



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

EL IMPACTO DE LOS MICRORNAS EN LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA  
DE CÉLULAS MCF-7 DURANTE EL DESARROLLO DE ESFEROIDES

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ERICK ANDRÉS MUCIÑO OLMOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITE TUTORAL:

DRA. MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO

MARZO, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**El impacto de los microRNAs en la reprogramación metabólica de  
células MCF-7 durante el desarrollo de esferoides**

por

Erick Andrés Muciño Olmos

I.BT., Instituto Politécnico Nacional (2014)

Tesis presentada para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biomédicas

en la

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ciudad de México, México. Marzo, 2021

*A mi padre, madre y hermanas:  
Gracias por su apoyo incondicional, la paciencia  
que me han tenido en este largo proceso de  
formación, son mi luz, mi fuerza y mi motivación  
para mejorar. Ojalá siempre esté a la altura de la  
educación que me ofrecieron y deje una huella  
positiva en todo aquel que necesite mi ayuda  
como ustedes lo hicieron en mi.*

ERICK

# Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado con la beca número 735969. A la UNAM por albergar grandes catedráticos que son indispensables para la formación de personal de calidad mundial. Al posgrado en ciencias biomédicas por brindarnos las herramientas para continuar nuestros estudios, incluida la siempre amable lic. Evangelina Vargas Barrientos.

Este trabajo estuvo dividido en dos partes. La parte computacional fue realizada bajo la tutoría del Dr. Osbaldo Resendis Antonio en el Laboratorio de Biología de Sistemas en Humano, ubicado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). La parte experimental fue realizada bajo la tutoría de la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas en el Laboratorio de Epigenética, ubicado en el INMEGEN.

Después de terminar este proceso lleno de retos, dificultades y aprendizaje. Agradezco al Doctor Osbaldo Resendis Antonio por darme la oportunidad de realizar un proyecto doctoral y brindarme su apoyo, experiencia y tutoría como director y amigo.

A mi comité tutorial, la Doctora Vilma Araceli Maldonado Lagunas y la Doctora Mahara Angélica Valverde Ramírez, valoro y atesoro la grandiosa guía con observaciones tanto profesionales como personales para mantenerme a flote.

A todos mis compañeros de diversos posgrados y del INMEGEN que proporcionaron innumerables discusiones que mantuvieron mi perspectiva amplia, mi estado mental saludable y mi motivación a tope para continuar el proyecto. Entre ellos, los ahora doctores que admiro profundamente, Edna Ayerim Mandujano Tinoco, Alfredo García Venzor, Angélica Paola Hernández Pérez, Christian Ávila Sánchez y Meztli Lucía Matadamas Guzmán.

A mis amigos en la ciencia, Aarón Vázquez Jiménez, Ugo Ávila Ponce de León, Gabriela Marisol Cruz Miranda, Araceli Gutiérrez Rodríguez, Felipe de Jesús Muñoz González, Diana Elena López Esparza, Jorge Enrique Arellano Villavicencio y Gema Mateo que me acompañaron en este tortuoso camino y lo llenaron de anécdotas inolvidables.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Cáncer (estado del arte) . . . . .	1
1.2. Estudio del cáncer de mama . . . . .	4
1.3. miRNAs . . . . .	6
1.4. Metabolismo de cáncer . . . . .	12
1.5. miRNAs y metabolismo . . . . .	18
1.6. Tecnologías Ómicas y secuenciación de alto rendimiento . . . . .	23
<b>2. Acotación</b>	<b>27</b>
<b>3. Antecedentes de la investigación</b>	<b>28</b>
<b>4. Pregunta de investigación e hipótesis</b>	<b>31</b>
<b>5. Justificación</b>	<b>32</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>7. Metodología. Estrategia experimental y bioinformática</b>	<b>34</b>
7.1. Estrategia Experimental . . . . .	34
7.1.1. Material Biológico . . . . .	34
7.1.2. Condiciones de cultivo celular . . . . .	34
7.1.3. Tratamiento para la disgregación celular de los ETMC . . . . .	37
7.1.4. Estimación de la distribución del diámetro de los ETMC . . . . .	37

7.1.5.	Selección de tiempos óptimos de cultivos para enriquecer la proporción proliferativa y quiescente dentro de los ETMC . . . . .	38
7.1.6.	Inmunofenotipificación . . . . .	38
7.1.7.	Extracción de ARN total . . . . .	38
7.1.8.	Construcción y secuenciación de librerías de ARN y ARN pequeño . . . . .	39
7.2.	Estrategia Bioinformática . . . . .	40
7.2.1.	Datos . . . . .	40
7.2.2.	Descarga, Almacenamiento y unión de los datos crudos de RNA-Seq y small RNA-Seq . . . . .	40
7.2.3.	Determinación de la calidad de los archivos de secuenciación y preprocesamiento	41
7.2.4.	Alineamiento y cuantificación de las entidades . . . . .	42
7.2.5.	Análisis exploratorio y análisis de expresión diferencial . . . . .	42
7.2.6.	Predicción de blancos de miRNAs usando mRNAs metabólicos . . . . .	44
7.2.7.	Análisis de enriquecimiento de vías . . . . .	44
<b>8.</b>	<b>Resultados</b>	<b>45</b>
8.1.	Cultivo de ETMC como modelo de proliferación y quiescencia . . . . .	45
8.2.	Análisis bioinformático de RNA-Seq y small RNA-Seq . . . . .	47
8.3.	Análisis de expresión diferencial y predicción de ARNm metabólicos blanco . . . . .	47
8.4.	Funciones de los pares de miRNAs-ARNm metabólicos . . . . .	49
8.5.	Análisis funcional . . . . .	55
<b>9.</b>	<b>Discusión</b>	<b>58</b>
9.1.	Comparación entre Q-ETMC y P-ETMC . . . . .	58
9.2.	Comparación entre Q-ETMC y Monocultivo . . . . .	60
9.3.	Comparación entre P-ETMC y Monocultivo . . . . .	62
9.4.	Vías de señalización alteradas . . . . .	63
<b>10.</b>	<b>Limitaciones y suposiciones importantes</b>	<b>66</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas</b>	<b>68</b>
11.1.	Conclusiones . . . . .	68

11.2. Perspectivas . . . . .	70
<b>Bibliografía</b>	<b>70</b>
<b>A. Diámetro de los ETMC</b>	<b>97</b>
<b>B. Diferencias de los datos de citometría en cultivo</b>	<b>99</b>
<b>Producción científica</b>	<b>99</b>



# Índice de figuras

7-1. Monocultivo de MCF-7 . . . . .	35
7-2. ETMC de MCF-7 . . . . .	36
7-3. PCA Datos de Secuenciación . . . . .	43
8-1. Modelo de ETMC de MCF-7 . . . . .	46
8-2. Flujo de trabajo de la metodología bioinformática. . . . .	48
8-3. Resumen del análisis de expresión diferencial. . . . .	50
8-4. Análisis de enriquecimiento de vías. . . . .	57
9-1. Representación esquemática de las vías metabólicas alteradas. . . . .	65
B-1. Diferencias estadísticas en las condiciones de cultivo . . . . .	100

# Índice de tablas

8-1. Vías afectadas por las parejas de miRNA-ARNm para la comparación entre Q-MCTS y P-MCTS. . . . .	52
8-2. Vías afectadas por las parejas de miRNA-ARNm para la comparación entre Q-MCTS y Monocultivo. . . . .	53
8-3. Vías afectadas por las parejas de miRNA-ARNm para la comparación entre P-MCTS y Monocultivo. . . . .	54
A-1. Distribución del diámetro de los ETMC en las réplicas biológicas . . . . .	98

# El impacto de los microRNAs en la reprogramación metabólica de células MCF-7 durante el desarrollo de esferoides

por

Erick Andrés Muciño Olmos

## Resumen

Durante la progresión tumoral, la alteración del metabolismo y la heterogeneidad celular son factores comunes de la malignidad del cáncer. En los últimos años, los microRNAs (miRNA) han surgido como elementos reguladores que inhiben la traducción y estabilidad de los ARNm, algunos causando alteraciones metabólicas directas en el cáncer. En este estudio, investigamos la relación funcional entre subpoblaciones celulares y la relación entre los miRNAs y sus ARNm blanco que controlan el metabolismo, y cómo esta regulación fina se diversifica según la etapa del tumor. Para ello, implementamos un análisis de tecnologías de alto rendimiento como, RNA-seq, small-RNA-seq y single-cell-RNA-seq en una línea celular de cáncer de mama (MCF-7). La línea celular se cultivó en condiciones de esferoides tumorales multicelulares (ETMC) y de monocultivo. Para los ETMC, seleccionamos dos puntos de tiempo durante su desarrollo para recapitular una etapa proliferativa y quiescente y contrastar sus patrones de expresión de miRNA y ARNm asociados con el metabolismo. Como resultado, a partir del análisis pareado entre RNA-seq y small-RNA-seq, identificamos un conjunto de nuevas interacciones reguladoras putativas directas entre miRNA y ARNm metabólicos representativos de las etapas proliferativa y quiescente. Además, los resultados del análisis de single-cell-RNA-seq muestran tres grandes grupos celulares, con una composición complementaria no redundante. Mientras que, un grupo promueve la proliferación, otros activan principalmente mecanismos para invadir otros tejidos y servir como población reservorio conservada en el tiempo. Nuestros resultados se pueden clasificar en dos áreas, la primera proporciona evidencia para ver el cáncer como una unidad sistémica que tiene poblaciones de células con estratificación de tareas con el objetivo final de preservar las características de los tumores, y la segunda es cómo los miRNAs modulan el panorama metabólico en ETMC de cáncer mama, que eventualmente ayudará a diseñar nuevas estrategias para mitigar el fenotipo del cáncer.

# El impacto de los microRNAs en la reprogramación metabólica de células MCF-7 durante el desarrollo de esferoides

by

Erick Andrés Muciño Olmos

## Abstract

During tumor progression, altered metabolism and cell heterogeneity are common drivers of cancer malignancy. In recent years, microRNAs (miRNAs) have emerged as regulatory elements that inhibit the translation and stability of crucial mRNAs, some of them causing direct metabolic alterations in cancer. In this study, we investigated the functional relationship among cell subpopulations and the relationship between miRNAs and their target mRNAs that control metabolism, and how this fine-tuned regulation is diversified depending on the tumor stage. To this end, we implemented a high-throughput analysis of RNA-seq, small RNA-seq and single-cell RNA-seq in a breast cancer cell line (MCF-7). The cell line was cultured in multicellular tumor spheroid (MCTS) and monoculture conditions. For MCTS, we selected two-time points during their development to recapitulate a proliferative and quiescent stage and contrast their miRNA and mRNA expression patterns associated with metabolism. As a result, from the paired analysis of RNA-seq and smallRNA-seq we identified a set of new direct putative regulatory interactions between miRNAs and metabolic mRNAs representative for proliferative and quiescent stages. Also, the results from the single-cell-RNA-seq analysis show three major robust cellular clusters, with a non-redundant complementary composition. Whilst, one cluster promotes proliferation, others mainly activate mechanisms to invade other tissues and serve as a reservoir population conserved over time. Our results can be categorized into two areas, the first one provides evidence to see cancer as a systemic unit that has cell populations with task stratification with the ultimate goal of preserving the hallmarks in tumors, and the second is how miRNAs modulate the metabolic landscape in breast cancer MCTS, which eventually will help to design new strategies to mitigate cancer phenotype.

# Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
AGO: Argonauta  
ADNc: ADN complementario  
Aldo A: aldolasa A  
AMPK: AMP quinasa (AMP kinase)  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ARNpol: ARN polimerasa  
ATP: Trifosfato de adenosina (Adenosine Triphosphate)  
BCAA: aminoácidos de cadena ramificada (Branched-Chain Amino Acids)  
CDK: Cinasas dependientes de ciclina (Cyclin-dependent Kinases)  
CDKI: Inhibidor de CDK (Cyclin-dependent Kinases Inhibitor)  
DGSCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8  
ETMC: Esferoides Tumorales Multicelulares  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GLUD: Glutamato Deshidrogenasa  
GLUT: Transportador de glucosa (Glucose transporter)  
HKs: hexocinasas  
HMGCR: 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA reductasa  
HTS: Secuenciación de alto rendimiento (High-throughput sequencing)  
LLC: Leucemia Linfocítica crónica  
m7G: 7-metilguanosina  
miRNA: microRNAs  
miRNA-seq: Secuenciación de microRNAs (microRNA sequencing)  
NEAA: Aminoácido no esencial (Non-essential amino acid)  
NGHRI: Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (National Human Genome Research Institute)  
nt: Nucleótido  
pb: pares de bases  
PE: extremos pareados (Paired-end)  
PET: Tomografía por emisión de positrones (Positron emission tomography)  
PFK1: Fosfofructoquinasa-1  
pre-miRNA: miRNA precursor  
pri-miRNA: miRNA primario  
ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)  
RNA-seq: Secuenciación de ARN (RNA sequencing)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)

SE: extremo único (Single-End)

shRNA: ARN de horquilla corta

small-RNA-seq: Secuenciación de ARN pequeño (small RNA sequencing)

SREBP: proteínas de unión a elementos reguladores de esterol (Sterol regulatory element-binding proteins)

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

Tb: Terabyte

U: Uracilo

XPO5: Exportina 5

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Cáncer (estado del arte)

El fenómeno del cáncer ha sido un problema que se ha mantenido a lo largo de la historia de la humanidad, existiendo informes documentados desde épocas tan ancestrales como el año 3000 AC [Strouhal, 1976; Hajdu, 2011]. Sin embargo, su estudio comenzó a tener mayor claridad hasta el siglo XV con el conocimiento generado del cuerpo humano. Posteriormente, desde el siglo XV al XX se desarrollaron varias técnicas y descubrimientos que permitirían comprender los procesos biológicos que ocurren en el cáncer. De esta forma, se identificaron procesos clave durante su patología para sugerir esquemas de tratamiento adecuado. A continuación mencionaré dos hechos relevantes que favorecieron al tratamiento del cáncer. En el año 1761 Giovanni Morgagni sería el primero en realizar una actividad que se ha convertido en rutina en el estudio del cáncer, la cual es la extracción de biopsias para relacionar la enfermedad del paciente con hallazgos patológicos [Ghosh, 2017]. Otro acontecimiento relevante fue la hipótesis sugerida por John Hunter, la cual postulaba que el cáncer podría ser curado por cirugía (Siglo XVII) [Bondeson, 2001]. Los acontecimientos mencionados anteriormente sentaron las bases de cómo enfrentar este gran problema. No obstante, para combatir realmente la enfermedad es necesario comprender su origen biológico a fondo. Esta rúbrica ha sido un tema central durante la historia de la humanidad, la cual se ha atribuido desde cuestiones religiosas hasta problemas genéticos. Actualmente conocemos y evitamos muchas sustancias o factores que podrían causar cáncer (carcinógenos) como: el alquitrán de hulla y sus derivados, algunos hidrocarburos, asbestos, radiaciones de varias fuentes, incluyendo el sol,

virus y muchísimos otros factores [El Ghissassi *et al.*, 2009; Bouvard *et al.*, 2009; Straif *et al.*, 2009; Grosse *et al.*, 2009; Secretan *et al.*, 2009; Baan *et al.*, 2009]. A pesar de tomar precauciones contra este tipo de sustancias o factores, el problema parece no detenerse [Siegel *et al.*, 2020]. Asimismo, en la actualidad seguimos sin entender los mecanismos que subyacen esta transformación celular maligna, es por esto que se intentó abordar este problema desde el planteamiento de su constitución genética [Wheeler y Wang, 2013]. Posteriormente sería elucidado que la respuesta a este problema no estaría completa, únicamente conociendo las diferencias genéticas entre una célula normal y su contraparte maligna [Hanahan y Weinberg, 2011]. El siguiente paso sería conocer qué efectos provocan estas diferencias genéticas, el cual sería abordado hasta entender cómo funcionan los genes y de qué manera esta función puede estar alterada por mutaciones. Es hasta este punto, que se puede explicar en qué manera los carcinógenos mencionados anteriormente tienen una repercusión en el desarrollo del cáncer. De manera más detallada, los químicos y radiaciones pueden generar daño al ADN, mientras que los virus, pueden introducir nuevas secuencias de ADN. Como conclusión a esta gran cantidad de trabajos científicos, se destaca la posibilidad de señalar la posición exacta del sitio dañado en un gen específico [Basu, 2018].

Retomando el tema de funcionalidad genética, entre finales de los 60 y principios de los 80, científicos descubrieron dos importantes familias de genes relacionadas con el cáncer: los oncogenes y genes supresores de tumores [Basu, 2018; Harris *et al.*, 1969; Shih y Weinberg, 1982]. De manera sencilla, los oncogenes son aquellos genes que causan el crecimiento anormal de las células. Estos están formados por cambios o mutaciones de ciertos genes normales de la célula llamados proto-oncogenes; esta clase de genes controla estímulos celulares como la división celular o el grado de diferenciación. Los genes supresores de tumores, son genes que disminuyen la división celular, y están implicados en la reparación del ADN y son responsables de controlar procesos como la apoptosis. Por lo que, su mal funcionamiento a nivel genético se divide en dos categorías: 1) mutaciones de ganancia de función en protooncogenes, y 2) mutaciones con pérdida de función en genes supresores de tumores. Ambas categorías están estrechamente relacionadas con el cáncer [Klein, 1988]. Este breve resumen histórico busca asombrar y abrumar de la tortuosidad que ha representado el estudio del cáncer para la humanidad, topándose con ejemplos básicos y eventos relevantes para llegar hasta este punto del conocimiento, sin olvidar todos los innumerables descubrimientos que no se mencionan a lo largo del escrito [Mukherjee, 2014]. Lo siguiente, con la finalidad de iniciar la pregunta central de la



gran mayoría de investigaciones dirigidas al estudio del cáncer “¿Cómo curar el cáncer?”. Antes de empezar a acercarnos a la respuesta de esta interrogante, me gustaría mencionar algunos avances que se han realizado en estas últimas décadas. Uno de ellos, fue la categorización de los procesos clave que sustentan el fenotipo maligno de las células de cáncer, el cual fue llevado a cabo por los científicos Hanahan y Weinberg en el 2000. En los trabajos realizados por estos científicos, se introdujo la palabra “hallmark” (rasgo característico) para describir cada actividad que lleva a cabo una célula maligna para mantener su fenotipo. Actualmente esta clasificación consta de **diez** rasgos característicos: **1.** Evasión de supresores de crecimiento, **2.** Evasión de la destrucción inmunitaria, **3.** Permitir la inmortalidad replicativa, **4.** Inflamación promovida por el tumor, **5.** Activación de la invasión y metástasis, **6.** Inducción de la angiogénesis, **7.** Inestabilidad genómica y mutaciones, **8.** Resistencia a la muerte celular, **9.** Desregulación en la bioenergética celular y **10.** Mantenimiento de la señalización proliferativa [Hanahan y Weinberg, 2011]. No obstante, la mayoría de estos rasgos característicos tiene como finalidad el mantenimiento de la proliferación crónica. Este estado a su vez, está acompañado de varias alteraciones, incluida la reprogramación metabólica, la cual fue descrita por primera vez en 1926 por Otto Warburg [Warburg, 1926]. Sin embargo, a pesar de su relevancia, este último aspecto se ha agregado recientemente a esta lista de rasgos característicos del cáncer publicada en 2011, convirtiéndolo en uno de los fenómenos metabólicos ampliamente observados en cáncer.

