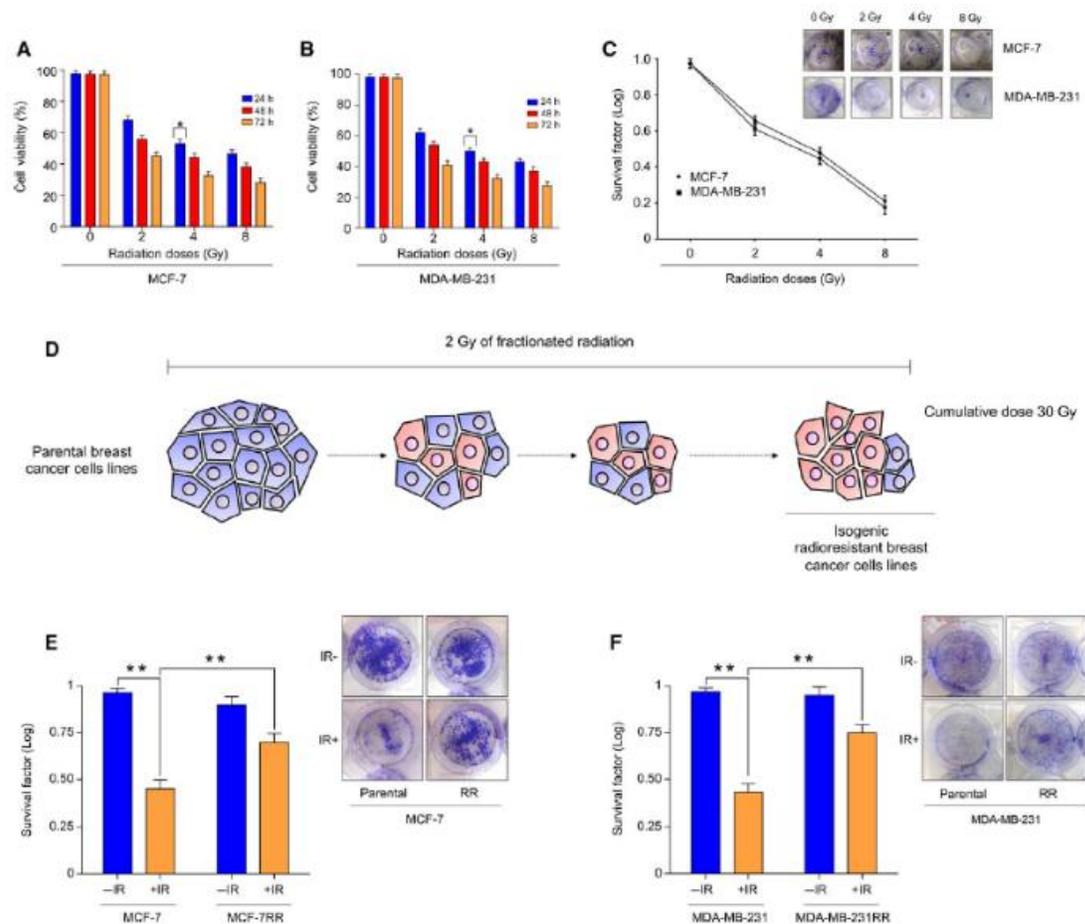
confirmed by clonogenic assays after single doses of 4 Gy of radiation. Acquired radioresistance of MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells was further indicated by an increase of survival after 4 Gy of radiation compared to parental cells. The SF of the MCF-7RR (Fig. 1E) and MDA-MB-231RR (Fig. 1F) cells was 0.70 and 0.75, respectively; whereas, for parental MCF-7 and MDA-MB-231 cells, the SF was 0.47 and 0.45, respectively. These data confirmed that the population resulting from the cells exposed to long-term therapeutic fractionated irradiation developed a radioresistant phenotype.

### 3.2. miR-122 is overexpressed in therapy-induced radioresistant breast cancer cells

To identify miRNAs associated with radioresistance in breast cancer, we analyzed the expression of 667 miRNAs by PCR array analysis in MCF-7RR cells. The expression of 16 miRNAs was modulated (Fig. 2A). miR-135b\*, miR-934, miR-223\*, miR-222\*, miR-122, miR-135b, miR-184, miR-411, miR-449b, miR-424\*, miR-10a, miR-218 and miR-222 miRNAs were significantly overexpressed (fold change  $\geq 1.5$ ), whereas miR-181a-2\*, miR-146a and miR-196b were down-regulated (fold change  $\leq -1.5$ ) (Table 1). Individual qRT-PCR assays using RNA samples from different clones of MCF-7RR cells further confirmed the array results (Fig. S1). Verified target genes of miRNAs were obtained from databases and previous studies (Table 2). GO and enrichment analysis indicated that the set of miRNAs could modulate biological pathways such as cell migration, signal transduction, apoptosis and survival (Fig. 2B). The expression of the most significantly modulated miRNAs identified in MCF-7RR cells was also evaluated in MDA-MB-231RR cells. Remarkably, overexpression of miR-122, miR-222 and miR-135b, as well as downregulation of miR-196b, was likewise observed in MDA-MB-231RR cells; conversely, miR-222\* and miR-934 were deeply suppressed in MDA-MB-231RR cells (Fig. 2C). These results suggested that variation of miR-122, miR-222, miR-135b and miR-196b expression might be a relevant phenomenon in the acquired radioresistance of breast cancer cells.

### 3.3. miR-122 increases radiosensitivity in parental breast cancer cells and in breast cancer patients treated with radiotherapy

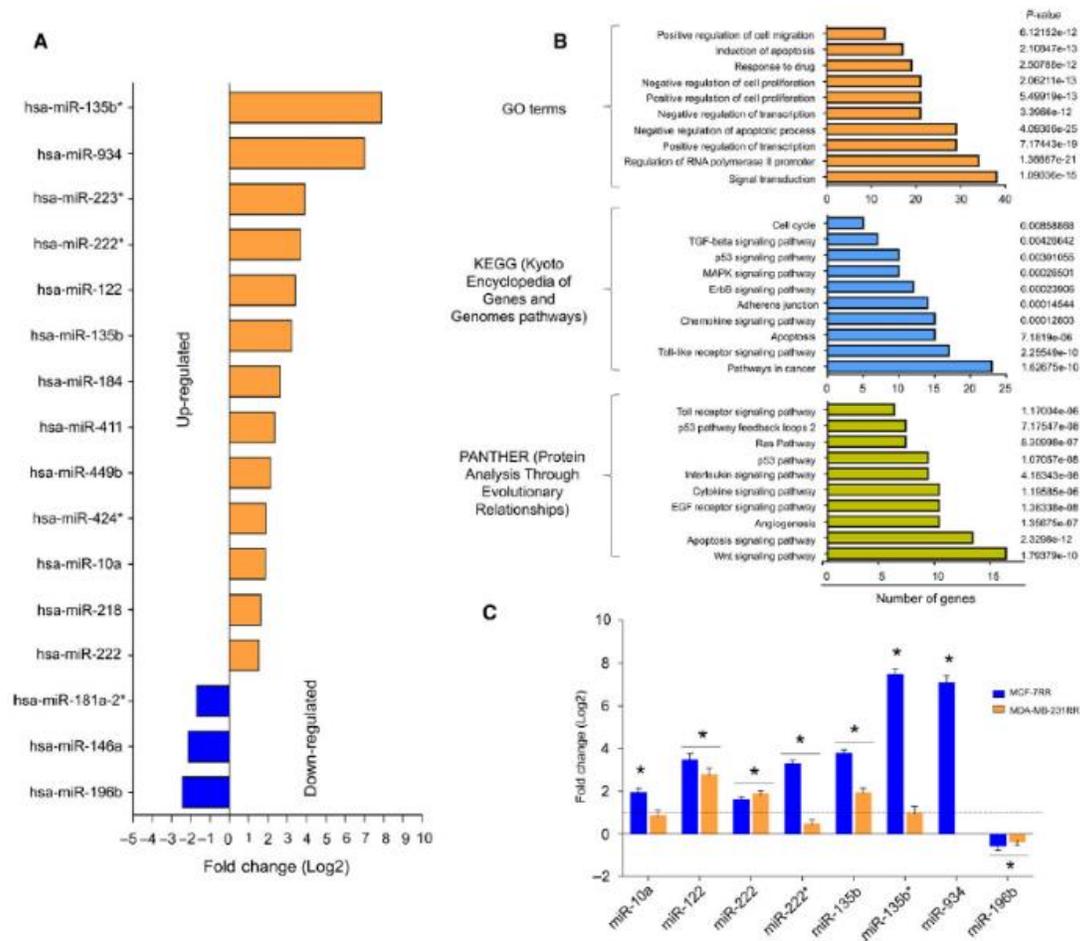
miR-122 has been described as a tumor suppressor and its downregulation is a common event in breast cancer (Wang *et al.*, 2012). Conversely, in the present study, overexpression of miR-122 was observed in



