



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efectos de la sobreexpresión de la metaloproteasa  
MT1-MMP en la expresión génica de la línea  
celular MCF-7 de cáncer de mama

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LAURA FÁTIMA LOZADA RODRÍGUEZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. FLORIA JOSEFINA LIZÁRRAGA  
SÁNCHEZ

CIUDAD DE MÉXICO 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos de la alumna  
Lozada  
Rodríguez  
Laura Fátima  
56 53 28 92  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311244340

2. Datos de la tutora  
Dra.  
Floria Josefina  
Lizárraga  
Sánchez

3. Datos sinodal 1  
Dra.  
Gisela  
Ceballos  
Cancino

4. Datos sinodal 2  
Dr.  
Julio Isael  
Pérez  
Carreón

5. Datos sinodal 3  
Dr.  
Fernando Edgar  
Krötzsh  
Gómez

6. Datos sinodal 4  
Dra.  
María Sandra  
Cabrera  
Benítez

7. Datos del trabajo escrito  
Efectos de la sobreexpresión de la metaloproteasa MT1-MMP en la expresión génica de la  
línea celular MCF-7 de cáncer de mama  
88 p.  
2019



Instituto Nacional de  
Medicina Genómica  
MÉXICO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Epigenética a cargo de la Dra. Vilma Maldonado Lagunas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de la Dra. Floria Josefina Lizárraga Sánchez.

“She had studied the universe all her life, but had overlooked its clearest message: For small creatures such as we the vastness is bearable only through love.”

— Carl Sagan, Contact

## Dedicatoria

---

*A mi madre Tere, eres en todo el universo, la persona más importante para mi. Me siento muy orgullosa de la mujer que eres y espero algún día devolverte todo lo que me has dado. A mi padre Eliseo por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento de mi vida. Gracias a los dos por creer y confiar en mí y gracias a la vida por permitirme tenerlos y disfrutar cada día a su lado.*

*A mi hermosa familia, por que desde que llegué al mundo se han preocupado por mí y me han enseñado a perseguir mis sueños.*

*Al hombre de mi vida... Jair, por todo el amor que me das y ser mi mayor motivación.*

*Con amor,*

*Fátima.*

## Agradecimientos

---

A mi madre, por el amor que me das, por tus cuidados, por ser mi mejor amiga y confidente, y por sacrificar toda tu vida para darme todo lo que hasta hoy tengo.

A mi papi Eli, por su amor de padre, por sus consejos y chistes, y a su familia por apoyarme siempre.

A mi hermana Danahe, gracias por las sonrisas y la alegría que le das a mi vida

A mis hermosas tías: Paty, Yola, Sonia, Lidia y Araceli las quiero mucho gracias por su apoyo incondicional, son las mejores tías que me pudo dar la vida.

A Jair por amarme y estar conmigo a lo largo de toda mi carrera profesional, gracias por crecer conmigo, gracias por ser el hombre que eres, te amo.

A mis abuelos, por enseñarme a ser quien soy hoy, por sus consejos, por consentirme y amarme todos los días.

A mis primos Diana e Iván por preocuparse por mi y enseñarme a creer en mi.

A Dafne Mabel, por que llegaste a cambiar mi vida con tus sonrisas y bailes, y por ser mi ejemplo de fortaleza. Gracias por haberme permitido formar parte de tu vida, te extraño.

A la familia González Cortés por todo su cariño y ejemplo de amor.

A mi tutora Floria, por su apoyo, confianza y tiempo que me dedicó todos los días hasta terminar esta tesis, gran parte de este excelente trabajo se lo debo a usted. Gracias también, por brindarme su amistad, por sus consejos y por todas las sonrisas.

A mis amigos del laboratorio Manuel, Alfredo y Ara, por enseñarme cosas nuevas todos los días y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos Diego, Marisol y Nancy, por todas las risas y por estar siempre conmigo, mi vida no sería lo mismo sin ustedes, los quiero mucho.

Al Dr. Leonardo, gracias por ser el profesor más cool de la Facultad de Ciencias y enseñarme que la botánica no era para mí, jamás lo olvidaré.

A la Dra. Vilma Maldonado, por brindarme la oportunidad de estar en su laboratorio y brindarme todas las facilidades para realizar este proyecto.

A mis sinodales, por tomarse el tiempo para leer mi tesis y por sus valiosos comentarios.

A la Facultad de Ciencias, por haberme permitido realizar mis estudios y por darme la oportunidad de conocer personas increíbles.

## Abreviaturas

---

**ACP:** Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés)

**ADAM'S:** Adamalinas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ATCC:** American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés

**CAF:** Fibroblastos asociados a cáncer (CAF, por sus siglas en inglés)

**CD:** Células dentríticas (DC, por sus siglas en inglés)

**CDIS:** Carcinoma ductal in situ

**cDNA:** ADN complementario (cDNA, por sus siglas en inglés)

**CLIS:** Carcinoma lobular in situ

**C<sub>T</sub>:** Ciclo umbral en PCR tiempo real

**DEG:** Genes diferencialmente expresados (DEG, por sus siglas en inglés)

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DMEM:** Medio de cultivo "Dulbecco's Modified Eagle's Medium", por sus siglas en inglés

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGFR:** Factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés)

**EMT:** Transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés)

**FC:** Fold change, por sus siglas en inglés

**GAGs:** Glicosaminoglicanos

**GLOBOCAN:** Global Cancer Observatory

**GPI:** Glicofosfatidilinositol

**GSEA:** Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA, por sus siglas en inglés)

**KPA:** Key Pathway Advisor (KPA, por sus siglas en inglés)

**LIF:** Factor inhibidor de la leucemia (LIF, por sus siglas en inglés)

**lncRNA:** RNA largo no codificante (lncRNA, por sus siglas en inglés)

**MCF-7:** Línea celular de cáncer de mama tipo luminal

**MDSC:** Células supresoras de origen mielóide (MDSC, por sus siglas en inglés)

**MEC:** Matriz Extracelular

**MMP:** Metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, por sus siglas en inglés)

**mRNA:** RNA mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés)

**MT-MMP:** Metaloproteasas asociadas a membrana (MT-MMP, por sus siglas en inglés)

**MT1-MMP:** Metaloproteasa de tipo membranal 1 (MT1-MMP, por sus siglas en inglés)

**NCI:** Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés)

**ncRNA:** RNA no codificante (ncRNA, por sus siglas en inglés)

**NHGRI:** Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI, por sus siglas en inglés)

**NK:** célula asesina (NK, por sus siglas en inglés)

**NRP1:** Neuropilina-1

**PBS:** Buffer salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

**RE:** Receptor de estrógeno

**RIN:** Número de integridad del RNA

**RNA-seq:** Secuenciación de RNA total

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés)

**RT:** Retro-transcripción

**SFB:** Suero fetal bovino

**TAN:** Neutrófilos asociados al tumor (TAN, por sus siglas en inglés)

**TBP:** Proteína de unión a TATA (TBP, por sus siglas en inglés)

**TCGA:** El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés)

**TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β, por sus siglas en inglés)

**TIMP-2:** Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2 (TIMP-2, por sus siglas en inglés)

**TMA:** Macrófagos asociados al tumor (TMA, por sus siglas en inglés)

**TME:** Microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés)

**TNM:** Tumor, nódulo y metástasis (TNM, por sus siglas en inglés)

**VEGF-A:** Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, por sus siglas en inglés)

**Zn<sup>2+</sup>:** Ion zinc

# Contenido

---

ABREVIATURAS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	13
I. RESUMEN.....	14
II. INTRODUCCIÓN .....	15
1. Cáncer .....	15
1.1 Epidemiología.....	16
1.2 Signos distintivos del cáncer.....	17
2. Cáncer de mama.....	18
2.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	18
2.2 Clasificación del cáncer de mama.....	20
2.3 Clasificación histológica.....	21
2.4 Clasificación molecular.....	21
3. Microambiente tumoral.....	23
4. Matriz extracelular.....	23
5. Metaloproteasas de matriz (MMPs).....	25
5.1 Estructura de las MMPs.....	26
5.2 Signos distintivos del cáncer y MMPs.....	27
5.3 MMPs, invasión y metástasis.....	27
5.4 MMPs y la proliferación celular.....	28
5.5 MMPs y apoptosis.....	28
5.6 MMPs y angiogénesis.....	29
5.7 MMPs e inflamación.....	29
6. Metaloproteasa de matriz tipo membranal (MT1-MMP).....	29
7. RNAs no codificantes y su papel en el cáncer.....	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	35

<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
1.	Objetivo general.....	35
2.	Objetivos particulares.....	35
<b>VI.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
1.	Cultivo de células MCF-7.....	36
2.	Plásmidos.....	36
3.	Transformación de bacterias.....	37
4.	Extracción de los plásmidos.....	37
5.	Transfección estable.....	38
6.	Extracción de RNA de las líneas celulares estables.....	38
7.	Validación de la sobreexpresión de MT1-MMP.....	39
8.	Retro-Transcripción (RT) o síntesis del DNA complementario (cDNA).....	40
9.	PCR cuantitativa.....	40
10.	Secuenciación del transcriptoma completo.....	41
11.	Control de calidad.....	41
12.	Análisis del transcriptoma y selección de genes diferencialmente expresados.....	41
13.	Análisis bioinformático por Key Pathway Advisor.....	42
14.	Validación de la secuenciación.....	43
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
1.	Transfección estable.....	44
2.	Sobreexpresión de MT1-MMP.....	45
3.	Calidad del RNA.....	46
4.	Control de calidad de los resultados de la secuenciación.....	49
5.	Expresión génica a nivel transcriptoma.....	52
6.	Validación de la secuenciación.....	57
7.	Análisis bioinformático por Key Pathway Advisor.....	60
7.1	Mapas de vías patológicas.....	60
7.2	Mapas de vías fisiológicas.....	64
7.3	Enfermedades.....	70
7.4	Redes de procesos.....	70
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	73
<b>X.</b>	<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	74
<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	80

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Cáncer.....	15
<b>Figura 2.</b> Cáncer en el mundo.....	16
<b>Figura 3.</b> Los Hallmarks del cáncer.....	17
<b>Figura 4.</b> Incidencia y mortalidad por cáncer de mama en México 2018.....	18
<b>Figura 5.</b> Tipos de cáncer de mama.....	19
<b>Figura 6.</b> Esquemas de clasificación del cáncer de mama.....	20
<b>Figura 7.</b> Principales componentes moleculares de la matriz extracelular.....	24
<b>Figura 8.</b> Clasificación de las MMPs de acuerdo a su estructura.....	26
<b>Figura 9.</b> Estructura básica de las metaloproteinasas.....	27
<b>Figura 10.</b> Estructura básica de la MT1-MMP.....	30
<b>Figura 11.</b> Líneas celulares estables pcDNA3.1 y pcDNA3.1-MT1-MMPmCh.....	45
<b>Figura 12.</b> Expresión de la MT1-MMP en las líneas celulares estables.....	46
<b>Figura 13.</b> Determinación de la calidad del RNA por electroforesis .....	47
<b>Figura 14.</b> Gel de referencia para elegir las perlas para la preparación de las bibliotecas.....	48
<b>Figura 15.</b> Análisis de componentes principales (ACP).....	49
<b>Figura 16.</b> Control de calidad de las muestras de RNA secuenciadas.....	51
<b>Figura 17.</b> Representación del total de transcritos.....	52
<b>Figura 18.</b> Mapa de calor que representa el cambio en el transcriptoma de la línea celular MCF-7 al sobreexpresar MT1-MMP.....	53
<b>Figura 19.</b> Validación de los datos de la secuenciación.....	59

## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Cebadores utilizados para PCR cuantitativa.....	40
<b>Tabla 2.</b> Cebadores utilizados para la validación de la RNA-seq.....	43
<b>Tabla 3.</b> Lista de genes codificantes diferencialmente sobreexpresados.....	55
<b>Tabla 4.</b> Lista de genes codificantes diferencialmente inhibidos.....	56
<b>Tabla 5.</b> Genes no codificantes diferencialmente expresados.....	57
<b>Tabla 6.</b> Comparación del valor de cambio de la RNA-seq con los resultados obtenidos mediante qRT-PCR.....	60
<b>Tabla 7.</b> Vías Patológicas.....	61
<b>Tabla 8.</b> Vías Fisiológicas.....	65
<b>Tabla 9.</b> Enfermedades.....	70
<b>Tabla 10.</b> Redes de procesos.....	71

## Material Suplementario

---

1. Lista total de transcritos que fueron alterados por la sobreexpresión de MT1-MMP.....	74
2. Lista Genes no codificantes diferencialmente expresados.....	74

## I. Resumen

---

El cáncer de mama es una patología heterogénea y se denomina así a un amplio grupo de enfermedades donde las células de la glándula mamaria se vuelven anormales, proliferando rápidamente y sin control, además de que adquieren la capacidad de invadir y así, se propagan a otros órganos. La familia de las metaloproteinasas de matriz está implicada en varios procesos celulares asociados a la progresión tumoral debido a su habilidad para remodelar la matriz extracelular y activar moléculas que estimulan la migración y la proliferación de las células cancerosas. En particular, la metaloproteasa de matriz tipo membranal-1 es un enzima clave para la progresión del cáncer. Con la finalidad de conocer con mayor detalle las funciones celulares y moleculares que son reguladas por la MT1-MMP, en este trabajo se planteó el siguiente objetivo general: Determinar los patrones de expresión diferencial de los RNAs en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 al sobreexpresar la MT1-MMP. Para cumplir con esta meta, se generaron cultivos estables derivados de células MCF-7 que sobreexpresaron la MT1-MMP y una línea celular control que no expresa la enzima. Se aisló el RNA total de estas líneas celulares, se analizó el perfil de expresión de los RNAs por la metodología de secuenciación completa del transcriptoma (RNA-seq) y se determinó un grupo de RNAs diferencialmente expresados entre ambas líneas celulares. Los resultados arrojados por la secuenciación se analizaron en la plataforma bioinformática Key Pathway Advisor en donde sólo fueron considerados 178 transcritos con cambios de expresión mayores de 1.3 y un valor de  $p < 0.05$ . El análisis de las vías de señalización reguladas por la MT1-MMP indicaron que se alteran procesos biológicos específicos asociados a la transcripción, la reproducción, la inflamación, la transducción de señales, la apoptosis, la diferenciación y el desarrollo. En conclusión, la sobreexpresión de la MT1-MMP-mCh provocó cambios en el perfil de expresión génica de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama que consecuentemente modularon las vías de señalización. Finalmente, este trabajo abre la posibilidad de estudiar a detalle vías y procesos específicos asociados a la sobreexpresión de la MT1-MMP en el cáncer de mama.

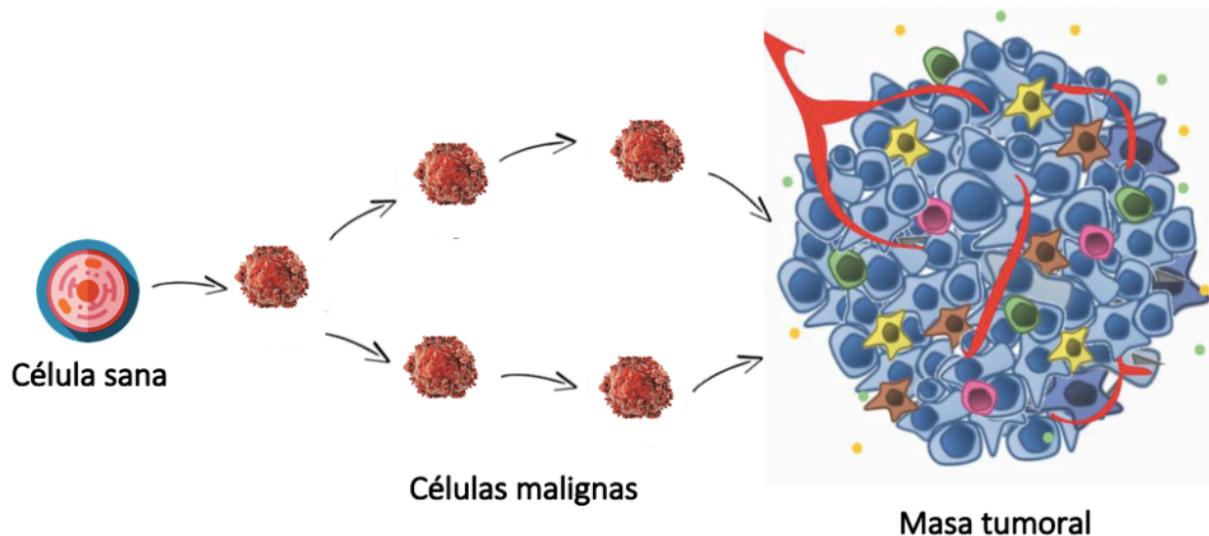
## II. Introducción

---

### 1. Cáncer

El término de cáncer se otorga a un amplio grupo de enfermedades que se define por el desarrollo de células anormales que se dividen y crecen sin control, adquiriendo rápidamente la capacidad de invadir otras partes del cuerpo y propagarse a otros órganos por medio del sistema sanguíneo o sistema linfático, este último proceso es conocido como metástasis (Fig.1) (Jiménez-Salazar, 2012) Se han clasificado alrededor de 100 tipos de cáncer los cuales comparten características biológicas durante la progresión tumoral, tales características fueron denominadas "hallmarks" por Hanahan y Weinberg en el año 2000 (Douglas Hanahan, 2000).

El origen etimológico de la palabra cáncer se inspiró en la observación de los tumores de mama ya que al expandirse por los tejidos, adoptaban la forma de un cangrejo (Salaverry, 2013). El estudio y tratamiento del cáncer son muy antiguos y ha sido de gran interés para diferentes culturas desde épocas remotas. Existen documentos como el papiro de Ebers que mencionan éste padecimiento.

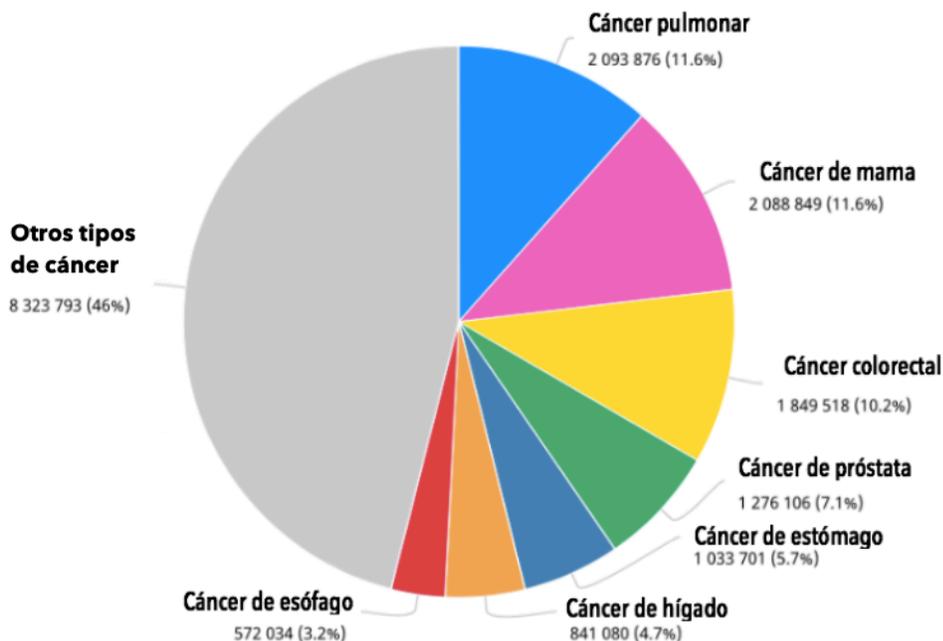


**Figura 1. Cáncer.** El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento rápido y desordenado de células malignas que adquieren rápidamente la capacidad de invadir otros tejidos.

## 1.1 Epidemiología

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se calcula que provocó 8.8 millones de defunciones en el año 2015 y se ha observado que se presenta con mayor incidencia en países en desarrollo. Actualmente se han identificado siete tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos en todo el mundo: organizándolos de mayor a menor mortalidad tenemos al cáncer pulmonar (11.6%), cáncer de mama (11.6%), cáncer colorectal (10.2%), cáncer de próstata (7.1%), cáncer de estómago (5.7%), cáncer de hígado (4.7%) y al cáncer de esófago (3.2%) (Fig. 2) ( GLOBOCAN, 2018).

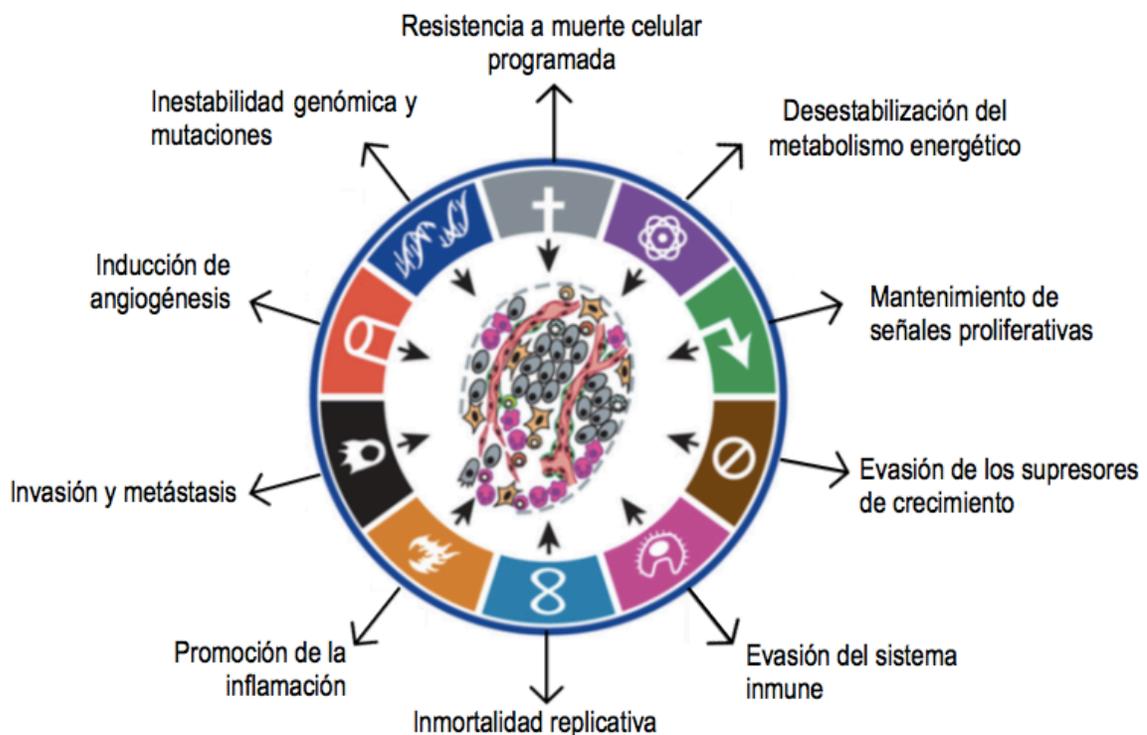
En México el cáncer es la tercera causa de muerte en el país y de acuerdo con las estadísticas del INEGI, durante el periodo de 2011 a 2016, los cinco principales tipos de cáncer que sobresalen como causa de mortalidad en la población son: los tumores malignos del sistema digestivo, el cáncer de órganos genitales femeninos, el tumor maligno de mama, el de órganos hematopoyéticos y los tumores malignos del sistema respiratorio (INEGI, 2018).