Un aspecto que incrementa la complejidad en el cáncer, es la heterogeneidad de las poblaciones celulares dentro del tumor, las cuáles tiene impacto sobre la efectividad y confiabilidad de los fármacos para tratar la alteración neoplásica [Yap *et al.*, 2012]. Con la finalidad de entender cómo se relacionan estos mecanismos, el estudio de esferoides tumorales multicelulares (ETMC) representa un modelo de gran interés que reproduce con mayor precisión el microambiente tumoral, la heterogeneidad existente en el tejido, diferencias de expresión en genes alterados y la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos [Kelm *et al.*, 2003]. Como se ha mencionado anteriormente, existen varios aspectos que se encuentran afectados en el cáncer, uno que hasta ahora no se ha mencionado es la regulación por microARNs (miRNAs, por sus siglas en inglés), la cual se conoce que tiene influencia en procesos relevantes para la progresión del cáncer. Los miRNAs son moléculas de ARN pequeños no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) que regulan cambios finos en la expresión genética. Notablemente, en el estudio del cáncer se ha propuesto que los miRNAs cooperan

en la carcinogénesis [Calin y Croce, 2006]. Estos últimos párrafos han abordado diversos elementos recientemente descritos que participan en la progresión del cáncer como: la reprogramación metabólica, la heterogeneidad intratumoral y los miRNAs. Sin embargo, es importante mencionar que no son los únicos ni los más importantes. No obstante, la respuesta a la gran interrogante (¿Cómo curar el cáncer?) probablemente se acerque cuando podamos integrar toda las fuentes de información que hemos generado como: la genómica, transcriptómica, metabolómica, miRNómica, epigenómica, redes de señalización, participación del sistema inmune, etc, en modelos computacionales que permitan la simulación sistémica y sistemática de esta vasta información para su entendimiento. En este contexto, nuestra propuesta para abordar este complejo rompecabezas de la biología del cáncer es: realizar un análisis integral de la regulación por miRNAs y sus efectos a nivel metabólico en un modelo de ETMC de una línea celular de cáncer de mama (MCF-7). Concluyendo, es necesario que equipos multidisciplinarios colaboren y formen este tipo de modelos, los cuales su finalidad es entender los mecanismos globales que rigen un fenotipo específico. Esperamos que en las próximas décadas se generen formalismos capaces de la integración de todos los niveles de regulación para entender de manera más completa las particularidades que rigen estas diferencias celulares y así atacar el problema de raíz.

## 1.2. Estudio del cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las neoplasias humanas más comunes, esta representa aproximadamente una cuarta parte de todos los cánceres en mujeres en todo el mundo y el 27% de los cánceres en países desarrollados con un estilo de vida occidental (Lakhani and International Agency for Research on Cancer 2012). Asimismo, es la segunda causa principal de muerte por cáncer en mujeres (Healton et al. 2007). Además, el cáncer de mama también puede ocurrir en hombres, pero es 100 veces más común en mujeres que en hombres. Sin embargo en hombres, suele tener un mal pronóstico debido a retrasos en el diagnóstico (International Agency for Research on Cancer 2008). El cáncer de mama ocurre en cualquiera de las células de las glándulas mamarias y exhibe una gran cantidad de anomalías genéticas y epigenéticas que presentan varias características clínicas (Masood 2016). Esto ha llevado a establecer clasificaciones para facilitar su estudio y tratamiento. Por ejemplo, existen clasificaciones basadas en expresiones genéticas, criterios morfológicos y

expresiones inmunohistoquímicas de los receptores de estrógenos y progesterona, Ki67, HER2 y claudinas. De acuerdo con la expresión de estos marcadores, se han clasificado seis subtipos moleculares; normal, luminal A, luminal B, ErbB2+, tipo basal y el tipo bajo en claudinas (Malhotra et al. 2010; Kondov et al. 2018). Estas categorizaciones proporcionan información importante sobre la probabilidad de metástasis, la selección y la respuesta al tratamiento. Un hecho importante a destacar es que una gran proporción del conocimiento actual acerca de los carcinomas mamarios y su clasificación es derivado a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando líneas celulares de cáncer mamario. Esto debido a que proporcionan una fuente ilimitada de material biológico homogéneo y autorreplicable utilizando protocolos simples de cultivo (Lacroix and Leclercq 2004). Un ejemplo de ello, es la generación de la línea celular MCF-7. Este acontecimiento representa un baluarte de la investigación del cáncer de mama ya que han pasado 50 años desde que un derrame pleural de una paciente con cáncer de mama metastásico condujo a la generación de esta línea celular de cáncer (Soule et al. 1973). MCF-7 es la línea celular de cáncer de mama humano más estudiada en el mundo. Con más de 25, 000 publicaciones, su popularidad es debido a la fidelidad con la que refleja muchos aspectos del cáncer de mama en el entorno clínico, particularmente en el tratamiento de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos (luminal A) (A. V. Lee, Oesterreich, and Davidson 2015). Durante su estudio, los primeros reportes se centraron en la regulación del estrógeno como factor de crecimiento y molécula de señalización, revelando que el estrógeno sin duda es un componente clave en la regulación del ciclo celular (Osborne and Schiff 2011). Además, se ha demostrado que el estrógeno induce y reprime simultáneamente una gran cantidad de genes, lo cual indica una vasta red de cambios que se coordinan para alterar el crecimiento del cáncer de mama (Casa et al. 2012). A pesar de las cuantiosas aportaciones por el estudio de MCF-7, las limitaciones más importantes están dadas por dos razones: 1) Solo representa al subtipo luminal A y 2) La gran mayoría de estos descubrimientos se realizaron creciendo las células MCF-7 adheridas sobre un soporte sólido (Monocapa). Este último, es el método clásico de cultivo celular, el cual carece de características fundamentales de tumores *in vivo*, como: los gradientes de nutrientes, las interacciones célula-célula, interacciones célula-matriz, condiciones de hipoxia, tres dimensiones y coexistencia con otros tipos celulares (Nath and Devi 2016). Por lo que, el cultivo en tres dimensiones surgió como una alternativa para aminorar algunas de las limitaciones de los cultivos en monocapa. Los sistemas de cultivo tridimensionales (3D) ofrecen la oportunidad única

de cultivar células cancerosas homotípicas o con varios tipos celulares, fomentando interacciones célula-célula y célula-matriz que asemejan ampliamente el entorno nativo de los tumores (Baal et al. 2009). Además, el microambiente 3D reproduce los diferentes tipos de heterogeneidad celular observados in vivo, como las disparidades en el ciclo celular, principalmente entre células proliferativas y quiescentes (Pampaloni, Reynaud, and Stelzer 2007). Dependiendo de la metodología utilizada para generar el cultivo 3D, existen cuatro modelos de cáncer esférico: 1) Los Esferoides Tumoraes MultiCelulares (ETMC), descritos por primera vez a principios de los años 70 a partir del cultivo de líneas celulares en condiciones no adherentes; 2) Las tumoresferas, un modelo de expansión de células troncales cancerosas, en un medio sin suero suplementado con factores de crecimiento; 3) Esferas tumorales derivadas de tejido neoplásico y 4) Esferoides multicelulares organotípicos, obtenidos por disociación y corte mecánicos del tejido tumoral (Weiswald, Bellet, and Dangles-Marie 2015). En función del objetivo del estudio, cada modelo posee sus propias cualidades e inconvenientes, siendo los ETMC el modelo esférico de cáncer mejor caracterizado, con el cual se han explorado áreas como: el crecimiento y la supervivencia tumoral, las condiciones hipóxicas, el cribado farmacológico de alto rendimiento y la radiosensibilidad (Baal et al. 2009); (Weiswald, Bellet, and Dangles-Marie 2015). Finalmente, aún con las limitaciones que este modelo posee, su uso en la exploración de la heterogeneidad intratumoral y sus disparidades en el ciclo celular del cáncer de mama promete ser un nicho importante del conocimiento que actualmente ha sido pobremente investigado.

### 1.3. miRNAs

Por muchos años, el célebre dogma central de la biología molecular utilizado para describir el flujo de información genética ( $\text{ADN} \rightarrow \text{ARN} \rightarrow \text{Proteína}$  [Crick, 1958]) se mantuvo inalterado, encasillando al ARN como una molécula plantilla o de infraestructura para la síntesis de proteínas. Sin embargo, después de varias décadas se fue revelando que los genomas de organismos complejos poseen ARN reguladores que orquestan mecanismos de control en el flujo de la información genética [Morris y Mattick, 2014]. Uno de ellos, fueron los miRNAs, los cuales presentan una función reguladora en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans* [Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993; Bray *et al.*, 2018]. Este descubrimiento estableció un nuevo paradigma para la regulación genética en eucariotas, el cual expone que estos ARN, de aproximadamente 22 nt, reprimen a su ARN mensajero (ARNm)

diana. Los miRNAs han demostrado ser omnipresentes en una gran cantidad de modelos de plantas y animales. Además, algunos miRNAs están altamente conservados en todas las especies [Pasquinelli *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010; Reinhart *et al.*, 2002]. Asimismo, su mecanismo de acción, es actuar como guías de secuencia-específica para el reconocimiento de su ARNm blanco [Lai, 2002]. Actualmente se han encontrado varios miles de miRNAs en decenas de plantas y animales, cuya colección se encuentran depositados en miRBase [Kozomara y Griffiths-Jones, 2011]. Este es un repositorio público en línea, donde se depositan todas las secuencias y anotaciones de los miRNAs descritos a la fecha. Aunque los miRNAs regulan diversos aspectos del desarrollo y la fisiología tanto en plantas como en animales, existen diferencias sustanciales entre ellos. Por ejemplo, los miRNAs se procesan de sus ARNm precursores por diferentes vías y en diferentes compartimentos subcelulares [Axtell *et al.*, 2011]. Una vez madurados, los miRNAs de plantas y animales tienen conjuntos de blancos muy diferentes, y el número de blancos de un miRNA animal generalmente excede al de un miRNA vegetal en al menos un orden de magnitud [Bartel, 2009]. En general, ambos reinos comparten vías centrales análogas que gobierna su biogénesis como: el procesamiento del su ARNm precursor por enzimas ARNasa tipo III: Dicer y/o Drosha para producir ARN pequeños de aproximadamente 21 a 24 nt que guían a las proteínas Argonauta (AGO). Con fines de simplicidad, a continuación se describe únicamente el proceso de biogénesis canónica de miRNAs animales. La biogénesis de miRNAs comienza con la transcripción de secuencias de ADN que contienen genes de miRNAs en miRNAs primarios (pri-miRNA, por sus siglas en inglés), está se lleva a cabo por la ARN polimerasa (ARNpol) II / III [Ha y Kim, 2014]. Posteriormente, los pri-miRNAs son procesados para generar miRNAs precursores (pre-miRNA, por sus siglas en inglés) por el complejo microprocesador. Este consiste en una proteína de unión al ARN, llamada DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) y enzima ribonucleasa tipo III, Drosha [Denli *et al.*, 2004]. Los pre-miRNAs resultantes poseen una estructura de tallo-asa ( 70 nt), y se exportan al citoplasma mediante el complejo: exportina 5 (XPO5) / RanGTP. Finalmente, son procesados por la endonucleasa tipo III, Dicer [Okada *et al.*, 2009; Ha y Kim, 2014]. Este procesamiento elimina el asa terminal, lo que da como resultado un dúplex de miRNA maduro [Zhang *et al.*, 2004]. La direccionalidad de la hebra del miRNA determina el nombre de la forma madura del miRNA. La hebra 5p surge del extremo 5' de la horquilla del pre-miRNA, mientras que la hebra 3p se origina en el extremo 3'. Ambas cadenas del dúplex del miRNA maduro, pueden cargarse en la familia de proteínas AGO (AGO1-4 en humanos) en una

manera dependiente de ATP [Maniataki, 2005]. Para cualquier miRNA, la proporción de hebra 5p o 3p cargada en AGO varía mucho según el tipo de célula o el entorno celular, desde proporciones casi iguales hasta la predominancia de una sobre otra [Meijer *et al.*, 2014]. La selección de la cadena 5p y 3p se basa en parte en la estabilidad termodinámica en los extremos 5' del dúplex del miRNA o en la existencia de un uracilo (U) en el extremo 5' como primer nucleótido [Khvorova *et al.*, 2003]. Es importante mencionar que aproximadamente la mitad de todos los miRNAs identificados actualmente son intragénicos, es decir se procesan principalmente a partir de intrones. Relativamente pocos son procesados de exones de genes que codifican proteínas, y el resto son intergénicos, por lo que se transcriben independientemente y están regulados por sus propios promotores [de Rie *et al.*, 2017; Kim y Narry Kim, 2007]. Además, existen casos en los cuales los miRNAs se transcriben en forma de un transcrito largo, por lo que los miRNAs generados de este cúmulo pueden tener regiones semillas (región de unión entre el miRNAs y su ARN blanco) similares, y son considerados familias de miRNAs [Tanzer y Stadler, 2004]. Otro hecho relevante, es que a la fecha se han dilucidado múltiples vías de biogénesis de miRNAs no canónicas. Estas pueden agruparse en dos tipos: vías independientes de Drosha/DGCR8 y vías independientes de Dicer. Los pre-miRNAs producidos por la vía independiente de Drosha/DGCR8 son similares a los sustratos de Dicer. Un ejemplo de estos pre-miRNAs, son los miRtrones, que se producen a partir de los intrones de ARNm durante el empalme de ARN (splicing de ARNm) [Ruby *et al.*, 2007; Babiarz *et al.*, 2008]. Otro ejemplo, son los pre-miRNAs protegidos con 7-metilguanosa (m7G, 5' caperuza), estos se exportan directamente al citoplasma a través de exportina 1 (XPO1) sin la necesidad del procesamiento por Drosha [Xie *et al.*, 2013]. Por otro lado, los miRNAs producidos por la vía independiente de Dicer son procesados por Drosha a partir de transcritos endógenos de ARN de horquilla corta (shRNA, por sus siglas en inglés) [Yang *et al.*, 2010]. El corte de Drosha sobre los shRNAs permite la carga del pre-miRNA generado en AGO2. Además, AGO2 realiza 2 cortes: el primero en la cadena 3p, y un segundo corte en dirección 3'-5' en la cadena 5p para completar su maduración [Cheloufi *et al.*, 2010]. En cuanto a su mecanismo de acción, la mayoría de los estudios hasta la fecha han demostrado que los miRNAs se unen a una secuencia específica en el extremo 3' UTR (región no traducida, por sus siglas en inglés) de su ARNm blanco para inducir la represión traduccional, la deadenilación y la hidrólisis de la caperuza 5' (decapping) [Huntzinger y Izaurralde, 2011; Ipsaro y Joshua-Tor, 2015]. Sin embargo, también se han detectado sitios de unión de miRNAs en otras regiones de ARNm,

incluida la 5' UTR, la región codificante y las regiones promotoras [Xu *et al.*, 2014; Broughton *et al.*, 2016]. La unión del miRNA a la región 5' UTR y regiones codificantes tiene efecto de silenciamiento sobre la expresión génica [Forman *et al.*, 2008] [Zhang *et al.*, 2018], mientras que la interacción del miRNA con la región promotora puede inducir la transcripción [Dharap *et al.*, 2013]. A la fecha, se ha descrito que los miRNAs juegan un papel importante en prácticamente todas las vías biológicas en mamíferos y otros organismos multicelulares [Jansson y Lund, 2012]. Además, enfoques computacionales y experimentales indican que un miRNA puede reprimir, en promedio, más de 100 ARNm. Asimismo, se predice que más del 60% de los genes que codifican proteínas humanas contienen sitios de unión a miRNAs dentro de sus 3' UTR [Friedman *et al.*, 2008]. Este conjunto de hechos revela el amplio impacto y la vasta abundancia que tienen los miRNAs en la regulación de la expresión génica, por lo que su expresión aberrante está relacionada con fenotipos de enfermedades, como el cáncer [Paul *et al.*, 2018; Hayes *et al.*, 2014]. El primer estudio que reveló esta asociación, mostró que la familia de miR-15/16 se elimina con frecuencia en la leucemia linfocítica crónica (LLC), lo que implica que estos miRNAs funcionan como supresores de tumores [Calin *et al.*, 2002]. Después de este descubrimiento, se publicaron innumerables estudios que definen el papel de los miRNAs en la patogénesis del cáncer. Sin embargo, todos estos descubrimientos pueden agruparse en dos categorías: 1) Los que se asocian a la pérdida de su expresión global y 2) al estado de su funcionamiento. Por ejemplo, a pesar de su desregulación global, la mayoría de los miRNAs están reprimidos en el tejido canceroso en comparación con el tejido normal, lo que conlleva a la pérdida de diferenciación en las células tumorales [Lu *et al.*, 2005]. De acuerdo con estas observaciones, la pérdida global de miRNAs es el resultado de la deleción genética en la maquinaria para su biogénesis, lo cual favorece la transformación celular maligna y la tumorigénesis in vivo [Lambertz *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2009]. Este hallazgo, destaca que la alteración de los miRNAs no es simplemente un efecto de la tumorigénesis, sino que tiene un papel causal en el desarrollo del cáncer. A pesar de la reducción general en los niveles de expresión de miRNAs a través de los diversos tipos de cáncer, varios miRNAs se encuentran regulados al alza, por lo que algunos indudablemente juegan papeles oncogénicos [Volinia *et al.*, 2006]. Detallando acerca del estado de su funcionamiento, la expresión de los miRNAs comparando el tejido normal y el tejido maligno apunta a que algunos miRNAs se regulan al alza o a la baja en cáncer, lo que podría categorizarlos con roles oncogénicos o de supresores de tumores, respectivamente. Sin embargo, esta clasificación debe ser abordada cuidadosamente,