**Fig. 1.** Establishment of an isogenic model of acquired radioresistant breast cancer cells. Proliferation of parental (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells was assessed by the MTT assay for 24, 48 and 72 h after irradiation with increasing doses (0, 2, 4 and 8 Gy) of irradiation. (C) Clonogenic survival of parental MCF-7 and MDA-MB-231 cells was assessed by colony formation in response to treatment with increasing doses (0, 2, 4 and 8 Gy) of irradiation. (D) Schematic overview of fractionated treatment schedule for establishment of radioresistant breast cancer cells. Parental cells were exposed to 2 Gy of irradiation to reach a total dose of 30 Gy. Radioresistance of MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells was confirmed by clonogenic assays after 4 Gy of irradiation. The SF of irradiated (IR+) MCF-7RR (E) and MDA-MB-231RR (F) cells was normalized by the SF of non-irradiated (IR-) cells. Representative images of the results of the clonogenic assays for MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells are shown in (E) and (F). Error bar indicates the SD from three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  by Student's *t*-test.

both radioresistant breast cancer cells. To investigate whether miR-122 might increase the radioresistance of breast cancer cells, we performed assays of gain-of-function in parental MCF-7 and MDA-MB-231 cells. We were able to overexpress miR-122 in parental MCF-7 (Fig. 3A) and MDA-MB-231 cells (Fig. 3B) using a mimic-miR122. Next, we evaluated the survival potential of these cells in response to radiotherapy by clonogenic assays. The results showed that, in non-irradiated cells, the overexpression of miR-122 alone but not scrambled transfected or control untransfected

significantly decreased the survival MCF-7 (SF = 0.63) (Fig. 3C) and MDA-MB-231 (SF = 0.4) (Fig. 3D) cells. Remarkably, cells transfected with mimic-miR122 treated with radiotherapy significantly diminished their survival potential (MCF-7: SF = 0.12; MDA-MB-231: SF = 0.07) (Fig. 3C,D). These results revealed that miR-122 is capable of sensitizing the breast cancer cells to radiotherapy. To investigate the clinical relevance of the miR-122 expression levels, we performed Kaplan–Meier analysis for RFS of breast cancer patients treated with radiotherapy. Data for



**Fig. 2.** Radioreistant breast cancer cells show the differential expression profile of miRNAs. (A) mRNA expression profile in MCF-7RR cells. (B) GO, signaling pathways and biological processes controlled by deregulated miRNAs in MCF-7RR cells. (C) Validation of the expression of a set of miRNAs in MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells was performed by qRT-PCR. All values were normalized using RNU44 as an internal control. The expression data were normalized using the parental MCF-7 and MDA-MB-231 cells. A dotted line indicates the threshold of the normalized data. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.01$  by ANOVA.

102 patients who received radiotherapy as a first-line treatment obtained from the TCGA database were randomly categorized into two groups according to positive or null expression of miR-122. The results revealed that patients with a positive expression of miR-122 and who had received radiotherapy had a significantly better RFS than those with negative expression of miR-122 (Fig. 3E), suggesting that patients with null expression of miR-122 were significantly associated with poor prognoses after radiotherapy. These results were in agreement with our findings obtained *in vitro*, in which miR-122 sensitized breast

cancer cells to irradiation. Furthermore, the results obtained *in vivo* suggested that the expression of miR-122 might be predictor biomarker for RFS in breast cancer patients treated with radiotherapy.

### 3.4. miR-122 knockdown overcomes acquired radioresistance in breast cancer cells

We have demonstrated that miR-122 is up-regulated in both radioreistant breast tumor cells. To obtain additional insight into the biological function of miR-122 in acquired radioresistance, we performed

**Table 1.** miRNAs with modulated expression in breast cancer cells MCF-7RR.

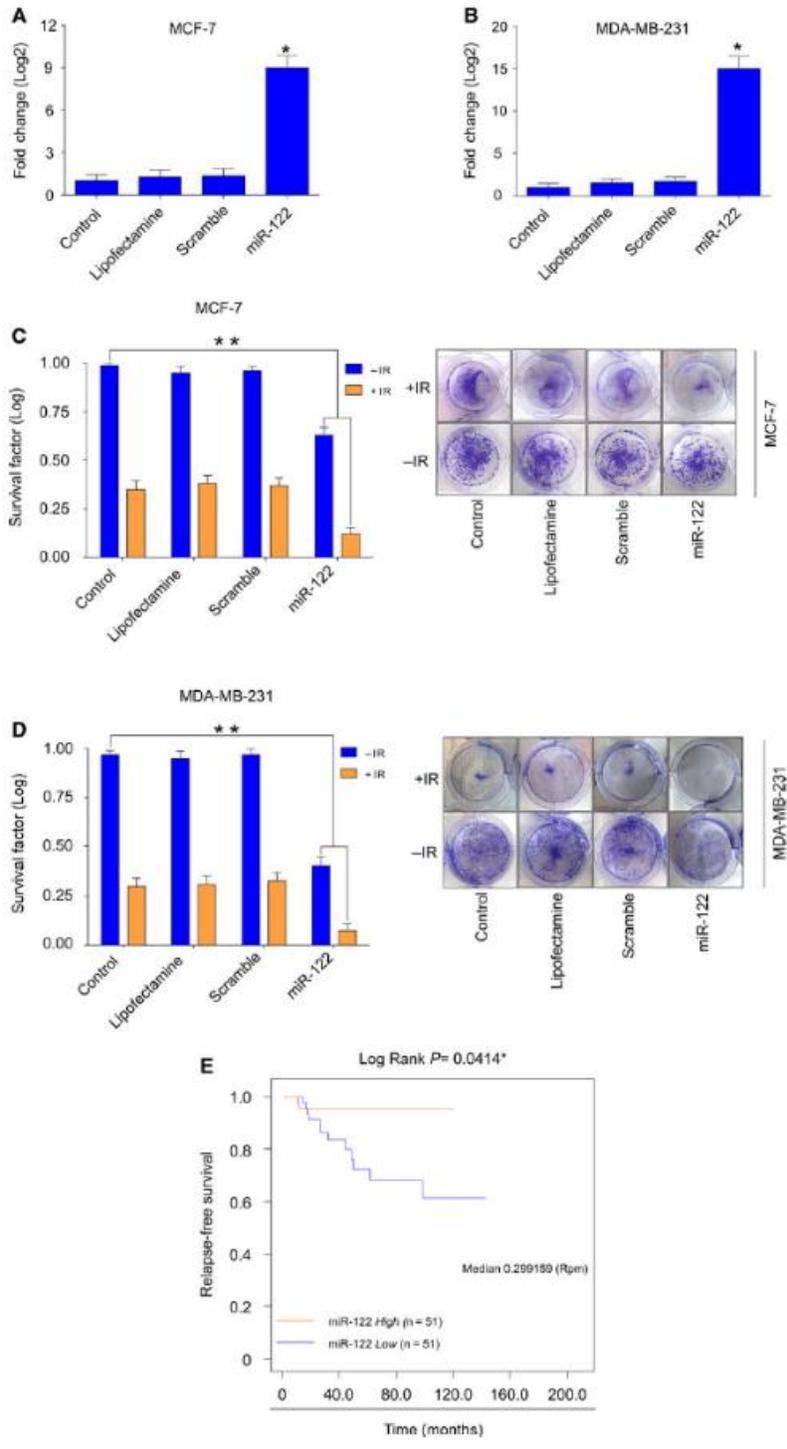
miRNA	Fold change (log 2)	R (P value)*	Chromosome
Down-regulated			
hsa-miR-196b	-2.43	0.0113	7p15.2
hsa-miR-146a	-2.13	0.05	5q34
hsa-miR-181a-2*	-1.7	0.0091	9q33.3
Up-regulated			
hsa-miR-222	1.53	0.0083	Xp11.3
hsa-miR-218	1.63	0.0097	4p15.31
hsa-miR-10a	1.88	0.032	17q21.32
hsa-miR-424*	1.9	0.0375	Xq26.3
hsa-miR-449b	2.14	0.017	5q11.2
hsa-miR-411	2.34	0.0452	14q32.31
hsa-miR-184	2.64	0.017	15q25.1
hsa-miR-135b	3.23	0.0068	1q32.1
hsa-miR-122	3.41	0.0282	18q21.31
hsa-miR-222*	3.7	0.0169	Xp11.3
hsa-miR-223*	3.9	0.0014	Xq12
hsa-miR-934	7	0.0529	Xq26.3
hsa-miR-135b*	7.9	0.015	1q32.1