**Figura 2. Muertes por cáncer a nivel mundial.** Número estimado de fallecimientos a nivel mundial, para ambos sexos en el año 2018. (Imagen tomada y modificada de: GLOBOCAN, 2018).

## 1.2 Signos distintivos del cáncer

En el año 2000 Hanahan y Weinberg describieron seis propiedades que adquiere un tumor maligno durante su desarrollo: mantenimiento de las señales proliferativas, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, activación de la invasión y la metástasis e "inmortalidad" replicativa. Estos signos distintivos (Hallmarks of cancer, en inglés) son ciertas características que logran conseguir las células al desarrollar un fenotipo transformado. En el año 2011 los mismos autores actualizaron esta información y propusieron nuevas características como son: evasión del sistema inmune, inestabilidad genómica y mutaciones, desestabilización del metabolismo energético y promoción de la inflamación (Fig. 3) (Hanahan & Weinberg, 2011).



**Figura 3. Signos distintivos del cáncer (Hallmarks).** Representan las características que confieren a la enfermedad su progresividad y su desarrollo y que culminan en un fenotipo más agresivo (Imagen tomada y modificada de: Hanahan, 2011).

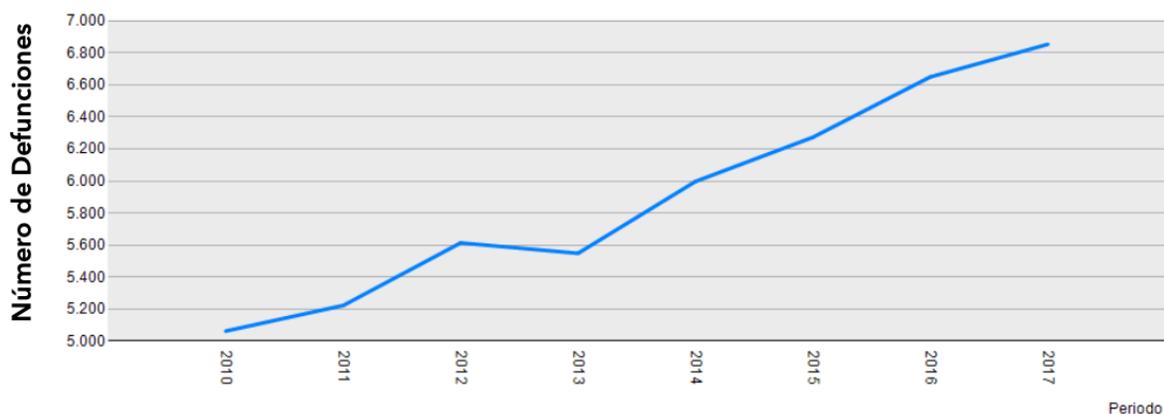
## 2. Cáncer de mama

---

El cáncer de mama es una enfermedad muy compleja y al igual que todos los demás tipos de cáncer inicia con la proliferación de células anormales que adquieren rápidamente la capacidad de invadir otros órganos y tejidos del cuerpo. A pesar de todos los avances de la oncología, el cáncer de mama sigue siendo la primera causa de muerte en la mujer, a nivel mundial y en México desde el 2006, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. El cáncer de mama es un problema de salud cada vez más importante debido a su incidencia y mortalidad (Cárdenas J., 2017 ).

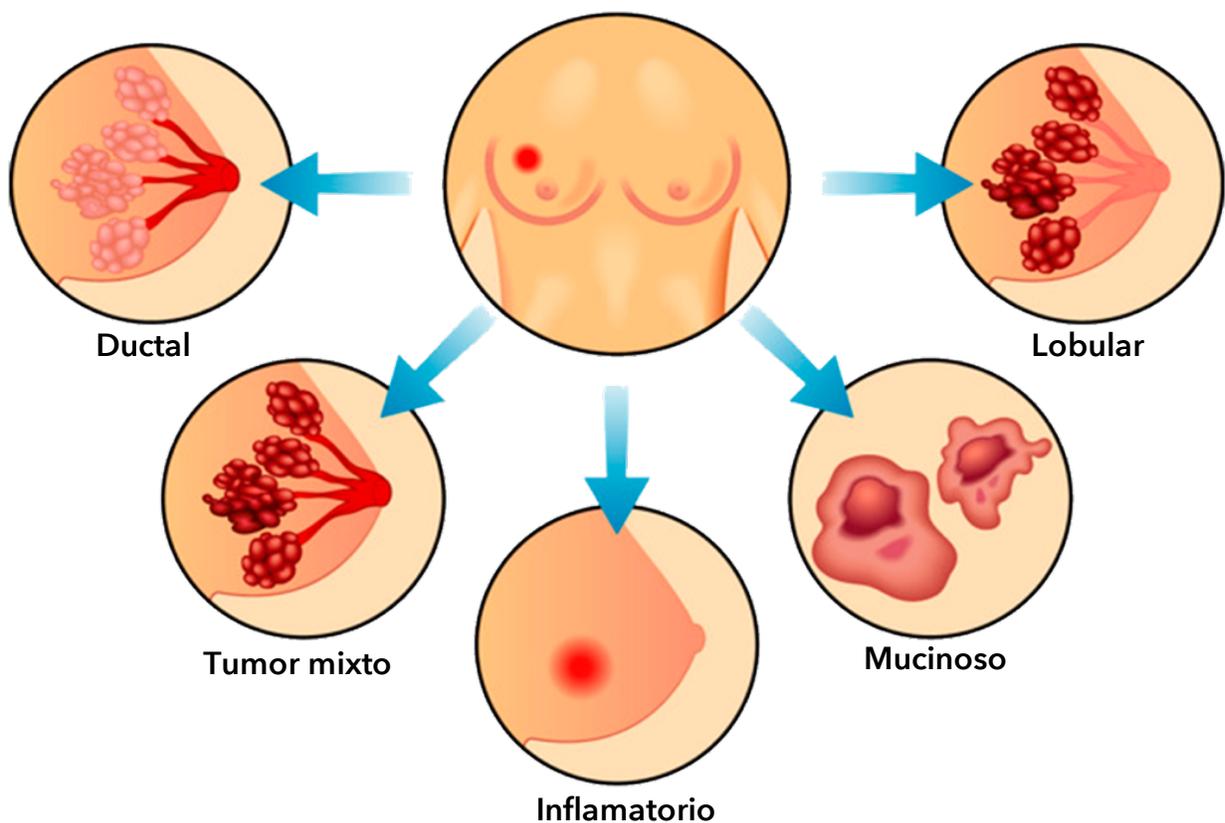
### 2.1 Epidemiología del cáncer de mama

En todo el mundo, cada año se diagnostican aproximadamente 1.67 millones de mujeres con cáncer de mama y cerca de 522,000 pacientes fallecen por esta enfermedad (Cárdenas J., 2017 ). En México, de acuerdo a las estadísticas del INEGI, el cáncer de mama ha presentado un aumento tanto en las tasas de incidencia como en las tasas de mortalidad (Fig.4) y en congruencia con las estadísticas del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) del año 2018, en nuestro país hubo 27,283 casos nuevos y fallecieron cerca de 6,884 pacientes (GLOBOCAN, 2018).



**Figura 4. Mortalidad de mujeres por cáncer de mama en México del año 2010 al 2017.** Gráfica que representa el número de fallecimientos por cáncer en mujeres de todas las edades en México del año 2010 al 2017 (Imagen tomada y modificada de: INEGI, 2019).

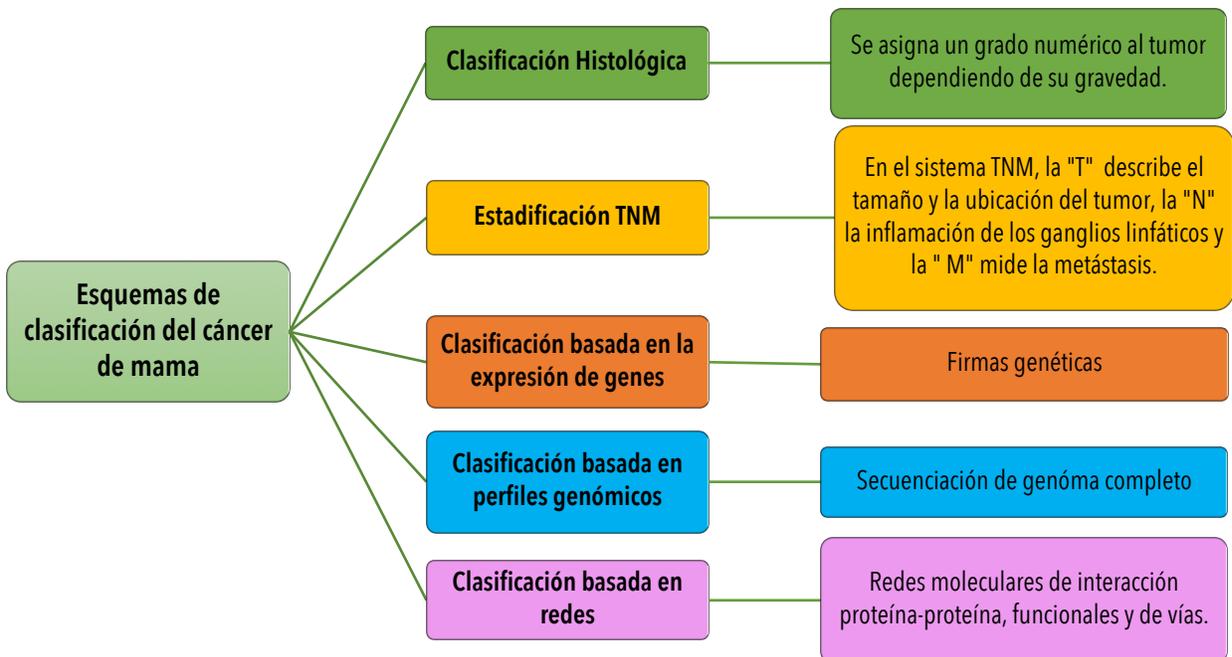
Las dificultades que se presentan en la lucha contra este tipo de cáncer son: la resistencia a los tratamientos y el diagnóstico tardío ya que la mayoría de los pacientes llegan en etapas muy avanzadas. El cáncer de mama se desarrolla principalmente en los lóbulos, lobulillos y bulbos (carcinoma lobulillar 20%) y el más frecuente en los conductos (carcinoma ductal 70%). Existen otros tipos de cáncer menos frecuentes como son: el cáncer de mama inflamatorio, el mucinoso y el mixto en este último; incluso se pueden combinar varios tipos de cáncer de mama y presentarse al mismo tiempo (Fig. 5) (Jiménez-Salazar, 2012).



**Figura 5. Tipos de cáncer de mama.** Diferentes tipos de cáncer de mama los de mayor frecuencia son: el ductal y lobular y los menos frecuentes son: el mucinoso, el inflamatorio y el mixto. (Imagen tomada y modificada de: Dreamstime, 2019. Types of breast cancer)

## 2.2 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es un conjunto de enfermedades que presentan diferencias genéticas y moleculares (Stingl & Caldas, 2007). Para mejorar el tratamiento y pronóstico se han desarrollado sistemas de clasificación que han progresado gracias a los avances en la investigación (Malhotra, Zhao, Band, & Band, 2010). Los esquemas de clasificación del cáncer de mama se dividen en cuatro clases: 1) Gradación histológica y estadificación del tamaño del tumor, invasión de los ganglios linfáticos y diseminación metastásica (TNM) que se basan en las propiedades físicas y anatómicas del cáncer, además de la cuantificación de su agresividad; 2) los esquemas basados en perfiles de expresión de microarreglos o de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR) que se pueden dividir en molecular y firmas de genes; 3) los esquemas basados en perfiles genómicos, los cuales utilizan tecnologías de nueva generación como la secuenciación de genoma completo y 4) los métodos basados en redes donde se integran las interacciones moleculares con perfiles de expresión y de mutación (Fig. 6) (Taherian-Fard, Srihari, & Ragan, 2015).



**Figura 6. Esquemas de clasificación del cáncer de mama.** (Imagen tomada y modificada de: Taherian-Fard, 2015)

## 2.3 Clasificación histológica

A grandes rasgos el cáncer de mama se puede clasificar en carcinoma *in situ* y en carcinoma invasivo (infiltrante). El carcinoma *in situ* es subclasificado a su vez en ductal o lobular y para distinguir los dos tipos se utilizan características citológicas y patrones de crecimiento. El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) se caracteriza por la presencia de células epiteliales malignas las cuales crecen dentro de los conductos mamarios, sin atravesar la membrana basal, es más común que el carcinoma lobular *in situ* (CLIS) y abarca a un grupo heterogéneo de tumores que han sido subclasificados con base en sus características arquitectónicas en cinco subtipos: comedón, cribiforme, micropapilar, papilar y sólido. Al igual que los carcinomas *in situ*, los carcinomas invasivos son un grupo de tumores diferenciados en subtipos histológicos y los principales son: ductal infiltrante, lobular invasivo, ductal/lobular, mucinoso (coloide), tubular, medular y carcinoma papilar (Malhotra et al., 2010).

El sistema de clasificación histológica más utilizado en el cáncer de mama es el sistema Nottingham. Esta clasificación combina el grado del tumor y el estadio de los ganglios linfáticos del sistema TNM para la determinación del tratamiento para los pacientes con cáncer de mama (Taherian-Fard et al., 2015).

## 2.4 Clasificación molecular

Gracias a los avances de la medicina genómica, la capacidad de predecir la respuesta a nuevas terapias dirigidas se vió beneficiada. Se realizaron estudios basados en analisis de expresión de genes por microarreglos y se identificaron nuevos subtipos moleculares en el cáncer de mama, que más tarde fueron validados y clasificados como: Tipo "basal", Her2+, Tipo "normal", luminal A, luminal B y un subtipo clasificado como "bajo en claudinas", por su denominación en inglés (Malhotra et al., 2010).

En los últimos años investigadores de todo el mundo participan en un proyecto llamado “El Atlas del Genóma del Cáncer” (TCGA, por sus siglas en inglés) una colaboración coordinada entre los institutos estadounidenses, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional de Investigación del Genóma Humano (NHGRI, por sus siglas en inglés) para mapear el genoma del cáncer de mama y de otros 32 tipos de cáncer. Esta investigación emplea un enfoque “multi-omic” la cual involucra diferentes plataformas tecnológicas como son: arreglos de número de copias de DNA genómico, arreglos de metilación de DNA, secuenciación de exoma, arreglos de mRNA, secuenciación de microRNA y arreglos de proteínas de fase reversa, todo con la finalidad de desarrollar información más completa e integrada sobre el cáncer. (The Cancer Genome Atlas et al., 2012).

En el cáncer de mama hasta el momento se han encontrado resultados interesantes en los dos tipos de neoplasias que tienen una mayor incidencia en la población: el carcinoma ductal y el carcinoma lobular. A grandes rasgos, se han podido identificar nuevos genes específicos mutados para cada subtipo molecular (HER2+, Luminal A, Luminal B, Basal y Claudin low), entre otras características genómicas importantes abriendo nuevas oportunidades para las terapias dirigidas. Por ejemplo, se sabe que la amplificación del gen y de la proteína HER2 está presente en aproximadamente 25% de los tipos de cáncer de mama invasivos, la presencia de HER2 se asocia a un mal pronóstico para los pacientes. A partir de un estudio de microarreglos se propuso utilizar al trastuzumab, un anticuerpo monoclonal como terapia dirigida para el tratamiento de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 (Vegran et al., 2009).

### **3. Microambiente tumoral**

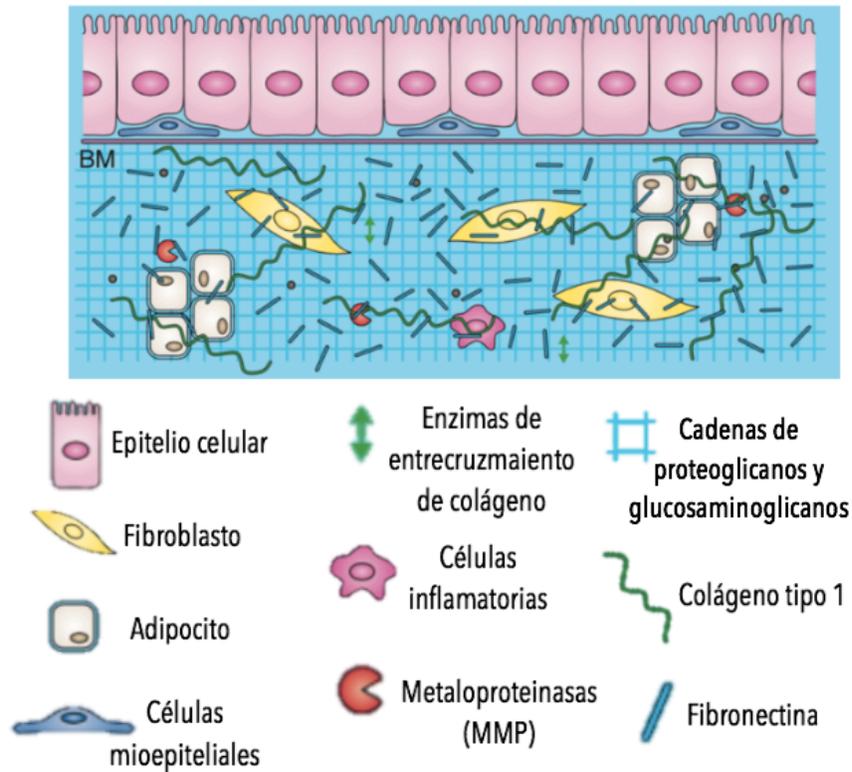
---

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) se define como una compleja red de células tumorales y no tumorales así como de una matriz extracelular, que integran en conjunto la masa de un tumor. En el TME se distinguen varios tipos celulares, por ejemplo las células del sistema inmune como las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), linfocitos T y B, macrófagos asociados al tumor, células supresoras de origen mielóide (MDSC), células dentríticas (DC), neutrófilos asociados al tumor (TAN), fibroblastos asociados a cáncer (CAF), adipocitos y pericitos (Balkwill, Capasso, & Hagemann, 2012). Todos estos tipos celulares juegan un papel crucial en la progresión del cáncer y la metástasis ya que a través de diferentes vías, proporcionan un entorno adecuado para la supervivencia de las células tumorales (Giussani, Merlino, Cappelletti, Tagliabue, & Daidone, 2015).

### **4. Matriz Extracelular**

---

Los tejidos en mamíferos, no están formados sólo por células, una parte de su volumen lo conforma el espacio extracelular, donde existe una compleja red de macromoléculas que constituyen la matriz extracelular (MEC). Esta matriz está formada por componentes que se secretan localmente y se encuentran interconectados en una malla organizada y asociada a la superficie de la célula que los produjo. Se clasifican en dos grandes grupos: 1) cadenas de polisacáridos llamados glicosaminoglicanos (GAGs) generalmente unidas covalentemente a proteínas en forma de proteoglicanos y 2) proteínas fibrosas como: colágeno, elastina, fibronectina y laminina, las cuales tienen funciones estructurales y adhesivas (Fig. 7). La variación en las cantidades de los diferentes tipos de macromoléculas y la forma en que se organizan en la MEC dan origen a una diversidad de formas que se adaptan a los requisitos funcionales del tejido que las forma. La MEC hace décadas sólo era considerada una estructura de soporte para las células, actualmente se sabe que es un componente clave de los tejidos y que regula la supervivencia, desarrollo, forma, polaridad y comportamiento, determinando procesos celulares importantes como la supervivencia, proliferación, migración, diferenciación y la apoptosis (Alberts B. et al., 2002).



**Figura 7. Principales componentes moleculares de la matriz extracelular.** La matriz extracelular está compuesta por una combinación muy compleja que le confiere un papel importante en una extensa variedad de procesos como son: la adhesión celular, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis (Imagen tomada y modificada de: (Frantz, 2010).

La remodelación de la MEC es necesaria para que las células tumorales la atraviesen con movimientos mesenquimales; sin embargo, en ausencia de proteasas y en ciertos microambientes, las células tumorales tienen la capacidad de empujar y deformar la MEC con movimientos ameboides (Castro-Castro et al., 2016).

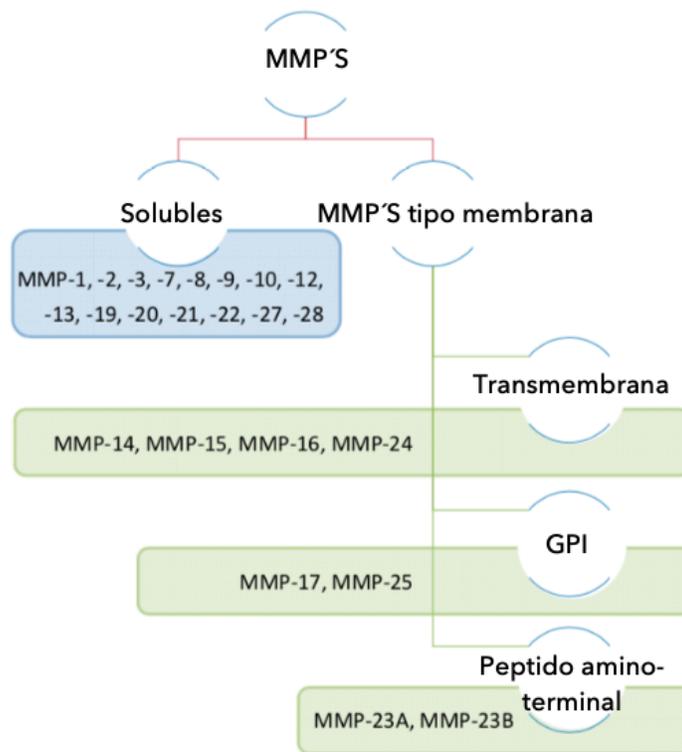
Existen varias familias de proteasas como las serin-proteasas, aspartato-proteasas, cistein-proteasas y las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) (Müller-Esterl, 2008) las cuales se encargan de remodelar los componentes que integran dicha MEC, activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión (Angosto & Álvarez-Gómez, 2010).