ya que los miRNAs podrían poseer ambas funciones dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, miR-221 y miR-222 tienen como blanco al oncogén KIT e inhiben el crecimiento de la leucemia eritroblástica [Felli *et al.*, 2005], por lo que funcionan como supresores de tumores en eritroblastos. Sin embargo, también suprimen al menos cuatro supresores de tumores importantes: PTEN, p27, p57 y TIMP3, por lo que funcionan como miRNAs oncogénicos en varios tumores sólidos humanos [Garofalo *et al.*, 2012]. Por último, los miRNAs se han visto implicados en la mayoría de los rasgos característicos del cáncer, incluida la proliferación, apoptosis, invasión/metástasis y angiogénesis [Di Leva *et al.*, 2014]. A pesar de los considerables avances en el campo, quedan muchos desafíos por delante. Uno de ellos, es la identificación de todos los ARNm blanco de miRNAs involucrados en el cáncer, estableciendo su contribución a la transformación maligna. Si estos blancos de miRNA son cruciales para el fenotipo maligno y las células cancerosas dependen de su desregulación para la proliferación y supervivencia, podemos esperar que su entendimiento facilitará el diseño de blancos terapéuticos. Con este fin, grandes contribuciones al conocimiento actual sobre las propiedades y funciones de los miRNAs provienen del desarrollo de varios enfoques computacionales, que hoy en día son una parte indispensable de cualquier investigación básica o aplicada relacionada con miRNAs [van Rooij, 2011; Ying, 2013]. Los métodos y recursos bioinformáticos disponibles cubren un alcance impresionante, desde la identificación de los miRNAs, pasando por la predicción de sus pre-miRNAs y sus ARNm blanco, la elucidación de las funciones de los miRNAs, hasta bases de datos que recopilan información biológica relevante [Akhtar *et al.*, 2016]; [Liu *et al.*, 2014]. Además de la implementación y especificidad del organismo, las herramientas mencionadas se diferencian principalmente en su metodología, las características consideradas en el análisis y, en consecuencia, su desempeño. A la fecha, aún se mejoran y publican constantemente nuevos métodos. Sin embargo, en esta inmensidad de posibilidades y características, revisar varios artículos o sitios web puede ser aún insuficiente para elegir el método deseado. Para abordar esta necesidad, existe la plataforma de tools4miRs [Lukasik *et al.*, 2016], la cual es un servicio fácil de usar, curado manualmente y filtrable que reúne métodos para análisis de miRNAs. Como se ha mencionado anteriormente, las funciones de los miRNA están asociadas con su unión a sus ARNm blanco. Por lo tanto, seleccionar posibles ARNm blanco es el primer paso para determinar el papel de un miRNA en cualquier fenotipo. Esta área posee una gran cantidad de herramientas bioinformáticas, las cuales pueden clasificarse en dos tipos: 1) algoritmos basados en reglas y 2) algoritmos controlados por entrenamiento de datos [Yue



*et al.*, 2009]. Los algoritmos basados en reglas, como su nombre lo indica, consisten en un conjunto de reglas que deben satisfacer un 3'UTR prueba o el propio miRNA. Estos algoritmos se llevan a cabo probando las reglas con una ponderación particular. Es por esta razón, que los resultados obtenidos rara vez convergen entre algoritmos de este tipo. Algunos ejemplos de algoritmos basados en reglas son: Targetscan [Lewis *et al.*, 2003], miRanda [Enright *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004] y PITA [Kertesz *et al.*, 2007]. Los algoritmos controlados por entrenamiento de datos, utilizan procedimientos sofisticados de modelación estadística, aprendizaje supervisado y/o aprendizaje automatizado (machine learning, por sus siglas en inglés) con ARNm diana positivos y negativos validados experimentalmente. Una de sus grandes ventajas, es que tienen la capacidad de descubrir características importantes a partir únicamente de los datos de entrenamiento. Algunos ejemplos de algoritmos controlados por entrenamiento de datos son: PicTar [Krek *et al.*, 2005], MirTarget [Kim *et al.*, 2006] y TargetBoost [Saetrom *et al.*, 2005]. Es importante mencionar que ambas categorías de algoritmos poseen información a priori, entre las más comunes se encuentran: el apareamiento con la región semilla del miRNA [Lewis *et al.*, 2003], este se define como el grado de complementariedad entre la secuencia del nucleótido 1 al 8 del extremo 5' del miRNA con la secuencia del ARNm blanco; la conservación evolutiva [Brennecke *et al.*, 2005] y la energía libre de hibridación ( $\Delta G$ ), la cual indica la fuerza de la unión entre un miRNA y su ARNm blanco. Normalmente, la energía libre de hibridación es un valor negativo y su unidad es kcal/mol. Cuanto menor es la energía libre, más firme es la estructura de unión y es más probable que la unión sea verdadera [Hofacker *et al.*, 1994]. A la fecha, el uso de los algoritmos controlados por entrenamiento de datos se minimizó debido a que fueron generados a partir de conjuntos limitados de interacciones (miRNA-ARNm blanco) válidas. Además, muchos de estos no han sido actualizados, este hecho también ocurrió para una gran cantidad de algoritmos basados en reglas. Por lo que, en la actualidad Targetscan v.7 [Agarwal *et al.*, 2015] se ha posicionado como la mejor herramienta para la predicción de ARNm blanco. Este hecho, se respalda en que se añadieron 14 nuevas características para predecir los ARNm blanco con mayor eficacia, y los resultados obtenidos tiene gran similitud con enfoques de entrecruzamiento de alto rendimiento (CLIP y CLASH, por sus siglas en inglés). Finalmente, el área dirigida al análisis masivo de miRNAs obtenidos a través del uso de tecnologías de alto rendimiento, como la secuenciación de miRNAs (miRNA-Seq, por sus siglas en inglés), ha sido ampliamente explorada esta última década. Esto ha permitido el diseño de herramientas bioinformáticas para su procesamiento,

y capacidad para traducirlo a información biológica relevante [Conesa *et al.*, 2016a]. Asimismo, este tipo de análisis han sido efectuados para el estudio de la expresión de los miRNAs en cáncer [Volinia *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2011]. Sin embargo, a la fecha, pocos trabajos han utilizado enfoques de información integral entre la secuenciación de los miRNAs y la secuenciación de sus ARNm blanco. Con lo anterior, hago referencia a que la mayoría de los estudios de asociación de miRNAs con sus ARNm blanco en cáncer, utilizando tecnologías de alto rendimiento, sólo exponen el rol de una fuente de información (ya sea RNA-seq o miRNA-seq). Es por esta razón, que el trabajo realizado en este escrito aborda un nicho poco explorado para la investigación de los miRNAs con sus ARNm blanco en cáncer.

## 1.4. Metabolismo de cáncer

La inclinación de la investigación del cáncer durante las últimas décadas se ha centrado en la ganancia de función de los oncogenes y la pérdida de función de los genes supresores de tumores. Aunque este paradigma proporcionó importantes conocimientos sobre la biología del cáncer, ahora está claro que existen factores adicionales que contribuyen a la carcinogénesis [Zhang y Yang, 2013]. Uno que se mencionó en secciones previas, es la reprogramación del metabolismo energético en las células cancerosas [Hirschey *et al.*, 2015]. Esta área, aunque antiguamente descrita, en la actualidad ha despertado un gran interés, ya que puede proporcionar nuevos blancos terapéuticos para inhibir el crecimiento tumoral. Además, se conoce que la mayoría de los tumores humanos son genéticamente distintos, con numerosos oncogenes activados y la pérdida de múltiples supresores tumorales. Por lo que, el tratamiento de los tumores únicamente con base en su perfil genético ha sido una tarea abrumadora debido a esta extrema variabilidad. No obstante, a pesar de que la mayoría de los tumores son genéticamente únicos, sus alteraciones desencadenan en un fenotipo metabólico común [Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017]. La mayoría de las adaptaciones metabólicas favorecen la supervivencia celular en condiciones de estrés o permiten que las células proliferen a niveles patológicamente elevados. Por lo que, las tres adaptaciones más comunes en el metabolismo del cáncer son: Alteraciones en la bioenergética, aumento en la biosíntesis de macromoléculas y el control de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) [DeBerardinis y Chandel, 2016]. La alteración más conocida en la bioenergética, fue planteada por Otto Warburg, la cual postulaba

que las células cancerosas captan la glucosa para generar una gran cantidad de lactato, aún en presencia de oxígeno. Además, se atribuía que esta adaptación metabólica se encuentra acompañada de un daño en la función mitocondrial, lo cual generó la idea errónea de que las células cancerosas dependen de la glucólisis como su fuente principal de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) [Weinhouse *et al.*, 1956]. En la actualidad, se conoce que las células cancerosas exhiben una glucólisis aeróbica elevada debido a la activación de oncogenes, la pérdida de genes supresores de tumores, y la sobreactivación de la vía PI3K. Como consecuencia a estas alteraciones, las células cancerosas toman ventaja de la alta utilización de la vía glucolítica para generar precursores que favorecen vías anabólicas [Pavlova y Thompson, 2016]. Un hecho relevante, es que la observación de Warburg acerca de la alta tasa en el consumo de glucosa se ha demostrado en diversos tipos de cáncer humano, utilizando tomografías por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) con fluorodesoxiglucosa (análogo de la glucosa marcado radioactivamente) [Jadvar, 2016; Robey *et al.*, 2008]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la gran mayoría de las células tumorales tienen la capacidad de producir energía a través de la oxidación de la glucosa [Jose *et al.*, 2011]. Es decir, el proceso por el cual los carbonos derivados de la glucosa ingresan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés) y se oxidan a  $\text{CO}_2$ , produciendo ATP a través de la fosforilación oxidativa. Por lo que, limitar la producción de ATP glucolítico mediante la inhibición de la actividad de la piruvato quinasa no previene la tumorigénesis, sugiriendo que la función principal de la glucólisis no es el suministro de ATP [Israelsen *et al.*, 2013]. Asimismo, el metabolismo mitocondrial es necesario para la proliferación de las células cancerosas y la tumorigénesis [Weinberg *et al.*, 2010]. Por lo tanto, a pesar de las altas tasas glucolíticas, la mayoría de las células cancerosas generan la mayor parte del ATP a través de la función mitocondrial, con la probable excepción de los tumores que poseen mutaciones en las enzimas involucradas en la respiración mitocondrial [Zu y Guppy, 2004]. El piruvato derivado de la glucólisis ha sido ampliamente descrito como suministro del ciclo TCA para mantener la producción de ATP mitocondrial en las células cancerosas. Sin embargo, la descomposición de los ácidos grasos y la utilización de los aminoácidos también favorecen este fenómeno. Por ejemplo, la  $\beta$ -oxidación en las mitocondrias genera acetil-CoA y los equivalente reductores NADH y  $\text{FADH}_2$ , que son utilizados por la cadena de transporte de electrones para producir ATP mitocondrial. Además, el aminoácido glutamina puede generar glutamato, y posteriormente  $\alpha$ -cetoglutarato para alimentar el ciclo TCA a través de una serie de reacciones

bioquímicas denominadas glutaminólisis [Hensley *et al.*, 2013]. Otras observaciones apuntan a que los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) como: la isoleucina, valina y leucina, se encuentran en niveles elevados en el plasma de pacientes con cáncer, ya que pueden transformarse en acetil-CoA y otras moléculas que pueden suministrar el ciclo TCA [Mayers *et al.*, 2014]. La flexibilidad metabólica proporcionada por las múltiples entradas en el suministro del ciclo TCA permiten que las células cancerosas respondan adecuadamente a las fuentes disponibles en el microambiente durante la progresión del tumor [Boroughs y DeBerardinis, 2015]. Por lo que, es muy probable que la combinación entre el microambiente local del tumor y las lesiones oncogénicas dicten el combustible que utilizan las mitocondrias para mantener el crecimiento tumoral. Los tumores sólidos poseen una heterogeneidad significativa en la perfusión, de modo que muchas células tumorales residen en entornos pobres en nutrientes y oxígeno. Por lo tanto, las células cancerosas han adaptado múltiples mecanismos para mantener la función mitocondrial para la supervivencia. Por ejemplo, la cadena de transporte de electrones mitocondrial puede funcionar de manera óptima a niveles de oxígeno tan bajos como 0.5% [Chandel *et al.*, 1997]. Por lo que, las células tumorales hipóxicas (<2% O<sub>2</sub>) pueden continuar su ciclo y utilizar glutamina como combustible para la producción de ATP [Fan *et al.*, 2013]. Además, el oncogén Kras en condiciones de depleción de nutrientes, impulsa a las células de cáncer a utilizar proteínas extraídas del espacio extracelular para producir glutamina y otros aminoácidos para alimentar el ciclo TCA para la supervivencia y el crecimiento celular [Kamphorst *et al.*, 2015]. Otro mecanismo de resistencia de las células cancerosas, se observa cuando la oxidación del piruvato a acetil-CoA se ve comprometida por la hipoxia o el deterioro de la cadena de transporte de electrones. Durante este fenómeno, la glutamina funge como suministro principal para proporcionar acetil-CoA como precursor biosintético, y así sostener el crecimiento tumoral [Metallo *et al.*, 2012; Mullen *et al.*, 2012]. Para sobrevivir al microambiente hipóxico del tumor, las células cancerosas disminuyen la demanda de ATP al reducir los procesos dependientes en el consumo de ATP, como ejecutar la bomba sodio-potasio. Si la disminución de la demanda de ATP no es suficiente para mantener la relación ATP/ADP, el aumento de ADP activa la adenilato quinasa, una enzima fosfotransferasa que amortigua la caída de los niveles de ATP al convertir dos moléculas de ADP en AMP y ATP [Lanning *et al.*, 2014]. El aumento de AMP durante la privación de nutrientes, desencadena la activación de AMP quinasa (AMPK), la cual activa vías catabólicas como la oxidación de ácidos grasos para estimular la producción de ATP [Hardie *et al.*, 2016]. En

condiciones de estrés metabólico, ciertas células cancerosas impulsadas por el oncogén Ras utilizan los lípidos para promover la producción de ATP [Kamphorst *et al.*, 2013]. Por lo tanto, existen múltiples mecanismos que le permiten a las células cancerosas mantener su relación ATP/ADP para sustentar la viabilidad en ambientes pobres en nutrientes y oxígeno. La biosíntesis de macromoléculas o las vías anabólicas son un aspecto clave del metabolismo del cáncer porque permiten que las células produzcan los precursores necesarios para la división celular y el crecimiento tumoral. Estas vías implican la adquisición de nutrientes simples (azúcares, aminoácidos esenciales, etc.) del espacio extracelular, seguida de su conversión en intermediarios biosintéticos a través de vías metabólicas centrales como la glucólisis, la ruta de las pentosa fosfato, el ciclo TCA y la síntesis de aminoácidos no esenciales. Dando como resultado, el ensamblaje de moléculas más grandes y complejas a través de procesos dependientes de ATP. Las tres clases macromoleculares más comúnmente estudiadas en el metabolismo del cáncer son proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, estos comprenden aproximadamente el 60, 15 y 5% de la masa seca de células de mamíferos, respectivamente [DeBerardinis y Chandel, 2016]. La biosíntesis de estas macromoléculas se controla con las mismas vías de señalización que gobiernan el crecimiento celular y son activadas en el cáncer a través de mutaciones tumorigénicas, particularmente la señalización de PI3K-Akt-mTOR [Lien *et al.*, 2016]. La biosíntesis de proteínas está altamente regulada y requiere la utilización de los aminoácidos esenciales y no esenciales. Las células cancerosas y otras células bajo la influencia de la señalización de factores de crecimiento expresan transportadores de superficie que les permiten adquirir aminoácidos del espacio extracelular [McCracken y Edinger, 2013]. Esto, además de proporcionar a las células la materia prima necesaria para la síntesis de proteínas, también les permite mantener la actividad del sistema de señalización mTOR, específicamente mTORC1. mTORC1 es estimulado por la presencia de aminoácidos y activa la síntesis de proteínas a través de sus efectos sobre la traducción y la biogénesis ribosomal [Laplanche y Sabatini, 2012]. Además, la mayoría de los aminoácidos no esenciales se producen mediante reacciones de transaminación, que transfieren el grupo amino del glutamato a un cetoácido. Las células cancerosas en proliferación absorben glutamina y la convierten en glutamato a través de una variedad de reacciones de desaminación y transaminación [Hensley *et al.*, 2013]. Tanto la captación de glutamina como la actividad de la glutaminasa son estimuladas por mTORC1, proporcionando glutamato para las reacciones de transaminación y/o mantenimiento del ciclo TCA, que también contribuye a la síntesis de aminoácidos. Por tanto, las condiciones de