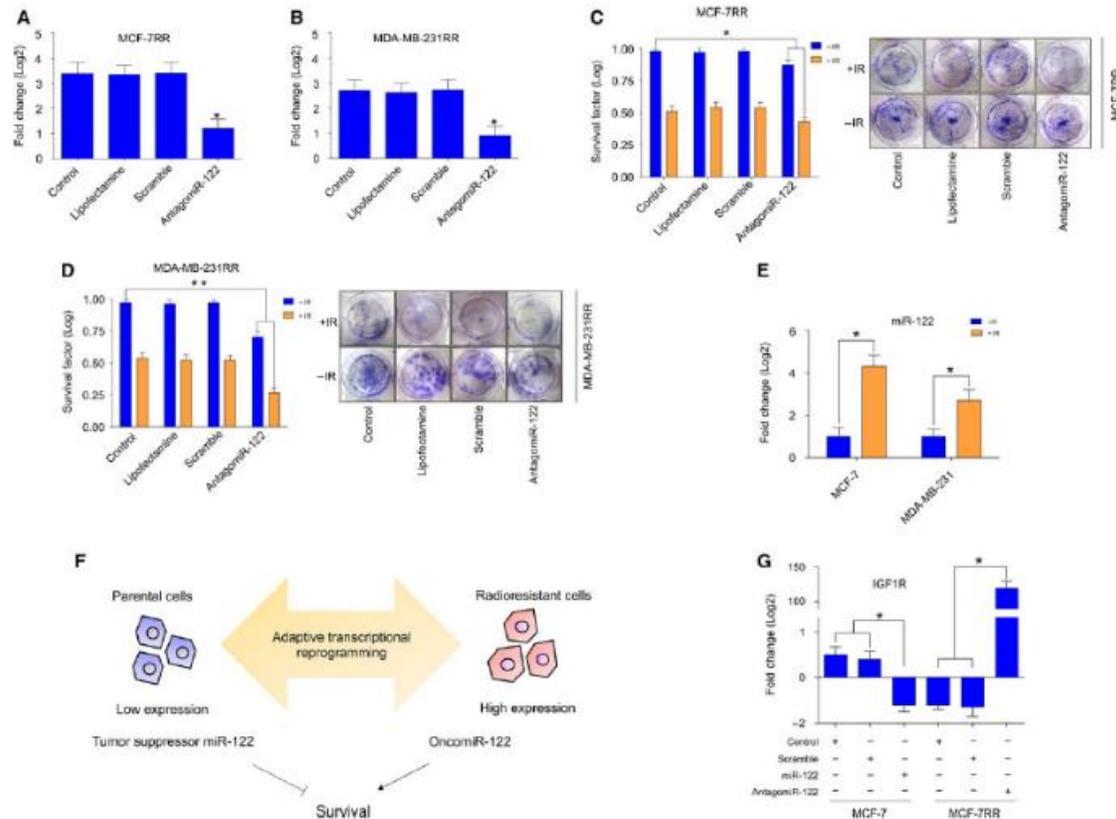
\*P &lt; 0.01 by ANOVA.

loss-of-function assays in MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells. We efficiently inhibited the expression of miR-122 in MCF-7RR (Fig. 4A) and MDA-MB-231RR (Fig. 4B) cells using antagomiR-122. The transfected cells were evaluated for radioresistance using clonogenic assays. As expected, the radioresistant cell lines with a deficiency in miR-122 had a significantly reduced survival efficiency. The results showed that knockdown of miR-122 alone (non-irradiated cells) but not in transfected cells with scrambled control had a significantly negative effect on survival rates in both MCF-7RR (SF = 0.87) (Fig. 4C) and MDA-MB-231RR (SF = 0.70) (Fig. 4D). This negative effect on survival was higher when cells were irradiated (MCF-7RR: SF = 0.43) (Fig. 4C) (MDA-MB-231RR: SF = 0.26) (Fig. 4D). Hence, the knockdown of miR-122 in radiotherapy-induced resistant cells is able to revert the radioresistance of the cells via delayed cell survival. Furthermore, these results suggest that miR-122 promotes survival pathways with respect to maintaining a radioresistant phenotype in breast cancer cells. Accordingly, we evaluated the expression of miR-122 in parental cells treated with radiotherapy. The results showed that radiation promotes overexpression of miR-122 in parental breast cancer cells (Fig. 4E). We hypothesized that overexpression of miR-122 was maintained during the adaptive biological reprogramming in response to continuous application of radiation (i.e. during the transition from a cancer cell to a radioresistant cancer cell) (Fig. 4F). Moreover, it is likely that miR-122 could gain an oncogenic role in radioresistant cells,

**Table 2.** Verified targets genes of miRNAs modulated in MCF-7RR cells.

	Genes
Down-regulated	
hsa-miR-196b	HOXB8, HOXC8, CD8A, HOXA9, HOXA9, MEIS1, FAS, ETS2, RDX, HOXB7
hsa-miR-146a	CXCR4, TLR2, FADD, TRAF6, IRAK1, ROCK1, BRCA2, BRCA1, NFKB1, CDKN1A, EGFR, CD40LG, FAS, ERBB4, SMAD4, TLR4, WASF2, STAT1, UHRF1, L1CAM, SMN1, CARD10, COPS8, ELAVL1, NUMB, PTGS2, CCL5, PTGES2, CNOT6L, SIKE1, CXCL12, PRKCE, RAC1, LAMC2, COX2, RNF11
hsa-miR-181a-2*	Not reported
Up-regulated	
hsa-miR-222	STAT5A, CDKN1B, SOD2, MMP1, FOXO3, CDKN1C, KIT, PPP2R2A, TIMP3, FOS, ICAM1, ESR1, BBC3, PTEN, SELE, DIRAS3, ETS1, DICER1, RECK, TRPS1, CERS2, GJA1, SSX2IP, DKK2, VGLL4
hsa-miR-218	LAMB3, LAMP1, IKBKB, SP1, VOPP1, BIRC6, ACTN1, STAM2, CDKN1B, BIRC5, GJA1, ROBO1, RICTOR, SOST, SFRP2, HOXB3, DKK2, TOB1, CDK6, BMI1, LEF1, MTF, PDGFRA, GLI2, OTUD7B, RUNX2, CDH2, EGFR, RET, SH3GL1
hsa-miR-10a	HOXA1, USF2, MAP3K7, BTRC, SRSF1, TRA2B, CHL1, PTEN, PIK3CG
hsa-miR-424*	Not reported
hsa-miR-449b	SIRT1, CCNE2, MET, GMNN, HDAC1
hsa-miR-411	Not reported
hsa-miR-135b	APC, KLF4, MAFB, CASR, PPP2R5C, SMAD5, LZTS1, MID1, MTCH2, ACVR1B, BMPR2, TGFBR1
hsa-miR-184	AKT2, INPPL1, NFATC2, SOX7, EIF2C2, MYC, BCL2, EZR
hsa-miR-122	CYP7A1, IGF1R, SRF, RAC1, RHOA, ANK2, NFATC2IP, ENTPD4, ANXA11, ALDOA, RAB6B, RAB11FIP1, FOXP1, MECP2, NCAM1, UBAP2, TBX19, AACs, DUSP2, ATP1A2, MAPK11, FUNDC2, AKT3, TPD52L2, GALNT10, G6PC3, AP3M2, SLC7A1, XPO6, FOXJ3, SLC7A11, TRIB1, EGLN3, NUMBL, ADAM17, DSTYK, FAM117B, BCL2L2, PRKAB1, ADAM10, ACVR1C, PRKRA, WNT1, PTPN1, NT5C3A, P4HA1, PKM, CLIC4, MEF2D, AXL, NOD2, FUT8
hsa-miR-222*	STAT5A, CDKN1B, SOD2, MMP1, FOXO3, CDKN1C, KIT, PPP2R2A, TIMP3, TNFSF10, FOS, ICAM1, ESR1, BBC3, PTEN, SELE, DIRAS3, ETS1, DICER1, RECK, TRPS1, CERS2, GJA1, SSX2IP, DKK2, ADAM1A, MGMT, VGLL4
hsa-miR-223*	Not reported
hsa-miR-934	Not reported
hsa-miR-135b*	APC, KLF4, MAFB, CASR, PPP2R5C, SMAD5, LZTS1, MID1, MTCH2, ACVR1B, BMPR2, TGFBR1