## 5. Metaloproteasas de matriz (MMPs)

---

Las metaloproteasas (MMPs) pertenecen a una familia extensa de metalopeptidasas denominadas "metzininas". Dentro de este grupo también se encuentran las serralisinas, astacinas y las adamalisinas (ADAM's) (Stöcker & Bode, 1995). Su actividad proteasa es dependiente del ión zinc ( $Zn^{2+}$ ) y requieren de la presencia de calcio para llevar a cabo su acción biológica y mantener su estabilidad. Al degradar prácticamente todos los componentes de la MEC actualmente se considera que son muy importantes para la regulación de la homeostasis en el microambiente. La mayoría de las MMPs son sintetizadas como proenzimas y se activan por diversos mecanismos como la acción autocatalítica y de otras proteasas originando cascadas de activación (Flores Reséndiz, Castellanos Juárez, & Benítez Bribiesca, 2009).

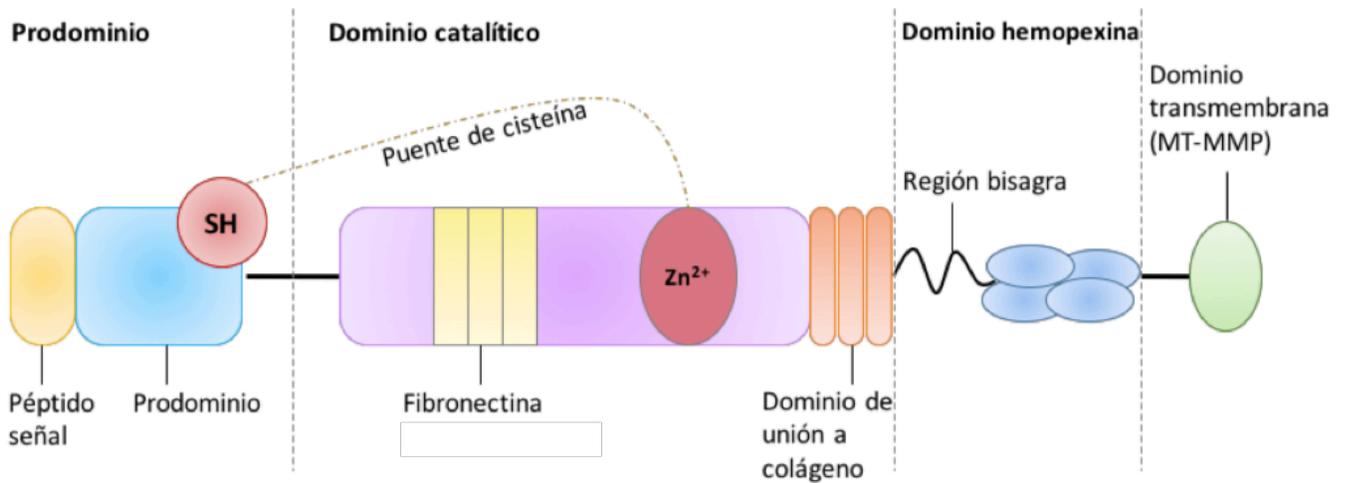
En 1962 Gross y Lapiere describieron a las MMPs por primera vez en la metamorfosis del renacuajo y desde entonces se han estudiado principalmente en vertebrados debido a sus enormes implicaciones en diferentes enfermedades como el cáncer (Iyer, Patterson, Fields, & Lindsey, 2012; Marino-Puertas, Goulas, & Gomis-Ruth, 2017). Hasta el momento se han identificado 24 MMPs en los seres humanos y están clasificadas en dos diferentes grupos: las MMPs solubles y las MMPs ancladas a la membrana por un dominio transmembranal, un glicofosfatidilinositol (GPI) o un péptido señal amino-terminal (Fig. 8). (Yip, Foidart, Noël, & Sounni, 2019).



**Figura 8. Clasificación de las MMP's de acuerdo a su estructura.** Las MMP's se clasifican principalmente en dos grupos: las MMP's solubles y las MMP's de membrana que se anclan por un dominio transmembrana, un GPI o un péptido amino terminal (Imagen tomada y modificada de (Yip et al., 2019).

## 5.1 Estructura de las MMPs

La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios: un péptido señal, que permite que la proteína se secrete desde la célula al espacio extracelular; un propéptido amino-terminal con residuos de cisteína (utilizados para proteger y evitar la activación del dominio catalítico carboxi-terminal); y un dominio catalítico en el cual el centro activo tiene un átomo de Zinc que se coordina con tres histidinas, en este sitio se origina la degradación de sustratos. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes: un dominio tipo hemopexina que media la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, un dominio transmembranal en el caso de las MMP asociadas a la membrana plasmática (MT-MMP, del inglés membrane type MMP) o una región hidrofóbica glicofosfatidilinositol (Fig.9) (Angosto & Gómez, 2010).



**Figura 9. Estructura básica de las metaloproteinasas.** Su estructura posee cuatro dominios principales: prodominio, dominio catalítico, dominio tipo hemopexina y dominio transmembrana (Imagen tomada de: Alonso I., 2017).

## 5.2 Signos distintivos del cáncer y MMPs

Aunque la primera función que se descubrió de las MMPs fue la degradación de los componentes estructurales de la MEC, actualmente sabemos que procesan otros sustratos que no son componentes de la matriz extracelular como receptores, o citocinas teniendo efectos pleiotrópicos. Se considera que participan en numerosos procesos en distintas enfermedades y especialmente en el establecimiento del microambiente tumoral durante la progresión del cáncer. Diversos estudios han relacionado a las MMPs con algunos de los signos distintivos del cáncer los cuales, se describen a continuación.

## 5.3 MMPs, invasión y metástasis

La metástasis implica la diseminación de células tumorales a través de una cascada de eventos hasta su paso a los vasos sanguíneos o linfáticos para permitir el crecimiento de tumores en órganos secundarios. Se sabe que las MMPs facilitan la invasión a través de la degradación de la MEC, ya que actúan directamente en

las células tumorales induciendo características celulares invasivas, también estimulan un fenotipo invasivo y metastásico en varios tipos de células epiteliales como de: ovario, riñón, pulmón, páncreas y próstata, mediante la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) (Radisky & Radisky, 2015). Estudios recientes indican que las células tumorales metastásicas se localizan en sitios llamados “nichos pre-metastásicos”. Las MMPs juegan un papel importante en la formación de estos nichos remodelando la MEC, regulando la angiogénesis y liberando y activando factores de crecimiento (Kaplan et al., 2005).

#### **5.4 MMPs y la proliferación celular**

La proliferación desregulada es una característica de las células cancerosas, en donde las MMPs contribuyen de manera importante en la interrupción del balance entre las señales de crecimiento y su inhibición en el microambiente tumoral, ya que regulan la disponibilidad y funcionalidad de diversos factores (Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010). Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés) (Massagué, 2008) y el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), esenciales para la homeostasis tisular y la proliferación celular, son procesados por las MMPs (Yu & Stamenkovic, 2000).

#### **5.5 MMPs y apoptosis**

La apoptosis, es otro proceso que comunmente se altera y que, utilizan las células transformadas para incrementar en número y el tamaño de los tumores. La apoptosis inicia a través de receptores extracelulares llamados Receptores de muerte (por ejemplo: Fas), activando una cascada proteolítica que conduce a la degradación de los compartimentos subcelulares y finalmente el DNA nuclear. Las MMPs modifican esta acción separando ligandos o receptores que trasducen señales proapoptóticas (Kessenbrock et al., 2010).

## 5.6 MMPs y angiogénesis

La angiogénesis juega un papel importante en la progresión tumoral ya que para que los tumores continúen creciendo y comiencen a migrar las células, necesitan formar nuevos vasos sanguíneos. Las MMPs pueden actuar negativa o positivamente como reguladores de la angiogénesis dependiendo de la etapa de un tumor y de la disponibilidad de sustratos. Las MMPs que participan en la angiogénesis tumoral principalmente son MMP-2, -9 y -14 y en menor medida MMP-1 y -7 (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2011).

## 5.7 MMPs e inflamación

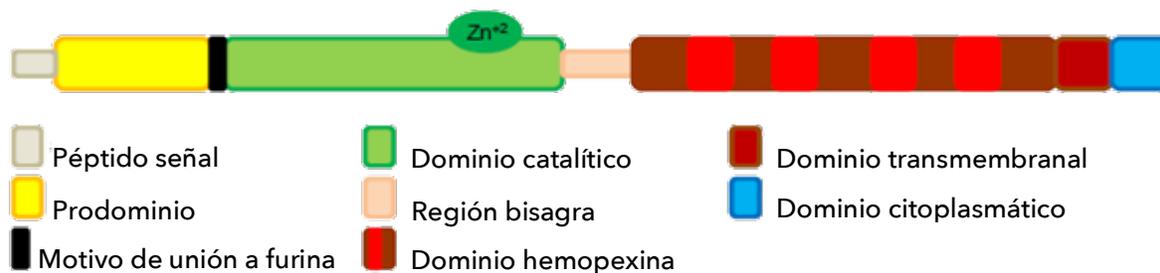
El proceso de inflamación y la producción de citocinas por parte de las células inmunes están relacionados con la progresión del cáncer (Lin & Karin, 2007). Se ha observado que las MMPs son reguladores importantes de la inmunidad innata y adquirida, además modulan la función de las citocinas y quimiocinas en el microambiente tumoral (Kessenbrock et al., 2010).

## **6. Metaloproteasa de matriz de tipo Membranal 1 (MT1-MMP)**

La MT1-MMP, también denominada MMP-14, desempeña un papel fundamental en las células tumorales debido a los diversos mecanismos proteolíticos y no proteolíticos que realiza, y por su expresión en diferentes tipos de células invasivas y proliferativas, incluidas las células cancerosas y las células estromales (Planchon et al., 2018) (Cepeda, Pelling, Evered, Leong, & Damjanovski, 2017) (Sakamoto & Seiki, 2017).

En el genoma humano, la MT1-MMP está codificada por el gen MMP14 ubicado en el cromosoma 14, se distingue de otras MMPs solubles por la presencia de un dominio transmembranal C-terminal y por su dominio citoplasmático (Fig.10). La MT1-MMP está regulada transcripcional y postraduccionalmente (glicosilación, fosforilación, palmitoilación, formación de enlaces disulfuro) como una proteasa y como una proteína de membrana (Pahwa, Stawikowski, & Fields, 2014). La MT1-

MMP se sintetiza como un zimógeno inactivo y se activa intracelularmente mediante la acción de proteínas convertasas (Chernov, Sounni, Remacle, & Strongin, 2009). Se ha reportado que en células de cáncer de colon la actividad de la MT1-MMP es de corta duración, ya activa y unida a la membrana plasmática tiene una vida media promedio de 1 hora. (Deryugina et al., 2004; Strongin, 2010), lo cual sugiere que su actividad es regulada finamente en al menos estas células tumorales.



**Figura 10. Estructura básica de la MT1-MMP.** La MMP-14 posee los dominios básicos descritos previamente para las MMPs, además de un dominio transmembranal (rojo) y un dominio citoplasmático (azul) y está clasificada dentro de las MMPs ancladas a la membrana.

La expresión de la MT1-MMP se encuentra incrementada en muchos tumores y se asocia a un mal pronóstico en pacientes con diferentes tipos de cáncer como: cáncer de mama, ovario, pulmón; por mencionar algunos. (Lafleur, Xu, & Hemler, 2009) (Watkins et al., 2009) (Zarrabi et al., 2011). Se ha observado que la sobreexpresión de MT1-MMP aumenta el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Tomari et al., 2009).

Se sabe que la MT1-MMP posee la capacidad de degradar varios componentes de la MEC como: las colágenas tipo I, II y III, la fibronectina, vitronectina, elastina K y la laminina-5 (Gilles et al., 2001). MT1-MMP es el único activador de la proMMP-2 soluble, la activación de la MMP-2 facilita la destrucción de la matriz; ambas MMPs están estrechamente relacionadas y están reguladas por su inhibidor tisular TIMP-2. El complejo MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 juega un papel

importante en la conducta invasiva de muchos tipos de células, ya que forma parte de la cascada de activación de las MMPs.

Otro punto de regulación en esta cascada fue descrito por Cepeda y col. (2017). Ellos demostraron que en células MCF-7 que llevan el transgen para la MT1-MMP y la expresan de forma estable, la fosforilación de ERK1/2 incrementaba. La vía de señalización ERK1/2 es esencial para muchos procesos celulares como la migración, la proliferación y la apoptosis. Cuando se inhibió la vía de señalización MAPK en esta misma línea celular que sobreexpresaba la MT1-MMP, se observó que la transcripción de MMP-2 incrementaba y la de MMP-9 disminuía, sugiriendo un mecanismo en cascada de la regulación de la expresión de estas MMPs por la MT1-MMP (Cepeda, Evered, Pelling, & Damjanovski, 2017).

La mayoría de las investigaciones han demostrado exitosamente las funciones de la MT1-MMP como una proteasa (catalítica) en procesos como la proliferación, invasión y metástasis; sin embargo, la MT1-MMP también posee actividad no proteasa (no catalítica), que involucra a su dominio tipo hemopexina o al dominio citoplasmático. Por ejemplo, se ha observado que la MT1-MMP forma un complejo en la superficie celular con su inhibidor fisiológico TIMP-2 para inducir la proliferación celular y la migración en células de cáncer de mama MCF-7. Esta actividad requiere de la cola citoplasmática de la MT1-MMP e implica la activación de ERK1/2 pero no de su actividad catalítica (García-Pardo & Opdenakker, 2015). Otro ejemplo de la actividad no catalítica de la MT1-MMP fue descrito por Sakamoto y col; 2017. La hipoxia es un factor que promueve el efecto Warburg (fenómeno en el cual las células malignas incrementan el metabolismo de la glucosa) y la transición epitelio-mesénquima mejorando las características migratorias e invasivas de las células. Sorprendentemente, Sakamoto y col., 2017 observaron que el dominio citoplasmático de la MT1-MMP se une a FIH-1 (factor inducible de hipoxia) y a Mint3 (Miembro de la familia A de unión a la proteína precursora de beta amiloide 3), reguladores clave de la acción de HIF. La unión FIH-1-Mint3 forma una interacción estable e impide la inactivación de HIF por hidroxilación. De esta manera, MT1-MMP activa a HIF durante la normoxia e induce la expresión de distintos genes, incluida la misma MT1-MMP (Sakamoto & Seiki, 2017).

Finalmente, es interesante mencionar que se ha observado que la inhibición de la mayoría de las MMPs en ratones no tiene un efecto significativo; sin embargo, los ratones knock-out de MT1-MMP presentan enanismo, dismorfismo craneofacial, artritis, osteopenia y fibrosis en tejidos blandos (Chernov et al., 2009)

## **7. RNAs no codificantes y su papel en cáncer**

---

La identificación reciente de una gran cantidad de transcritos no codificantes se ha relacionado con el control de diferentes procesos celulares claves desregulados en la carcinogénesis (Schmitt & Chang, 2016; Y. Tang et al., 2017). En particular, los RNA largos no codificantes (lncRNA) son un grupo de transcritos de más de 200 nucleótidos de largo, sintetizados en su mayoría por la polimerasa II, algunos son procesados como los RNA mensajeros (“capping” al 5’, poliadenilados al 3’ y pasan por procesos de corte y empalme de exones o “splicing”) (Chen, 2016). Regulan la expresión génica de manera transcripcional y postranscripcional en diversos contextos celulares y procesos biológicos. Sus mecanismos de acción son diversos, pueden actuar como andamios, señuelos o señalizadores para proteínas. Además, actúan sobre blancos genéticos en forma *cis* o *trans* o por interferencia antisentido (Fanucchi & Mhlanga, 2017). Así, los lncRNAs son un grupo muy diverso de moléculas, que también se caracterizan por un nivel de expresión menor comparado con los transcritos codificantes, la cual es tejido-específica y está limitada a ciertos estados del desarrollo (Chen, 2016; Su et al., 2014).

Algunos lncRNA han sido implicados directamente en la carcinogénesis de la mama. Incluso, la expresión diferencial de algunos lncRNA, tanto en tejidos como en líneas celulares, se asocia con grupos jerárquicos que se relacionan con los subtipos de la clasificación PAM50 (basada en la expresión diferencial de los RNA mensajeros) (Su et al., 2014; Wu et al., 2016). Recientemente, se demostró que existe una co-expresión entre algunos lncRNA y mRNA al comparar los tejidos normales con los de tumor de mama. En este contexto se observó que algunos lncRNA juegan un papel importante en la regulación de la proliferación, expresión de genes del ciclo celular y crecimiento mitogénico dependiente de

estrógeno en células MCF-7 de cáncer de mama (Lv et al., 2016; Sun, Gadad, Kim, & Kraus, 2015; J. Wang et al., 2017). En otro estudio se identificó un grupo específico de 4 lncRNA que se encuentran desregulados de forma característica en células triple negativo de cáncer de mama (Wu et al., 2016). Asimismo, la participación de algunos lncRNA ha sido descrita en el proceso metastásico del cáncer de mama. Por ejemplo, el lncRNA-ROR se ha relacionado con la inducción epitelio-mesénquima en tejidos provenientes de tumores de cáncer de mama. En concordancia, en otro estudio se encontró un grupo de lncRNA característicos al proceso de transición epitelio-mesénquima en la línea celular MCF10A de células epiteliales de la mama humana (Hou et al., 2014). Por otro lado, se identificó al lncRNA NKILA como un supresor de la metástasis de células de cáncer de mama que actúa a través de la regulación de la vía de NF- $\kappa$ B (Liu et al., 2015) Existen otros ejemplos de lncRNA implicados en el cáncer de mama; sin embargo, se desconoce aún la funcionalidad de la gran mayoría de estas moléculas, así como su participación y mecanismo de acción preciso.

Recientemente algunos lncRNA han sido asociados a la regulación de la expresión de la MT1-MMP en diferentes tipos de cáncer. Li y colaboradores, reportaron que el lncRNA MALAT regula la expresión de varias MMPs, entre ellas la MT1-MMP (Y. Li et al., 2017). Independientemente, Zheng y su grupo observaron que en las células de carcinoma de ovario, el lncRNA UCA1 funciona como esponja del miR-485-5p, quien tiene como blanco al mensajero de la MT1-MMP (Zheng et al., 2017). Por otra parte, se reportó que ZFAS, un lncRNA asociado a metástasis en carcinoma hepatocelular, funciona como esponja del miR-150, quien regula la expresión de MT1-MMP (Yang, Li, Cheng, & Jiang, 2018).

### III. Justificación

---

El cáncer de mama en México constituye la primera causa de muerte oncológica en la población femenina. Más del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer de mama se deben a las metástasis, esto debido a la falta de biomarcadores eficientes y específicos que nos permitan predecir en pacientes de alto riesgo la probabilidad de generar metástasis. La MT1-MMP está implicada en varios procesos celulares que al alterarse llevan a la progresión tumoral, debido a la capacidad que tienen para remodelar la matriz extracelular y activar moléculas y citocinas que estimulan la migración y la proliferación de las células cancerosas. Algunos estudios han analizado el transcriptoma bajo la influencia de la MT1-MMP en células de fibrosarcoma HT1080 y durante el desarrollo de la glándula mamaria en el embrión del ratón. No obstante, en células de cáncer de mama se desconocen las moléculas que regulan los procesos celulares inducidos por la MT1-MMP. Así, este estudio proyecta analizar los cambios en el perfil transcripcional de las células MCF-7 de cáncer de mama producidos por la sobreexpresión de la MT1-MMP con la idea de tener un panorama integral de las funciones de esta enzima.

## **IV. Hipótesis**

---

La sobreexpresión de la MT1-MMP modifica la expresión de distintos RNAs y las funciones de las células de cáncer de mama MCF-7.

## **V. Objetivos**

---

### **1. Objetivo General**

Determinar el efecto de la MT1-MMP en el patrón de expresión diferencial de los ARNs en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

### **2. Objetivos particulares**

- 1.** Generar líneas celulares estables que sobreexpresan la MT1-MMP a partir de las células MCF-7 de cáncer de mama.
- 2.** Determinar el perfil de expresión de los genes por RNA-seq de las líneas celulares estables de MCF-7.
- 3.** Validar el nivel de expresión de algunos RNAs en las líneas celulares estables de MCF-7.
- 4.** Analizar las anotaciones ontológicas de los datos obtenidos de la secuenciación del transcriptoma e identificar los RNAs diferencialmente expresados relacionados con procesos celulares alterados en cáncer.

## **VI. Materiales y Métodos**

---

### **1. Cultivo de células MCF-7**

La línea celular MCF-7 se adquirió del ATCC (American Type Culture Collection) y se mantuvo en medio DMEM (Cat. No. 10-013 CMR 1L *Corning*, USA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Cat. No. 26140-079 *Gibco*) en placas de cultivo, en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para generar las líneas celulares estables, se emplearon células de pases tempranos (3-6). Las células a una confluencia del 85-90% fueron despegadas utilizando 1 mL de PBS 1X (Buffer salino de fosfatos) con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) al 0.5% y 50 µL de Tripsina (Cat. No. 25200-056 *Gibco*) por 5 min. Posteriormente se les adicionaron 4 mL de medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), esto para inhibir la acción de las proteasas. A continuación las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min y resuspendidas en medio DMEM enriquecido con 5 % de SFB. Finalmente 800,000 células fueron sembradas en 6 cajas de 35 mm para obtener un triplicado biológico de cada condición, como se explicará a continuación en la sección de transfección estable.

### **2. Plásmidos**

El vector pcDNA3.1-MT1-MMPmCherry fue empleado para expresar la MT1-MMP (donado por el Dr. Philippe Chavrier del Instituto Curie, París, Francia) y como plásmido control se empleó el vector pCDNA3.1.