crecimiento en las que abundan la glutamina y los aminoácidos esenciales permiten la activación de la síntesis de proteínas mediada por mTORC1. Cuando los nutrientes son escasos, las células tienen acceso a una serie de vías catabólicas para degradar macromoléculas y reabastecerse de intermediarios metabólicos intracelulares clave. Las vías de degradación de proteínas se han caracterizado ampliamente como mecanismos para suministrar aminoácidos en las células cancerosas. Las proteínas intracelulares y otras macromoléculas se pueden reciclar a través de la autofagia, un proceso altamente regulado a través del cual las proteínas y los organelos se liberan dentro del lisosoma y se degradan [Galluzzi *et al.*, 2014]. La autofagia es una vía de supervivencia esencial durante la privación de nutrientes o factores de crecimiento, y algunos estudios demuestran su contribución en el cáncer [Poillet-Perez y White, 2019]. Las células tumorales producen rápidamente ácidos grasos para la biosíntesis de membranas, reacciones de prenilación y señalización celular. La síntesis de ácidos grasos requiere fuentes de acetil-CoA y poder reductor en forma de NADPH citosólico. Por lo tanto, la síntesis eficaz de ácidos grasos requiere la integración con otras vías del metabolismo del carbono y de óxido-reducción. Una de las vías más importantes para la producción de ácidos grasos es la lipogénesis de novo. Esta ruta, describe el proceso mediante el cual los átomos de carbono derivados de los carbohidratos como la glucosa y los aminoácidos, incluida la glutamina, se convierten en ácidos grasos [Baenke *et al.*, 2013]. En el tejido normal, la lipogénesis de novo se limita a los hepatocitos y adipocitos; sin embargo, las células cancerosas también pueden reactivar esta vía anabólica incluso en presencia de fuentes de lípidos exógenos, y aunque el sustrato principal para la síntesis de ácidos grasos es el acetil-CoA citoplasmático, también puede derivarse del citrato o del acetato [Röhrig y Schulze, 2016]. Asimismo, la regulación de la lipogénesis de novo ocurre principalmente a nivel transcripcional a través de la activación de las proteínas de unión a elementos reguladores de colesterol (SREBP, por sus siglas en inglés), de las cuales existen tres factores de transcripción principales: SREBP1a y SREBP1c que surgen del empalme alternativo del gen SREBPF1, y SREBP2 codificado por el gen SREBPF2 [Eberlé *et al.*, 2004]. Interesantemente, en células cancerosas con una señalización constitutiva de mTORC1 en hipoxia se induce un estado de dependencia del acceso a ácidos grasos extracelulares para mantener la integridad del retículo endoplásmico en apoyo a la biosíntesis de proteínas [Young *et al.*, 2013]. Dicho lo anterior, una de las principales ventajas de las células cancerosas al mantener una alta tasa de lipogénesis es su flexibilidad para desviarlos a diferentes vías biosintéticas para generar una poza de diversas especies de lípidos con funciones

distintas. Por otra parte, se requieren nucleótidos de purina y pirimidina para la síntesis de ARN y ADN. La biosíntesis de novo de nucleótidos es amplia y requiere la coordinación de varias vías. Por ejemplo: 1) las moléculas que componen el esqueleto de la fosforribosilamina se produce a partir de ribosa-5-fosfato, un intermediario de la ruta pentosa fosfato, y 2) una reacción de donación de la amida utilizando la glutamina como sustrato [Stincone *et al.*, 2015]. De esta manera, las bases de las purinas y pirimidinas se construyen a partir de varios aminoácidos no esenciales y grupos metilo donados de la poza del metabolismo de un carbono y el metabolismo de folatos. El ciclo TCA aporta oxalacetato, que se transamina a aspartato, un intermediario necesario para sintetizar las bases de las purinas y pirimidinas. Además, la conversión de ribonucleótidos en desoxinucleótidos por la ribonucleótido reductasa requiere una fuente de NADPH. Claramente, la biosíntesis de nucleótidos es una vulnerabilidad que ha sido explotada para atacar a las células cancerosas, ya que los análogos de nucleósidos y antifolatos han sido un pilar de los regímenes quimioterapéuticos durante décadas [Heiden y Vander Heiden, 2011]. Sin embargo, se desconoce en gran medida la señalización oncogénica que interactúa con la biosíntesis de nucleótidos. Por lo que, se necesita trabajo adicional para determinar cómo otros aspectos de la síntesis de novo de nucleótidos, las vías de recuperación de purinas y pirimidinas y las actividades accesorias como el metabolismo del folato se regulan en las células cancerosas en apoyo a la proliferación celular. Se han detectado tasas elevadas de ROS en casi todos los tipos de cáncer, estas promueven muchos aspectos del desarrollo y la progresión del tumor [Liou y Storz, 2010]. Las ROS son especies químicas intracelulares que contienen oxígeno e incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) [Murphy, 2009]. Históricamente, se ha pensado en las ROS como subproductos metabólicos letales de la respiración celular y el plegamiento de proteínas. Sin embargo, los estudios de las últimas décadas han revelado un papel previamente subestimado de las ROS en la señalización celular. Los niveles bajos de ROS, en particular  $H_2O_2$ , pueden oxidar de forma reversible los residuos de cisteína de las proteínas para regular positivamente la proliferación celular y la adaptación celular al estrés metabólico [Finkel, 2012]. Sin embargo, a medida que aumentan los niveles de  $H_2O_2$ , se inician las vías de señalización de la muerte celular y el  $H_2O_2$  se convierte en  $OH^-$ , que puede dañar directamente el ADN, las proteínas y los lípidos. Las células cancerosas tienen una mayor tasa de producción de ROS y mayor tasa de mitocondrias en comparación con las células normales. Esto permite la activación de las vías de señalización y factores de transcripción necesarios para

la tumorigénesis. Por ejemplo, la hipoxia estimula el aumento de la tasa de producción de ROS en las mitocondrias [Chandel *et al.*, 1998]. Por lo tanto, los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias y al sistema NADPH oxidasa pueden prevenir la proliferación de células cancerosas, la activación hipóxica del factor de transcripción HIF, la tumorigénesis y la metástasis [Porporato *et al.*, 2014; Weinberg *et al.*, 2010; Orr *et al.*, 2015]. Finalmente, a pesar de los cuantiosos avances en el entendimiento del metabolismo del cáncer. Existen algunas algunas consideraciones para determinar un posible blanco metabólico para la terapia del cáncer. En primer lugar, es probable que la inhibición de algunas enzimas metabólicas sea sistémicamente tóxica debido a sus funciones fisiológicas en los tejidos normales [Erez y DeBerardinis, 2015]. Además, la factibilidad de inhibir estas vías terapéuticamente depende de la tolerancia en el bloqueo sistémico de la vía. Por ejemplo, las células proliferantes normales, como las células inmunitarias y las células troncales, también reprograman su metabolismo de manera similar a las células cancerosas [Pearce *et al.*, 2013; Ito y Suda, 2014]. Actualmente existen varios blancos metabólicos para disminuir la progresión tumoral. Uno de ellos, tiene como objetivo la proteína glucolítica hexoquinasa-2 (HK2). Muchas células tumorales sobreexpresan HK2, y modelos preclínicos de ratón y cáncer de mama demuestran que la inhibición de HK2 retrasa la progresión del tumor [Patra *et al.*, 2013]. Además, la delección sistémica de HK2 en ratones no causa consecuencias fisiológicas adversas. Sin embargo, actualmente se desconoce el efecto de la inhibición de HK2 sobre el sistema inmunológico. Dicho lo anterior, los nuevos desafíos en el estudio del metabolismo de cáncer serán desarrollar enfoques analíticos o computacionales para entender la interconexión entre el metabolismo, las vías de señalización y otros mecanismos de regulación. Además, la generación de modelos con distintos tipos celulares en co-cultivo, como: células cancerosas, fibroblastos asociados a tumores, células del sistema inmunológico y células endoteliales. Esto permitirá comprender la cooperación metabólica entre poblaciones de células dentro de un tumor y si la reprogramación metabólica de las células estromales brinda nuevas oportunidades terapéuticas.

## 1.5. miRNAs y metabolismo

Como se ha mencionado anteriormente, los miRNAs poseen múltiples funciones biológicas incluidas el control de la proliferación celular, el ciclo celular y la muerte celular. Sin embargo, sus funciones como reguladores clave del metabolismo han atraído la atención en los últimos años. Esto



debido a que las células cancerosas muestran una mayor autonomía metabólica en comparación con las células no transformadas, absorbiendo nutrientes y metabolizándolos en vías que soportan el crecimiento y la proliferación. En este sentido, los miRNAs regulan procesos metabólicos celulares a través de diversos mecanismos, que incluyen la regulación directa de enzimas metabólicas y transportadores de procesos metabólicos, la regulación de factores de transcripción, oncogenes, supresores tumorales, y múltiples vías de señalización oncogénicas [Chen *et al.*, 2012]. La utilización de la glucólisis aeróbica por encima de la fosforilación oxidativa es una de las características bioquímicas ampliamente observadas en las células tumorales [Hsu y Sabatini, 2008]. Esta adaptación metabólica se denomina “efecto Warburg”, que consiste en el aumento de la glucólisis en condiciones de alta tensión de oxígeno y da lugar a una mayor producción de lactato [Kroemer y Pouyssegur, 2008]. De manera interesante, el cambio metabólico en las células cancerosas está influenciado por redes oncogénicas y de supresores tumorales que a su vez son blancos de miRNAs. Por ejemplo, la vía de PI3K/Akt desempeña un papel clave en el metabolismo de las células cancerosas, y esta vía es blanco de varios miRNAs como, miR-320, miR-328-3p y miR-126 [Zhang *et al.*, 2020; Yan y Ye, 2019; Xiao *et al.*, 2016]. En general, se conoce que los miRNAs pueden regular el metabolismo de la glucosa, lípidos, aminoácidos y el ciclo TCA por lo que los hallazgos puntuales en cada de una de estas vías se describen a continuación. Para describir la función regulatoria de los miRNAs sobre el metabolismo de la glucosa, existen dos categorías principales: La primera está relacionada a los miRNAs involucrados en la regulación de la captación de la glucosa y la segunda a la regulación directa de la glucólisis. La primera categoría involucra la regulación de los transportadores de glucosa (GLUTs, por sus siglas en inglés). Los GLUTs son un amplio grupo de proteínas de membrana que facilitan el transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática en la mayoría de las células de mamíferos. La desregulación de los GLUTs da como resultado una alta absorción de glucosa, un metabolismo acelerado y un aumento de los requerimientos glucolíticos en los tejidos tumorales. Hasta la fecha, se han identificado 14 miembros de GLUTs [Thorens y Mueckler, 2010] y existen varios factores que se han visto implicados en la regulación de su expresión. Por ejemplo, las hormonas ováricas, en particular los estrógenos, proveen un mecanismo de regulación de los GLUTs [Rivenzon-Segal *et al.*, 2003]. Además, la hipoxia también se ha demostrado que impulsa la expresión de GLUTs [Macheda *et al.*, 2005]. De la misma manera, los miRNAs se han postulado como posibles reguladores de la captación de glucosa alterando las expresiones de los GLUTs. Actualmente, se ha

confirmado que miR-133 regula indirectamente la expresión de GLUT4, al tener como blanco a KLF15 en un modelo de rata [Horie *et al.*, 2009]. Otros estudios en células T24 de cáncer de vejiga, identificaron a miR-195-5p como un regulador directo de GLUT3 al tener como blanco la región no traducida 3' de GLUT3 [Fei *et al.*, 2012], y a miR-21 como regulador de la expresión de GLUT1 y GLUT3 [Yang *et al.*, 2015]. Curiosamente, este conjunto de hechos apuntan a que los miRNAs podrían regular los niveles de glucosa intracelular. Por otra parte, una gran cantidad de estudios sugieren que los miRNAs regulan directamente a la glucólisis a través del control de varias enzimas esenciales de esta ruta, incluidas las hexocinasas (HKs), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la fosfofructoquinasa-1 (PFK1) [Chan *et al.*, 2015]. Las HKs catalizan el primer paso del metabolismo de la glucosa y existen cuatro isoformas HK1 a HK4. Entre ellas se encuentra HK2, que con frecuencia se sobreexpresa en el cáncer y desempeña un papel importante en el crecimiento, la supervivencia y la metástasis del tumor al reprimir la función mitocondrial [Mathupala *et al.*, 2009]. Interesantemente, se ha demostrado que miR-143 regula a la baja la HK2 e inhibe el metabolismo de la glucosa en cáncer de mama [Jiang *et al.*, 2012], en cáncer de pulmón [Fang *et al.*, 2012], en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [Peschiaroli *et al.*, 2013], y en cáncer de colon [Gregersen *et al.*, 2012]. Otros estudios revelan la existencia de otros miRNAs que participan en la regulación de las HKs, por ejemplo, miR-155 promueve la transcripción de HK2 mediante la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) [Jiang *et al.*, 2012]. Además, la regulación de HK2 es mediada por miR-125b en células de carcinoma hepatocelular [Jiang *et al.*, 2014], y en leucemia linfocítica crónica [Tili *et al.*, 2012]. Finalmente, existen otros componentes de la glucólisis que también son regulados por miRNAs. Uno de ellos, es el rompimiento de la fructosa 1,6-bisfosfato a gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Esta reacción aldólica reversible es llevada a cabo por la aldolasa A (Aldo A), la cual es regulada negativamente por el clúster de miR-15a/16-1 [Calin *et al.*, 2008]. Otros ejemplos, incluyen la represión de la expresión de GAPDH por el miR-644a [Sikand *et al.*, 2012], y la regulación negativa de la fosfofructoquinasa mediada por el miR-320a teniendo como blanco la región no traducida 3' de la subunidad PFKm [Tang *et al.*, 2012]. Al igual que el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de los lípidos de las células cancerosas también está regulado por diversas vías de señalización oncogénicas, y se cree que tienen un papel relevante en el inicio y progresión tumoral [Menendez y Lupu, 2007]. Es por esta razón, que las alteraciones en el metabolismo de lípidos se han propuesto como una característica común de las

células malignas [Cairns *et al.*, 2011]. Los lípidos son macromoléculas de biosíntesis para organelos y células, y la lipogénesis de novo proporciona a las células cancerosas el sustento para la construcción de membranas, moléculas de señalización, modificaciones postraduccionales de proteínas, y suministro energético para apoyar la rápida proliferación celular [Zhang y Du, 2012]. Además, se conoce que varios miRNAs participan en la regulación del metabolismo de lípidos en células de cáncer. Entre ellos, se encontró que miR-122 regula el metabolismo de las grasas y el colesterol al controlar la expresión de *Agpat1*, *Cidec* y *Stard4* en cáncer de hígado [Hsu *et al.*, 2012]. Otro estudio demostró que miR-185 y miR-342 controlan la lipogénesis y la colesterogénesis en las células de cáncer de próstata reduciendo la expresión de *SREBP-1* y *SREBP-2*, dando como resultado la regulación negativa de sus genes blanco, incluidos *FASN* y la 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA reductasa (*HMGCR*) [Li *et al.*, 2013]. Por otra parte, se ha demostrado que miR-205 desregula el metabolismo de los lípidos en carcinoma hepatocelular al tener como blanco a *ACSL1*, una enzima del metabolismo de los lípidos en el hígado [Cui *et al.*, 2014]. En resumen, los miRNAs que regulan el metabolismo de lípidos poseen una baja expresión en sus modelos de cáncer. Lo que sugiere que el restablecimiento de los ejes de regulación asociados con estos miRNAs podrían ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas para el desarrollo de agentes anticancerígenos y la sobrerrepresentación en el uso de estas vías asociadas a su regulación podría emplearse en el diagnóstico y pronóstico de cánceres humanos. En las células de cáncer, el suministro opulento de aminoácidos es importante para mantener la proliferación. Además, los aminoácidos tienen una función directa como sustratos para la síntesis de proteínas, y la generación de energía, impulsada por la síntesis de nucleósidos y el mantenimiento de la homeostasis redox [Kamphorst *et al.*, 2015; Vettore *et al.*, 2020]. Las células cancerosas poseen un microambiente complejo y a menudo limitado en nutrientes, por lo que a veces son parte de una comunidad metabólica, formando relaciones simbióticas y parasitarias. Este hecho, es evidente en cánceres que son auxotróficos para algunos aminoácidos [Chiu *et al.*, 2018]. Por lo que, la desregulación del metabolismo de aminoácidos puede explorarse desde diversos puntos de control, incluida la regulación por miRNAs. En particular, la glutaminasa es crucial en el metabolismo mitocondrial ya que convierte la glutamina en glutamato, que además se transforma para producir  $\alpha$ -cetoglutarato. Esta vía, denominada glutaminólisis está controlada por el miR-23a y miR-23b [Gao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012]. Además, se conoce que el miR-23b-3p regula la prolina oxidasa, la primera enzima en el catabolismo de la prolina, la cual es regulada a la baja en los tumores renales humanos [Liu *et al.*,

2012]. Otros estudios muestran que miR-122 regula negativamente el transportador de aminoácidos catiónicos de alta afinidad (CAT-1) [Chang *et al.*, 2004], y miR-29b controla al complejo  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa, que cataliza el paso irreversible en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (incluyendo leucina, isoleucina y valina) [Mersey *et al.*, 2005]. Curiosamente a la fecha, las investigaciones sobre el metabolismo de los aminoácidos remarcan que muchos tumores silencian la expresión de genes necesarios para la síntesis de algunos aminoácidos, produciendo una auxotrofia que requiere simbiosis metabólica con el estroma. Sin embargo, el panorama general que incluye como los miRNAs podrían influir en esta adaptación metabólica para respaldar la viabilidad y la proliferación en cáncer aún es desconocido. Como se describió previamente, el uso preferencial de la glucólisis aeróbica por encima de la fosforilación oxidativa es un evento común en células de cáncer. Sin embargo, evidencia reciente demuestra que ciertas células cancerosas dependen en gran medida del ciclo del TCA para la producción de energía y la síntesis de macromoléculas [Anderson *et al.*, 2018]. No obstante, aunque ambos comportamientos son recurrentes en diversos tipos de cáncer, la regulación guiada por miRNAs ha sido ampliamente observada en modelos de cáncer que utilizan la glucólisis aeróbica [Singh *et al.*, 2011]. Por ejemplo: miR-183 es sobreexpresado en glioblastomas y regula la isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) [Tanaka *et al.*, 2013]. Además, en varios tipos de cáncer el miR-210 regula el ciclo de TCA teniendo como blanco a las proteínas de ensamblaje del grupo de hierro-azufre (ISCU 1/2), la citocromo c oxidasa 10 (COX10), la succinato deshidrogenasa subunidad D (SDHD), y el factor de ensamblaje 4 del complejo Ubiquinona Oxidoreductasa (NDUFA4) [Favaro *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Puisségur *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2009]. Curiosamente, la regulación de los miRNAs sobre el ciclo de TCA juega un papel importante en el mantenimiento del metabolismo glucolítico, y aunque hay muchas funciones de los miRNAs que se desconocen, es importante estudiarlas para comprender cómo las células tumorales mantienen su fenotipo. Como conclusión, los miRNAs asociados a la regulación del metabolismo en cáncer podrían funcionar como blancos terapéuticos prometedores, por lo que es de esperar que los trabajos científicos como el que se presenta aquí puedan generar hipótesis para el diseño de tratamientos contra el cáncer.