**Fig. 4.** miR-122 is overexpressed in radioresistant breast cancer cells and its inhibition reverts the radioresistant phenotype. Knockdown of miR-122 in radioresistant (A) MCF-7RR and (B) MDA-MB-231RR cells transfected with antagomiR-122 was verified by qRT-PCR assays. All values were normalized using RNU44 as an internal control. AntagomiR-122-transfected cells were evaluated for a radioresponse by clonogenic survival. Data for SF of transfected (C) MCF-7RR and (D) MDA-MB-231RR cells irradiated (+IR) with 4 Gy of X-ray are shown. Data were normalized using non-irradiated cells (–IR). Representative images of the results of the clonogenic assays for MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells are shown in (C) and (D). (E) Overexpression of miR-122 in parental MCF-7 and MDA-MB-231 induced by treatment with 4 Gy of X-ray was evaluated by qRT-PCR assays. The expression data were normalized using parental MCF-7 and MDA-MB-231 cells. All values were normalized using RNU44 as an internal control. (F) Schematic representation of the role of miR-122 as a tumor suppressor miRNA in parental breast cancer cells and its oncogenic role during the transition from a cancer cell to a radioresistant cancer cell. (G) Expression of *IGF1R* in MCF-7 and MCF-7RR cells transfected with mimic-miR122 and antagomiR-122, respectively, was evaluated by qRT-PCR. All values were normalized using GAPDH as an internal control. Data are presented graphically as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  by ANOVA.

therefore having a dual function in breast cancer cells, acting either as a tumor suppressor or an oncogene depending on the cellular context (Fig. 4F). The adaptive

transcriptional reprogramming includes the possibility that target genes of the miRNAs could be also changed, producing oncogenic or tumor-suppressive effect. In this

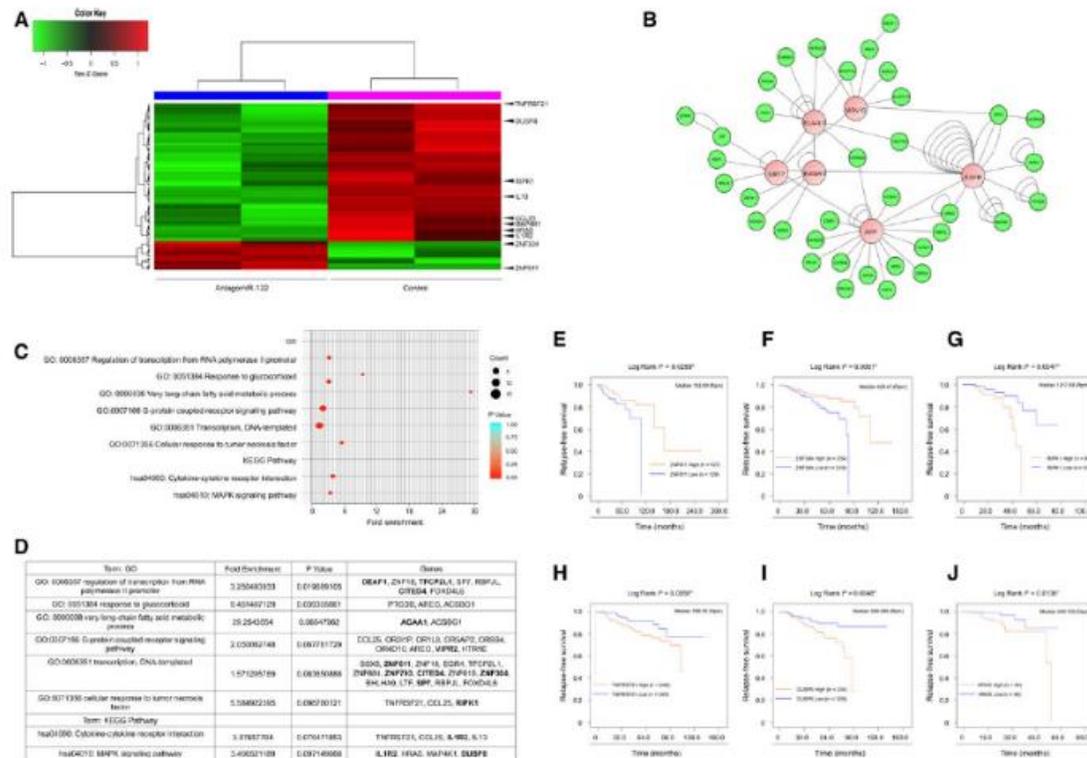
**Fig. 3.** MiR-122 promotes radiosensitivity in parental breast cancer cells. Increased expression of miR-122 in parental (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells transfected with mimic-miR122 was verified by qRT-PCR assays. All values were normalized using RNU44 as an internal control. Mimic-miR122-transfected cells were evaluated for a radioresponse by clonogenic survival. Data for SF of transfected (C) MCF-7 and (D) MDA-MB-231 cells irradiated (+IR) with 4 Gy of X-ray are shown. Data were normalized using non-irradiated cells (–IR). Representative images of the clonogenic assays results of MCF-7 and MDA-MB-231 cells are shown in (C) and (D). Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  by ANOVA. (E) Kaplan–Meier analysis of the breast cancer patients with tumors positive or negative for miR-122 expression who received radiotherapy treatment. Curves were compared using a log-rank test \* $P < 0.01$ . Rpm, reads per million.

way, miR-122 should regulate different target genes to act as a positive regulator of the survival pathways, thus favoring an oncogenic function in radioresistant cells. To explore this hypothesis, we evaluated the expression of *IGF1R*, which has previously been reported as a target gene of miR-122 in breast cancer (Wang *et al.*, 2012). Remarkably, the results obtained via qRT-PCR showed that *IGF1R* is down-regulated in parental MCF-7 cells with gain-of-function of miR-122 and up-regulated in MCF-7RR cells with loss-of-function of miR-122 (Fig. 4G), which is consistent with targeted activity of miR-122. These results suggest that radiosensitivity

observed in MCF-7RR cells with loss-of-function of miR-122 could be independent of the *IGF1R* function. Taken together, these results indicate that miR-122 has an oncogenic role in the acquired radioresistance of breast cancer cells.