La construcción del plásmido con la secuencia de la MT1-MMP humana está descrita en el artículo de Sakurai-Yageta, et. al. (2008). El cDNA de la MT1-MMP humana fue obtenido de RZPD-GmbH (número de clonas IRAKp961P20107QQ2 e IRAKp96100484QQ2). La MT1-MMP-mCherry fue generada por PCR usando la misma estrategia, insertando la mCherry entre los aminoácidos 534 y 535, N-terminales a la región transmembranal (Sakurai-Yageta et al., 2008)

### 3. Transformación de bacterias

Para la transformación de bacterias se utilizó el kit TransformAid Bacterial Transformation System (*Thermo Scientific*). Se inocularon 60  $\mu\text{L}$  de bacterias *Escherichia coli* (cepa XL1 blue) en una placa de petri con medio LB/agar a 37°C por 24 horas. Al siguiente día se sacaron las placas de la incubadora y se tomó una porción de bacterias de 0.4 x 0.4 cm de la zona con mayor crecimiento bacteriano, esta porción se resuspendió en 1.5 mL de medio "C" y se incubó a 37°C en agitación durante 2 horas. Posteriormente el pellet de bacterias se centrifugó por un minuto y se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de solución T. Este paso se repitió nuevamente adicionando 120  $\mu\text{L}$  de solución T dejando finalmente incubar por 5 min en hielo. Después de la incubación, en nuevos tubos de 1.5 mL se adicionaron 50 pg de plásmido control pcDNA 3.1 y 50 pg de plásmido pCDNA3.1-MT1-MMPmCherry. Posteriormente se dió un choque térmico por 30 seg a 42°C, se adicionaron 250 mL de medio SOC y se dejó incubar por 1 hora a 37°C en agitación a 230 rpm. De esta mezcla de bacterias transformadas se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se cultivaron en placas de medio LB/agar con ampicilina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 12 horas a 37°C.

### 4. Extracción de los plásmidos

Las colonias separadas de bacterias se aislaron y se pusieron en tubos de 3 mL de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina, a 37° C por menos de 8 horas. Transcurrido este tiempo se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del precultivo y se incubó en un matraz con 250 ml de medio LB con ampicilina durante 12 hrs. Las bacterias fueron centrifugadas a 6,000 rpm durante 10 minutos. Para la extracción de los plásmidos se empleó el Kit Hi Speed Midi prep (*QIAGEN*) utilizando el protocolo del fabricante y se describe brevemente a continuación. El pellet de bacterias se resuspendió en 6 ml de Buffer P1, después se añadieron 6 ml de Buffer P2 (invirtiendo de 4 a 6 veces o hasta que la solución se torne azul) y se incubó por 5 min. En seguida se agregaron 6 ml de Buffer P3 y se dejó incubar por 10 minutos. Para el precipitado del DNA del lisado celular se adicionaron 3.5 ml de isopropanol dejando reposar por 5 min a temperatura ambiente. A continuación

el lisado celular se lavó con 2 ml de etanol al 70% y finalmente el DNA se eluyó con 500  $\mu$ L de agua milliQ. La cuantificación de la pureza de ácidos nucleicos obtenidos se realizó en un espectrofotómetro (Nano Drop N-1000, Thermo Scientific) y posteriormente con estos datos, los plásmidos fueron utilizados para transfectar las células MCF-7 de cáncer de mama. Se verificó que la pureza de los plásmidos tuviera una relación 260/280 nm mayor a 1.80.

## 5. Transfección estable

Para la transfección estable de las células MCF-7 se sembraron 800,000 células por pozo en medio DMEM suplementado con 5% de SFB, en una placa de 6 pozos durante 24 hrs. Posterior a este tiempo las células se lavaron dos veces con medio DMEM sin suero. Se elaboró una mezcla de transfección independiente para cada vector. Por cada pozo correspondiente se colocaron 3  $\mu$ g de cada plásmido, pcDNA3.1 y pcDNA 3.1-MT1-MMPmCh respectivamente, en 100  $\mu$ L de medio sin suero y se incubó 5 minutos. Después se agregaron 7  $\mu$ L de lipofectamina 2000 (No. Cat. P/N 52887, *Invitrogen*) a cada tubo, se mezcló suavemente y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se retiró el medio a las células, se añadió la mezcla de transfección respectiva a cada pozo, se añadieron 900  $\mu$ L de medio sin suero y se incubó toda la noche. Al día siguiente se retiraron las mezclas y se colocó medio DMEM suplementado con 5% de SFB con Geneticina (G418) (Cat. No. A1720-5g, *Sigma-Aldrich*) 0.6  $\mu$ g/mL durante 4 semanas para generar líneas celulares estables. Las células seleccionadas se mantuvieron en crecimiento en DMEM con 5% SFB durante todos los experimentos posteriores y a partir de ese momento las líneas celulares se nombraron como: MCF-7-pcDNA3.1 y MCF-7-MT1-MMP-mCh.

## 6. Extracción de RNA de las líneas celulares estables

La extracción del RNA se realizó con el reactivo TRIzol (Cat. No. 15596018 *Invitrogen*) utilizando el protocolo del fabricante. Brevemente, a los cultivos en monocapa con un 85-90% de confluencia en placas de 35 mm se les removió el medio, posteriormente se les agregaron 500  $\mu$ L de TRIzol Reagent directamente sobre la monocapa y se rasparon con un gendarme estéril para desprender y lisar

las células. El lisado se pipeteó hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogenizar la mezcla y posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo (Cat. No. C2432-500mL, *Sigma-Aldrich*), se dejó incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C y se obtuvo la separación de fases fenol-cloroformo, roja inferior y una fase transparente superior. La fase transparente que contiene el RNA se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol (Cat. No. 19516-500 mL *Sigma-Aldrich*) se dejó incubar durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm a 4°C. El precipitado del RNA total formó un pellet de color blanco en la parte inferior del tubo, con mucho cuidado se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de etanol al 75% diluido con agua DEPC para hacer un primer lavado, el paso anterior se repitió 3 veces y en el último lavado, la pastilla de color blanco se dejó secar hasta que se observó transparente e inmediatamente fue resuspendida en 30  $\mu$ L de agua MilliQ libre de nucleasas. La cuantificación de la pureza de los RNAs obtenidos se analizó en un espectrofotómetro (Nano Drop N-1000, *Thermo Scientific*) y en un gel desnaturizante.

## **7. Validación de la sobreexpresión de MT1-MMP**

La validación de la sobreexpresión de la metaloproteasa de membrana tipo 1 se llevó a cabo por PCR en tiempo real (RT-qPCR) y se utilizaron dos técnicas: la transcripción reversa que es la síntesis de un DNA monocatenario (cDNA o DNA complementario) mediante un RNA monocatenario como plantilla mediado por la transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) capaz de generar millones de copias de una secuencia específica de DNA blanco a través de la enzima DNA polimerasa.

## 8. Retro-Transcripción (RT) o síntesis del DNA complementario (cDNA)

Previamente a la síntesis de cDNA, los RNAs aislados primeramente se trataron con DNAsa (Cat. No. M610A *Promega*),. Se utilizaron 1.5 µg de cada muestra de RNA para retro-trascribir a cDNA con el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Cat. No. 4368814 *Thermo Fisher Scientific*) según lo indicado por el fabricante.

## 9. PCR cuantitativa

Una vez generado el cDNA se determinó la sobreexpresión de MT1-MMP en la línea celular MCF-7 con la transfección estable. Para llevar a cabo la q-PCR se emplearon los oligos o cebadores diseñados para el gen MT1-MMP (Tabla 1). La q-PCR se realizó con SYBR® Select Master Mix (Cat No. 4472908 *Applied Biosystems*), para obtener la expresión relativa o *fold change* (FC) de cada gen que se validó se utilizó el método del  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ , la normalización de los resultados se llevó a cabo comparando con la expresión del gen constitutivo TBP (TATA Binding Protein) para las muestras control y las muestras experimentales, empleando cebadores específicos.

**Tabla 1. Cebadores (primers) utilizados para PCR cuantitativa.**

Gen		Secuencia
MT1-MMP	Forward	5'- TGG AGG AGA CAC CCA CTT TGA - 3'
	Reverse	5'- GCC ACC AGG AAG ATG TCA TTT C - 3'
TBP	Forward	5'- CCA CAG CTG TTC CAC TCA CA - 3'
	Reverse	5'- CTG ATG ATT ACC GCA GCA AA - 3'.

## **10. Secuenciación del transcriptoma completo**

El análisis de los cambios en la expresión génica a nivel del transcriptoma en cada cultivo obtenido, fue evaluada mediante la técnica de nueva generación, RNA-seq. La secuenciación del transcriptoma completo o RNA-seq se realizó en la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) mediante el equipo NextSeq500 (Illumina). La secuenciación del genoma completo permite detectar RNA codificante así como RNA no codificante. La metodología consiste en la conversión de RNA a cDNA por medio de la ligación de las secuencias adaptadoras, la secuenciación de los productos para obtener lecturas cortas (reads) y por último la alineación de estos "reads" o lecturas con secuencias genómicas para su posterior identificación.

## **11. Control de calidad**

Para realizar la secuenciación de genoma completo primero se determinó la calidad de las muestras de RNA. El control de calidad fue evaluado por un bioanalizador de electroforesis capilar Agilent RNA 6000 Nano el cual asignó un número de integridad al RNA denominado RIN a cada una de nuestras muestras. Para la secuenciación se emplearon muestras con un RIN mayor a 8.5.

## **12. Análisis del transcriptoma y selección de genes diferencialmente expresados**

Los resultados arrojados por la RNA-seq se analizaron en el programa CLC Genomics, (versión 7.0 CLC Bio-Quigen) por el Dr. Jorge Meléndez Zajgla y se utilizaron diferentes parámetros para el análisis estadístico: en el alineamiento se consideró un máximo de 2 mismatches, 0.9 para la fracción de "largo mínimo", 0.8 para la fracción de similitud, el rango de mapeo fue de  $16 \times 10^6$  a  $28 \times 10^6$  y un  $m$  de 2 hits mínimo por lectura. Los resultados con niveles relativos de expresión menores a 2 ó con menos de 10 lecturas fueron excluidos. Los datos filtrados fueron analizados en plataformas bioinformáticas como GSEA y Key Pathway Advisor en donde sólo fueron considerados los genes con cambios de expresión mayores de 2 y un valor de  $p < 0.05$ .

### 13. Análisis bioinformático por *Key Pathway Advisor*

Key Pathway Advisor (KPA) es una herramienta creada por la empresa Clarivate Analytics (<http://ipscience.thomsonreuters.com/product/metacore/.2016> KPA, Version 17.4 platform) que emplea una base curada de interacciones génicas y se utiliza para el análisis de datos de genes diferencialmente expresados (DEG, por sus siglas en inglés). Este software se centra en la identificación de genes con cambios asociados a las diferentes condiciones propuestas en un experimento. Para utilizar este software se generó un archivo en formato excel de acuerdo a las instrucciones del programa donde se utilizaron únicamente 178 genes sin exceder un máximo de 1000 genes. Estos 178 genes fueron seleccionados con base en su FC y su valor de "p". Después de generar el archivo excel, en primera instancia el software pide que se asignen los parámetros a utilizar, para este caso se decidió utilizar un valor de  $p < 0.05$  y FC de +/- 1.5. Esta herramienta muestra diferentes apartados donde se puede interactuar con la información obtenida.

Para poder interpretar los resultados se utilizan algunos conceptos:

- 1. Mapas de vías patológicas (Pathological Pathway Maps):** Es una lista de rutas y mapas de procesos celulares enriquecidos y representan cambios en vías bioquímicas o cascadas de señalización encontradas en enfermedades específicas, se representan por cambios en genes o proteínas individuales encontrados en nuestros datos.
- 2. Mapas de vías fisiológicas (Physiological Pathway Maps):** Representan rutas bioquímicas o cascadas de señalización. El análisis de estos mapas muestra cómo la actividad de los procesos fisiológicos se vio afectada por la regulación de la expresión diferencial.
- 3. Enfermedades (Diseases):** Proporciona una lista de enfermedades y genes que relacionados con la base de datos y el análisis de enriquecimiento, muestran cambios significativos asociados a enfermedades particulares.
- 4. Redes de procesos (Process Networks):** Una red de procesos representa vías con un mayor número de interacciones entre los genes de nuestra base de datos y los genes de la base de KPA, centrándose en el mecanismo de una molécula clave.

## 14. Validación de la secuenciación

Para validar y corroborar los datos obtenidos en la RNA-seq se realizó RT-qPCR para 4 genes codificantes y 1 lncRNA (RNA largo no codificante). Se utilizó el programa Primer-Basic Local Alignment Search Tool (*Primer-BLAST*) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para el diseño de los seis pares de primers (Tabla 2) y se utilizó el programa Oligo Analyzer IDT (*Integrated DNA Technologies*) para corroborar su eficiencia *in silico*.

**Tabla 2. Cebadores (primers) utilizados para la validación de la RNA-seq.**

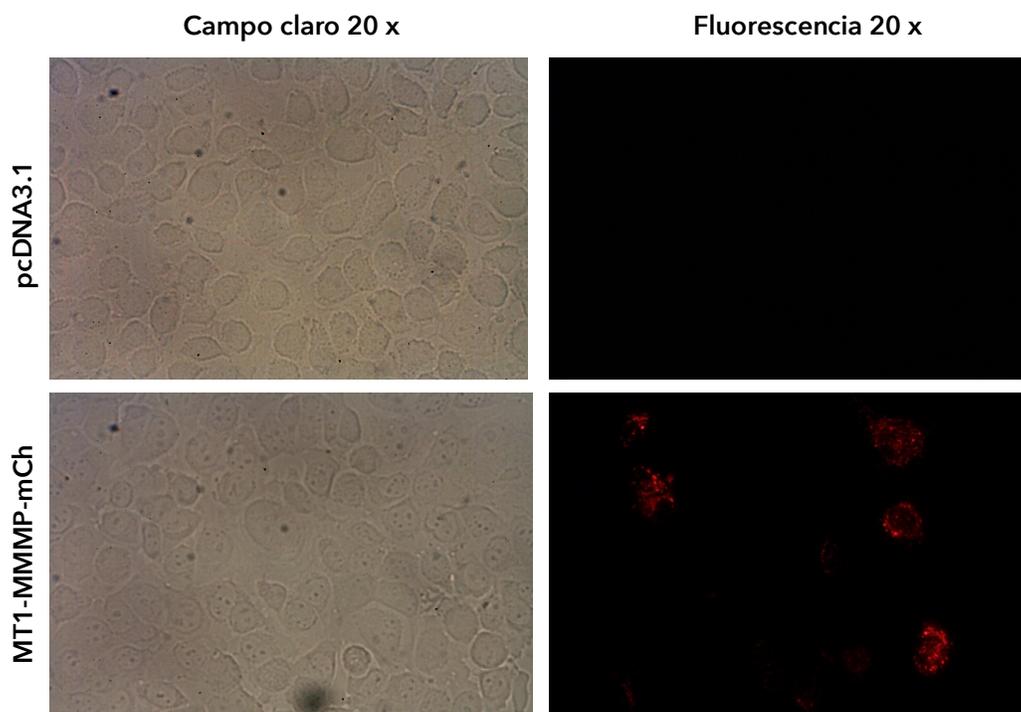
Primers	Secuencia	TM (C°)	Tamaño del producto
<b><i>KLHL13</i></b>			
Fw	TAGGTCTGACACCACTCACT	61.1	116 pb
Rv	TAGGTCTGACACCACTCACT	60.1	
<b><i>LIF</i></b>			
Fw	GTGACCTACGGCCCTGACAC	63.08	171 pb
Rv	ACATCTGGACCCAACCTCCTG	59.6	
<b><i>PABPC4L</i></b>			
Fw	GGCAGATTCAAAAACCGAAA	60.1	101 pb
Rv	TCATCCATGTCACCTCCAAA	60.1	
<b><i>NRP1</i></b>			
Fw	GCTCCGGACCCATACCAGAGAA	57.4	340 pb
Rv	TGCATTCAAGGCTGTTGGGA	60.6	
<b><i>LINC02163-A</i></b>			
Fw	CATTCCTGTGGGTTCTTGGT	59.8	100 pb
Rv	GAAGTACGGCACCAGCATTT	60.1	
<b><i>LINC02163-B</i></b>			
Fw	AACATCTTCAAGGCAGAAACG	60.4	158 pb
Rv	TGCTACTGGTTGCAGGATTTT	61.8	

## VII. Resultados y discusión

---

### 1. Transfección estable

Para generar las líneas celulares MCF-7 estables, las células se transfectoron con los plásmidos pcDNA 3.1 y pcDNA 3.1-MT1-MMPmCherry, que además de tener la secuencia de la MT1-MMP contiene la secuencia para la proteína fluorescente mCherry. La secuencia mCherry fue insertada por PCR entre los aminoácidos 534 y 535 en la región N-terminal del dominio transmembranal de la MT1-MMP (Sakurai-Yageta et al., 2008). Cabe mencionar que la línea celular MCF-7 de cáncer de mama no expresa la MT1-MMP. Después de 24 hrs, se observaron las células en un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 20x donde se observó que aproximadamente un 85% de las células emitían fluorescencia. Por lo tanto, consideramos que la mayoría de las células se transfectoron correctamente con los plásmidos (Fig.11). A partir de este momento las células MCF-7 se mantuvieron bajo selección con G418 (geneticina) a una concentración de 800 µg/mL durante 4 semanas.

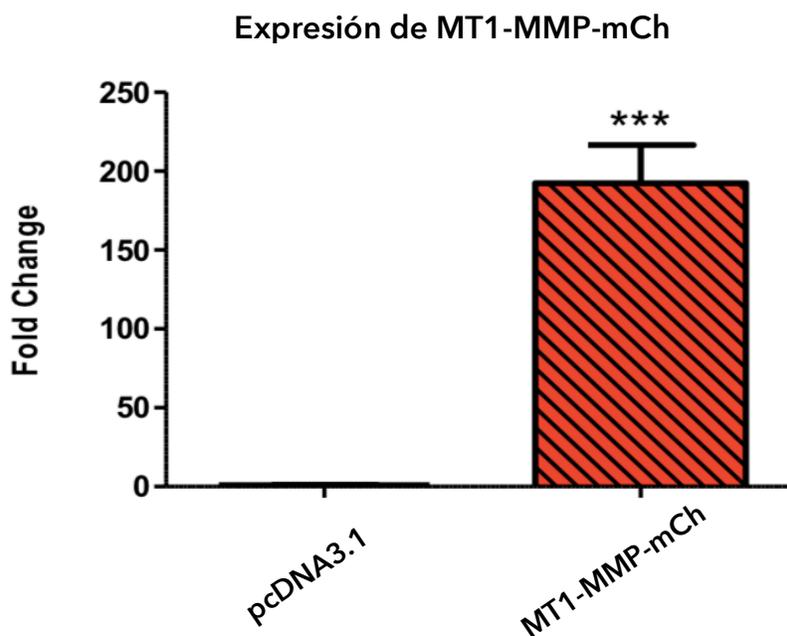


**Figura 11. Líneas celulares estables pcDNA3.1 y pcDNA3.1-MT1-MMPmCh.** En la imagen podemos observar la eficiencia de la transfección con el plásmido pcDNA3.1-MT1-MMP-mCh en células MCF-7, a la izquierda tenemos el total de células observadas en campo claro con un objetivo 20x. La imagen de la derecha presenta las células que incorporaron el plásmido, las células pcDNA3.1 no presenta fluorescencia porque no tiene ninguna proteína fluorescente incorporado en su ADN, al contrario de las células pcDNA3.1-MT1-MMP-mCh que emiten fluorescencia debido al fluoróforo mCherry.

## 2. Sobreexpresión de MT1-MMP

Para corroborar que las líneas celulares se transfectaron establemente, evaluamos la expresión del gen MT1-MMP mediante RT-qPCR en las células MCF-7 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-MT1-MMP-mCh con respecto a las MCF-7 transfectadas con el vector control pcDNA3.1. Para normalizar los resultados de la expresión de la MT1-MMP analizamos la expresión del gen TBP como control. Los datos fueron cuantificados mediante el ciclo umbral (CT) y se calculó la expresión relativa expresada como tasa de cambio o fold change (FC). Observamos que el valor del FC es estadísticamente significativo entre nuestras

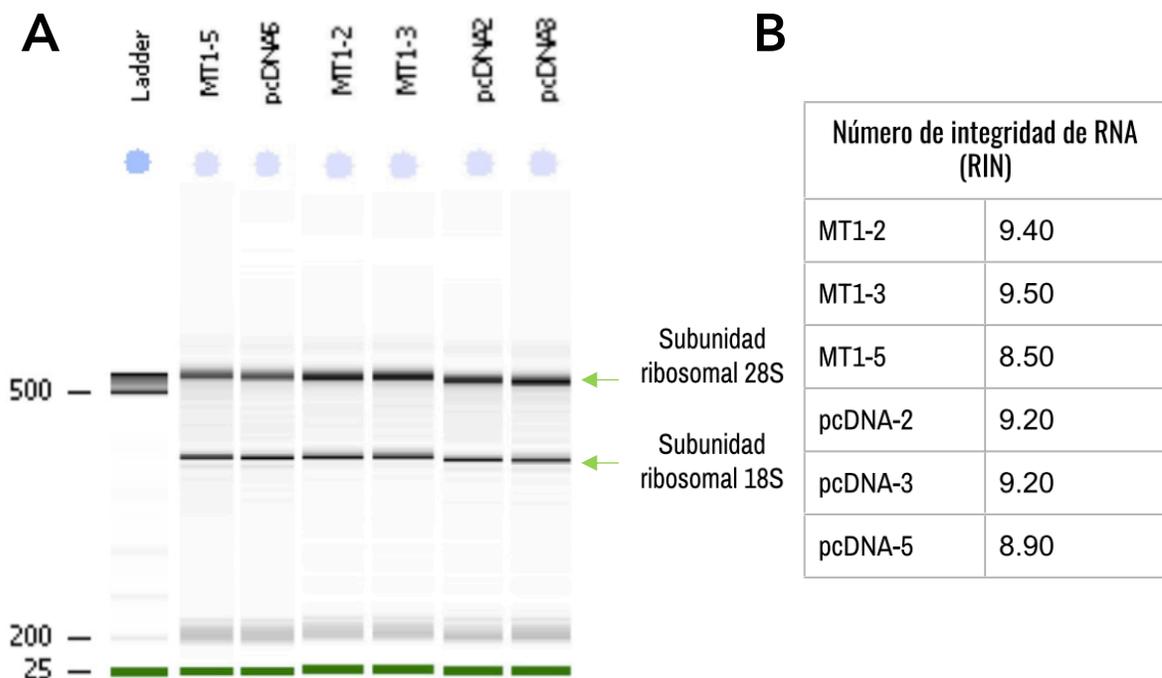
dos líneas celulares estables, es decir, observamos que las células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-MT1-MMP-mCh expresan niveles significativamente altos del gen MT1-MMP (200) en comparación con las células transfectadas con el plásmido control (2.1) (Fig. 12).