## 1.6. Tecnologías Ómicas y secuenciación de alto rendimiento

La investigación biológica ha experimentado enormes cambios durante las últimas tres décadas. Anteriormente, la investigación solía centrarse casi exclusivamente en un solo aspecto de una única molécula por experimento. En la actualidad, las tecnologías modernas han permitido analizar simultáneamente miles de moléculas y discernir la forma en que estas moléculas influyen o interactúan entre sí. El cambio ha sido tan espectacular que ha dado lugar a un sufijo descriptivo completamente nuevo, “-ómicas”, para describir estos campos de estudio Veenstra [2021]. Las tecnologías Ómicas adoptan una visión holística de las moléculas que componen una célula, tejido u organismo. Están dirigidas principalmente a la detección universal de genes (genómica), ARNm (transcriptómica), proteínas (proteómica), metabolitos (metabolómica), miRNAs (miRNómica), entre otros, en una muestra biológica específica reduciendo en gran medida los sesgos. La iniciativa creada por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NGHRI, por sus siglas en inglés) fue un proyecto precursor de estas tecnologías, la cual destinó aproximadamente 70 millones de dólares a tecnologías de secuenciación de ADN para lograr la disminución del costo de secuenciación de un genoma humano Schloss [2008]. Este hecho promovió el surgimiento de una serie de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés). Para poner esta iniciativa en perspectiva, las mejoras a la secuenciación tradicional de Sanger han disminuido el costo por base en alrededor de 100 veces con la finalización del Proyecto del Genoma Humano Reuter *et al.* [2015]. Sin embargo, para alcanzar un costo final en la secuenciación del genoma humano de \$1,000 dólares, fue necesario un salto de gigante (cinco órdenes de magnitud). Actualmente, el costo de secuenciación de un genoma (sin interpretación) es inferior a \$400 dólares. No obstante, el camino hacia esta hazaña involucró a muchas plataformas comerciales de HTS, que difieren en muchos detalles pero típicamente siguen una metodología general semejante que incluye: la preparación del templado, la amplificación clonal, y la secuenciación masiva en rondas cíclicas. Además, la estrategia específica empleada por cada plataforma determina la calidad, la cantidad, los sesgos en los datos de la secuenciación resultantes, y la utilidad de la plataforma para aplicaciones particulares. Ejemplos de estas plataformas de HTS incluyen al pirosecuenciador de Roche 454 Margulies *et al.* [2005], el secuenciador Heliscope de molécula única por el proveedor Helicos Harris *et al.* [2008], y la plataforma SOLiD de life technologies Valouev *et al.* [2008]. Interesantemente, Illumina/Solexa

lanzó el Genome Analyzer II en 2006, y los avances en la tecnología de Illumina durante los años intermedios han marcado en gran medida el ritmo de las tremendas reducciones en los costos. Como consecuencia, las plataformas Illumina dominan actualmente el mercado de las HTS. La metodología que utilizan los secuenciadores de Illumina comprende la amplificación clonal de fragmentos de ADN ligados a un adaptador sobre una superficie de vidrio Bentley *et al.* [2008]. Las bases incorporadas son leídas usando una estrategia de terminación cíclica reversible, que secuencia la hebra molde un nucleótido a la vez a través de rondas progresivas de incorporación, lavado, toma de imágenes y escisión de bases. En esta estrategia, se utilizan 3'-O-azidometil-dNTPs marcados con fluorescencia para detener la reacción de la polimerización, lo que permite la eliminación de bases no incorporadas y la toma de imágenes fluorescentes para determinar el nucleótido añadido Guo *et al.* [2008]. Después se escanea la celda de flujo con una cámara de dispositivo de carga acoplada, se eliminan las trazas fluorescentes y el bloqueo por los 3'-O-azidometil-dNTPs, y se repite el proceso. En todos los modelos de Illumina, las tasas de error están por debajo del 1% y el tipo de error más común es el de la sustitución Dohm *et al.* [2008]. A la fecha Illumina produce los secuenciadores MiSeq, NextSeq 500 y la gama de HiSeq, cada uno optimizado para una variedad de rendimientos y tiempos de respuesta. Por ejemplo: MiSeq está diseñado como un secuenciador rápido y personal, con tiempos de ejecución de 4 horas, utilizado para secuenciación dirigida y secuenciación de pequeños genomas. El HiSeq 2500, por otro lado, está diseñado para aplicaciones de alto rendimiento, produciendo resultados de 1 Terabyte (Tb) en 6 días. Además, a principios de 2014, Illumina presentó el NextSeq 500, que al igual que el MiSeq, está diseñado como un secuenciador rápido para laboratorios individuales. Independiente a la secuenciación de genomas, existe un gran interés por la secuenciación del transcriptoma. El transcriptoma es el perfil completo de ARNs y su cantidad en una célula, ligado a una etapa de desarrollo o condición fisiológica específica. Por lo que, comprender el transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los componentes moleculares de células y tejidos, y también para comprender estados fisiológicos y de la enfermedad Chu y Corey [2012]. Los objetivos clave de la transcriptómica son: 1) catalogar todas las especies de ARNs, incluidos los ARN no codificantes y los ARN pequeños; para determinar la estructura transcripcional de los genes, en términos de sus sitios de inicio, extremos 5' y 3', patrones de corte y empalme y otras modificaciones postranscripcionales; y 2) cuantificar los niveles de expresión cambiantes de cada ARN durante el desarrollo y en diferentes condiciones.

Bajo estos objetivos, se desarrollaron diversos métodos para la cuantificación de transcriptomas. Uno de ellos, es denominado RNA-seq (secuenciación de ARN, por sus siglas en inglés), el cual tiene claras ventajas sobre los enfoques existentes y se espera que revolucione la forma en que se analizan los transcriptomas eucariotas Wang *et al.* [2009]. En general, previo a la secuenciación por la tecnología de RNA-seq se parte de una población de ARN (total o fraccionado) que se convierte en una biblioteca de fragmentos de ADN complementario (ADNc) con adaptadores unidos a uno o ambos extremos. Posteriormente, cada molécula, con o sin amplificación, se secuencian con HTS para obtener secuencias cortas de un extremo (secuenciación de un solo extremo) o ambos extremos (secuenciación pareada). Las lecturas son típicamente de 30 a 400 pares de bases (pb), dependiendo de la tecnología de secuenciación de ADN utilizada, y en principio, cualquier HTS se puede utilizar para RNA-seq Holt y Jones [2008]. Adicionalmente, existen dos consideraciones importantes cuando se utiliza la tecnología de RNA-seq: 1) La construcción de la librería y 2) El análisis bioinformático. Referente a la construcción de la librería, existen varias etapas en la manipulación de las librerías de ADNc que se utilizan para perfilar diferentes tipos de ARNs. Por ejemplo: los ARN largos se fragmentan en porciones más pequeñas (200-500 bp) para que sean compatibles con la mayoría de HTS. Los métodos de fragmentación más comunes incluyen: La fragmentación de ARN (hidrólisis o nebulización de ARN) y fragmentación de ADNc (tratamiento con ADNasa I o sonicación). Cada uno de estos métodos crea un sesgo diferente en el resultado. En particular, la fragmentación del ARN tiene poco sesgo sobre los transcritos Mortazavi *et al.* [2008], pero disminuye la proporción de lecturas en los extremos de los transcritos Wang *et al.* [2009]. Por el contrario, la fragmentación del ADNc está fuertemente sesgada a la identificación de secuencias en los extremos 3', y por lo tanto, proporciona información abundante sobre esta región Nagalakshmi *et al.* [2008]. Finalmente, el uso de RNA-seq conlleva varios desafíos bioinformáticos, incluido el desarrollo de métodos eficientes para almacenar, recuperar y procesar grandes cantidades de datos. Además, aunque actualmente existen una miríada de herramientas para el procesamiento de los datos generados por RNA-seq, no existe una metodología única para su análisis Conesa *et al.* [2016b]. Por lo que, la selección del conjunto de herramientas bioinformáticas para llevar a cabo el análisis es una consideración medular para la interpretación biológica de los datos.

En este trabajo se emplearon las tecnologías de secuenciación de RNA-seq, small-RNA-seq y single cell RNA-seq, utilizando la plataforma de secuenciación de illumina NextSeq. Aunque cada una

posee una metodología propia para la construcción de las librerías de cDNA, el tamaño de los fragmentos finales, normalmente es menor a 500 pb. Además, como se mencionó anteriormente, es importante tener en cuenta que la secuenciación puede implicar lecturas de un solo extremo (SE, por sus siglas en inglés) o por ambos extremos (PE, por sus siglas en inglés), aunque esta última es preferible para el descubrimiento de transcritos de novo o el análisis de la expresión de isoformas Katz *et al.* [2010]. Adicionalmente, las lecturas más largas mejoran el mapeo y la identificación de los transcritos Garber *et al.* [2011]; Łabaj *et al.* [2011], por lo que la mejor opción de secuenciación dependerá de los objetivos del análisis. Por ejemplo, las lecturas SE son cortas, más baratas y suelen ser suficientes para los estudios dirigidos a obtener los cambios en el perfil de la expresión génica en organismos bien anotados, mientras que las lecturas PE de mayor cobertura son preferibles caracterizar transcriptomas mal anotados. Otro factor importante, es la profundidad de secuenciación o el tamaño de la biblioteca, que es el número de lecturas secuenciadas para una muestra determinada. A medida que la muestra se secuencia a un nivel más profundo se detectarán más transcritos y su cuantificación será más precisa Mortazavi *et al.* [2008]. Sin embargo, la profundidad de secuenciación óptima depende nuevamente de los objetivos del experimento. Mientras que algunos autores argumentarán que tan solo cinco millones de lecturas mapeadas son suficientes para cuantificar con precisión genes de expresión media a alta en la mayoría de los transcriptomas eucariotas, otros secuenciarán hasta 100 millones de lecturas para cuantificar con precisión genes y transcripciones que tienen bajos niveles de expresión Sims *et al.* [2014]. En el caso particular del estudio de células individuales, la cuantificación a menudo se lleva a cabo con solo un millón de lecturas, pero se puede realizar de manera confiable para genes altamente expresados con tan solo 50,000 lecturas Pollen *et al.* [2014]. Finalmente, un factor de diseño crucial para la secuenciación es el número de réplicas. El número de réplicas que deben incluirse en un experimento de RNA-seq depende tanto de la cantidad de variabilidad técnica en los procedimientos de RNA-seq como de la variabilidad biológica del sistema en estudio, así como de la potencia estadística deseada (es decir, la capacidad de detectar diferencias estadísticamente significativas en la expresión entre grupos experimentales), siendo tres réplicas el mínimo para cualquier análisis inferencial. En resumen, los parámetros más importantes para un estudio de secuenciación son: el tipo de secuenciación (SE ó PE), la profundidad y el número de réplicas biológicas, y aunque las HTS continúan perfeccionándose estos parámetros determinaran la cantidad, calidad y preguntas biológicas que se pueden abordar y responder.



## Capítulo 2

### Acotación

El proyecto doctoral constó de dos proyectos: 1) Un proyecto principal dedicado a investigar el impacto de los microRNAs en la reprogramación metabólica de células MCF-7 durante el desarrollo de esferoides, y 2) un proyecto en colaboración con el Dr. Aarón Vázquez Jiménez, enfocado a revelar la heterogeneidad funcional en esferoides tumorales multicelulares (ETMC) de cáncer de mama mediante el uso de RNA-seq de célula única (single cell RNA-seq). Ambos proyectos utilizaron el mismo modelo experimental de ETMC de MCF-7. Además, para ambos proyectos se utilizaron las mismas etapas de cultivo caracterizadas por inmunofenotipificación referentes a ETMC enriquecidos en células proliferativas (ETMC de 6 días de edad) y células quiescentes (ETMC de 19 días de edad). Sin embargo, es importante mencionar que el presente escrito sólo describe a profundidad el proyecto dirigido a investigar el impacto de los microRNAs en la reprogramación metabólica de células MCF-7 durante el desarrollo de esferoides. No obstante, al final del escrito se incluye la publicación generada a través del análisis de los datos de scRNA-seq en caso de posibles inquietudes.

## Capítulo 3

# Antecedentes de la investigación

La mayoría de las células del cuerpo humano no conservan una actividad constante del ciclo celular, por el contrario, residen en estados fuera de ciclo. Por otra parte, una minoría de células se encuentran activamente ciclando (proliferando), y se sitúan en compartimientos de tránsito y amplificación de células troncales para la autorenovación de los tejidos, como el epitelio y la médula ósea [Potten y Loeffler, 1990]. En contraste, la mayoría de las células funcionales salen del ciclo celular de dos maneras: 1) De forma irreversible hacia estados terminales diferenciados (p.ej. miocitos, neuronas o células epiteliales superficiales de la piel o mucosas) o 2) se retiran reversiblemente a un estado quiescente (G0) (p. ej. células gliales, células foliculares tiroideas o hepatocitos) [Williams y Stoeber, 2007; Hall y Watt, 1989]. El ciclo celular posee cuatro fases secuenciales. La fase S, es la etapa en la que se lleva a cabo la replicación del ADN; La fase M, describe la etapa cuando la célula se divide en dos células hijas; y las fases G1 y G2, las cuales son fases de preparación que separan a la fase S y M. Particularmente, la fase G1 sucede después de la mitosis (fase M) y es una etapa en la que la célula es sensible a señales positivas y negativas de redes de señalización de crecimiento. La fase G2 es la brecha después de la fase S, y se caracteriza por ser una etapa de preparación previa a la mitosis [Murray y Hunt, 1993]. La fase G0 representa un estado en el que las células se han retirado reversiblemente del ciclo de división celular en respuesta a una alta densidad celular o privación de mitógenos [Zetterberg y Larsson, 1985]. Alternativamente, las células pueden retirarse irreversiblemente del ciclo de división celular a estados terminalmente diferenciados o senescentes. Además, la progresión a través del ciclo celular es impulsada por la familia de cinasas dependientes de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés) y sus parejas reguladoras, las ciclinas [Malumbres y

Barbacid, 2006]. Por ejemplo, las ciclinas D-CDK4, D-CDK6 y E-CDK2 impulsan la progresión de G1 a través de su punto de control, lo cual permite a las células completar el ciclo celular [Planas-Silva y Weinberg, 1997]. Otros ejemplos incluyen a la ciclina A-CDK2, la cual es necesaria para el inicio de la fase S, y la ciclina B-CDK1 que regula la progresión a través de G2 y la entrada en la mitosis [Nigg, 2001]. Adicionalmente, la progresión a través de cada fase del ciclo celular y la transición entre sus fases son monitoreadas por mecanismos de censado, llamados puntos de control, que mantienen el orden correcto de las etapas del ciclo celular [Hartwell y Weinert, 1989]. Si los mecanismos de censado detectan eventos aberrantes o incompletos del ciclo celular (p.ej. daño al ADN), las vías de control promueven proteínas efectoras para desencadenar el arresto del ciclo celular hasta que el problema esté resuelto [Bartek *et al.*, 2004]. De esta forma, los inhibidores de CDK (CDKI) funcionan como proteínas efectoras que pueden detener de manera reversible la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, el arresto en G1 puede ser inducido mediante dos mecanismos diferentes: 1) la acción de la familia de CDKs Ink4 (INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) e INK4D (p19)), los cuales inhiben a CDK4 y CDK6, o 2) a través de la familia de inhibidores Cip/Kip (p21, p27, p57), los cuales suprimen la actividad de CDK2 [Malumbres y Barbacid, 2009]. La desregulación del ciclo celular subyace en la proliferación celular descontrolada que caracteriza al fenotipo maligno. Este fenómeno ha sido ampliamente explorado, desde la regulación de los componentes del ciclo celular hasta el desarrollo de fármacos para inhibir la progresión del ciclo celular en cáncer [Vermeulen *et al.*, 2003]. Adicionalmente, la comprensión de cómo el ciclo celular funciona en sincronía con los cambios metabólicos podría tener importantes implicaciones terapéuticas. Ejemplos de esta sincronía incluyen; la sobrerregulación de GLS1 aumentando la glutaminólisis, la cual soporta la replicación del ADN en la fase S; algunas enzimas glucolíticas (PKM2, ALDO, GAPDH) son translocadas periódicamente al núcleo para sobrerregular la expresión de genes involucrados en el ciclo celular; y la glucólisis aerobia soporta activamente la síntesis de proteínas, particularmente en la fase G1 [Icard *et al.*, 2019]. Sin embargo, a pesar de estos grandes avances en la investigación del cáncer, las diferencias metabólicas entre células proliferativas y quiescentes son un nicho poco explorado. Actualmente, existe un reporte que indica que las células en proliferación catabolizan el glutamato a través de transaminasas para acoplar la síntesis de aminoácidos no esenciales (NEAA, por sus siglas en inglés) a la generación de acetoglutarato y la anaplerosis del ciclo TCA. Además, a medida que las células pasan a un estado quiescente, se reduce el consumo de glutamina y la expresión

de transaminasas, mientras que se induce la glutamato deshidrogenasa (GLUD), lo que conduce a una menor síntesis de NEAA [Coloff *et al.*, 2016]. No obstante, este estudio fue realizado en un modelo tumoral no maligno (MCF-10), por lo que los resultados podrían no tener una representación en modelos tumorales malignos (p.ej. MCF-7). Es por esta razón, que el trabajo descrito en esta tesis aborda este planteamiento e incluye la participación que podrían tener los miRNAs en el metabolismo del cáncer.

## Capítulo 4

# Pregunta de investigación e hipótesis

### Preguntas de investigación

¿Cuál es la correlación entre los niveles de expresión de miRNAs y ARNm, y las proporciones de células proliferativas y quiescentes conformando los ETMC durante su crecimiento?

¿Cuáles son los potenciales mecanismos biológicos por los cuales los miRNAs inducen un cambio metabólico entre las células proliferativas y quiescentes de ETMC de MCF-7?

¿Cuáles son las diferencias metabólicas guiadas por los miRNAs entre el modelo en monocultivo y los ETMC?

### Hipótesis

Un grupo específico de microRNAs y sus ARNm blanco participan en los cambios en el metabolismo entre subpoblaciones proliferativas y quiescentes en el modelo de ETMC y el monocultivo de MCF-7.