### 3.5. Transcriptomic landscape of the radioresistant breast cancer cells with loss-of-function of miR-122

To obtain a comprehensive molecular understanding of the oncogenic role of miR-122 in acquired



**Fig. 5.** Transcriptome analysis of MCF-7RR cells with knockdown of miR-122 and analysis of prognostic factor genes in breast cancer patients. (A) Heat map showing the differential expression pattern of 158 genes in MCF-7RR cells transfected with antagomiR-122. The heat map indicates 131 up-regulated (red) and 27 down-regulated (green) genes. The columns represent a duplicate of individual samples of MCF-7RR cells with knockdown of miR-122, as well as MCF-7RR untransfected cells. The rows represent individual genes. Arrows indicate genes with prognostic value in breast cancer patients treated with radiotherapy. (B) Interactome generated from protein-protein interaction data by Key Pathway *cytoscape* (Alcaraz *et al.*, 2014). The 36 genes shown in green are the modulated genes by knockdown of miR-122. The six genes shown in pink are linker genes that connect the 36 genes from transcriptome. The numbers of connections in the network are shown as nodes. (C) Bubble chart shows the enriched GO terms of the genes modulated by the knockdown of miR-122. Biological processes are shown on the y-axis. The color and size of the bubble represent the number of genes involved in each GO/network process and significance, respectively. (D) Chart of GO and biological processes of genes modulated by the knockdown of miR-122. Gene symbol are shown. Bold-labeling indicates genes containing miR-122 binding sites in their 3'-UTR. Kaplan-Meier curves of RFS. Survival curves of high vs low expression of (E) *ZNF611*, (F) *ZNF304*, (G) *RIPK1*, (H) *TNFRSF21*, (I) *DUSP8* and (J) *HRAS* of patients with breast cancer treated with radiotherapy. High or low gene expression levels according to > median or ≤ median expression levels each gene. Curves were compared using a log-rank test \**P* ≤ 0.05; \*\**P* ≤ 0.01. Rpm, reads per million.

radioresistance, we utilized a gene expression profiling approach with microarrays aiming to systematically identify genes associated with loss-of-function of miR-122 in radioresistant cells. In total, 158 differentially expressed genes were identified in hierarchical clustering analysis (Fig. 5A). Twenty-seven genes were up-regulated (fold change  $\geq 1.3$ ) and 131 genes were down-regulated (fold change  $\leq -1.3$ ); (Table S1). Using the Key Pathway Miner App of CYTOSCAPE to determine interconnected pathways by protein–protein interaction *in silico*, we revealed products of genes that were not observed in the microarrays assays (outliers), such as *EGFR*, *APP*, *MOV10*, *EWSR1*, *SIRT7* and *ELAVL1* (Fig. 5B). Our analysis by functional protein association networks, GO and biological pathways (Fig. 5C) showed that the gene signature in knockdown miR-122-MCF-7RR could be associated with regulation of transcription (*SSX8*, *ZNF611*, *ZNF18*, *EGR4*, *TFCP2L1*, *ZNF684*, *ZNF793*, *CITED4*, *ZNF616*, *ZNF304*, *BHLHA9*, *LTF*, *SP7*, *RBPJL*, *FOXD4L6*), the G-protein coupled receptor signaling pathway (*CCL25*, *OR211P*, *OR1L8*, *OR5AP2*, *OR8B4*, *OR4D10*, *AREG*, *VIPR2*, *HTR1E*), the TNF pathway (*TNFRSF21*, *CCL25*, *RIPK1*), the Ras-MAPK pathway (*IL1R2*, *HRAS*, *MAP4K1*, *DUSP8*) and the inflammatory response (*TNFRSF21*, *CCL25*, *IL1R2*, *IL13*) (Fig. 5D). To identify potential genes that could be directly regulated by miR-122, we performed *in silico* analysis of 3'-UTR binding sites for miR-122 in modulated genes. We found nine up-regulated and 29 down-regulated genes containing canonical 3'-UTR binding sites for miR-122 (Table 3), highlighting the up-regulation of *IGLON5*, *NUP62CL*, *ACAA1*, *KLHL5*, *FBXO48*, *ZNF304*, *VIPR2*, *CCDC127* and *ZNF611*, as well as the down-regulation of *DUSP8*, *DDR2*, *IL1R2*, *DEAF1* and *RIPK1*. Therefore, microarrays analysis revealed that radioresistant cells with loss-of-function of miR-122 are highly enriched for genes encoding signaling pathways and transcriptional processes, suggesting that a major influence of miR-122 function on acquired radioresistance is related to maintaining survival networks.

### 3.6. Genes associated with loss-of-function of miR-122 are involved in the outcome of breast cancer patients treated with radiotherapy

To determine the prognostic value of genes associated with loss-of-function of miR-122, we evaluated RFS in 491 breast cancer patients treated with radiotherapy, as obtained from the TCGA database. Patients were categorized according to the median expression of each gene; therefore, we obtained different groups of patients

according to the low and high expression of an individual gene. Characteristic populations are shown in Tables S2–S7. In the analysis for RFS, differential expression of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *DUSP8*, *TNFRSF21* and *HRAS* genes was associated with outcome for breast cancer patients who received radiotherapy. Kaplan–Meier curves showed that increased expression of *ZNF611* ( $P = 0.0269$ ; Fig. 5E) and *ZNF304* ( $P = 0.0081$ ; Fig. 5F), as well as lower expression of *RIPK1* ( $P = 0.0047$ ; Fig. 5G), *TNFRSF21* ( $P = 0.0058$ ; Fig. 5H) and *DUSP8* ( $P = 0.048$ ; Fig. 5I) and *HRAS* ( $P = 0.0138$ ; Fig. 5J), was associated with longer RFS. These results were in accordance with the experimental evidence obtained in MCF-7RR cells in which an increase of *ZNF611* and *ZNF304* expression, in addition to a decrease of *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8* and *HRAS* expression, induced by knockdown of miR-122 was correlated with radiosensitivity *in vitro*.

### 3.7. miR-122 differentially controls levels of ZNF611, ZNF304, RIPK1, DUSP8, HRAS and TNFRSF21 protein in radioresistant breast cancer cells

Our findings obtained by Kaplan–Meier analysis revealed that *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *DUSP8*, *TNFRSF21* and *HRAS* genes have a prognostic value in patients treated with radiotherapy. Among these genes, *ZNF611* (positions 2916–2922), *ZNF304* (positions 2676–2682), *RIPK1* (positions 1680–1684) and *DUSP8* (positions 1631–1634) contain canonical miR-122 3' UTR-binding sites (Fig. 6A). For experimental validation of the transcriptome results, and also to test whether modulation of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *DUSP8*, *HRAS* and *TNFRSF21* following knockdown of miR-122 might be a common event in radioresistant breast cancer cells, we performed western blot assays in transfected MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells with antagomiR-122. As expected, we verified the results obtained by microarrays assays in MCF-7RR cells. Levels of proteins *ZNF304* and *ZNF611* were up-regulated, whereas *RIPK1* and *DUSP8* were repressed, when we inhibited miR-122 (Fig. 6B). Levels of *HRAS* and *TNFRSF21* levels were observed with non-significant changes. The results showed a direct correlation among the expression of miR-122 and *ZNF304*, *ZNF611*, *RIPK1* and *DUSP8* levels. As a control, we compared the abundance of these proteins in parental MCF-7 cells transfected with mimic-miR122 (Fig. 6C). The results showed that the expression of *ZNF304*, *RIPK1*, *DUSP8* and *TNFRSF21* was not changed when we forced overexpression of miR-122, whereas the expression of *HRAS* was higher