**Figura 12. Expresión de la MT1-MMP-mCh en las líneas celulares estables.** En la gráfica se muestra la expresión relativa de la MT1-MMP en las células MCF-7 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-MT1-MMPmCherry en comparación con las células que fueron transfectadas con el plásmido control (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

### 3. Calidad del RNA

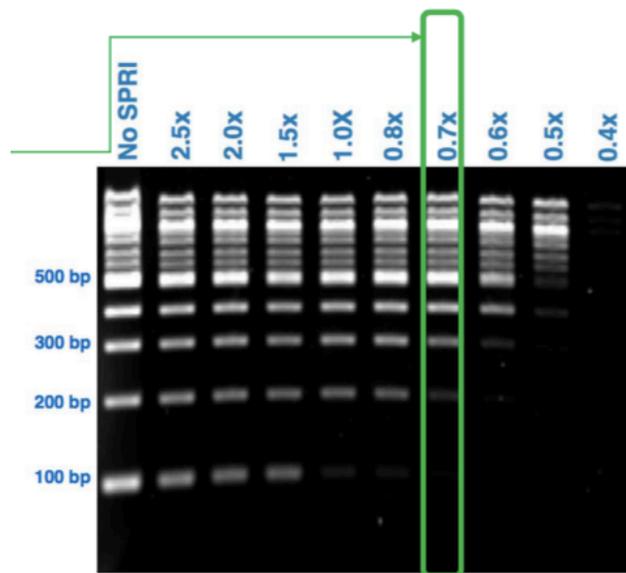
Para relizar la RNA-seq se extrajo el RNA total de 3 réplicas biológicas de cada línea celular estable, MCF-7-pcDNA3.1 y -pcDNA-MT1-MMP-mCh. Se evaluó en primera instancia, la calidad del RNA por la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) con un bioanalizador Agilent RNA 6000 Nano el cual realiza electroforesis capilar y asigna un número de integridad llamado RIN empleando programas computacionales que aplican un algoritmo evaluando la corrida electroforética de cada muestra (Fig.13).



**Figura 13. Determinación de la calidad y electroforesis del ARN.** En la imagen A del lado izquierdo se puede observar el carril del gel que representa el marcador de peso molecular ("ladder") en kb, ésta sirve de guía para visualizar los fragmentos de RNA según el tamaño que tengan en el gel y la intensidad de luz. Las bandas que están señaladas muestran los RNAs 28S y 18S respectivamente y en la imagen B se muestra una tabla con el número de RIN que tuvo cada una de las muestras.

Se sabe por los datos obtenidos y comparando con otros artículos donde realizan secuenciación de nueva generación, que la ejecución de la RNA-seq no fue la óptima debido a que la preparación de las bibliotecas no fue la correcta. Como se puede observar en el gel de electroforesis de la figura 13, nuestras muestras de RNA estaban enriquecidas en fragmentos a partir de 500 pares de bases y de menor peso molecular. Sin embargo, en la figura 14 pudimos observar que la concentración de perlas que se eligió por la unidad de secuenciación del INMEGEN para purificar los cDNAs (rectángulo verde) probablemente no fue la indicada. La concentración de perlas que se eligió fue de 0.7x, por lo que posiblemente perdimos la mayoría de los fragmentos de menos de 500 pb. Se

piensa que al haber quedado fuera la mayoría de los fragmentos de cada biblioteca de esta purificación, al final se obtuvo una lista pequeña de genes diferencialmente expresados. Adicionalmente, pensamos que la eliminación de los rRNA (ribosomales) no fue la óptima ya que la mayoría de los datos que se pudieron alinear pertenecían a rRNA y/o RNAs pequeños.



**Figura 14. Gel de referencia para elegir las perlas para la preparación de las bibliotecas.** El gel muestra los intervalos de dilución de perlas sugeridos por el protocolo TruSeq de acuerdo a los fragmentos de RNA observados en las muestras estándar. Con estos datos se debe seleccionar la concentración de perlas que corresponda mejor al patrón de bandas observado en las muestras a secuenciar.

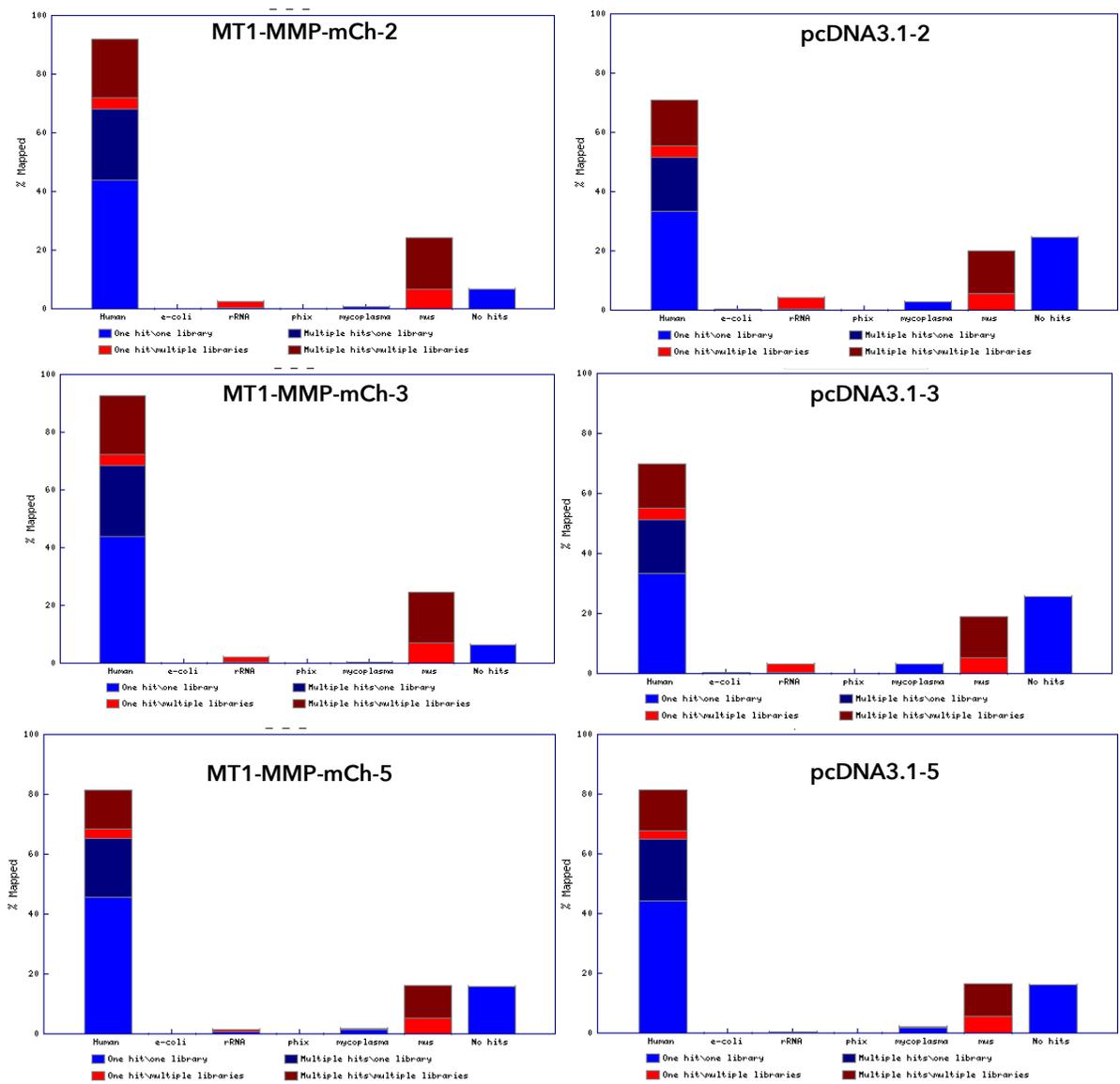
Por otra parte, al inicio de este proyecto se consideró que al analizar todos los datos de la RNA-seq se incluiría información de la parte no codificante del transcriptoma, en especial eran de nuestro interés los lncRNA's. Sin embargo, dados los problemas que se mencionaron anteriormente en la secuenciación, obtuvimos muy pocos datos de ellos. A pesar de esto, con los datos que se obtuvieron se pudo validar la expresión diferencial de 4 genes codificantes y 1 lncRNA (ver sección de validación). Esto quiere decir que probablemente la parte que fue secuenciada es de calidad.

#### 4. Control de calidad de los resultados de la secuenciación

Para analizar los cambios en la expresión génica a nivel de transcriptoma en cada muestra de RNA obtenida de ambas líneas celulares se revisó la calidad del RNA después de la secuenciación. En el gráfico de componentes principales se puede observar que las muestras se agruparon de acuerdo al vector con el que fueron transfectadas, las muestras derivadas de las células MCF-7-MT1-MMP-mCh representadas con los colores: rojo, amarillo y verde están más agrupadas que las muestras del control MCF-7-pcDNA representadas con los colores azul claro, azul rey y rosa (Fig.15). El análisis de componentes principales es una técnica estadística que permite transformar un conjunto de variables correlacionadas entre sí, en un conjunto sintético de variables no correlacionadas denominados factores o componentes principales.

**Figura 15. Análisis de componentes principales (ACP).** El ACP muestra la agrupación de las muestras de ambos grupos en cada plano del gráfico. Las muestras derivadas de las células MCF-7-MT1-MMP-mCh representadas con los colores: rojo, amarillo y verde. Las muestras del control MCF-7-pcDNA representadas con los colores azul claro, azul rey y rosa.

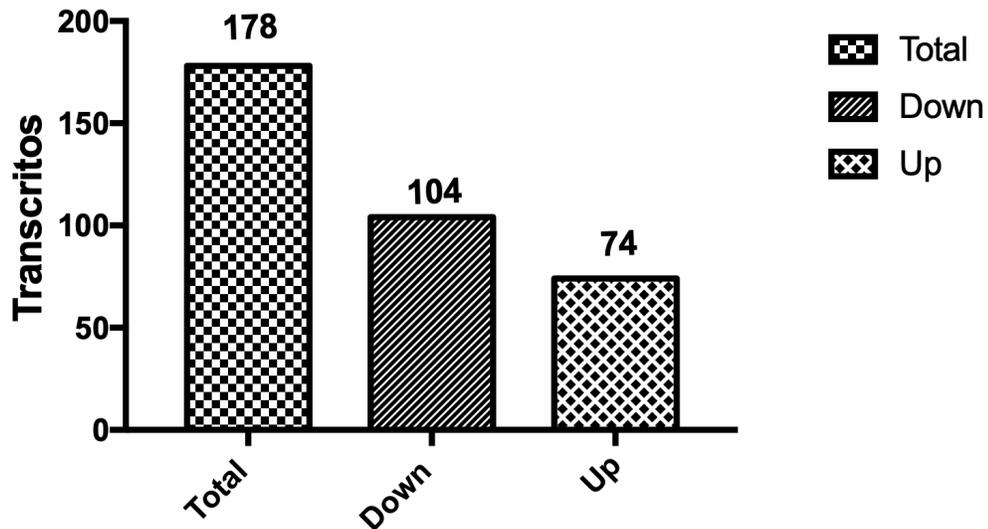
Paralelamente, las lecturas (reads) que se obtuvieron se compararon con bases de datos de genomas de diferentes organismos entre ellos, el genoma humano, el cual muestra lecturas mapeadas del 70% al 90% en cada muestra, además pudimos observar que algunas de nuestras muestras presentaban pequeña contaminación con micoplasma. Esto se ha observado en el 80% de los datos de RNAseq depositados en la literatura (Olarerin-George & Hogenesch, 2015) por lo que se considera que probablemente esto no afecta en el análisis de nuestra base de datos; sin embargo, es importante tenerlo en cuenta (Fig. 16).



**Figura 16. Control de calidad de las muestras de RNA secuenciadas.** Representación gráfica de la comparación de las lecturas con genomas de diferentes organismos en las muestras secuenciadas MT1-MMP-mCh-1,-2,-5 y su respectivo control pcDNA3.1-1,-2,-5. Se puede observar que la mayoría de los transcritos que fueron secuenciados pertenecen a RNA humano y debido a la homología de genes ortólogos con el ratón hay una barra que se comparte parcialmente.

## 5. Expresión génica a nivel transcriptoma

Con base en los datos obtenidos se realizaron diferentes análisis bioinformáticos para determinar el número total de transcritos expresados diferencialmente entre ambas líneas celulares e inferir los procesos celulares y fisiológicos en los cuales pudieran estar involucrados. Estos genes se consideraron a partir de un FC +/- 1.3 y se muestran en la figura 17.



**Figura 17. Representación del total de transcritos.** El número total de transcritos que fueron alterados por la sobreexpresión de la MT1-MMP fue de 178, de los cuales 74 aumentaron su expresión y 104 fueron inhibidos, con un fold change +/- 1.3 y un *p-value* menor de 0.05.

Después de obtener el número total de transcritos expresados diferencialmente entre ambas líneas celulares, se realizó un "heat map" o mapa de calor donde se hizo con una comparación Euclidiana. Se puede observar una lista de genes cuya expresión fue modificada por la sobreexpresión de la MT1-MMP. Las primeras tres muestras de lado izquierdo representan las tres muestras biológicas en las que se sobreexpresa la MT1-MMP y las tres de la derecha muestran al grupo control. Los colores simbolizan la expresión relativa de cada gen: el color verde representa una baja expresión de los genes y el color rojo representa el aumento de los mismos con respecto al control (Fig.18).

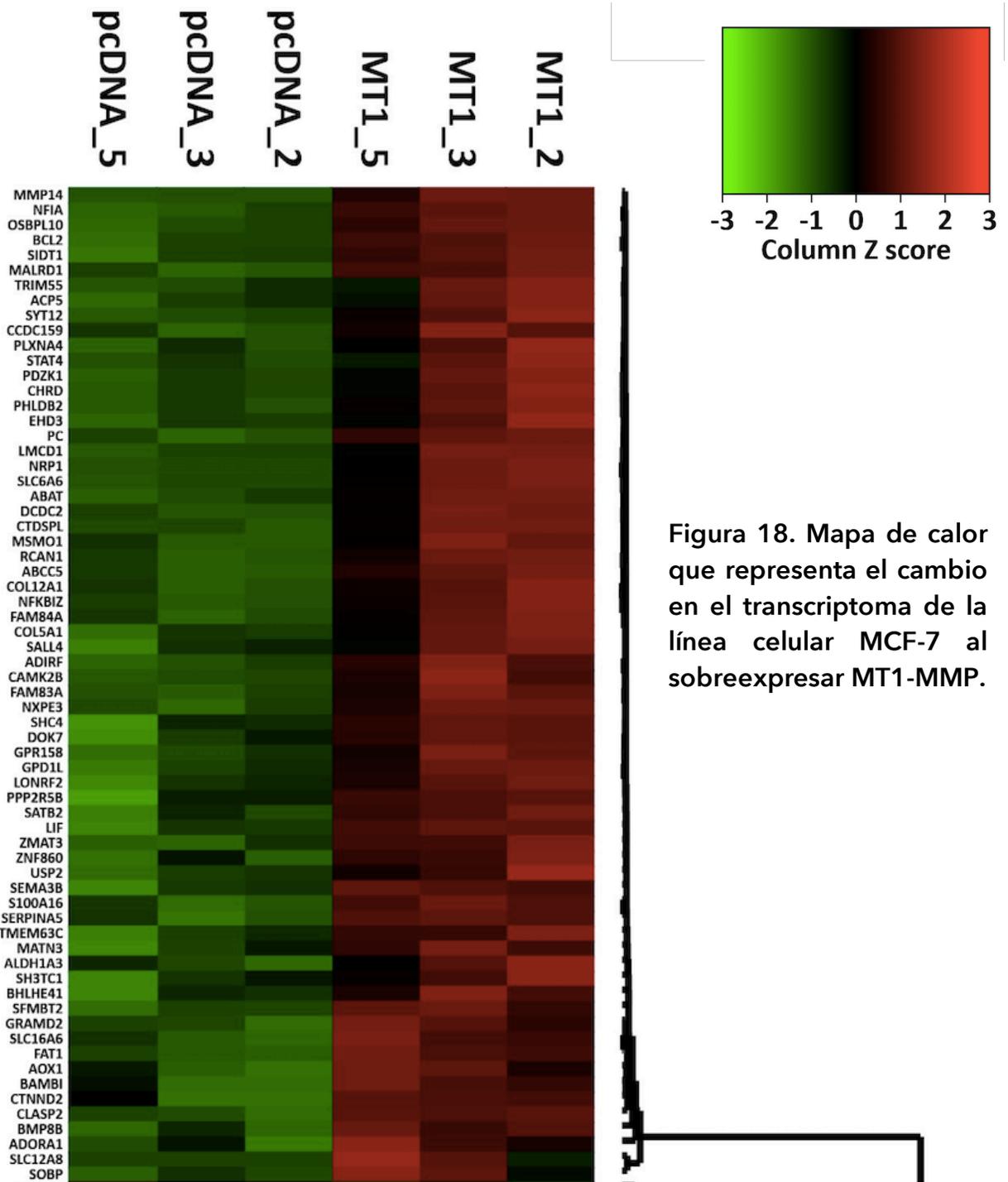


Figura 18. Mapa de calor que representa el cambio en el transcriptoma de la línea celular MCF-7 al sobreexpresar MT1-MMP.



Los 10 genes que presentaron una expresión mas elevada por la modulación de la MT1-MMP se muestran en la Tabla 3. Se puede destacar que dentro de esta lista de genes sobreexpresados se encuentra el gen MMP14 lo que comprueba la sobreexpresión de la MT1-MMP en los datos de la RNA-seq.

**Tabla 3. Lista de genes codificantes diferencialmente sobreexpresados**

	Nombre y símbolo del gen	Función	Fold Change
1	Matrix metallopeptidase 14 <b>MMP14</b>	Actividad proteasa de tipo membranal	52.970
2	GRAM domain containing 2 <b>GRAMD2</b>	Componente de membranas	5.647
3	Signal transducer and activator of transcription 4 <b>STAT4</b>	Factor de transcripción y transductor de señales	5.385
4	Ubiquitin Specific Peptidase 32 Pseudogene 3 <b>USP32P3</b>	Pseudogen	5.292
5	Tripartite motif containing 55 <b>TRIM55</b>	Adaptador transitorio, regulador del ensamblaje de los sacómeros	4.7187
6	Solute carrier family 12 member 8 <b>SLC12A8</b>	Actividad ATPasa, transportador transmembranal de sustancias y actividad importadora	4.383
7	Acid phosphatase 5, tartrate resistant <b>ACP5</b>	Glicoproteína que cataliza la conversión de monoéster ortofosfórico en alcohol y ortofosfato	3.491
8	Aldehyde oxidase 1 <b>AOX1</b>	Produce preóxido de hidrógeno y cataliza la formación de superóxido	3.007
9	Ubiquitin specific peptidase 2 <b>USP2</b>	Miembro de la familia de enzimas desubiquitinadoras, es una proteasa específica que se requiere para la señalización de NF-KB inducida por TNF-alfa (factor de necrosis tumoral)	2.986
10	Synaptotagmin 12 <b>SYT12</b>	Participa en la regulación dependiente del calcio del tráfico de membrana en la transmisión sináptica	2.873

Por otro lado en la tabla 4 se muestran los 10 genes cuya expresión fue mayormente inhibida por la sobreexpresión de MT1-MMP. En esta lista se puede destacar que se encuentran genes importantes en procesos como: la apoptosis, la citocinesis y la exocitosis. Además de receptores de membrana, ligandos, proteasas, proteínas de unión a poli-A y proteínas transmembranales.

**Tabla 4. Lista de genes codificantes diferencialmente inhibidos.**

	<b>Nombre del gen</b>	<b>Función</b>	<b>Fold Change</b>
1	Caspase 14	<b>CASP14</b> Miembro de la familia de la cisteína-ácido aspártico proteasa (caspasa). Papel central en la ejecución de la apoptosis	-6.127
2	Kelch like family member 13	<b>KLHL13</b> Proteína adaptadora, forma complejos ubiquitina-proteína-ligasa con Cullin 3 y otras proteínas. Importante para la segregación correcta de los cromosomas y completar la citocinesis.	-3.422
3	Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha	<b>GUCY1A3</b> Las ciclasas de guanilato solubles son proteínas heterodiméricas que catalizan la conversión de GTP a 3', 5'-GMP cíclico y pirofosfato.	-3.460
4	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	<b>KIT</b> Receptor transmembranal de tipo 3 para MGF (factor de crecimiento de mastocitos, también conocido como factor de células madre)	-3.361
5	Poly(A) binding protein cytoplasmic 4 like	<b>PABPC4L</b> Proteínas de unión a poli-A, regula los niveles de RNAm y participa en la traducción de proteínas	-3.206
6	Adhesion G protein-coupled receptor L2	<b>ADGRL2</b> Regulación de la exocitosis	-3.076
7	Bone morphogenetic protein 5	<b>BMP5</b> Ligando de la superfamilia de proteínas TGF-beta que conducen al reclutamiento y activación de los factores de transcripción de la familia SMAD	-3.010
8	Receptor activity modifying protein 3	<b>RAMP3</b> Miembro de la familia RAMP de proteínas de dominio transmembrana simple, necesarias para transportar el receptor tipo calcitonina (CRLR) a la membrana plasmática	-2.872
9	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1	<b>TMTC1</b> Miembros de la familia TMTC O-manosil-transferasas, transfiere residuos de manosilo al grupo hidroxilo de los residuos de serina o treonina	-2.826
10	Nectin cell adhesion molecule 3	<b>NECTIN3</b> Proteínas nectina, funcionan como moléculas de adhesión en las uniones adherentes	-2.752

Por otra parte, el análisis de los datos de la secuenciación mostró nueve genes no codificantes significativamente modulados al sobreexpresar la MT1-MMP (Tabla 5), de los cuales seis tienen una expresión incrementada y tres muestran una disminución en su expresión. En la literatura está descrito sólo uno de los nueve genes no codificantes: LINC02163-201. Se conoce muy poco acerca de este RNA largo intergénico, pero se sabe que está relacionado a la transición epitelio-mesénquima a través del eje miR-593-3p/ FOXK1 en células de cáncer gástrico.