## Capítulo 5

# Justificación

Es imperativo conocer los mecanismos que rigen la patogénesis y progresión del cáncer para diseñar terapias con mayor impacto en el diagnóstico y progresión de la enfermedad. Por lo que, este estudio tiene la finalidad de sugerir mecanismos que detonen el cambio metabólico en células proliferativas y quiescentes en esferoides de una línea celular de cáncer de mama (MCF-7). Con este objetivo, proponemos implementar una serie de herramientas bioinformáticas, las cuales nos permitirán realizar un análisis integrativo entre los perfiles de expresión de miRNAs y mRNAs. Potencialmente, este enfoque permitirá la integración de dos diferentes tipos de información (miRNAs y mRNAs) para el entendimiento de las redes de regulación implicadas en el desarrollo de esferoides tumorales multicelulares. En consecuencia, la integración de diferentes tipos de información permitirá la generación de modelos capaces de sugerir hipótesis encaminadas a identificar y diseñar posibles blancos terapéuticos o biomarcadores que permitan la detección temprana y/o el tratamiento del cáncer de mama.

# Capítulo 6

## Objetivos

### Objetivo General

Explorar y sugerir el papel que los microRNAs tienen en la reprogramación metabólica de células proliferativas y quiescentes durante el desarrollo de esferoides tumorales multicelulares de la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

### Objetivos particulares

- Seleccionar los tiempos característicos con distintas poblaciones de ETMC de MCF-7. Realizar una cinética de cultivo de ETMC de MCF-7 y caracterizar cuantitativamente por citometría de flujo los tiempos específicos durante los cuales, las proporciones de células proliferativas y quiescentes varían significativamente.
- Secuenciar los miRNAs y ARNm de los modelos de proliferación y quiescencia de los ETMC y el monocultivo. Extraer el RNA total de los tiempos característicos para cada subpoblación celular y llevar a cabo la secuenciación de alto rendimiento (RNA-seq y small-RNA-seq).
- Construir una red de interacción entre miRNAs y ARNm blanco. Analizar los datos de secuenciación con software bioinformáticos para integrar las redes de ARNm y miRNAs para explorar y sugerir hipótesis sobre los mecanismos que inducen el fenotipo metabólico en esferoides de MCF-7.

## Capítulo 7

# Metodología. Estrategia experimental y bioinformática

### 7.1. Estrategia Experimental

#### 7.1.1. Material Biológico

El material biológico consistió de la línea celular MCF-7(ATCC HTB-22TM, Manassa, VA, USA), la cual fue obtenida del material criopreservado del laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (Figura 7-1). Esta línea celular deriva de una efusión pleural de una región metastásica de glándula mamaria.

#### 7.1.2. Condiciones de cultivo celular

La línea celular fue cultivada utilizando dos estrategias de cultivo diferentes: El crecimiento en monocapa (Figura 7-1) y el modelo de ETMC (Figura 7-2). Para el crecimiento en monocapa, las células de MCF-7 se cultivaron en medio DMEM(ATCC 30-2002, Manassa, VA, USA) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB, ATCC 30-2020, Manassa, VA, USA). Cada dos días se realizó un recambio de medio. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones constantes a 37°C y con una atmósfera húmeda saturante al 5 % de CO<sub>2</sub> en una incubadora. Para todos los experimentos realizados con esta estrategia de cultivo, se utilizó una densidad celular entre 70-80 % de confluencia con menos de nueve resiembras. La densidad y viabilidad de las células tumorales en el cultivo



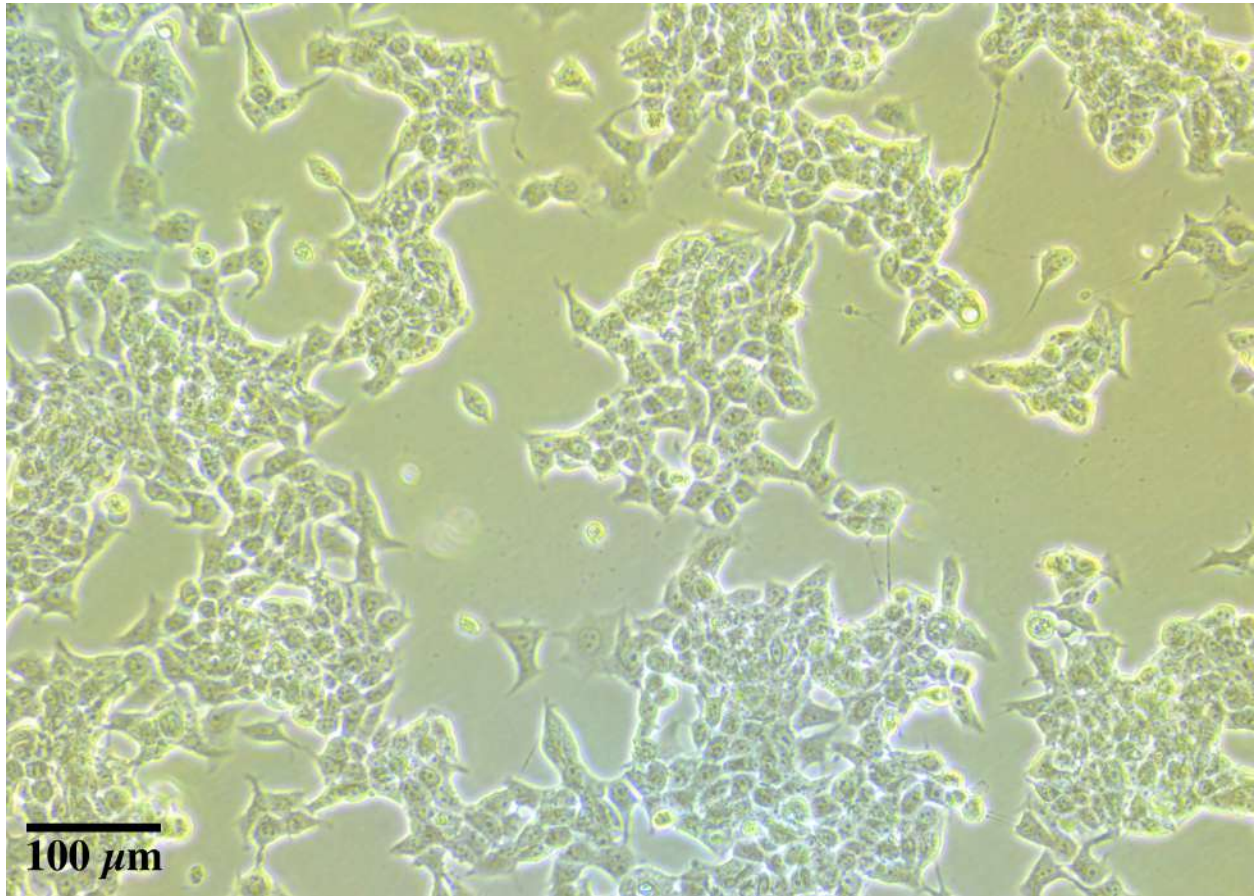
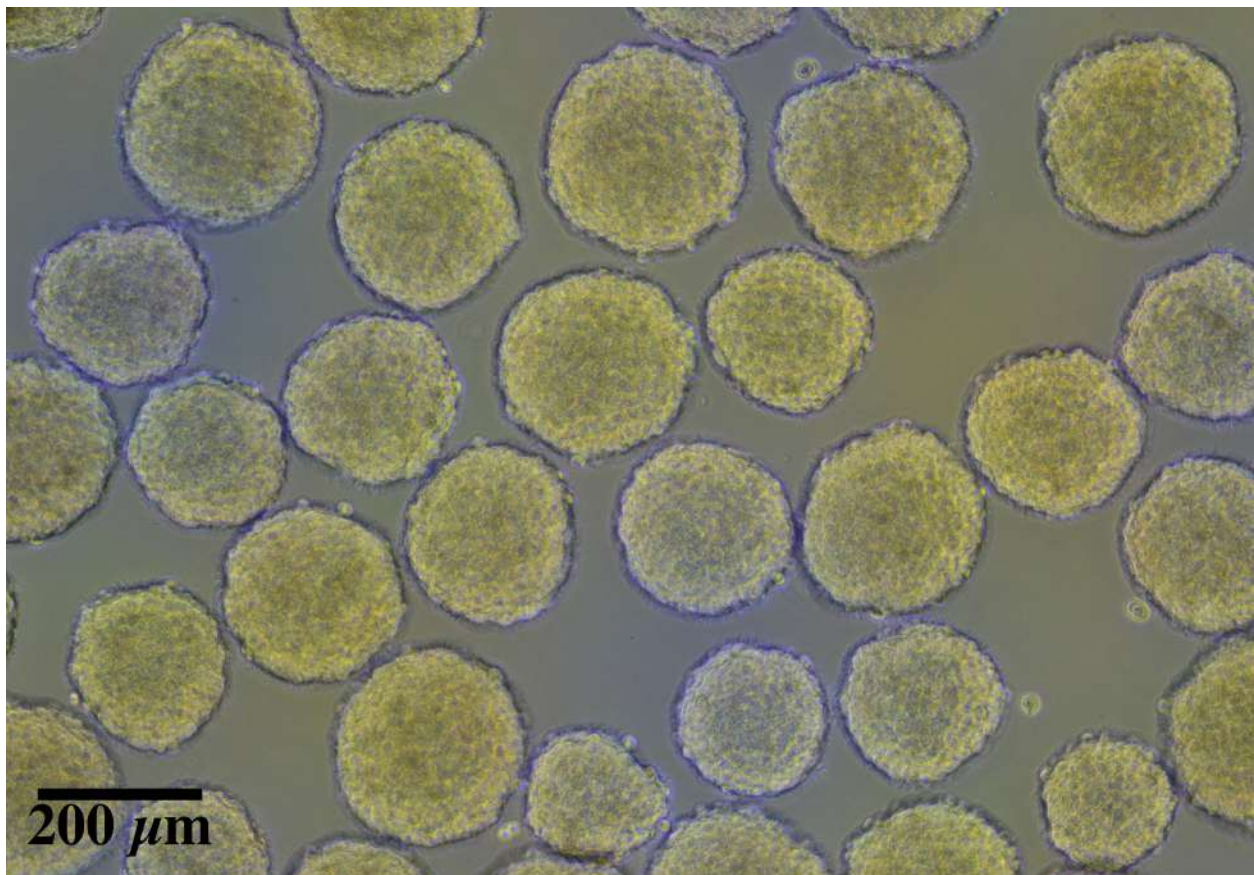


Figura 7-1: Línea celular MCF-7. Monocultivo de la línea celular MCF-7.

fueron monitoreadas por conteo en cámara de Neubauer y evaluadas por técnica de exclusión con azul de tripano(Sigma-Aldrich t8154, St. Louis, MO, USA), estableciendo como valor mínimo de viabilidad 95 %. La generación de ETMC fue llevada a cabo utilizando un cultivo en suspensión. Se inoculó una suspensión celular de MCF-7 con una densidad de  $1 \times 10^6$  células en frascos para cultivo en suspensión de  $12.5 \text{ cm}^2$  (UltraCruz sc-200257, Tex, USA) que contenían 5 mL de medio L-15 (ATCC 30-2008, Manassa, VA, USA), suplementado con 5 % v/v de SFB. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones constantes a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con agitación orbital de 59 rpm [Mandujano-Tinoco *et al.*, 2017]. Durante el crecimiento de los ETMC se realizó un recambio de medio cada dos días.



**Figura 7-2:** ETMC de MCF-7. Ejemplificación del cultivo de ETMC de MCF-7 a 11 días de crecimiento.

### **7.1.3. Tratamiento para la disgregación celular de los ETMC**

Los ensayos experimentales partieron de ETMC con 6 y 19 días de edad de cultivo. Los ETMC fueron colectados y transferidos a tubos de 1.5mL, posteriormente se realizó un lavado con buffer fosfato salino 1X(VWR 97062-732, PA, USA). A las células recolectadas se les añadió una solución que contiene enzimas proteolíticas y colagenolíticas (Accutase™(Invitrogen 00-4555-56, CA, USA)) durante 45 minutos a 37°C en una incubadora con agitación orbital. Cada 5 minutos los ETMC fueron gentilmente homogeneizados por pipeteo durante la reacción enzimática. Para asegurar una disgregación óptima, se añadió una solución de tripsina-EDTA (0.25 % Tripsina, 1 mM EDTA) durante 5 minutos a 37°C. La reacción de la tripsina se detuvo añadiendo medio suplementado con SFB en una relación 1:1. Finalmente, las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en una solución de buffer fosfato salino con 0.1 % de albúmina de suero bovino (Cell Signaling Technology BSA #9998, USA).

### **7.1.4. Estimación de la distribución del diámetro de los ETMC**

La distribución del diámetro en los ETMC con 4, 7, 11, 15, 17 y 19 días de edad de cultivo fue estimada con los siguientes pasos. Primero, se tomaron fotos directamente sobre el cultivo de los ETMC, asegurándose que la mayor proporción de los ETMC estuviera posicionada al centro del recipiente de cultivo. Las fotos fueron tomadas usando un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100. Continuando con lo anterior, las imágenes fueron procesadas a través de una paquetería de análisis fotográfico, MorphLibJ (Legland, Arganda-Carreras, and Andrey 2016), para estimar el diámetro de Feret en todos los ETMC embebidos en cada fotografía. El valor reportado del diámetro de Feret en Figura 8-1B representa el valor promedio de los ETMC propiamente medidos para cada día de cultivo. Finalmente, la distribución del diámetro fue calculada utilizando tres cultivos de ETMC independientes capturando fotografías de los tiempos de cultivo mencionados anteriormente (Tabla.S1).

### **7.1.5. Selección de tiempos óptimos de cultivos para enriquecer la proporción proliferativa y quiescente dentro de los ETMC**

Para evaluar la abundancia de las células en estadio proliferativo y quiescente dentro de los ETMC, se seleccionaron 4 tiempos de cultivo: 6, 8, 17 y 19 días. Los primeros dos tiempos de cultivo fueron elegidos debido a que después de 6 días la mayoría de las células se agregan para formar un ETMC. El último par de tiempos de cultivo se seleccionaron debido a que después de 20 días de cultivo, la proporción de células necróticas aparece, la cuál es una condición que se pretende evitar en este estudio.

### **7.1.6. Inmunofenotipificación**

Los cultivos de ETMC en día 6, 8, 17 y 19 fueron disgregados como se describe en la **sección 6.1.3**. A Continuación, se tomaron alícuotas de  $3 \times 10^6$  células para cada día de cultivo. La fijación fue llevada a cabo utilizando PFA al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente y enjuagando 3 veces con buffer fosfato salino 1X. Subsecuentemente, la permeabilización fue llevada a cabo añadiendo metanol (previamente enfriado en hielo) durante 30 minutos. Antes de la tinción con los anticuerpos, el metanol fue removido realizando lavados con buffer fosfato salino 1X y se tomó una alícuota de  $1 \times 10^6$  células. Posteriormente, las células fueron enjuagadas 3 veces con buffer de incubación (Solución de 0.1% de albúmina de suero bovino en buffer fosfato salino). La inmunotinción se realizó resuspendiendo las células con los anticuerpos primarios: Ki67-Alexa Fluor 488<sup>®</sup> (CST 11882, Massachusetts, USA) y p27-PE (CST 12184, Massachusetts, USA) utilizando una dilución 1:50 e incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes del análisis por citometría de flujo, las células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ L de buffer fosfato salino 1X. Finalmente, la inmunofenotipificación fue llevada a cabo en un citómetro de flujo FACSAria.

### **7.1.7. Extracción de ARN total**

El ARN total fue aislado del modelo en monocapa y los cultivos de ETMC con 6 y 19 días de edad utilizando un protocolo adaptado de extracción con TRIzol (Invitrogen, CA, USA). Previo a la extracción con TRIzol se realizaron ajustes particulares para cada modelo de cultivo que se describen a continuación: Para el cultivo en monocapa, se utilizó un cultivo con una confluencia

entre 70-80 %. Posteriormente, se retiró el medio y se vertió 1 mL de TRIzol directamente sobre la placa de cultivo y se homogeneizó hasta que todas las células fueron separadas de la placa de cultivo, este paso fue asistido por el uso de un raspador (UltraCruz sc-395250, Tex, USA) y la mezcla fue recuperada en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL. Para los cultivos de ETMC con 6 y 19 días de edad, los ETMC fueron recuperados en tubos de 1.5 mL por centrifugación. Se retiró el medio y se resuspendió en 1 mL de TRIzol. La solución fue homogeneizada vigorosamente hasta que no hubo cúmulos celulares. Los pasos que se describen a continuación se utilizaron para ambos modelos de cultivo. A las células mezcladas con TRIzol provenientes de la monocapa y los ETMC con 6 y 19 días de edad, se les añadió 10  $\mu$ L de tritón (Merck T8787, St. Louis, USA) al 2% dejando reposar la reacción a temperatura ambiente por 10 minutos. Después, se añadieron 200 $\mu$ L de cloroformo en grado biología molecular y se mezcló por inversión, dejando reposar la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una vez finalizada la reacción con el cloroformo, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 18°C, con esto conseguimos la separación de la mezcla en 3 fases (orgánica, acuosa y lipídica/proteica), nuestras distintas formas de ARN se encuentran en la fase acuosa la cual se aísla y se transfiere a tubos para microcentrífuga. A la fase acuosa recuperada se le añadieron 0.25  $\mu$ L de glucógeno (ThermoFisher R0561, Waltham, USA) como reactivo de coprecipitación. A esta mezcla se le añadió 1mL de isopropanol en grado para biología molecular, con el fin de bajar el coeficiente de floculación y precipitar el ARN, este proceso se dejó bajo incubación durante 20 minutos a -20°C. Al terminar la incubación, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 45 minutos a 18°C, la finalidad es obtener un pequeño pellet al cual se le retira el sobrenadante y se le lava y purifica con 1 mL de etanol al 75 % en grado para biología molecular, asegurándose de que se mezcle bien el pellet. Este proceso de lavado y purificación con etanol se repitió 3 veces. Se centrifuga una última ocasión con las mismas condiciones, para posteriormente quitar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol durante 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se resuspende en 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas y se almacena a -80°C.

#### **7.1.8. Construcción y secuenciación de librerías de ARN y ARN pequeño**

Previo a la construcción de las librerías de ARN y ARN pequeño se aseguró que todas las extracciones de ARN total de la sección **sección 6.1.7.** tuvieran una cantidad mínima de 1 $\mu$ g y que el valor de integridad (RIN, por sus siglas en inglés) de las muestras fuera RIN>7. La secuenciación de

nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo sobre aislado de ARN total utilizando la plataforma NextSeq500(Illumina, Inc.). La construcción de las librerías de ARN y ARN pequeño se realizó siguiendo el protocolo de los kits comerciales TruSeq RNA Library Prep Kit(Illumina, Inc.) y CD Small RNA Library Prep kit(Illumina, Inc.), respectivamente. La información de la secuenciación de alto rendimiento se puede encontrar en el repositorio E-MTAB-9741 de ArrayExpress.