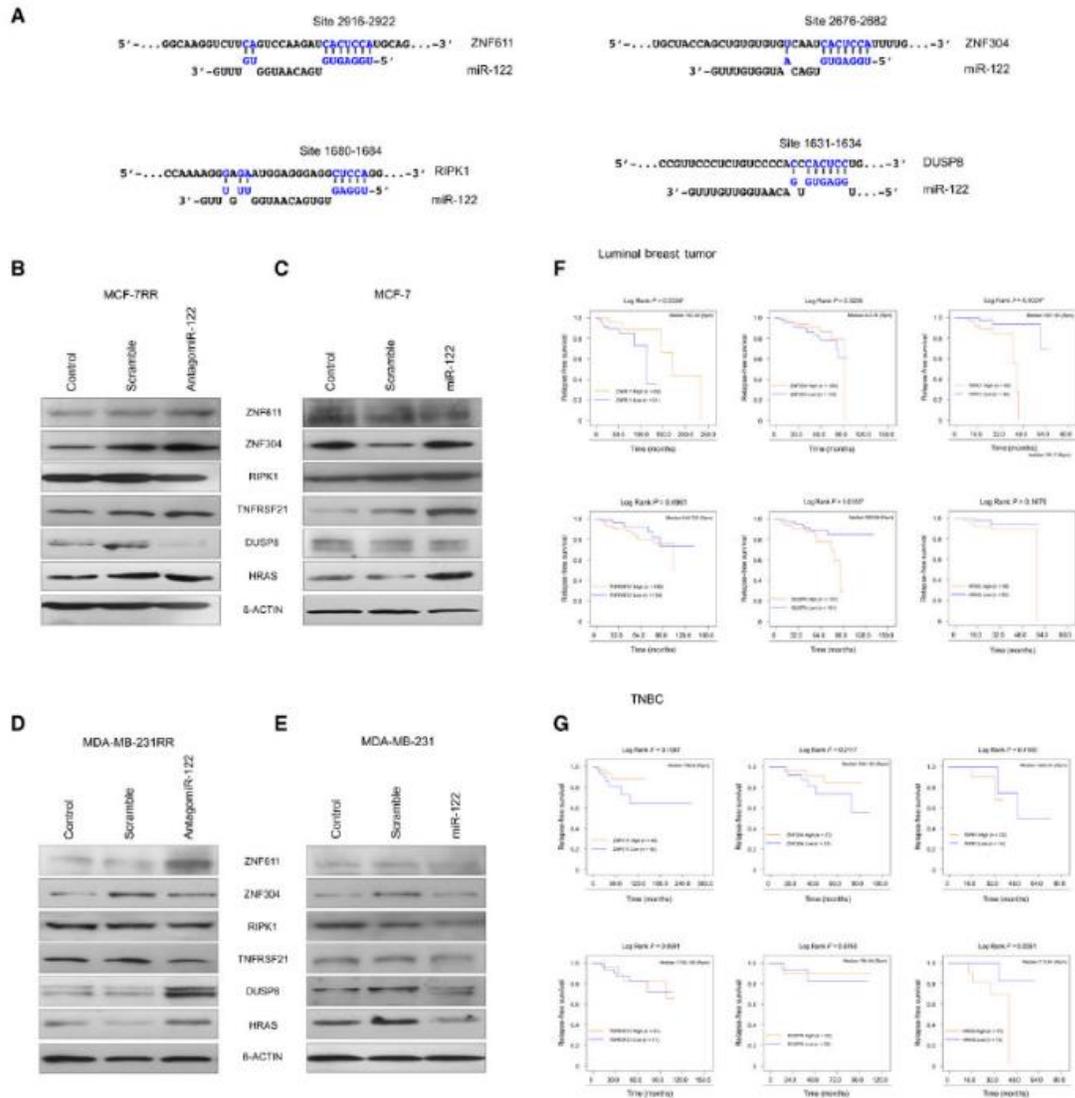
**Table 3.** Genes differentially regulated in knockdown miR-122-MCF-7RR cells with a 3'-UTR-canonical binding site to miR-122.

Gene	Function
Up-regulated	
<i>IGLON5</i>	Neuronal cell-adhesion protein
<i>NUP62CL</i>	Nucleocytoplasmic transporter activity
<i>ACAA1</i>	Acetyl-CoA C-acyltransferase activity
<i>KLHL5</i>	Ubiquitin-protein transferase activity
<i>FBXO48</i>	Decreased interleukin-8 secretion
<i>ZNF304</i>	Activation of KRAS and silencing of several tumor suppressor genes
<i>VIPR2</i>	Pituitary adenylate cyclase activation
<i>CCDC127</i>	Cell surface transport
<i>ZNF611</i>	Transcriptional regulation
Down-regulated	
<i>LCE2C</i>	Precursors of the cornified envelope of the stratum
<i>PRH2</i>	Protective and reparative environment for dental enamel
<i>RAB40AL</i>	Mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins
<i>MICAL2</i>	Actin binding and flavin adenine dinucleotide binding
<i>SEMA5A</i>	Semaphorin gene family that encodes membrane proteins containing a semaphorin domain and several thrombospondin type-1 repeats. May promote angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation and migration and inhibiting apoptosis
<i>SLC25A18</i>	Involved in the transport of glutamate across the inner mitochondrial membrane
<i>PODNL1</i>	Small leucine-rich repeat protein family
<i>DUSP8</i>	Phosphatase activity with synthetic phosphatase substrates and negatively regulates mitogen-activated protein kinase activity
<i>DDR2</i>	Tyrosine kinase that functions as cell surface receptor for fibrillar collagen and regulates cell differentiation, remodeling of the extracellular matrix, cell migration and cell proliferation
<i>C2CD4A</i>	Involved in inflammatory process. May regulate cell architecture and adhesion
<i>KIAA0825</i>	Cell surface transport
<i>ZNF793</i>	Transcriptional regulation
<i>DLX4</i>	Play a role in determining the production of hemoglobin S. May act as a repressor
<i>LIN28A</i>	Protein that acts as a posttranscriptional regulator of genes involved in developmental timing and self-renewal in embryonic stem cells. Disrupting the maturation of certain miRNAs
<i>SP7</i>	Transcriptional activator essential for osteoblast differentiation
<i>TFCP2L1</i>	Transcriptional suppressor, cellular self-renewal
<i>CITED4</i>	Acts as transcriptional coactivator for TFAP2/AP-2. Enhances estrogen-dependent transactivation mediated by estrogen receptors
<i>TRPM1</i>	Cation channel essential for the depolarizing photoresponse of retinal ON bipolar cells. It is

**Table 3.** (Continued).

Gene	Function
	part of the GRM6 signaling cascade. Metastasis in melanoma
<i>IL1R2</i>	Cytokine receptor that belongs to the interleukin-1 receptor family
<i>VEPH1</i>	Downregulation of Wnt pathway after Wnt3A stimulation
<i>ARHGAP23</i>	GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting them to an inactive GDP-bound state
<i>C4B</i>	Complement component 4B, including the ZB transcript in the same orientation, complexing with C2 to form the C3/C5 convertase, classical pathway
<i>CNIH3</i>	Regulates the trafficking and gating properties of AMPA-selective glutamate receptors
<i>DEAF1</i>	Cell proliferation, arresting cells in the G0 or G1 phase. Required for neural tube closure and skeletal patterning. Regulates epithelial cell proliferation and side-branching in the mammary gland
<i>EPPIN</i>	Serine protease inhibitor that plays an essential role in male reproduction and fertility
<i>HEATR3</i>	Role in ribosomal protein transport and in the assembly of the 5S ribonucleoprotein particle (5S RNP). The encoded protein also may be involved in NOD2-mediated NF-kappa B signaling
<i>NUB1</i>	Protein that functions as a negative regulator of NEDD8, a ubiquitin-like protein that conjugates with cullin family members in order to regulate vital biological events
<i>RIPK1</i>	Serine-threonine kinase, which transduces inflammatory and cell-death signals (programmed necrosis) following death receptors ligation, activation of pathogen recognition receptors and DNA damage. Activates the MAP3K5-JNK apoptotic cascade
<i>KRT77</i>	Responsible for the structural integrity of epithelial cells

compared to non-transfected and scrambled transfected cells (Fig. 6C). Notably, *ZNF611* was down-regulated when miR-122 was overexpressed (Fig. 6C). These findings suggested that miR-122 could target *ZNF611* but was unable to modulate *ZNF304*, *RIPK1*, *DUSP8* and *TNFRS21* protein levels in parental MCF-7 cells. Although not all of the western blot results were similar in MDA-MB-231RR compared to MCF-7RR, we observed that, in MDA-MB-231RR cells, knockdown of miR-122 was correlated with up-regulation of *ZNF611*, *DUSP8* and *HRAS* (Fig. 6D). Moreover, in parental MDA-MB-231 cells, forced overexpression of miR-122 was also correlated with inhibition of *ZNF611*, *DUSP8* and *HRAS* levels