En la tabla 5 se muestran los genes no codificantes. "Nombre" se refiere a la designación que les da las diferentes plataformas bioinformáticas como: ENSEMBLE, Begee, AnnoInc, LNCipedia y "Biotipo" representa la clasificación de los ncRNA.

**Tabla 5. Genes no codificantes diferencialmente expresados.**

	Nombre	pb	Biotipo	Fold Change
1	AC239799.1-201	3411	Antisentido con decaimiento	8.999
2	LINC02163-201	574	lincRNA	1.824
3	FAM198B-AS1-201	2917	Antisentido	1.753
4	AC055854.1-203	1630	Antisentido	1.538
5	CCDC18-AS1-219	1212	Antisentido	1.587
6	AC007743.1-201	3075	Antisentido	1.556
7	AC048338.1-201	2748	Antisentido con decaimiento	-4.750
8	AC104083.1-201	2615	Antisentido traslapado	-6.714
9	C1QTNF3-AMACR-201	3424	Antisentido con decaimiento	-25.331

## 6. Validación de la secuenciación

La evaluación de la expresión del mRNA de los cinco genes que se eligieron para validar la secuenciación por qRT-PCR se presentan en la figura 19. Con base al mapa de calor que realizamos previamente se decidió escoger dos genes al azar (KLHL13 y PABPC4L ), eligiendo los que mostraron poca variación entre las muestras. El gen KLHL13 codifica una proteína adaptadora que forma el complejo E3 ubiquitina-proteína-ligasa, necesario para la segregación de los cromosomas y la finalización de la citocinesis; actualmente no hay información que relacione a

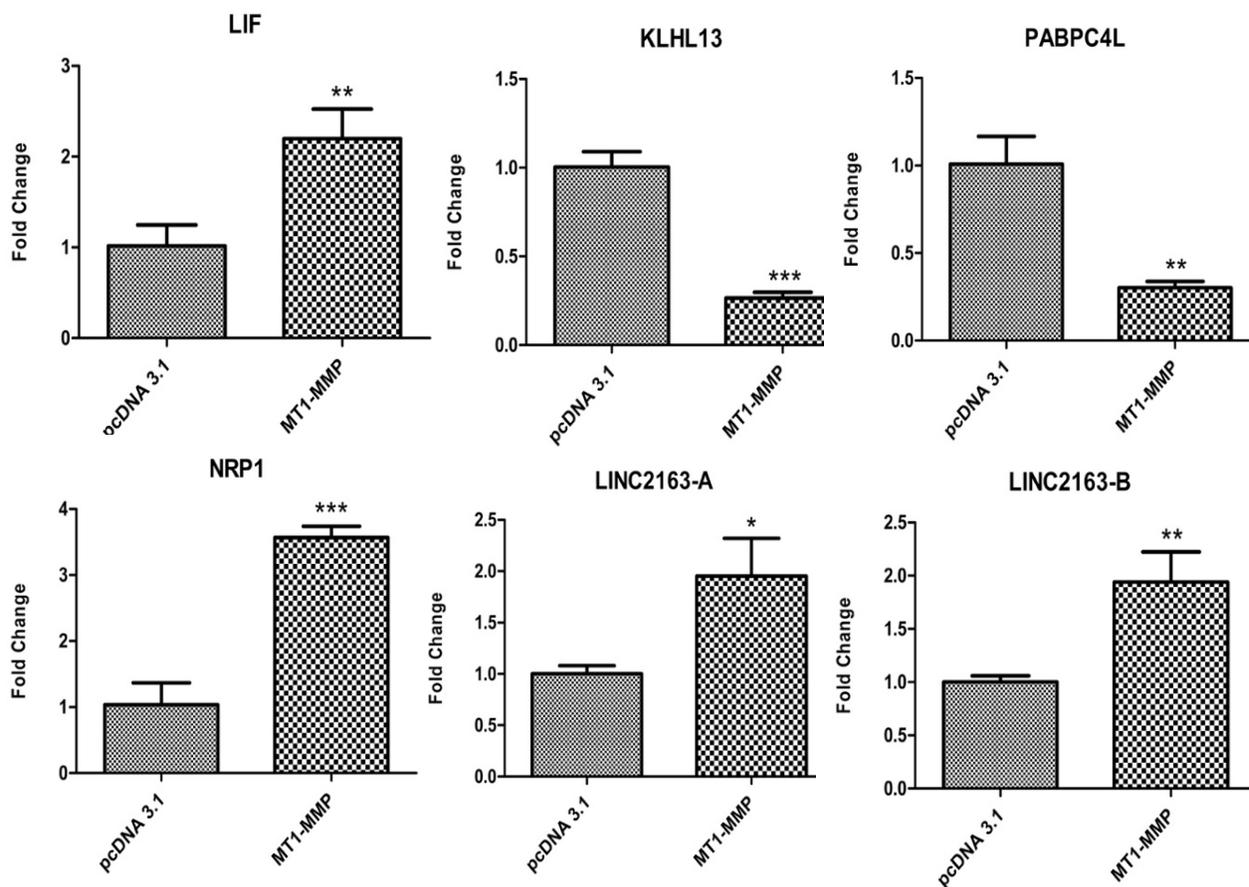
KLHL13 con la MT1-MMP. Por otro lado, el gen PABPC4L pertenece a la familia de proteínas de unión a poli-A, es necesario para regular los niveles de ARNm en linfocitos T y participa en la regulación de la traducción de proteínas en plaquetas. Tampoco se encontró información que relacione este gen con la MT1-MMP.

Además se eligieron dos genes relevantes en procesos asociados a los hallmarks o marcadores del cáncer y a las MMPs: LIF y NRP1. Como se mencionó, LIF regula la progresión de diversos tipos de cáncer, contribuye a la proliferación y metástasis. En particular, LIF y su receptor LIFR están asociados al crecimiento de los tumores de cáncer de mama, donde LIF funciona como un oncogen, como se mencionará mas adelante (X. Li et al., 2014). Más aun, LIF promueve la degradación del colágeno a través de la activación de las MMPs en fibroblastos de corazón (F. Wang et al., 2002). En nuestros datos observamos que la MT1-MMP provocó un incremento en la expresión de LIF. Esto sugiere que un mecanismo a través del cual MT1-MMP podría regular la proliferación y la migración en las células de cáncer de mama por la activación de la vía de LIF.

En cuanto al gen NRP1 se sabe que participa en diferentes tipos de vías de señalización que controlan la migración, la invasión y la supervivencia celular. Además regula la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima a través de la interacción con ligandos y co-receptores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los miembros de la familia de las semaforinas (Jubb et al., 2012; Seifi-Alan, Shams, Bandehpour, Mirfakhraie, & Ghafouri-Fard, 2018). En relación a lo anterior, Munaut y col. 2003, relacionaron la expresión de VEGF y sus receptores (VEGFR-1, sVEGFR-1, VEGFR-2 y NRP1) con la expresión de MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en glioblastomas humanos, comprobando que si hay una fuerte correlación entre la expresión de VEGF y las MMPs. Otras investigaciones reportan que la expresión de NRP1 juega un papel importante en la migración y la invasión de las células del melanoma por la ausencia de VEGFR-2, por la activación de AKT y la secreción de MMP-2 (Ruffini, D'Atri, & Lacal, 2013).

Por último, para complementar la validación de la RNAseq, se decidió validar un lncRNA poco conocido con sus isoformas: LINC02163-A y LINC02163-B. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de la MT1-MMP induce la expresión

de este lncRNA. El LINC02163 está implicado en la regulación del crecimiento y la transición epitelio-mesénquima de las células de cáncer gástrico (Dong et al., 2018). Por ahora, en células MCF-7 de cáncer de mama, podemos considerar que este es el primer trabajo en el que se relaciona la MT1-MMP con el LINC02163.



**Figura 19. Validación de los datos de la secuenciación.** En la figura se muestran los valores de la expresión diferencial de los 4 genes codificantes y 1 lncRNA que fueron elegidos para validar la secuenciación mediante qRT-PCR. Se empleó como control de referencia el gen constitutivo TBP (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

Como se puede observar en la figura 21 los genes que se eligieron para la validación de la RNA-seq mostraron una diferencia significativa en expresión al comparar ambas líneas celulares. Además, la tendencia y la proporción de cambio coincide con los datos obtenidos para cada uno de estos genes en la RNA-seq (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación del valor de cambio de la RNA-seq con los resultados obtenidos mediante qRT-PCR.

Gen	Fold change RNA-seq	Fold Change qRT-PCR
<i>LIF</i>	2.631506051	2.163883927
<i>KLHL13</i>	-3.422127668	-3.433928515
<i>PABPC4L</i>	-3.206744452	-3.3447512
<i>NRP1</i>	2.733793838	3.444481593
<i>LINC02163-A</i>	1.824620309	1.95005765
<i>LINC02163-B</i>	1.824620309	1.938500062

## 7. Análisis bioinformático por Key Pathway Advisor

Para inferir algunos procesos celulares en los cuales la MT1-MMP pudiera estar implicada, se empleó el programa KPA. Los parámetros que se utilizaron fueron un *p-value* menor a 0.05 y FC de +/- 1.3 y se empleó la matriz de 178 genes diferencialmente expresados. Además se le indicó al programa buscar datos relacionados con cáncer de mama.

### 7.1 Mapas de vías patológicas

En primer lugar observamos el apartado "Pathway Maps" donde se muestran dos subgrupos, el primero de ellos llamado "Pathological Pathway Maps" o "Mapas de vías patológicas", que muestra las vías patológicas que son estadísticamente significativas. El número de mapas obtenido de la interacción de los genes de nuestra base de datos y la base curada del programa se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Lista de vías patológicas.**

<i>Pathological Pathway Maps// Vías Patológicas</i>		
<b>Nombre</b>	<b>Input Data p-value</b>	<b>Genes involucrados</b>
1	Papel putativo del receptor de estrógeno y la señalización del receptor de andrógenos en la progresión del cáncer de pulmón.	9.405E-4 <i>Bcl-2, CYP19, p38MAPK, CYP1B1, AR</i>
2	Regulación de la actividad CFTR (normal y CF).	0.00102 <i>PDZK1, PP2A-reg, ADCY, PKA-reg, PKA-reg type II</i>
3	Principales alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer de pulmón.	0.004051 <i>IBP, SEMA3B, NRP1, Bcl-2</i>
4	Papel de las alteraciones epigenéticas en la supervivencia y migración de las células SCLC.	0.01835 <i>SEMA3B, CBX2, Bcl-2</i>
5	Influencia de fumar en la activación de la señalización de EGFR en células de cáncer de pulmón.	0.01957 <i>AREG, ADCY1, PKA-reg</i>
6	c-Myc en mieloma múltiple	0.01984 <i>p38MAPK, HDAC6</i>
7	Expresión β-andrenérgica dependiente de la expresión de CFTR	0.01984 <i>ADCY1, PKA-reg</i>
8	Principales vías de transformación de las células de Schwann en neurofibromatosis tipo 1.	0.02008 <i>AREG, SDF-1, Bcl-2, p38MAPK</i>
9	Papel del GIP en la patogénesis de la diabetes tipo 2.	0.02215 <i>PKA-reg, p38MAPK, Bcl-2</i>
10	Vías antiapoptóticas en respuesta al estrés del retículo endoplásmico en el mieloma múltiple.	0.02485 <i>Bcl-2, p38MAPK</i>
11	Regulación de PDE4 en la expresión de cito/quimiocinas en enfermedades inflamatorias de la piel.	0.02783 <i>ADCY1, PKA-reg</i>
12	Vías PGE2 en el cáncer	0.02936 <i>ADCY1, PKA-reg, AREG</i>
13	Inhibición de la señalización de RUNX3 en cáncer gástrico	0.03623 <i>H3F3A, Bcl-2</i>
14	Acción neuroprotectora del litio.	0.04509 <i>P38MAPK, HSP70, Bcl-2</i>
15	Plegamiento dependiente de HSP70 y HSP40 en la enfermedad de Huntington.	0.04583 <i>HSPA1A, HSP70</i>

La tabla muestra las 15 vías patológicas estadísticamente significativas inferidas por KPA (p-value < 0.05 y fold change de +/- 1.3). Se muestran los genes regulados en cada vía; en color rojo se encuentran los genes inhibidos y en verde aquellos sobreexpresados.

En este primer subgrupo podemos observar que se encuentran cambios en vías bioquímicas o en cascadas de señalización encontradas en células en condiciones patológicas. Con la información que se obtuvo, se hizo una búsqueda bibliográfica para inferir la relación de estos procesos y/o de sus moléculas clave con las MMPs y específicamente con la MT1-MMP. Para comenzar se ha descrito que la línea celular MCF-7 es una línea no invasiva y naturalmente no expresa la MT1-MMP (Cepeda et al., 2016). En este estudio los cambios que se observan por la sobreexpresión de la MT1-MMP en el transcriptoma de las células MCF-7 se asocian a enfermedades importantes como: cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de la médula ósea, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades de la piel y diabetes principalmente (Tabla 9).

Para la mayoría de estas vías se ha encontrado información en la literatura relacionada a las MMP's y/o a la MT1-MMP. En este primer análisis que infirió KPA, se encontró un incremento en la expresión del mRNA de Bcl-2. Esta proteína se asocia al control de la muerte celular, la migración, la invasión y la metástasis en diferentes tipos de cáncer. Se ha reportado que Bcl-2 provoca un incremento en la expresión y la actividad de varias MMPs principalmente a la MMP-9 y la MMP-2 (Ricca et al., 2000; Wick et al., 1998). Nuestros resultados sugieren que la MT1-MMP provoca un incremento en el mRNA de Bcl-2, sugiriendo un mecanismo de activación de las cascadas de apoptosis y de activación de las MMPs, ya que se sabe que la MT1-MMP es un activador de la MMP-2 y ésta a su vez de la MMP-9.

Continuando con el análisis encontramos otra molécula importante sobreexpresada en la RNAseq de las células MCF-7 que expresan MT1-MMP llamada neuropilina (NRP1). Como se señaló previamente, se sabe que NRP1 participa en diferentes tipos de vías de señalización actuando indirectamente en la progresión tumoral afectando la angiogénesis o directamente sobre las células tumorales (Ellis, 2006). Las neuropilinas se han descrito como una familia de receptores de glucoproteínas transmembranales que tienen una fuerte correlación con las semaforinas de clase 3 y con los miembros de la familia de ligandos del VEGF (Jubb et al., 2012). En relación a lo anterior se puede destacar que en nuestros resultados se encuentra incrementada la expresión de SEMA3 y

junto a la expresión de NRP1, el análisis de KPA infiere una interacción con VEGF coincidiendo con la información reportada en la literatura. En cuanto a la relación de estas moléculas con la MT1-MMP las investigaciones de Sounni y col. (2004) reportan que, la MT1-MMP controla la expresión de VEGF a nivel transcripcional a través de la vía de la cinasa de tirosinas Src en células MCF-7 de cáncer de mama (Sounni et al., 2004). A pesar de que en nuestros resultados observamos la regulación de NRP1 y de SEMA3, no se observó la regulación del mRNA para VEGF.

El análisis por KPA infirió la vía asociada al cáncer gástrico, en la cual se muestra la inhibición de la expresión del gen RUNX3 y el incremento en la de Bcl-2. Como consecuencia de la regulación de este último gen y de acuerdo a lo reportado en la literatura, se piensa que el proceso de la muerte celular está atenuado en nuestro modelo y por lo tanto se promueve la sobrevivencia y el crecimiento celular. Esto apoya a los estudios realizados de Jin Bai y col; (2013) en cáncer de mama, ya que muestran que la expresión reducida de RUNX3 se correlaciona con el grado histológico avanzado y el mal pronóstico de los pacientes. Estos autores proponen que RUNX3 regula la migración y la invasión de las células de cáncer de mama a través de la inhibición de la expresión y actividad de MMP-2 (Bai et al., 2013). A pesar de que ya existen reportes de la relación entre el gen RUNX3 y la MMP-2 hasta ahora no se había reportado una relación entre la expresión del gen RUNX3 y la MT1-MMP.

Una de las vías que infirió KPA está asociada a las enfermedades neurodegenerativas, en la que se observó la modulación de algunas proteínas de choque térmico (HSP, del inglés heat shock proteins). La función de estas proteínas es rescatar y reconstituir el plegamiento de las proteínas que por diversos factores de estrés se plegaron incorrectamente (Asea & Kaur, 2018). En nuestros datos la expresión de HSP70 se encuentra inhibida por la sobreexpresión de la MT1-MMP por lo que de acuerdo a lo reportado en la literatura, esta vía estaría asociada a un efecto antitumorigénico de la MT1-MMP y/o a su participación a patologías asociadas a la inhibición de HSP70. Se ha observado que en células de cáncer de mama la HSP70 forma parte de un complejo co-chaperona que actúa junto con HSP90 $\alpha$  para activar a la MMP-2,

contribuyendo a la migración e invasión de éstas células (Gullberg, Sims, McCready, & Jay, 2011). Por otra parte se sabe que en la mayoría de los tipos de celulares, incluidas las tumorales, el efecto antiapoptótico de HSP70 depende de su interacción con HSP40. La HSP40 inhibe la acción de los proteosomas que, cuando se activan, degradan una amplia variedad de proteínas que conducen a la muerte celular (Roth, Zhong, Tamm, & Szilard, 2009).

La siguiente vía arrojada por KPA es la de PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E2). La prostaglandina E2 es una hormona que tiene diversas funciones importantes tanto en la reproducción, el metabolismo y en el sistema inmune (Ke et al., 2016). Los reportes de Alfranca y col; (2008) indican que PGE<sub>2</sub> desencadena la activación de MT1-MMP, la cual libera a TGF- $\beta$  que uniéndose con su receptor AIK5 activan la vía de SMAD3 promoviendo la angiogénesis (Alfranca et al., 2008).

Las células tumorales poseen diversos mecanismos que les permiten mantener su homeostasis (Hanahan & Weinberg, 2011). En nuestro modelo observamos que hay proteínas que activan la proliferación, migración e invasión como Bcl-2, VEGF y NRP1; y en paralelo, también se encontraron moléculas cuya expresión está disminuida, como RUNX3, HSP70 y PGE<sub>2</sub>. Estos datos nos sugieren que posiblemente existan mecanismos que actúen como un asa de retroalimentación (negativa o positiva) modulando algunos procesos regulados por la MT1-MMP.

### **7.1.1 Mapas de vías fisiológicas**

El segundo subgrupo denominado "Physiological Pathway Maps" o "Mapas de vías fisiológicas" muestra los 13 mapas de las vías fisiológicas que son estadísticamente significativas (Tabla 8).

**Tabla 8. Lista de vías fisiológicas.**

**Physiological Pathway Maps// Vías Fisiológicas**

<b>Nombre</b>	<b>Input Data p-value</b>	<b>Genes involucrados</b>
1 Desarrollo/ Receptores $\beta$ -adrenérgicos señalización vía AMP cíclico.	0.003601	<i>ADCY1, PKA-reg, PKA-reg II, p38MAPK</i>
2 Transducción de señales/ Vías adicionales de activación de NF-KB (en el núcleo).	0.006835	<i>ADCY1, H3F3A, PKA-reg</i>
3 Desarrollo/ Receptores $\beta$ -adrenérgicos en la diferenciación de adipocitos marrón.	0.01155	<i>ADCY1, PKA-reg, p38MAPK</i>
4 Desarrollo/ Señalización de PACAP en células neurales.	0.01248	<i>ADCY1, PKA-reg, Bcl-2</i>
5 Células madre/ La estimulación de la diferenciación de fibroblastos embrionarios de ratón en adipocitos por factores extracelulares.	0.01396	<i>LIF, ADCY1, PKA-reg, p38MAPK</i>
6 Apoptosis y supervivencia/ Fosforilación de BAD.	0.01662	<i>ADCY1, PKA-reg, p38MAPK</i>
7 Transcripción/ Vía de señalización CREB	0.02411	
8 Desarrollo/ Receptores adrenérgicos Alfa 1 señalización vía AMP cíclico.	0.02425	<i>ADCY1, PKA-reg</i>
9 Desarrollo/ Receptor de señalización Adenosina A3	0.02843	<i>M33, H3F3A</i>
10 Células madre/ Desmetilación H3K36 en el mantenimiento de células madre.	0.0296	<i>p38MAPK, Wee1</i>
11 Ciclo celular/ Papel de las proteínas 14-3-3 en la regulación del ciclo celular.	0.03536	<i>ADCY1, PKA-reg, p38MAPK</i>
12 Transcripción/ Vía PPAR.	0.0437	<i>PP2A, PKA-reg, p38MAPK, SGK1</i>
13 Neurogénesis NGF/ Señalización TrkA mediada por MAPK.	0.04928	<i>PKA-reg, p38MAPK, SGK1, PP2A</i>

La tabla muestra las 13 vías fisiológicas estadísticamente significativas inferidas por KPA ( $p$ -value < 0.05 y fold change de +/- 1.3). Se muestran los genes regulados en cada vía; en color rojo se encuentran los genes inhibidos y en verde aquellos sobreexpresados.

Estas vías representan cascadas de señalización de “células sanas”. Principalmente se encontraron rutas implicadas en el mantenimiento y regulación epigenética del fenotipo troncal. En particular se sabe que este fenotipo en las células de cáncer de mama es favorecido por la expresión de la MT1-MMP (J. Li et al., 2012). Otras rutas que infirió el programa fue la regulación del ciclo celular y la diferenciación celular, además se observó que estas vías se relacionan con el sistema inmune.

Es relevante mencionar que la mayoría de las vías y procesos inferidos por la herramienta KPA se relacionan principalmente con los transcritos de los genes Adenilato ciclasa, MAPK p38, PKA-regulatoria, cuya expresión está inhibida, así como de algunos genes cuya expresión se encuentra incrementada, como Bcl-2, la fosfatasa PP2A y LIF, principalmente.

Una de las vías fisiológicas reguladas por la expresión de la MT1-MMP es la vía de NF-KB. La actividad de este factor de transcripción es modulada por cascadas de fosforilación. En nuestros resultados se observa que la actividad de NF-KB se suprime al sobreexpresar la MT1-MMP debido a la inhibición de el RNAm de la adenilato ciclasa/AMPC/PKA-reg. Por otra parte se sabe que PKA es una de las cinasas que puede activar NF-KB, quien a su vez es regulada por la Adenilato ciclasa/AMPC/PKA-reg. En particular, la vía de NF-KB regula la expresión de algunas MMPs, por lo que este mecanismo podría regularse negativamente al sobreexpresar la MT1-MMP.