## 7.2. Estrategia Bioinformática

### 7.2.1. Datos

El conjunto de datos presentados en este estudio se encuentran en repositorios online. El nombre de los repositorios y número de acceso se encuentran en: ArrayExpress, acceso: E-MTAB-9741 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-9741/>).

### 7.2.2. Descarga, Almacenamiento y unión de los datos crudos de RNA-Seq y small RNA-Seq

La totalidad de los datos crudos fueron descargados desde la plataforma de Illumina (BaseSpace) y almacenados en un servidor local con sistema operativo Ubuntu 16.04.6 LTS (GNU/Linux 4.4.0-174-generic x86\_64). Los 72 datos crudos de RNA-Seq al ser una librería pareada poseen la siguiente estructura de nombramiento:

ABL#\_N.fastq; p.ej. N1Esf19L1\_1.fastq.gz

A= Réplica biológica: N1, N2 y N3.

B= Modelo experimental: EMTC 19 (Esf19), EMTC 6 (Esf6) y Monocapa (Mono).

L#= Número de línea: 1, 2, 3 y 4.

N= Tipo de lectura: 1=Lectura directa y 2= Lectura reversa.

Los 52 datos crudos de small RNA-Seq al ser una librería directa poseen la siguiente estructura de nombramiento:

AB\_S#\_L00#\_R1\_001.fastq; p. ej. N1Esf19\_S6\_L001\_R1\_001.fastq.gz

A= Réplica biológica: N1, N2 y N3.

B= Modelo experimental: EMTC 19 (Esf19), EMTC 6 (Esf6) y Monocapa (Mono).

S#= Número asignado en la hoja de muestra (Parámetros para el secuenciador).

L#= Número de línea: 1, 2, 3 y 4.

R1= Lectura directa.

Ambas tecnologías de secuenciación poseen lecturas de 4 líneas (posición en la celda de flujo) para cada muestra, por lo que es conveniente concatenarlas en un solo archivo para su procesamiento posterior. Previo a la unión de los archivos, se utilizó el comando gunzip para descomprimir todos los archivos.

```
> gunzip.fastq.gz
```

Este paso permitió que el concatenado de los archivos no estuvieran corruptos. Finalmente, se utilizó el comando cat para concatenar todos los archivos de una misma réplica biológica y modelo experimental. Por ejemplo:

```
> cat N1Esf19L1_1.fastq N1Esf19L2_1.fastq N1Esf19L3_1.fastq N1Esf19L4_1.fastq > N1Esf19_1.fastq
```

Este proceso dio como resultado la reducción de 72 a 18 archivos para RNA-Seq y de 52 a 9 archivos para small RNA-Seq.

### **7.2.3. Determinación de la calidad de los archivos de secuenciación y preprocesamiento**

A los 18 archivos de RNA-Seq (.fastq) y los 9 archivos de small RNA-Seq (.fastq) se les realizó una evaluación de calidad utilizando el software FastQC v3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Este programa tiene como objetivo proporcionar de manera sencilla algunas comprobaciones de control de calidad, principalmente en datos sin procesar, los cuales provienen de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Debido a que FastQC entrega un reporte individual por cada muestra, se utilizó el software MultiQC [Ewels *et al.*, 2016] para resumir todos los reportes en un reporte único con la información de todas las muestras. Una de las medidas más importantes que se observa en este reporte es el nivel de calidad Phred (Phred quality score, en

inglés). Esta medida permite conocer la confianza en la asignación de cada llamado de base por parte del secuenciador. Por lo que, se utilizó un nivel de calidad  $\text{Phred} \geq 33$  para el preprocesamiento de los datos crudos. Este valor indica una precisión del 99.95 % en el llamado de base o una probabilidad que el llamado de base sea incorrecto de 1 en 1000. Únicamente a los datos de RNA-Seq se les realizó un recorte en ambos extremos de la lectura (5' y 3'). Esto debido a que las corridas con secuenciadores Illumina poseen baja calidad al inicio y final de la secuenciación. Para el proceso de recorte se utilizó el software Trimmomatic versión 0.36 [Bolger *et al.*, 2014].

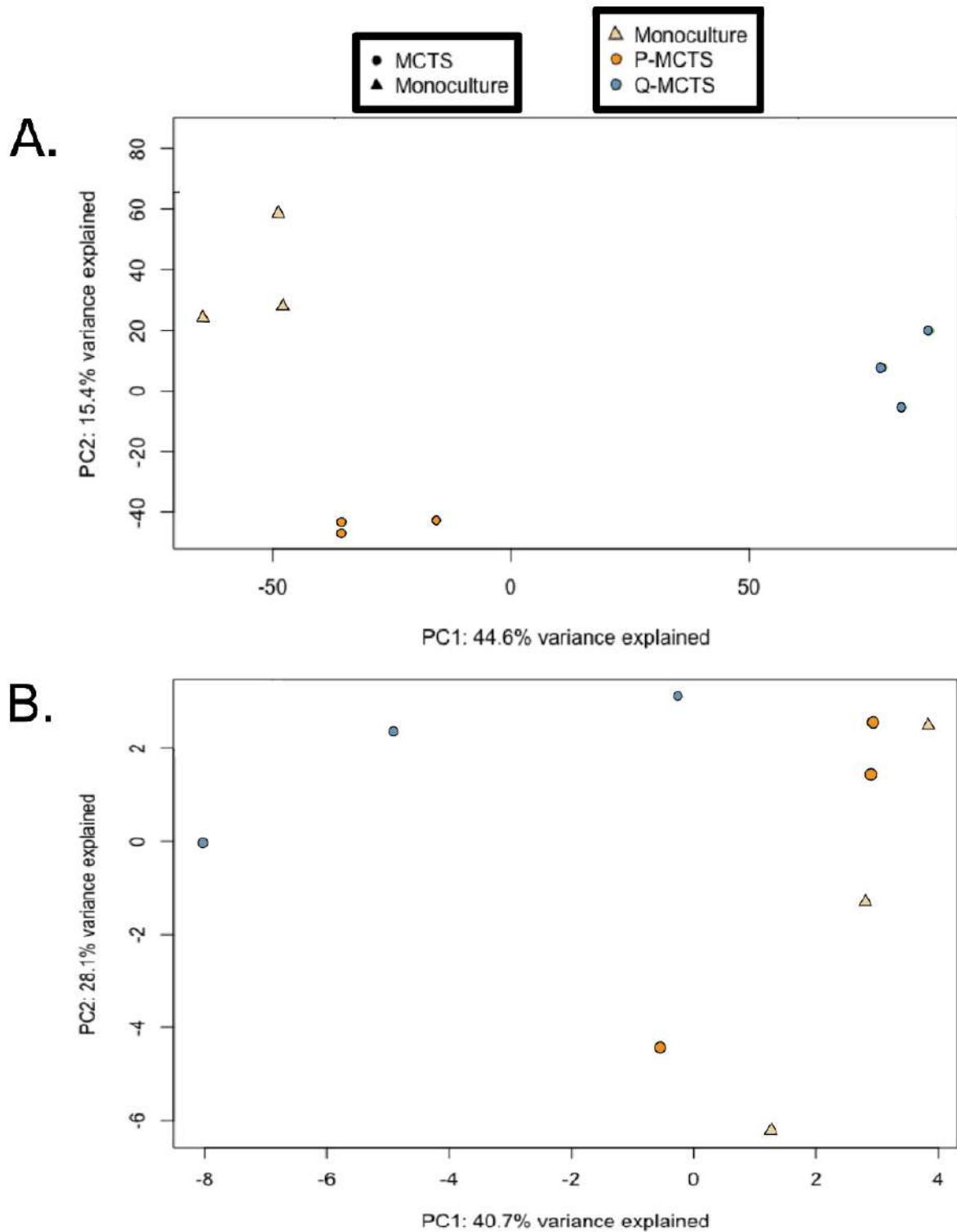
#### 7.2.4. Alineamiento y cuantificación de las entidades

Previo al alineamiento de las lecturas de RNA-Seq preprocesadas se construyó el índice que utiliza el alineador Kallisto para realizar el alineamiento y cuantificación sobre una construcción específica del genoma humano (GRCh38). Posteriormente, se realizó el alineamiento con Kallisto versión 0.43.1 [Bray *et al.*, 2016], y las cuantificaciones obtenidas por muestra fueron condensadas utilizando la paquetería de R, tximport [Soneson *et al.*, 2015]. Por otra parte, para las lecturas provenientes de la tecnología de small RNA-Seq el alineamiento se llevó a cabo utilizando el alineador Bowtie2 versión 2.3.2 [Langmead y Salzberg, 2012] utilizando los parámetros sugeridos para el alineamiento de secuencias de miRNAs [Ziemann *et al.*, 2016]. Además, se utilizó la construcción GRCh38 del genoma humano para realizar el índice de Bowtie2. Finalmente, los archivos .sam generados a partir del alineamiento con Bowtie2 fueron condensados utilizando la paquetería de R, FeatureCounts [Liao *et al.*, 2014] y el archivo de anotaciones funcionales de miRBase versión 22 (hsa.gff3).

#### 7.2.5. Análisis exploratorio y análisis de expresión diferencial

Las cuantificaciones de ARNm y miRNAs obtenidas a partir de las tecnologías de RNA-Seq y small RNA-Seq fueron inspeccionadas a través de un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para los datos normalizados y sin normalizar (Figura 7-3). El análisis de expresión diferencial fue llevado a cabo utilizando la paquetería de R, edgeR versión 3.26 [McCarthy *et al.*, 2012] para ambos casos.





**Figura 7-3: Análisis de Componentes Principales después de la normalización.** A. Distribución de las muestras después de la normalización para los datos de expresión de ARNm. B. Distribución de las muestras después de la normalización para los datos de expresión de miRNAs.

### 7.2.6. Predicción de blancos de miRNAs usando mRNAs metabólicos

Para obtener un subconjunto de ARNm metabólicos inmersos en los resultados obtenidos del análisis de expresión diferencial, se filtraron los ARNm expresados diferencialmente (ED) a través de una lista de ARNs relacionados con vías metabólicas de la base de datos de KEGG utilizando una tasa de descubrimientos falsos (FDR, por sus siglas en inglés) menor al 5%. Posteriormente, se utilizaron de manera conjunta los miRNAs ED y los ARNm ED metabólicos mencionados anteriormente para obtener los posibles pares de miARN-ARNm calculados con la base de datos de miRGate [Andrés-León *et al.*, 2016]. De los resultados obtenidos con miRGate, solo se utilizaron las predicciones del algoritmo Targetscan y los pares de miARN-ARNm validados experimentales para filtros posteriores. Finalmente, se filtraron los posibles pares cuando el log2FC tiene un valor inverso entre los miRNA y los ARNm metabólicos, además se seleccionaron los pares que aparecen al menos dos veces en una ruta metabólica.

### 7.2.7. Análisis de enriquecimiento de vías

El análisis de enriquecimiento de vías se realizó por dos métodos diferentes dentro la herramienta de Webgestalt [Liao *et al.*, 2019]. El primero consiste en tomar la lista completa de ARNm para llevar a cabo un análisis de sobre-representación (ORA, por sus siglas en inglés). El segundo, es el análisis de enriquecimiento por conjuntos de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) el cual se realizó utilizando los ARNm ED con un FDR menor al 5%. Para ambas metodologías se utilizaron las bases de datos de KEGG, GO, Panther y wikipathway.

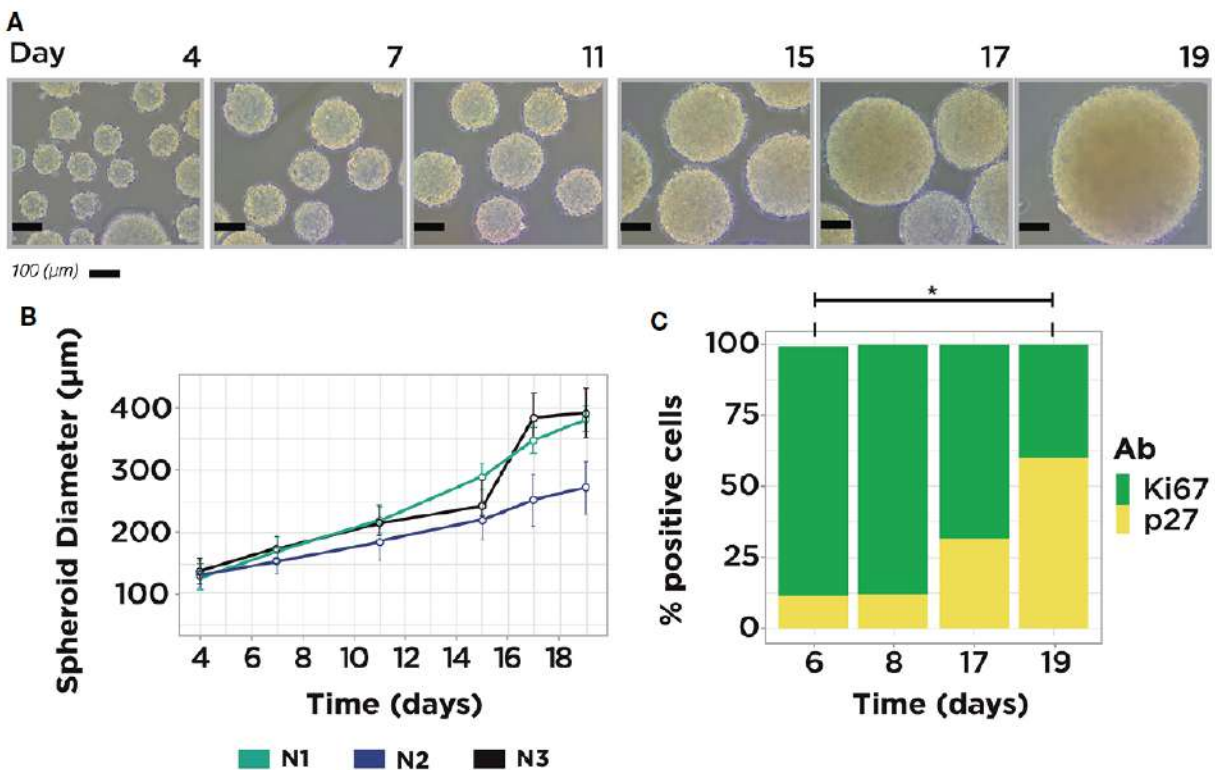
## Capítulo 8

# Resultados

### 8.1. Cultivo de ETMC como modelo de proliferación y quiescencia

Para explorar la posible interacción entre miRNAs y ARNm asociados a una función metabólica en cáncer, llevamos a cabo un cultivo de ETMC con la línea celular de cáncer de mama (MCF-7). Utilizamos principalmente esta línea celular humana con características luminales (ER+, PR+, HER2-) debido a su alta incidencia en mujeres con cáncer de mama en todo el mundo [Bray *et al.*, 2018]. En este modelo de ETMC, las células en suspensión de la línea celular MCF-7 se cargaron en placas no adherentes para estimular la adhesión célula-célula y promover estructuras esféricas bien redondeadas. Este modelo experimental, y sus protocolos implementados, facilitaron el seguimiento de la progresión de los ETMC y aseguraron la producción de grandes lotes de ETMC en diversos puntos de tiempo (Figura 8-1A). El diámetro de Feret informado en la Figura 8-1B. es el valor promedio de las mediciones de los ETMC en cada punto de tiempo (Tabla A-1). Para seleccionar el momento óptimo en el que los ETMC se enriquecen principalmente en una fase del ciclo celular, evaluamos la presencia de un marcador estándar de proliferación (Ki67) y quiescencia (p27) en cuatro puntos de tiempo utilizando inmunofenotipificación. Además, para contrastar las diferencias con un método de cultivo clásico, incluimos un modelo 2D (monocultivo) a lo largo de todo el estudio para compararlo con los ETMC enriquecidos con una población celular proliferativa y los ETMC enriquecidos con una población celular quiescente. Aplicamos un análisis de prueba t sobre la composición relativa de la población proliferativa y quiescente en el monocultivo y los ETMC para identificar dos tiempos de muestra para proceder con la secuenciación de siguiente generación. El

análisis estadístico mostró diferencias significativas en algunas muestras entre la expresión de Ki67 y p27 (Figura B-1). Como resultado de este estudio, encontramos que sólo la comparación entre los ETMC a los 6 y 19 días de edad mostró diferencias estadísticas en ambos marcadores del ciclo celular (Figura 8-1C). En consecuencia, estos puntos de tiempo durante el cultivo de ETMC se seleccionaron para llevar a cabo el transcriptoma y el perfil de ARNs pequeños. Estos resultados indican que los ETMC de 6 días están principalmente enriquecidos en células proliferativas (P-MCTS), y los ETMC de 19 días están principalmente enriquecidos en células quiescentes (Q-MCTS).