**Fig. 6.** Levels of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8* and *HRAS* are differentially regulated by miR-122 in parental and radioresistant breast cancer cells. (A) Schematic illustration of the potential miR-122 binding site in the 3'-UTR of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1* and *DUSP8* genes. Letters labeled in blue indicate the seed region. Levels of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8* and *HRAS* proteins were evaluated by western blot assays in (B) MCF-7RR transfected with antagomiR-122. (C) Parental MCF-7 transfected with mimic-miR122. (D) MDA-MB-231RR transfected with antagomiR-122. (E) Parental MDA-MB-231 transfected with mimic-miR122.  $\beta$ -actin was used as an internal control. Images are representative of three independent experiments. Kaplan–Meier curves of RFS. Survival curves of high vs low expression of *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8* and *HRAS* of patients with (F) luminal breast cancer and (G) TNBC treated with radiotherapy. High or low gene expression levels according to  $>$  median or  $\leq$  median expression levels each gene. Curves were compared using a log-rank test \* $P \leq 0.05$ .

(Fig. 6E). These results suggested that *ZNF611* and *DUSP8* might be targeted by miR-122 in the MDA-MB-231RR model. It should be noted that miR-122

could modulate dissimilar pathways in radioresistant breast cancer cells compared to parental breast cancer cells, which might partially explain the dual function

as a tumor suppressor or oncomiR depending on the cellular context. On the other hand, the variability of the results among the radioresistant cells could be a result of a difference in cellular context with respect to the origin of the cell lines because MDA-MB-231 is a model of the triple-negative breast cancer (TNBC) subtype, whereas MCF-7 is a model of a luminal tumor. In this sense, we evaluated the prognostic value of the *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *TNFRSF21*, *DUSP8* and *HRAS* genes according to tumor subtypes. The RFS of patients with luminal breast cancer and TNBC treated with radiotherapy was evaluated by Kaplan–Meier analysis. The results showed that higher levels of *ZNF611* ( $P = 0.0338$ ), as well as lower levels of *RIPK1* ( $P = 0.0024$ ) and *DUSP8* ( $P = 0.0165$ ), were associated with longer RFS in luminal subtypes (Fig. 6F). However, although these genes were not significantly associated with RFS in TNBC subtypes, higher levels of *ZNF611* and *ZNF304* and lower levels of *HRAS* showed a trend for an association with a longer RFS (Fig. 6G).

#### 4. Discussion

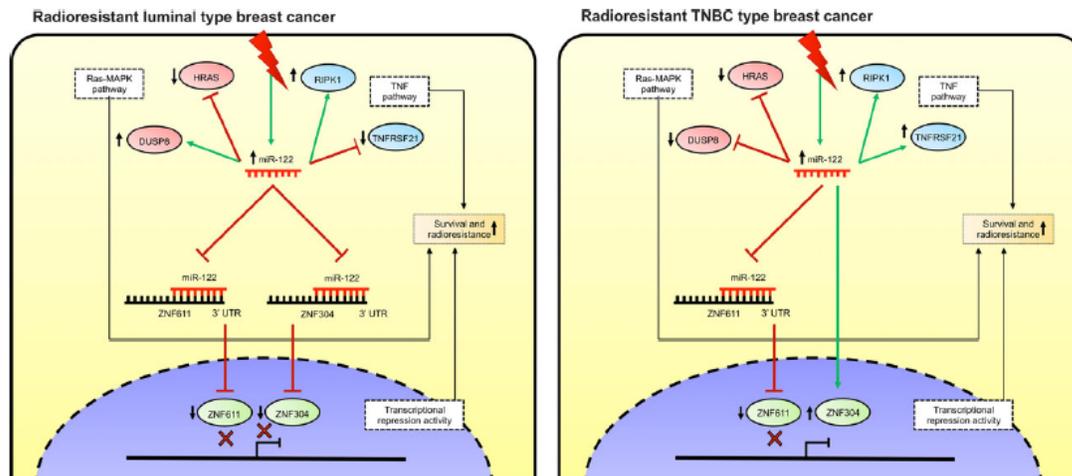
To gain insight into the molecular adaptations underpinning the radioresistance of breast cancer cells, we report the development of isogenic radioresistant breast cancer cell lines, miRNome landscape analysis and functional analysis of miR-122. An isogenic model of radioresistance was developed by cumulative exposure of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to 30 Gy-fractionated radiation, resulting in the generation of a subline with significantly increased survival potential compared to sham control cells, as reported previously in a model of radioresistant lung cancer cells (Arechaga-Ocampo *et al.*, 2017). The development of isogenic chemo- and radioresistant cell lines has been used successfully to investigate the molecular changes associated with acquired resistance to therapy and tumor aggressiveness in cancer (McDermott *et al.*, 2014). Exposure of tumors to fractionated radiation schedules can select a cancer cell subpopulation with an increased capacity to overcome the anti-proliferative effects of radiotherapy (Zaider and Hanin, 2011) by modulating the abundance and functions of molecules, including miRNAs (Arechaga-Ocampo *et al.*, 2017; Methetraitrit and Slack, 2013; Zhang *et al.*, 2014). In the present study, we identified a set of miRNAs related to acquired radioresistance. Wang *et al.* (2014b) have shown that the expression of a group of miRNAs establishes a useful molecular signature with respect to differentiating radioresistant from non-radioresistant tumors, even though they originate from

the same histological type. In this sense, we identified the miRNome of the isogenic MCF-7RR cell line compared to the parental MCF-7 cell line and found 16 miRNAs to be differentially expressed (13 up- and three down-regulated). Among them, miR-184 (Fang *et al.*, 2017), miR-424\* (Zhang *et al.*, 2017b), miR-218 (Wang *et al.*, 2017), miR-222 (Wei *et al.*, 2017) and miR-10a (Rong *et al.*, 2016) have been reported in relation to chemotherapy resistance in several types of tumors. Others, such as miR-135b\* (Wang *et al.*, 2014a,b), miR-223\* (de Melo Maia *et al.*, 2016), miR-135b (Han *et al.*, 2017) and miR-196b (Ren *et al.*, 2017), have been reported as oncomiRs. The aberrant expression of miRNAs in the radioresistance of human tumors is a result of their function as negative regulators of gene expression. miRNAs can control the expression of genes that are components of cell survival pathways, apoptosis, the immune response and cell differentiation, amongst others (Bartel, 2004). The results of our bioinformatic analysis of the GO and biological pathways revealed that the set of miRNAs is implicated in proliferation and survival pathways, the immune response and transcriptional control, suggesting that signaling pathways involved in acquired radioresistance can be directed by the coordinated action of these molecules. It is remarkable that deregulation of the miRNAs identified in MCF-7RR cells is conserved in MDA-MB-231RR cells. Specially, miR-196b, miR-222 and miR-122 show similar expression in both radioresistant cell lines, which suggests that they might have a significant role in the phenotypic evolution of cancer cells to acquired radioresistance. Notably, miR-122 is known to act as a tumor suppressor in breast cancer by targeting *IGF1R* (Wang *et al.*, 2012) and *ADAM10* genes (Ergün *et al.*, 2015). In addition, miR-122 has the same role in liver and glioma tumors, in which it suppresses mechanisms to promote tumor progression and survival (Wang *et al.*, 2014a,b). In the present study, we demonstrate that miR-122 significantly reduced the survival of the parental cells, although this effect was enhanced when the cells were irradiated. This result is consistent with previous reports of the tumor suppressor function of miR-122 in breast cancer (Ergün *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012) and it also highlights its potential as a radiosensitizer. Similarly, a previous study showed that miR-122 induces radiosensitivity in lung cancer cells exposed to different doses of radiation. The ectopic overexpression of miR-122 in lung cancer cells decreased anchorage-dependent invasion and inhibited cell growth by knockdown of target genes related to tumor survival and the cellular stress response (Ma *et al.*, 2015). The role of miR-122 as a radiosensitizer

in lung cancer is consistent with our findings in breast cancer. Recently Zhang *et al.* (2017a,b) reported the function of miR-122-3p in response to radiation in TNBC cells. It was demonstrated that miR-122-3p promotes sensitivity to radiation by modifying cellular apoptosis, migration and invasion as a result of modulation of the PTEN/PI3K/AKT pathway. It should be noted that miR-122-3p (miR-122\*) is the passenger strand of leading strand miR-122-5p (miR-122); therefore, miR-122-3p could target different genes, giving it an independent function compared to miR-122-5p. The results of the studies by Zhang *et al.* (2017a,b), together with our results, suggest that miR-122\* and miR-122 might function cooperatively to promote the sensitivity of breast cancer cells exposed to radiation. However, in our isogenic model of acquired radioresistant breast cancer cells, we did not observe the aberrant expression of miR-122-3p and so the role of miR-122-3p in acquired radioresistance in breast cancer still remains unknown.