Referente a lo anterior, se sabe que existen diferentes receptores celulares que activan la vía de las proteínas G heterotriméricas/Adenilato ciclasa/AMP cíclico/PKA. La cinasa PKA activa a las cinasas dependientes de mitógenos como por ejemplo, la MAPKp38. Este conjunto de cinasas está implicado en distintos procesos celulares como son la diferenciación de los adipocitos a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (J. Tang, Li, Lu, & Cho, 2013). En nuestro modelo observamos que la sobreexpresión de la MT1-MMP provoca una disminución del mRNA de las cinasas Adenilato ciclasa, PKA y p38.

Con respecto a la diferenciación de los adipocitos, Feinberg y col; (2013), estudiaron el desarrollo de la glándula mamaria en ratones deficientes en MT1-MMP (MMP14<sup>-/-</sup>). Estos ratones pueden generar correctamente los ductos dentro de la glándula mamaria durante el desarrollo temprano. A pesar de que la MT1-MMP no se requiere para esta morfogénesis, el análisis del transcriptoma reveló que ésta regula la adipogénesis en la glándula mamaria ya que promueve la formación de los depósitos de tejido graso blanco (Feinberg, Rowe, Saunders, & Weiss, 2016). En conjunto, nuestros resultados y el trabajo de Feinberg y col., sugieren que la MT1-MMP participa en procesos de adipogénesis

Cabe señalar que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos fue otra de las vías modulada al sobreexpresar la MT1-MMP en las células MCF-7. Se sabe que cuando se activa esta vía, en las células de cáncer de mama se incrementa la formación de invadopodia y la capacidad de generar metástasis en modelos de ratón (Chang et al., 2016). A través de estos receptores, las células tumorales inducen la expresión de MMPs. Mas aún, se sabe que el estrés crónico y la nicotina, factores asociados al desarrollo del cáncer de mama, inducen la secreción de adrenalina y promueven la formación de tumores.

En términos generales se considera actualmente que la tumorigénesis es un proceso complejo, controlado por la interconexión de redes biológicas. Las masas tumorales no son entidades independientes y no sólo están formadas por células tumorales proliferantes. Existen distintos tipos de células "normales" que forman el estroma asociado a los tumores, además del desarrollo de vasos sanguíneos y linfáticos así como de la participación del sistema nervioso. Evidencias experimentales y clínicas han mostrado que algunos tumores están inervados y que se forman sinapsis neuro-neoplásicas que directamente secretan neurotransmisores hacia las células tumorales. Además, las células cancerosas no sólo expresan los receptores para los neurotransmisores si no que también son capaces de sintetizarlos. Algunos de éstos actúan localmente de manera autocrina o paracrina o pueden incluso circular hacia otras regiones (J. Tang et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente en este trabajo, al incrementar la sobreexpresión de MT1-MMP se observó un aumento en la expresión del factor LIF. Se sabe que su expresión es mayor en líneas celulares más metastásicas que en aquellas menos agresivas como las células MCF-7. Hasta el momento no existe una relación entre la expresión de MT1-MMP y LIF, sin embargo, se sabe que LIF promueve el crecimiento tumoral y la metástasis a través de la vía de mTOR/AKT. Al ser un regulador de la diferenciación se ha relacionado también con el mantenimiento de un fenotipo troncal. Finalmente, en las células MCF-7 induce la TEM a través de miR21 y STAT3 (X. Li et al., 2014).

LIF podría participar en la progresión tumoral de maneras alternativas. Se sabe por ejemplo, que la sobreexpresión de LIF estimula la diferenciación de los adipocitos, involucrados en el desarrollo del cáncer de mama. Por otra parte, LIF promueve la producción de Nociceptina del sistema inmune y nervioso. La nociceptina es un péptido anti-opioide que provoca analgesia y que regula la respuesta inmune. A su vez, puede inhibir a la adenilato ciclasa y la acumulación de AMPc (Finley, Happel, Kaminsky, & Rogers, 2008).

Se puede enfatizar que en relación a la información presentada anteriormente sobre el fenotipo troncal, la herramienta KPA infirió la vía de "mantenimiento del fenotipo troncal por la desmetilación de la Histona3 en la Lisina 36". La expresión del mRNA de la metilasa M33 incrementó al sobreexpresar a la MT1-MMP, mientras que el mRNA para la Histona3 disminuyó. Este resultado sugiere que en nuestro modelo la sobreexpresión de la MT1-MMP podría regular un mecanismo que modifique la metilación y afectar así el mantenimiento del fenotipo troncal.

Siguiendo con el análisis, otro proceso regulado por la sobreexpresión de la MT1-MMP es el ciclo celular ya que observamos que disminuyó el mRNA para las cinasas p38 y Wee1. En particular, ambas cinasas pueden prevenir la apoptosis y regular el ciclo celular a través de su interacción con las proteínas 14-3-3, ya que controlan la distribución nuclear/citosólica de distintas moléculas señalizadoras con las cuales interactúan (Zhang et al., 2015). Por lo anterior, podría pensarse que a través de las cinasas p38 y Wee1 la MT1-MMP regula el ciclo celular y la apoptosis; sin embargo, es necesario explorar cuál sería este mecanismo.

Otra vía de señalización inhibida por la expresión de la MT1-MMP en las células MCF-7 fue la del receptor CXCR3B. Trabajos previos han mostrado que específicamente en estas células, esta vía inhibe la proliferación, promueve la apoptosis, disminuye la expresión de la proteína Bcl-2, activa a la MAPK p38 e inhibe a las cinasas Erk1/2. Cabe mencionar que no se encuentran datos en la literatura que relacionen a CXCR3B con la MT1-MMP (Balan & Pal, 2014).

En su conjunto, los datos de este análisis sugieren que la MT1-MMP modula vías de señalización implicadas en la diferenciación (neuronal y de adipocitos) y el mantenimiento del fenotipo troncal, al mismo tiempo que el ciclo celular y la apoptosis. Como se ha visto a lo largo del análisis de todo este estudio, se sabe que existen trabajos previos que han relacionado a las MMPs en la regulación de estas vías de señalización y fenotipos celulares; sin embargo, existe muy poca información sobre la relación directa con la MT1-MMP en particular (J. Tang et al., 2013).

Un trabajo previo a esta tesis, investigó el efecto de la sobreexpresión de la MT1-MMP en la respuesta transcripcional de las células de fibrosarcoma HT1080 (Rozanov et al., 2008). Este trabajo realizó un análisis empleando un Sentrix HumanRef8 BeadChip con 24,000 transcritos de los 22,000 representados en la base de datos RefSeq. Se reportaron 312 transcritos diferencialmente expresados ( $p\text{-value} < 0.01$  y FC +/- 2.0) al comparar las células que sobreexpresan la MT1-MMP y aquellas células que tienen inhibida su expresión contra las células control. La mayoría de los genes identificados se relacionaron con el proceso de angiogénesis y con el mantenimiento de la MEC (colágenas, fibronectina, laminina, HIF-1 $\alpha$ , entre otras). A pesar de la diferencia en el tipo celular y la metodología para analizar los cambios que la MT1-MMP provoca en el transcriptoma, en similitud a los datos del microarreglo de las células HT1080, nuestros datos coinciden en que la colágena V se sobreexpresa y la metalotioneína 2A se inhibe.

### 7.1.2 Enfermedades

A continuación se muestran las “Diseases” o “Enfermedades” donde se obtuvo un total de 202 enfermedades esto quiere decir que los genes de nuestra base de datos están asociados a estas enfermedades. La tabla 9 muestra los primeros 10 ya que consideramos que son los más significativos y consistentes con los mapas de vías patológicas y fisiológicas.

**Tabla 9. Lista de enfermedades**

<i>Diseases // Enfermedades</i>	
<i>Nombre</i>	<i>Input Data p-value</i>
1	Neoplasias del sistema nervioso central
2	Enfermedad de Hodgkin
3	Infecciones virus RNA
4	Carcinoma de la mama ductal
5	Carcinoma in Situ
6	Espectro de esquizofrenia y otros desórdenes psicóticos
7	Neoplasias, ductal, lobular y medular
8	Leucemia
9	Enfermedades del pulmón
10	Enfermedad de Huntington

La tabla muestra las 10 enfermedades estadísticamente significativas inferidas por KPA (p-value < 0.05 y fold change de +/- 1.3).

En esta tabla se puede enfatizar que se encuentran enfermedades relacionadas a las vías que infirió KPA, en particular observamos que se encuentran enfermedades como el cáncer de mama, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades del pulmón principalmente.

### 7.1.3 Redes de procesos

En seguida observamos los “Process Networks” o “Redes de proceso” donde se obtuvo un total de 15, estas redes representan un grupo de vías con una serie de

eventos muy específicos, los cuales se centran en una molécula clave. Como se pueden observar en la tabla 10 hay procesos específicos alterados en la reproducción, la inflamación, la transducción de señales, la apoptosis, la transcripción y el desarrollo.

**Tabla 10. Lista de redes de procesos.**

<i>Process Networks // Redes de procesos</i>		
<b>Nombre</b>	<b>Input Data p-value</b>	<b>Genes involucrados</b>
1 Reproducción/ Vía de señalización FSH-beta	4.164E-4	<i>IBP, ADCY1, PKA-reg, PP2A, H3F3A, CYP19</i>
2 Inflamación/ Señalización de histaminas.	8.913E-4	<i>ADCY1, PKA-reg, p38MAPK, GUCY1</i>
3 Transducción de señales/ Vía ESR1 nuclear.	0.003426	<i>ADCY1, PKA-reg, RAMP3, CYP1B1, SDF-1, Bcl-2</i>
4 Transducción de señales/ Señalización WNT.	0.003519	<i>PP2A, ADCY1, PKA-cat, p38MAPK</i>
5 Plegamiento de proteínas/ Respuesta a proteínas con plegamiento incorrecto	0.01631	<i>HSPA1A, HSP70, HSPA1B, HSPA2</i>
6 Transducción de señales/ Señalización de colecistoquinina.	0.01706	<i>GPCRs, ADCY1, PKA-reg, p38MAPK</i>
7 Apoptosis/ Antiapoptosis mediada por señales externas vía NF-kB.	0.02041	<i>ADORA1, ADCY1, PKA-reg, PP2A, Bcl-2</i>
8 Transcripción/ Receptores nucleares, regulación transcripcional.	0.02047	<i>ADCY1, PKA-reg, p38MAPK, HMG1,2, AR</i>
9 Reproducción/ Diferenciación del sexo masculino.	0.0212	<i>p38MAPK, HSP70, Bcl-2, PKA-reg, CXB2</i>
10 Reproducción/ Regulación de gonadotropina.	0.0226	<i>ADCY1, GUCY1, PKA-reg, p38MAPK, AR</i>
11 Desarrollo/ Desarrollo y pigmentación del melanocito	0.03358	<i>c-KIT, PKA-reg</i>
12 Transducción de señales/ Vía de ESR1 membrana.	0.03991	<i>ADCY1, PKA-reg, AR</i>

La tabla muestra las 12 redes de proceso estadísticamente significativos inferidos por KPA (p-value < 0.05 y fold change de +/- 1.3). Se muestran los genes regulados en cada vía; en color rojo se encuentran los genes inhibidos y en verde aquellos sobreexpresados.

Como se mencionó antes la mayoría de las vías y procesos inferidos por la herramienta KPA se relacionan principalmente con los transcritos de los genes Adenilato ciclasa, MAPK p38, PKA-regulatoria, cuya expresión está inhibida y algunos genes cuya expresión se encuentra incrementada, como Bcl-2, la fosfatasa PP2A y LIF. En las redes de proceso de la tabla 12 se puede observar que estos transcritos son moléculas clave para procesos específicos como la transducción de señales, el plegamiento de proteínas, la apoptosis, la transcripción, el desarrollo y la reproducción, inferidas por el programa.

Finalmente como se puede observar en los resultados inferidos por KPA la sobreexpresión de la MT1-MMP provocó cambios en la expresión génica de las células MCF-7. A pesar de que se conoce el papel que puede desempeñar la MT1-MMP en los diferentes procesos celulares durante la progresión del cáncer como la invasión, la proliferación y la metástasis, actualmente no se cuenta con datos de un análisis de transcriptoma completo de células de cáncer de mama con la sobreexpresión de la MT1-MMP.

## **VIII. Conclusiones**

---

1. Se generaron las líneas celulares estables MCF-7-pcDNA3.1 y MCF-7-pcDNA3.1-MT1-MMP-mCh.
2. La sobreexpresión de la MT1-MMP-mCh provocó cambios en el transcriptoma de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.
3. Se regularon significativamente 178 genes, de los cuales 74 se sobreexpresaron y 104 se inhibieron.
4. Se moduló la expresión de 9 ncRNA, 6 incrementaron su expresión y 3 disminuyeron.
5. La sobreexpresión de la MT1-MMP moduló vías de señalización y procesos celulares asociados a las principales características o hallmarks del cáncer.

## **IX. Perspectivas**

---

En un futuro se piensa analizar el transcriptoma al inhibir la expresión de la MT1-MMP en líneas celulares de cáncer de mama con la idea de analizar profundamente los datos, comparar los cambios observados en este trabajo y actualizar la información que se tiene sobre los mecanismos en los que participa la MT1-MMP en el cáncer. De manera particular, se pretende enfocar este trabajo en la parte no codificante del transcriptoma para determinar la participación de algunos lncRNA específicos en procesos como la migración o invasión de las células de cáncer de mama.

## X. Material suplementario

---

### 1. Lista total de transcritos que fueron alterados por la sobreexpresión de la MT1-MMP

	Nombre ENSEMBL	Nombre del gen	p-value
1	ENSG00000157227.12	<i>MMP14</i>	52.9706518
2	ENSG00000213240.8	<i>RP11-458D21.5</i>	8.9990914
3	ENSG00000175318.11	<i>GRAMD2</i>	5.64720751
4	ENSG00000138378.17	<i>STAT4</i>	5.38511373
5	ENSG00000189423.11	<i>USP32P3</i>	5.29265262
6	ENSG00000147573.16	<i>TRIM55</i>	4.71879265
7	ENSG00000221955.10	<i>SLC12A8</i>	4.38364318
8	ENSG00000102575.10	<i>ACP5</i>	3.49193557
9	ENSG00000138356.13	<i>AOX1</i>	3.00725559
10	ENSG00000036672.15	<i>USP2</i>	2.98670179
11	ENSG00000173227.13	<i>SYT12</i>	2.87365536
12	ENSG00000071282.11	<i>LMCD1</i>	2.87881185
13	ENSG00000170356.8	<i>OR2A20P</i>	2.94028553
14	ENSG00000099250.17	<i>NRP1</i>	2.73379384
15	ENSG00000148671.13	<i>ADIRF</i>	2.65493422
16	ENSG00000174827.13	<i>PDZK1</i>	2.64822221
17	ENSG00000128342.4	<i>LIF</i>	2.63150605
18	ENSG00000162599.15	<i>NFIA</i>	2.56374584
19	ENSG00000090539.15	<i>CHRD</i>	2.31576869
20	ENSG00000204740.9	<i>MALRD1</i>	2.24359591
21	ENSG00000163485.15	<i>ADORA1</i>	2.1567139
22	ENSG00000146038.11	<i>DCDC2</i>	2.11061151
23	ENSG00000125089.16	<i>SH3TC1</i>	2.05598788
24	ENSG00000171791.12	<i>BCL2</i>	2.01607069
25	ENSG00000108932.11	<i>SLC16A6</i>	2.00608209
26	ENSG00000159200.17	<i>RCAN1</i>	1.97135134
27	ENSG00000123095.5	<i>BHLHE41</i>	1.97207271
28	ENSG00000083857.13	<i>FAT1</i>	1.95099211
29	ENSG00000221866.9	<i>PLXNA4</i>	1.95641339
30	ENSG00000198879.11	<i>SFMBT2</i>	1.92973611
31	ENSG00000144645.13	<i>OSBPL10</i>	1.87128225
32	ENSG00000251348.1	<i>HSPD1P11</i>	1.82506609
33	ENSG00000251026.1	<i>RP11-138J23.1</i>	1.82462031
34	ENSG00000012171.17	<i>SEMA3B</i>	1.80383928

35	ENSG00000095739.10	<i>BAMBI</i>	1.7699437
36	ENSG00000130635.15	<i>COL5A1</i>	1.76655984
37	ENSG00000013016.14	<i>EHD3</i>	1.7607631
38	ENSG00000248429.5	<i>RP11-597D13.9</i>	1.75396764
39	ENSG00000132031.12	<i>MATN3</i>	1.74502952
40	ENSG00000184254.16	<i>ALDH1A3</i>	1.74578819
41	ENSG00000072858.10	<i>SIDT1</i>	1.73357704
42	ENSG00000172667.10	<i>ZMAT3</i>	1.72952286
43	ENSG00000173599.13	<i>PC</i>	1.72121985
44	ENSG00000183401.11	<i>CCDC159</i>	1.72118413
45	ENSG00000185634.11	<i>SHC4</i>	1.69032397
46	ENSG00000119042.16	<i>SATB2</i>	1.67112778
47	ENSG00000188643.10	<i>S100A16</i>	1.66780349
48	ENSG00000175920.15	<i>DOK7</i>	1.65547337
49	ENSG00000112320.11	<i>SOBP</i>	1.6521987
50	ENSG00000147689.16	<i>FAM83A</i>	1.64686229
51	ENSG00000165548.10	<i>TMEM63C</i>	1.64577682
52	ENSG00000169862.18	<i>CTNND2</i>	1.64217208
53	ENSG00000111799.20	<i>COL12A1</i>	1.63835225
54	ENSG00000058404.19	<i>CAMK2B</i>	1.64008713
55	ENSG00000183044.11	<i>ABAT</i>	1.6109754
56	ENSG00000151025.9	<i>GPR158</i>	1.61265137
57	ENSG00000144815.14	<i>NXPE3</i>	1.61080888
58	ENSG00000144802.11	<i>NFKBIZ</i>	1.60649343
59	ENSG00000101115.12	<i>SALL4</i>	1.60616379
60	ENSG00000162981.13	<i>FAM84A</i>	1.59871932
61	ENSG00000068971.13	<i>PPP2R5B</i>	1.60158706
62	ENSG00000197385.5	<i>ZNF860</i>	1.59562692
63	ENSG00000223745.7	<i>RP4-717I23.3</i>	1.58766006
64	ENSG00000116985.10	<i>BMP8B</i>	1.58202922
65	ENSG00000152642.10	<i>GPD1L</i>	1.56347795
66	ENSG00000170500.12	<i>LONRF2</i>	1.55941282
67	ENSG00000114770.16	<i>ABCC5</i>	1.55551849
68	ENSG00000131389.16	<i>SLC6A6</i>	1.55445762
69	ENSG00000052802.12	<i>MSMO1</i>	1.54443
70	ENSG00000263934.4	<i>SNORD3A</i>	1.53922302
71	ENSG00000253125.1	<i>RP11-459E5.1</i>	1.53861426
72	ENSG00000144677.14	<i>CTDSPL</i>	1.53400781
73	ENSG00000144824.19	<i>PHLDB2</i>	1.53154581
74	ENSG00000188488.13	<i>SERPINA5</i>	1.5282189

75	ENSG00000163539.16	CLASP2	1.52350308
76	ENSG00000141401.11	IMPA2	0.74811003
77	ENSG00000115271.10	GCA	0.74821809
78	ENSG00000077312.8	SNRPA	0.74744302
79	ENSG00000081320.10	STK17B	0.74286984
80	ENSG00000110697.12	PITPNM1	0.74113237
81	ENSG00000228253.1	MT-ATP8	0.73729238
82	ENSG00000128016.5	ZFP36	0.73699696
83	ENSG00000169083.15	AR	0.73428587
84	ENSG00000126803.9	HSPA2	0.73364978
85	ENSG00000175895.3	PLEKHF2	0.73355518
86	ENSG00000164758.7	MED30	0.7329905
87	ENSG00000206634.1	SNORA22	0.73283403
88	ENSG00000094631.18	HDAC6	0.73105587
89	ENSG00000125148.6	MT2A	0.72793903
90	ENSG00000164442.9	CITED2	0.72581236
91	ENSG00000164104.11	HMGB2	0.72397639
92	ENSG00000182986.12	ZNF320	0.72095223
93	ENSG00000128656.13	CHN1	0.71828117
04	ENSG00000102172.15	SMS	0.71528031
95	ENSG00000166483.10	WEE1	0.71240886
96	ENSG00000115457.9	IGFBP2	0.71160871
97	ENSG00000147202.17	DIAPH2	0.71123897
98	ENSG00000115468.11	EFHD1	0.71119306
99	ENSG00000185869.13	ZNF829	0.70738787
100	ENSG00000134779.14	TPGS2	0.70778072
101	ENSG00000138434.16	SSFA2	0.70541775
102	ENSG00000121900.18	TMEM54	0.70158388
103	ENSG00000150477.14	KIAA1328	0.69126039
104	ENSG00000144290.16	SLC4A10	0.68828381
105	ENSG00000099954.18	CECR2	0.68489621
106	ENSG00000277443.1	MARCKS	0.68448589
107	ENSG00000050628.20	PTGER3	0.68111624
108	ENSG00000102362.15	SYTL4	0.67811608
109	ENSG00000111885.6	MAN1A1	0.67541411
110	ENSG00000152217.16	SETBP1	0.67457527
111	ENSG00000246705.4	H2AFJ	0.66998372
112	ENSG00000166750.9	SLFN5	0.66433307
113	ENSG00000092445.11	TYRO3	0.66315376
114	ENSG00000234745.9	HLA-B	0.65996444