Besides its function *in vitro*, we show that the expression of miR-122 in breast tumors was significantly associated with a favorable response to radiotherapy compared to those patients who did not express miR-122. In such patients, miR-122 has a tumor-suppressive role for treatment-naïve tumors (i.e. in patients who have not yet received radiation therapy and therefore radioresistance has not yet developed). With these results, we demonstrate that miR-122 is related to the sensitivity to radiotherapy in parental

breast cancer cells both *in vitro* and *in vivo* in a set of breast tumors, which, to our knowledge, has not been reported previously. Unexpectedly, in MCF-7RR and MDA-MB-231RR cells, we observed overexpression of miR-122. Its downregulation by antagomiR-122 was able to revert the resistance to radiotherapy by counteracting cell survival. By contrast to functioning as a tumor suppressor, miR-122 appears to have an oncogenic role in breast cancer cells that have acquired radioresistance. It is known that miRNAs can act as a tumor suppressor or as an oncogene depending on the scenario. Svoronos *et al.* (2016) provide an excellent review in which they discuss the dual role of miRNAs in cancer cells themselves and as extrinsic factors. They also report that dual function could be dependent on different cell phenotypes, tumor microenvironment, immune evasion and by selective pressure induced by therapy treatments, including radiotherapy. We showed that miR-122 is up-regulated in response to radiation treatment, suggesting that continuous fractionated irradiation maintains the overexpression of miR-122 until a radioresistant phenotype is attained. Based on our results, we propose that miR-122 could acquire an oncogenic function under the pressure exerted by radiation in breast cancer, which allows evolution of the cell and adaptation to radiotherapy. To explore the genes and biological pathways modulated by miR-122 in radioresistant cells, we analyzed the transcriptome of MCF-7RR cells with loss-of-function of miR-122. The results showed 158 genes to be



**Fig. 7.** Schematic representation of miR-122-mediated radioresistance in breast cancer cells. miR-122 has an oncogenic role in the acquired radioresistance of luminal and TNBC cells by differentially controlling the expression of ZNF611 and ZNF304 transcription factors, as well as modulating the expression of genes involved in RAS-MAPK and TNF pathways to promote survival.

differentially modulated, of which 27 were increased and 131 were decreased. Analyses of the biological network by CYTOSCAPE revealed protein outliers that have been reported in radiotherapy resistance in cancer and survival, as well as proliferation and epigenetic regulation, such as *EGFR* (Lee *et al.*, 2011), *MOV10* (El Messaoudi-Aubert *et al.*, 2010), *ELAVL1* (Mehta *et al.*, 2016), *SIRT7* (Chen *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017), *APP* (Lim *et al.*, 2014) and *EWSR1* (Suzuki *et al.*, 2012). Many studies have reported that radiotherapy can induce transcriptional reprogramming to enable acquired resistance and to avoid the toxicity triggered by radiotherapy (Doan *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2013). We determined that miR-122 modulates genes related to molecular processes such as transcriptional regulation and the signaling of receptors coupled to G proteins, as well as the MAPK and TNF pathways. This diversity of cellular processes is consistent with numerous regulatory mechanisms associated with the response to radiation and radioresistance in breast cancer (Kaidar-Person *et al.*, 2013). In the transcriptomic landscape induced by knockdown miR-122, we identified genes involved in these cellular processes such as *ZNF611*, *ZNF304*, *RIPK1*, *DUSP8*, *HRAS* and *TNFRSF21*. Moreover, these genes were prognostic factors in breast cancer patients treated with radiotherapy. The clinical findings were in accordance with the results of survival assays *in vitro*. Among the set of up-regulated genes, we found that *ZNF611* and *ZNF304* contain canonical miR-122-binding sites in their 3'-UTR region; in addition, we verified that the protein levels of these transcription factors also increase when miR-122 is inhibited in MCF-7RR cells. *ZNF304* and *ZNF611* are transcription factors that belong to the C2H2 zinc finger family possessing Krüppel associated box and are related to transcriptional silencing by the recruitment of epigenetic complexes (Aslan *et al.*, 2015; Pengue and Lania, 1996). *ZNF304* has also been reported as a regulator of the RAS pathway by recruitment of an epigenetic silencing complex in tumor suppressor genes in colorectal cancer (Serra *et al.*, 2014) and as a promoter of cell survival in ovarian cancer (Aslan *et al.*, 2015). *ZNF611* has not yet been reported in cancer. On the other hand, *RIPK1*, *DUSP8*, *HRAS* and *TNFRSF21* were down-regulated when we knocked-down miR-122. *RIPK1* (Miyamoto, 2011) and *TNFRSF21* (Benschop *et al.*, 2009) are components of the TNF pathway, whereas *DUSP8* (Keyse, 2008) and *HRAS* (Knobbe *et al.*, 2004) act on the RAS-MAPK pathway. Alteration in the activity of transcription factors could be critical for the development and maintenance of radioresistance in breast cancer by control genes of the survival

pathways, such as the RAS-MAPK and TNF pathways (Ishihara *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018). Many of the genes that we observed to be down-regulated in the transcriptome analysis might be part of an epigenetic network of transcriptional silencing driven by axis miR-122-*ZNF611* or miR-122-*ZNF304*. This is a research topic that is currently under investigation; however, we have obtained preliminary data strongly suggesting that *RIPK1* and *DUSP8* possess elements of response to *ZNF611* and *ZNF304* in their promoter regions (data not shown). Therefore, we propose that the dual function of miR-122 in the isogenic model of radioresistant breast cancer cells could be result of transcriptional reprogramming controlled by the modulation of *ZNF611* and *ZNF304* by miR-122.

## 5. Conclusions

In conclusion, the data obtained in the present study contribute to our understanding of the mechanisms of molecular adaptation to radiotherapy in breast cancer cells. The evidence indicates the aberrant expression of a set of miRNAs linked to carcinogenesis and the molecular control of pathways related to the response to therapy in cancer. Particularly, the overexpression of miR-122 maintains the radioresistant phenotype in breast cancer cells by promoting cell survival, from the regulation of several genes to the downstream effects of these genes, which confers it with an oncogenic function (Fig. 7).

## Acknowledgements

Isidro X. Perez-Añorve was recipient of CONACyT fellowship (#416929). The authors are grateful to undergraduate student Perla Lopez and postgraduate student Victor M. Gonzalez for establishment of the radioresistant model and the analysis of miRNA expression profiles. They also express their thanks to M. S. Christian Adame (Centro Medico Nacional 'Siglo XXI', Mexico) for optimizing the radiotherapy dose for all of the experimental analyses. The authors are very grateful to Biol. Raul Bonilla Moreno (Biomedicina Molecular; CINVESTAV-IPN) for his valuable technical support. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT; 115591, 181534 and 284748), Instituto de Ciencia y Tecnologia del Distrito Federal (ICYT-DF; PIUTE10-147) and Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP-SEP; 47310447). EA-O, CHG-DR and ES-R are supported by the Natural Science Department at UAM Cuajimalpa Unit.