115	ENSG00000005249.12	<i>PRKAR2B</i>	0.65727607
116	ENSG00000147642.16	<i>SYBU</i>	0.64720215
117	ENSG00000233251.7	<i>AC007743.1</i>	0.64233509
118	ENSG00000156711.16	<i>MAPK13</i>	0.64171728
119	ENSG00000118985.15	<i>ELL2</i>	0.62663648
120	ENSG00000184564.8	<i>SLITRK6</i>	0.61410641
121	ENSG00000138061.11	<i>CYP1B1</i>	0.61124833
122	ENSG00000165474.5	<i>GJB2</i>	0.60828386
123	ENSG00000159247.13	<i>TUBBP5</i>	0.60843407
124	ENSG00000182575.7	<i>NXPH3</i>	0.59805756
125	ENSG00000125430.8	<i>HS3ST3B1</i>	0.58876116
126	ENSG00000168785.7	<i>TSPAN5</i>	0.57004908
127	ENSG00000196932.11	<i>TMEM26</i>	0.57185925
128	ENSG00000115267.5	<i>IFIH1</i>	0.57040214
129	ENSG00000106541.11	<i>AGR2</i>	0.56963553
130	ENSG00000169856.8	<i>ONECUT1</i>	0.56786672
131	ENSG00000109861.15	<i>CTSC</i>	0.56796193
132	ENSG00000164649.19	<i>CDCA7L</i>	0.56546586
133	ENSG00000112541.13	<i>PDE10A</i>	0.56102478
134	ENSG00000265735.2	<i>RN7SL5P</i>	0.56341364
135	ENSG00000119714.10	<i>GPR68</i>	0.56253974
136	ENSG00000241399.6	<i>CD302</i>	0.56076791
137	ENSG00000100097.11	<i>LGALS1</i>	0.55420489
138	ENSG00000164619.8	<i>BMPER</i>	0.55092919
139	ENSG00000137968.16	<i>SLC44A5</i>	0.54337385
140	ENSG00000151632.16	<i>AKR1C2</i>	0.53966131
141	ENSG00000135547.8	<i>HEY2</i>	0.53831716
142	ENSG00000164742.14	<i>ADCY1</i>	0.53715035
143	ENSG00000148700.13	<i>ADD3</i>	0.52746468
144	ENSG00000135052.16	<i>GOLM1</i>	0.52646939
145	ENSG00000143995.19	<i>MEIS1</i>	0.5226707
146	ENSG00000164418.19	<i>GRIK2</i>	0.51863872
147	ENSG00000145908.12	<i>ZNF300</i>	0.51258106
148	ENSG00000181104.6	<i>F2R</i>	0.50663071
149	ENSG00000118515.11	<i>SGK1</i>	0.50081253
150	ENSG00000178538.9	<i>CA8</i>	0.49793644
151	ENSG00000091622.15	<i>PITPNM3</i>	0.49626574
152	ENSG00000057704.10	<i>TMCC3</i>	0.49183344
153	ENSG00000188452.13	<i>CERKL</i>	0.48428687
154	ENSG00000158747.13	<i>NBL1</i>	0.48739161

155	ENSG00000107562.16	<i>CXCL12</i>	0.48497008
156	ENSG00000197409.7	<i>HIST1H3D</i>	0.47905559
157	ENSG00000092621.11	<i>PHGDH</i>	0.47606878
158	ENSG00000121361.3	<i>KCNJ8</i>	0.46365637
159	ENSG00000153976.2	<i>HS3ST3A1</i>	0.45352624
160	ENSG00000132554.19	<i>RGS22</i>	0.44280292
161	ENSG00000021826.14	<i>CPS1</i>	0.44186196
162	ENSG00000137819.13	<i>PAQR5</i>	0.43522686
163	ENSG00000119638.12	<i>NEK9</i>	0.43186946
164	ENSG00000173467.8	<i>AGR3</i>	0.42511272
165	ENSG00000177707.10	<i>PVRL3</i>	0.36335685
166	ENSG00000133687.15	<i>TMTC1</i>	0.35385394
167	ENSG00000122679.8	<i>RAMP3</i>	0.3481401
168	ENSG00000112175.7	<i>BMP5</i>	0.33221115
169	ENSG00000117114.19	<i>ADGRL2</i>	0.32506691
170	ENSG00000254535.3	<i>PABPC4L</i>	0.31184275
171	ENSG00000157404.15	<i>KIT</i>	0.29748357
172	ENSG00000164116.16	<i>GUCY1A3</i>	0.28901006
173	ENSG00000003096.13	<i>KLHL13</i>	0.29221587
174	ENSG00000256861.1	<i>RP11-512M8.5</i>	0.21050931
175	ENSG00000105141.5	<i>CASP14</i>	0.16319961
176	ENSG00000260244.1	<i>RP11-588K22.2</i>	0.14893425
177	ENSG00000273294.1	<i>C1QTNF3-AMACR</i>	0.03947587
178	ENSG00000266953.6	<i>RP11-618P17.4</i>	0.02681156
179	ENSG00000267059.2	<i>AC005943.2</i>	0.0002133

## 2. Lista Genes no codificantes diferencialmente expresados.

	<b>Gene ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>Transcript ID</b>	<b>Fold Change</b>
1	ENSG00000213240.8	AC239799.1-201	8.999	ENST00000612520.1
2	ENSG00000251026.1	LINC02163-201	1.824	ENST00000514769.1
3	ENSG00000248429.5	FAM198B-AS1-201	1.753	ENST00000503611.5
4	ENSG00000253125.1	AC055854.1-203	1.538	ENST00000521141.1
5	ENSG00000223745.7	CCDC18-AS1-219	1.587	ENST00000451302.6
6	ENSG00000233251.7	AC007743.1-201	1.556	ENST00000596663.5
7	ENSG00000256861.1	AC048338.1-201	-4.750	ENST00000535844.1
8	ENSG00000260244.1	AC104083.1-201	-6.714	ENST00000569449.1
9	ENSG00000273294.1	C1QTNF3-AMACR-201	-25.331	ENST00000382079.3

## Bibliografía

---

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & P., W. (2002). The extracellular matrix of animals In *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York Garland Science.

Alfranca, A., López-Oliva, J. M., Genís, L., López-Maderuelo, D., Mirones, I., Salvado, D., . . . Redondo, J. M. (2008). PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGF $\beta$ /Alk5 signaling pathway. *112*(4), 1120-1128. doi:10.1182/blood-2007-09-112268 %J Blood

Angosto, M. C., & Gómez, J. Á. Á.-. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer *Revista Real Academia Nacional de Farmacia*, 76(1).

Asea, A. A. A., & Kaur, P. (2018). *HSP70 in Human Diseases and Disorders*: Springer International Publishing.

Bai, J., Yong, H. M., Chen, F. F., Song, W. B., Li, C., Liu, H., & Zheng, J. N. (2013). RUNX3 is a prognostic marker and potential therapeutic target in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139(11), 1813-1823. doi:10.1007/s00432-013-1498-x

Balan, M., & Pal, S. (2014). A novel CXCR3-B chemokine receptor-induced growth-inhibitory signal in cancer cells is mediated through the regulation of Bach-1 protein and Nrf2 protein nuclear translocation. *J Biol Chem*, 289(6), 3126-3137. doi:10.1074/jbc.M113.508044

Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, 125(Pt 23), 5591-5596. doi:10.1242/jcs.116392

Cárdenas J., B. E., Bautista V., Cervantes G. (2017 ). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario *Gaceta Mexicana de Oncología*, 7, 137.

Castro-Castro, A., Marchesin, V., Monteiro, P., Lodillinsky, C., Rossé, C., & Chavrier, P. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. *32*(1), 555-576. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125227

Cepeda, M. A., Evered, C. L., Pelling, J. J. H., & Damjanovski, S. (2017). Inhibition of MT1-MMP proteolytic function and ERK1/2 signalling influences cell migration

and invasion through changes in MMP-2 and MMP-9 levels. *J Cell Commun Signal*, 11(2), 167-179. doi:10.1007/s12079-016-0373-3

Cepeda, M. A., Pelling, J. J., Evered, C. L., Leong, H. S., & Damjanovski, S. (2017). The cytoplasmic domain of MT1-MMP is dispensable for migration augmentation but necessary to mediate viability of MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 350(1), 169-183. doi:10.1016/j.yexcr.2016.11.019

Cepeda, M. A., Pelling, J. J., Evered, C. L., Williams, K. C., Freedman, Z., Stan, I., . . . Damjanovski, S. (2016). Less is more: low expression of MT1-MMP is optimal to promote migration and tumorigenesis of breast cancer cells. *Mol Cancer*, 15(1), 65. doi:10.1186/s12943-016-0547-x

Chang, A., Le, C. P., Walker, A. K., Creed, S. J., Pon, C. K., Albold, S., . . . Sloan, E. K. (2016). beta2-Adrenoceptors on tumor cells play a critical role in stress-enhanced metastasis in a mouse model of breast cancer. *Brain Behav Immun*, 57, 106-115. doi:10.1016/j.bbi.2016.06.011

Chen, L. L. (2016). Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends Biochem Sci*, 41(9), 761-772. doi:10.1016/j.tibs.2016.07.003

Chernov, A. V., Sounni, N. E., Remacle, A. G., & Strongin, A. Y. (2009). Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem*, 284(19), 12727-12734. doi:10.1074/jbc.M900273200

Deryugina, E. I., Ratnikov, B. I., Yu, Q., Baciuc, P. C., Rozanov, D. V., & Strongin, A. Y. (2004). Prointegrin maturation follows rapid trafficking and processing of MT1-MMP in Furin-Negative Colon Carcinoma LoVo Cells. *Traffic*, 5(8), 627-641. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00206.x

Dong, L., Hong, H., Chen, X., Huang, Z., Wu, W., & Wu, F. (2018). LINC02163 regulates growth and epithelial-to-mesenchymal transition phenotype via miR-593-3p/FOXK1 axis in gastric cancer cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46(sup2), 607-615. doi:10.1080/21691401.2018.1464462

Douglas Hanahan, R. A. W. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100(1), 57-70. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

Ellis, L. M. (2006). The role of neuropilins in cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5), 1099-1107. doi:10.1158/1535-7163.Mct-05-0538

Fanucchi, S., & Mhlanga, M. M. (2017). Enhancer-Derived lncRNAs Regulate Genome Architecture: Fact or Fiction? *Trends in Genetics*, 33(6), 375-377. doi:10.1016/j.tig.2017.03.004

Feinberg, T. Y., Rowe, R. G., Saunders, T. L., & Weiss, S. J. (2016). Functional roles of MMP14 and MMP15 in early postnatal mammary gland development. *Development*, 143(21), 3956-3968. doi:10.1242/dev.136259

Finley, M. J., Happel, C. M., Kaminsky, D. E., & Rogers, T. J. (2008). Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. *Cell Immunol*, 252(1-2), 146-154. doi:10.1016/j.cellimm.2007.09.008

Flores Reséndiz, D., Castellanos Juárez, E., & Benítez Bribiesca, L. (2009). Las proteasas en la progresión neoplásica. *Gaceta Médica de México*, 145(0016-3813), 131-142.

García-Pardo, A., & Opdenakker, G. (2015). Nonproteolytic functions of matrix metalloproteinases in pathology and insights for the development of novel therapeutic inhibitors. *Metalloproteinases In Medicine*. doi:10.2147/mnm.S63629

Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*, 278(1), 16-27. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x

Gilles, C., Polette, M., Coraux, C., Tournier, J.-M., Meneguzzi, G., Munaut, C., . . . Foidart, J.-M. (2001). Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5  $\gamma$ 2 chain degradation to mammary epithelial cell migration. *114(16)*, 2967-2976.

Giussani, M., Merlino, G., Cappelletti, V., Tagliabue, E., & Daidone, M. G. (2015). Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*, 35, 3-10. doi:10.1016/j.semcancer.2015.09.012

Gullberg, D., Sims, J. D., McCready, J., & Jay, D. G. (2011). Extracellular Heat Shock Protein (Hsp)70 and Hsp90 $\alpha$  Assist in Matrix Metalloproteinase-2 Activation and Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *PLoS ONE*, 6(4). doi:10.1371/journal.pone.0018848

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hou, P., Zhao, Y., Li, Z., Yao, R., Ma, M., Gao, Y., . . . Lu, J. (2014). LincRNA-ROR induces epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Cell Death Dis*, 5, e1287. doi:10.1038/cddis.2014.249

INEGI. (2018). Estadísticas a Propósito del Día Mundial contra el Cáncer (4 de Febrero). *Comunicado de Prensa*, 61, 13

Iyer, R. P., Patterson, N. L., Fields, G. B., & Lindsey, M. L. (2012). The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 303(8), H919-H930. doi:10.1152/ajpheart.00577.2012

Jiménez-Salazar, J. E. G.-N., Leticia; Königsberg-Fainstein, Mina; Gómez-Quiroz, Luis Enrique; Zentella-Dehesa, Alejandro; Damián- Matsumura, Pablo (2012). Estructura y función de las uniones estrechas en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama humano *REB. Revista de Educación Bioquímica*, Vol. 31, núm. 2 49-59pp

Jubb, A. M., Strickland, L. A., Liu, S. D., Mak, J., Schmidt, M., & Koeppen, H. (2012). Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol*, 226(1), 50-60. doi:10.1002/path.2989

Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., . . . Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438, 820. doi:10.1038/nature04186  
<https://www.nature.com/articles/nature04186#supplementary-information>

Ke, J., Yang, Y., Che, Q., Jiang, F., Wang, H., Chen, Z., . . . Wan, X. (2016). Prostaglandin E2 (PGE2) promotes proliferation and invasion by enhancing SUMO-1 activity via EP4 receptor in endometrial cancer. *Tumor Biology*, 37(9), 12203-12211. doi:10.1007/s13277-016-5087-x

Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015

Lafleur, M. A., Xu, D., & Hemler, M. E. (2009). Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Molecular biology of the cell*, 20(7), 2030-2040. doi:10.1091/mbc.E08-11-1149

- Li, J., Zucker, S., Pulkoski-Gross, A., Kuscu, C., Karaayvaz, M., Ju, J., . . . Cao, J. (2012). Conversion of stationary to invasive tumor initiating cells (TICs): role of hypoxia in membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) trafficking. *PLoS ONE*, 7(6), e38403. doi:10.1371/journal.pone.0038403
- Li, X., Yang, Q., Yu, H., Wu, L., Zhao, Y., Zhang, C., . . . Hu, W. (2014). LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget*, 5(3), 788-801. doi:10.18632/oncotarget.1772
- Li, Y., Wu, Z., Yuan, J., Sun, L., Lin, L., Huang, N., . . . Liao, W. (2017). Long non-coding RNA MALAT1 promotes gastric cancer tumorigenicity and metastasis by regulating vasculogenic mimicry and angiogenesis. *Cancer Lett*, 395, 31-44. doi:10.1016/j.canlet.2017.02.035
- Lin, W.-W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175-1183. doi:10.1172/JCI31537
- Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., . . . Song, E. (2015). A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks IkappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 27(3), 370-381. doi:10.1016/j.ccell.2015.02.004
- Lv, M., Xu, P., Wu, Y., Huang, L., Li, W., Lv, S., . . . Fu, Z. (2016). LncRNAs as new biomarkers to differentiate triple negative breast cancer from non-triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 7(11), 13047-13059. doi:10.18632/oncotarget.7509
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10(10), 955-960.
- Marino-Puertas, L., Goulas, T., & Gomis-Ruth, F. X. (2017). Matrix metalloproteinases outside vertebrates. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(11 Pt A), 2026-2035. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.003
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), 215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
- Müller-Esterl, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*: Editorial Reverté.

Olarerin-George, A. O., & Hogenesch, J. B. (2015). Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*, 43(5), 2535-2542. doi:10.1093/nar/gkv136

Pahwa, S., Stawikowski, M. J., & Fields, G. B. (2014). Monitoring and Inhibiting MT1-MMP during Cancer Initiation and Progression. *Cancers (Basel)*, 6(1), 416-435. doi:10.3390/cancers6010416

Planchon, D., Rios Morris, E., Genest, M., Comunale, F., Vacher, S., Bièche, I., . . . Gauthier-Rouvière, C. (2018). MT1-MMP targeting to endolysosomes is mediated by upregulation of flotillins. *131(17)*, jcs218925. doi:10.1242/jcs.218925 %J Journal of Cell Science

Radisky, E. S., & Radisky, D. C. (2015). Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20, 1144-1163.

Ricca, A., Biroccio, A., Del Bufalo, D., Mackay, A. R., Santoni, A., & Cippitelli, M. (2000). bcl-2 over-expression enhances NF- $\kappa$ B activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7ADR breast-cancer cells. *86(2)*, 188-196. doi:doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000415)86:2<188::AID-IJC7>3.0.CO;2-W

Roth, M., Zhong, J., Tamm, M., & Szilard, J. (2009). Mesothelioma cells escape heat stress by upregulating Hsp40/Hsp70 expression via mitogen-activated protein kinases. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 451084. doi:10.1155/2009/451084

Rozanov, D. V., Savinov, A. Y., Williams, R., Liu, K., Golubkov, V. S., Krajewski, S., & Strongin, A. Y. (2008). Molecular signature of MT1-MMP: transactivation of the downstream universal gene network in cancer. *Cancer Res*, 68(11), 4086-4096. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6458

Ruffini, F., D'Atri, S., & Lacal, P. M. (2013). Neuropilin-1 expression promotes invasiveness of melanoma cells through vascular endothelial growth factor receptor-2-dependent and -independent mechanisms. *Int J Oncol*, 43(1), 297-306. doi:10.3892/ijo.2013.1948

Sakamoto, T., & Seiki, M. (2017). Integrated functions of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in regulating cancer malignancy: Beyond a proteinase. *Cancer Sci*, 108(6), 1095-1100. doi:10.1111/cas.13231

Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J. B., Daviet, L., Camonis, J., . . . Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is

required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol*, 181(6), 985-998. doi:10.1083/jcb.200709076

Salaverry, O. (2013). La etimología del cáncer y su curioso curso histórico %J Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 30, 137-141.

Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell*, 29(4), 452-463. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.010

Seifi-Alan, M., Shams, R., Bandehpour, M., Mirfakhraie, R., & Ghafouri-Fard, S. (2018). Neuropilin-1 expression is associated with lymph node metastasis in breast cancer tissues. *Cancer Manag Res*, 10, 1969-1974. doi:10.2147/CMAR.S169533

Sounni, N. E., Roghi, C., Chabottaux, V., Janssen, M., Munaut, C., Maquoi, E., . . . Noel, A. (2004). Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 279(14), 13564-13574. doi:10.1074/jbc.M307688200

Stingl, J., & Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 791-799. doi:10.1038/nrc2212

Stöcker, W., & Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(3), 383-390. doi:[https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80101-4](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80101-4)

Strongin, A. Y. (2010). Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), 133-141. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.04.009

Su, X., Malouf, G. G., Chen, Y., Zhang, J., Yao, H., Valero, V., . . . Esteva, F. J. (2014). Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget*, 5(20), 9864-9876. doi:10.18632/oncotarget.2454

Sun, M., Gadad, S. S., Kim, D. S., & Kraus, W. L. (2015). Discovery, Annotation, and Functional Analysis of Long Noncoding RNAs Controlling Cell-Cycle Gene Expression and Proliferation in Breast Cancer Cells. *Mol Cell*, 59(4), 698-711. doi:10.1016/j.molcel.2015.06.023

- Taherian-Fard, A., Srihari, S., & Ragan, M. A. (2015). Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. *Briefings in Bioinformatics*, 16(3), 461-474. doi:10.1093/bib/bbu020
- Tang, J., Li, Z., Lu, L., & Cho, C. H. (2013). beta-Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 23(6 Pt B), 533-542. doi:10.1016/j.semcancer.2013.08.009
- Tang, Y., Cheung, B. B., Atmadibrata, B., Marshall, G. M., Dinger, M. E., Liu, P. Y., & Liu, T. (2017). The regulatory role of long noncoding RNAs in cancer. *Cancer Lett*, 391, 12-19. doi:10.1016/j.canlet.2017.01.010
- The Cancer Genome Atlas, N., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., . . . Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490, 61. doi:10.1038/nature11412  
<https://www.nature.com/articles/nature11412#supplementary-information>
- Tomari, T., Koshikawa, N., Uematsu, T., Shinkawa, T., Hoshino, D., Egawa, N., . . . Seiki, M. (2009). High throughput analysis of proteins associating with a proinvasive MT1-MMP in human malignant melanoma A375 cells. *100(7)*, 1284-1290. doi:doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01173.x
- Vegran, F., Boidot, R., Coudert, B., Fumoleau, P., Arnould, L., Garnier, J., . . . Lizard-Nacol, S. (2009). Gene expression profile and response to trastuzumab-docetaxel-based treatment in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 101(8), 1357-1364. doi:10.1038/sj.bjc.6605310
- Wang, F., Trial, J., Diwan, A., Gao, F., Birdsall, H., Entman, M., . . . Mann, D. (2002). Regulation of Cardiac Fibroblast Cellular Function by Leukemia Inhibitory Factor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10), 1309-1316. doi:10.1006/jmcc.2002.2059
- Wang, J., Ye, C., Xiong, H., Shen, Y., Lu, Y., Zhou, J., & Wang, L. (2017). Dysregulation of long non-coding RNA in breast cancer: an overview of mechanism and clinical implication. *Oncotarget*, 8(3), 5508-5522. doi:10.18632/oncotarget.12537
- Watkins, G. A., Jones, E. F., Scott Shell, M., VanBrocklin, H. F., Pan, M.-H., Hanrahan, S. M., . . . Franc, B. L. (2009). Development of an optimized activatable MMP-14 targeted SPECT imaging probe. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(2), 653-659. doi:10.1016/j.bmc.2008.11.078

Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Tonn, J. C., & Weller, M. (1998). BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *440(3)*, 419-424. doi:10.1016/S0014-5793(98)01494-X

Wu, W., Wagner, E. K., Hao, Y., Rao, X., Dai, H., Han, J., . . . He, C. (2016). Tissue-specific Co-expression of Long Non-coding and Coding RNAs Associated with Breast Cancer. *Sci Rep*, *6*, 32731. doi:10.1038/srep32731

Yang, H., Li, G., Cheng, B., & Jiang, R. (2018). ZFAS1 functions as an oncogenic long non-coding RNA in bladder cancer. *Biosci Rep*, *38(3)*. doi:10.1042/BSR20180475

Yip, C., Foidart, P., Noël, A., & Sounni, N. E. (2019). MT4-MMP: The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases. *20(2)*, 354.

Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development*, *14(2)*, 163-176.

Zarrabi, K., Dufour, A., Li, J., Kuscu, C., Pulkoski-Gross, A., Zhi, J., . . . Cao, J. (2011). Inhibition of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14)-mediated cancer cell migration. *The Journal of biological chemistry*, *286(38)*, 33167-33177. doi:10.1074/jbc.M111.256644

Zhang, W., Shen, Q., Chen, M., Wang, Y., Zhou, Q., Tao, X., & Zhu, X. (2015). The role of 14-3-3 proteins in gynecological tumors. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *20*, 934-945.

Zheng, J., Yi, D., Liu, Y., Wang, M., Zhu, Y., & Shi, H. (2017). Long noncoding RNA UCA1 regulates neural stem cell differentiation by controlling miR-1/Hes1 expression. *Am J Transl Res*, *9(8)*, 3696-3704.