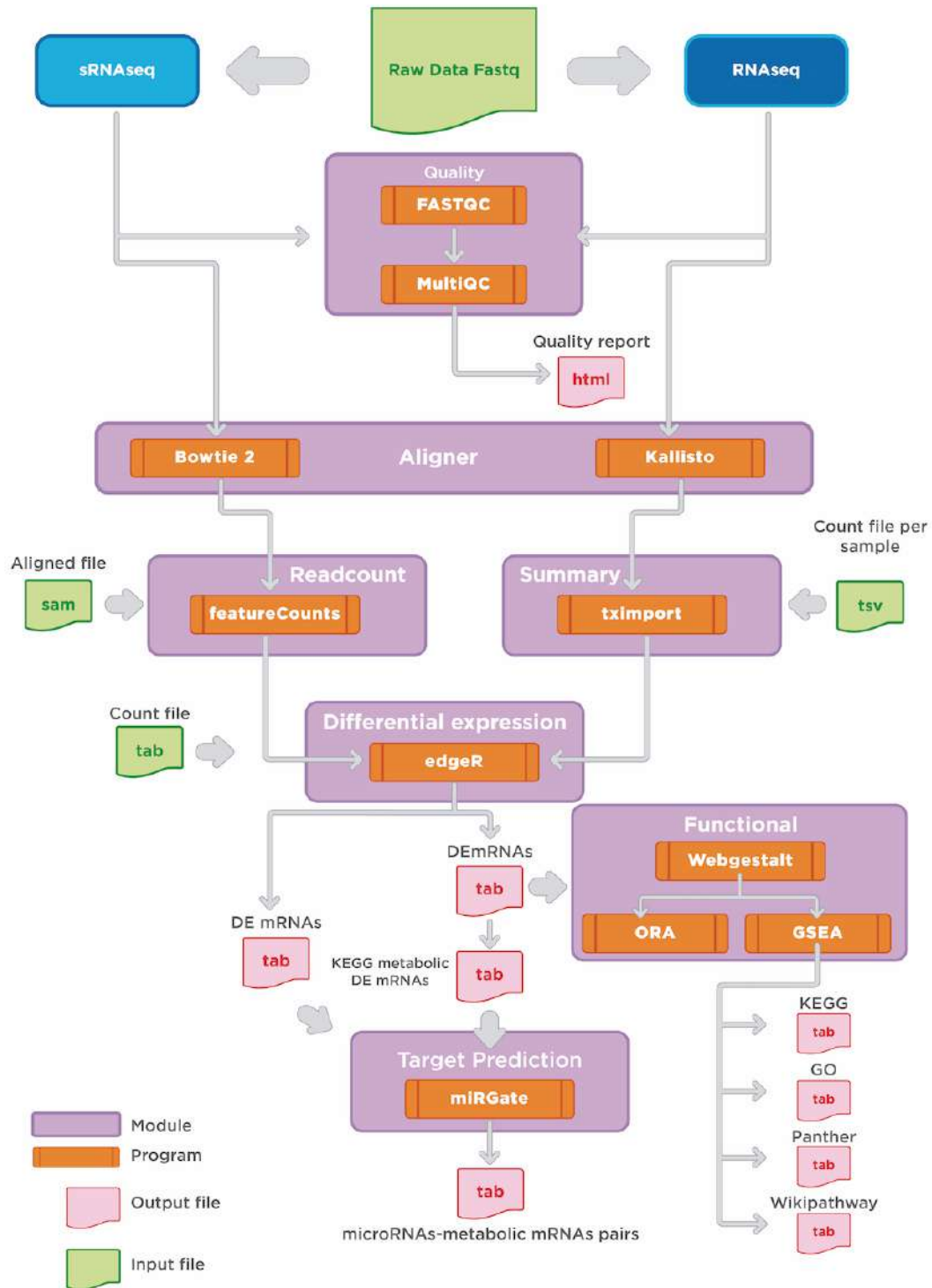
**Figura 8-1: Modelo de ETMC de MCF-7.** A. Imágenes Representativas del cultivo de ETMC de MCF-7 mostrando las diferencias de tamaño a través del tiempo. B. Distribución del diámetro de los ETMC, el promedio de ETMC medidos por tiempo= 67, n=3. C. Immunofenotipificación de las subpoblaciones de ETMC utilizando citometría de flujo con los marcadores Ki67 y p27 en cuatro condiciones temporales: Día 6, 8, 17 y 19. La expresión de ambos marcadores muestra una diferencia estadística en la comparación entre Día 6 y 19. El asterisco indica una diferencia estadística de  $P < 0.05$  (Prueba de T asumiendo varianzas iguales en datos normalizados,  $t = \pm 4.4629$ ;  $df = 4$ ).

## 8.2. Análisis bioinformático de RNA-Seq y small RNA-Seq

Hasta la fecha, pocas herramientas computacionales pueden realizar simultáneamente el análisis de RNA-Seq y de small RNA-Seq. Entre estos algoritmos, miARma-Seq proporciona una herramienta de análisis de multiprocesos que puede eludir a estas restricciones y permitir el estudio de los perfiles de expresión de miRNA y sus ARNm blanco [Andrés-León *et al.*, 2016]. Un estudio que combine la secuenciación de ARNm y miRNAs sin duda puede proporcionar un marco adecuado para evaluar las conexiones por pares entre los miRNAs y los ARNm blanco metabólicos. Con este objetivo en mente, implementamos algunos cambios en el pipeline original de miARma-Seq, utilizando las herramientas más adecuadas para cada módulo de procesamiento. Los dos cambios significativos en el pipeline se realizaron en la herramienta de alineación para los datos de RNA-Seq y la herramienta de enriquecimiento. Por lo tanto, configuramos Kallisto y Webgestalt como las nuevas herramientas de procesamiento (Figura 8-2). Una descripción detallada de los ajustes realizados para cada módulo de procesamiento se describe en la sección de métodos. En resumen, nuestro pipeline está integrado por un conjunto de módulos que abarca pasos clásicos para cada tecnología (ARNm y microARN), como el control de calidad, alineamiento, expresión diferencial, predicción de blancos y análisis funcional. En la Figura 8-2 se muestra una vista global de todo el pipeline implementado en este trabajo.

## 8.3. Análisis de expresión diferencial y predicción de ARNm metabólicos blanco

En esta sección perseguimos dos objetivos: El primero, explorar cómo cambia la expresión de miRNAs y ARNm entre las condiciones; el segundo, identificar posibles mecanismos de regulación a nivel metabólico que involucren conjuntos de parejas de miRNAs y sus ARNm blanco. Para evaluar los cambios en los perfiles de expresión del ARN entre las muestras, obtuvimos el perfil de expresión diferencial de ARNm y miRNAs para cada comparación por pares entre P-MCTS, Q-MCTS y la condición de monocultivo. Desde un punto de vista estadístico, usamos un FDR  $<0.05$  como criterio para seleccionar aquellos ARNm y miRNAs expresados diferencialmente entre condiciones. Como resultado, identificamos un total de 1,289 ARNm y 35 miRNAs expresados diferencialmente entre

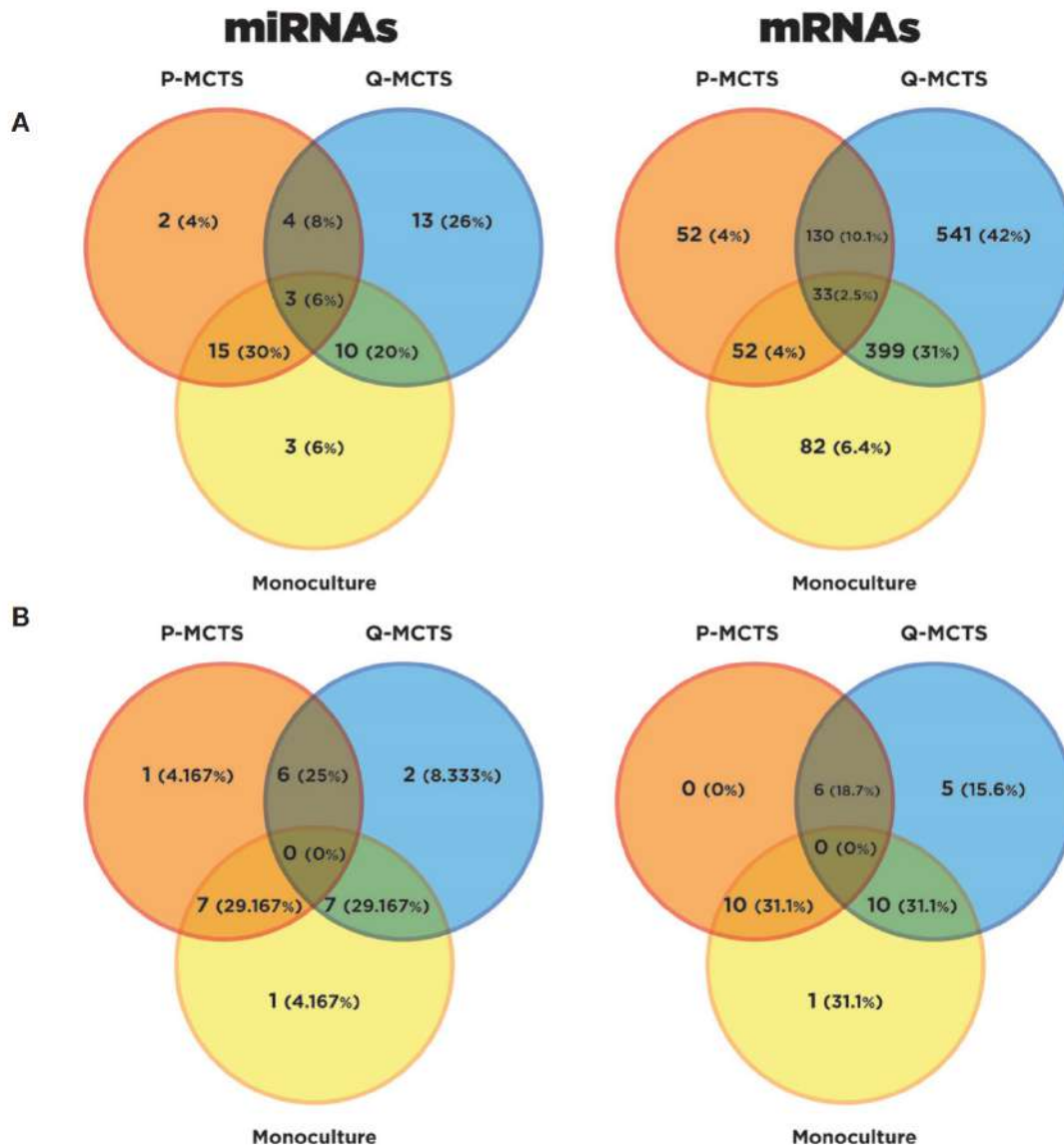


**Figura 8-2: Flujo de trabajo de la metodología bioinformática.** Resumen de los módulos generales implementados para el análisis de expresión de ARNm y miRNAs. Los módulos principales se indican en violeta. Los archivos de salida se indican en rosa claro. La metodología de trabajo muestra los programas aplicados en los pasos principales del análisis de datos de secuenciación de RNA-seq y small-RNA-seq: 1) control de calidad, 2) alineamiento, 3) conteo de lecturas y expresión diferencial, 4) análisis funcional; y 5) predicción de blancos de miRNAs.

todas las condiciones. En particular, la comparación entre P-MCTS y monocultivo no mostró resultados significativos con el umbral estadístico mencionado anteriormente. Por lo tanto, para tener una idea de las diferencias en la regulación, usamos solo para esta comparación un valor de  $p < 0.05$  (no ajustado). Al hacerlo, se agregaron al análisis 15 miRNAs únicos. La (Figura 8-3A) resume el conjunto de ARNm y miRNAs ED obtenidos por comparación con las consideraciones indicadas anteriormente. Para inferir acerca de los mecanismos metabólicos guiados por los miRNAs, llevamos a cabo un filtro dentro de los ARNm ED para obtener simplemente el subconjunto de ARNm que poseen una función metabólica. Este último análisis se logró utilizando el conjunto de genes de las vías metabólicas de KEGG [Kanehisa y Goto, 2000]. Posteriormente, miRGate se utilizó para caracterizar in silico las posibles interacciones reguladoras entre los ARNm metabólicos ED y los miRNAs ED. Como resultado de este análisis bioinformático, se seleccionaron 32 ARNm y 24 miRNAs con interacciones probables entre el miRNA y ARNm blanco obtenidas con las consideraciones descritas en la sección **6.2.6**. Para seccionar cuál de estas interacciones regulatorias entre miRNAs y ARNm metabólicos son únicos o compartidos en las condiciones de cultivo, recopilamos visualmente esta comparación en la (Figura 8-3B). En esta última figura, se muestra la distribución numérica y el porcentaje de miRNAs y sus ARNm blanco compartidos y específicos para cada condición de cultivo. En la siguiente sección, presentamos un análisis en profundidad sobre estos pares de interacciones entre miRNAs-ARNm y sus posibles consecuencias funcionales.

## 8.4. Funciones de los pares de miRNAs-ARNm metabólicos

En la sección anterior, identificamos un conjunto de 24 miRNAs y 32 ARNm que podrían tener un efecto regulador en las vías metabólicas para las tres comparaciones. Basado en este conjunto de 24 miRNAs y 32 ARNm, en esta sección exploramos su patrón de expresión y su posible influencia en las vías de señalización y metabólicas para cada condición realizando un comparación por pares, véase la Tabla 8-1, Tabla 8-2 y Tabla 8-3. En términos generales, los pares de miARN-ARNm podrían influir en diferentes vías de señalización y metabólicas. Por ejemplo, en la comparación entre Q-ETMC y P-ETMC, observamos una regulación al alza de los ARNm involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo de los lípidos, y notamos una regulación a la baja de la biosíntesis de aminoácidos. Además, los ARNm que participan en la glucólisis, la fosforilación oxidativa y el



**Figura 8-3: Resumen del análisis de Expresión Diferencial.** A. Diagrama de Venn resultante de los ARNm ED y los miRNAs ED en las comparaciones por condición con un umbral específico. El naranja, el azul y el amarillo representan los ARNm y miRNAs ED en las condiciones de P-MCTS, Q-MCTS y monocultivo, respectivamente. B. Diagrama de Venn resultante del subconjunto de ARNm metabólicos ED y miRNAs ED después de la predicción de blancos con la información pareada utilizando miRGate.



metabolismo de los glucanos no muestran una preferencia particular por una comparación debido a la disparidad en el uso de la vía (Tabla 8-1). El análisis comparativo entre Q-ETMC y monocultivo mostró una regulación positiva en los ARNm que participan en el metabolismo de los lípidos, en particular el metabolismo de los glicerofosfolípidos. En particular, aunque teníamos un conjunto diferente de ARNm ED en cada condición, observamos que los ARNm en el metabolismo de los glicerofosfolípidos permanecen regulados al alza en Q-ETMC con respecto a todas las comparaciones. Entre las vías exclusivas sobreexpresadas en monocultivo, se destacan el metabolismo del fosfato de inositol, el metabolismo de las purinas, el metabolismo de los glicosaminoglicanos y las vías de señalización del calcio y los esfingolípidos. El metabolismo del carbono para esta comparación también mostró diferencias en el uso de la vía (Tabla 8-2). Finalmente, la comparación entre P-ETMC y monocultivo mostró una preferencia por la biosíntesis y degradación de los aminoácidos, el metabolismo del inositol y el metabolismo de los glicerofosfolípidos en P-ETMC. La condición de monocultivo no muestra un uso de vía particular para esta comparación; sin embargo, hay una sobreexpresión en GFPT2, lo que sugiere una preferencia por el metabolismo del azúcar UDP (Tabla 8-3).

**Tabla 8-1:** Vías afectadas por las parejas de miRNA-ARNm para la comparación entre Q-MCTS y P-MCTS.

		hsa-miR-7974	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-663a	hsa-miR-1184
Glycerophospholipid metabolism	DGKG	+/-			
	PLA2G3	+/-			
	PLA2G4C		+/-		
Ether lipid metabolism	PLA2G3	+/-			
	PLA2G4C		+/-		
Arachidonic acid metabolism	PLA2G3	+/-			
	PLA2G4C		+/-		
Linoleic acid metabolism	PLA2G3	+/-			
	PLA2G4C		+/-		
Alpha-Linolenic acid metabolism	PLA2G3	+/-			
	PLA2G4C		+/-		
Ras signaling pathway	PLA2G3 PLA2G4C	+/-			
Phospholipase D signaling pathway	DGKG	+/-			
	PLA2G4C			+/-	
Choline metabolism in cancer	DGKG	+/-			
	PLA2G4C			+/-	
Phosphatidylinositol signaling system	DGKG	+/-			
	ITPKB			-/+	-/+
N-Glycan biosynthesis	MGAT5				-/+
	STT3B				-/+
Oxidative phosphorylation	ATP6V1C1				-/+
	NDUFB6				-/+
Glycolysis / Gluconeogenesis	HK2				-/+
	PGAM1				-/+
Biosynthesis of amino acids	GLUL			-/+	
	PGAM1				-/+
		hsa-miR-454-3p	hsa-miR-3143	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-15a-5p
N-Glycan biosynthesis	MGAT5				
	STT3B	+/-	+/-	+/-	
Oxidative phosphorylation	ATP6V1C1				+/-
	NDUFB6				+/-
Glycolysis / Gluconeogenesis	HK2		+/-		
	PGAM1		+/-		

Para clasificar los perfiles de expresión entre el ARNm blanco y su miRNA, definimos una notación de dos componentes, el cual indica la expresión relativa. +/- muestra los casos donde el ARNm es sobreexpresado y el miRNA es subexpresado en Q-MCTS con respecto a P-MCTS. -/+ representa la situación inversa.

**Tabla 8-2:** Vías afectadas por las parejas de miRNA-ARNm para la comparación entre Q-MCTS y Monocultivo.

		hsa-miR-7974	hsa-miR-3648	hsa-miR-663b	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-3652	hsa-miR-1226-3p
Purine metabolism	AMPD2			-/+					
	HPRT1					-/+			
	ADA		-/+						
Fructose and mannose metabolism	HK2						+/-		
	KHK							-/+	
	GMPPB								+/-
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	XYLT2							-/+	
	NDST1							-/+	
Phospholipase D signaling pathway	DGKG	+/-							
	PLCB3			-/+					
Ether lipid metabolism	PLA2G3	+/-							
	PLD3				+/-				
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	HK2						+/-		
	GMPPB								+/-
Carbohydrate digestion and absorption	HK2						+/-		
	PLCB3			-/+					
		hsa-miR-7974	hsa-miR-3929	hsa-miR-663a	hsa-miR-3648	hsa-miR-663b	hsa-miR-501-5p		
Phosphatidylinositol signaling system	DGKG	+/-							
	INPP5A		-/+						
	ITPKB		-/+	-/+	-/+				
	PLCB3					-/+			
Glycerophospholipid metabolism	DGKG	+/-							
	PLA2G3	+/-							
	PLD3						+/-		
Inositol phosphate metabolism	INPP5A		-/+						
	ITPKB		-/+	-/+	-/+				
	PLCB3					-/+			
Calcium signaling pathway	ITPKB		-/+	-/+	-/+				
	PLCB3					-/+			
Sphingolipid signaling pathway	PLCB3					-/+			
	CERS6		-/+						

Para clasificar los perfiles de expresión entre el ARNm blanco y su miRNA, definimos una notación de dos componentes, el cual indica la expresión relativa. +/- muestra los casos donde el ARNm es sobreexpresado y el miRNA es subexpresado en Q-MCTS con respecto a Monocultivo. -/+ representa la situación inversa.

**Tabla 8-3:** Vías afectadas por las parejas de miRNA-ARNm para la comparación entre P-MCTS y Monocultivo.

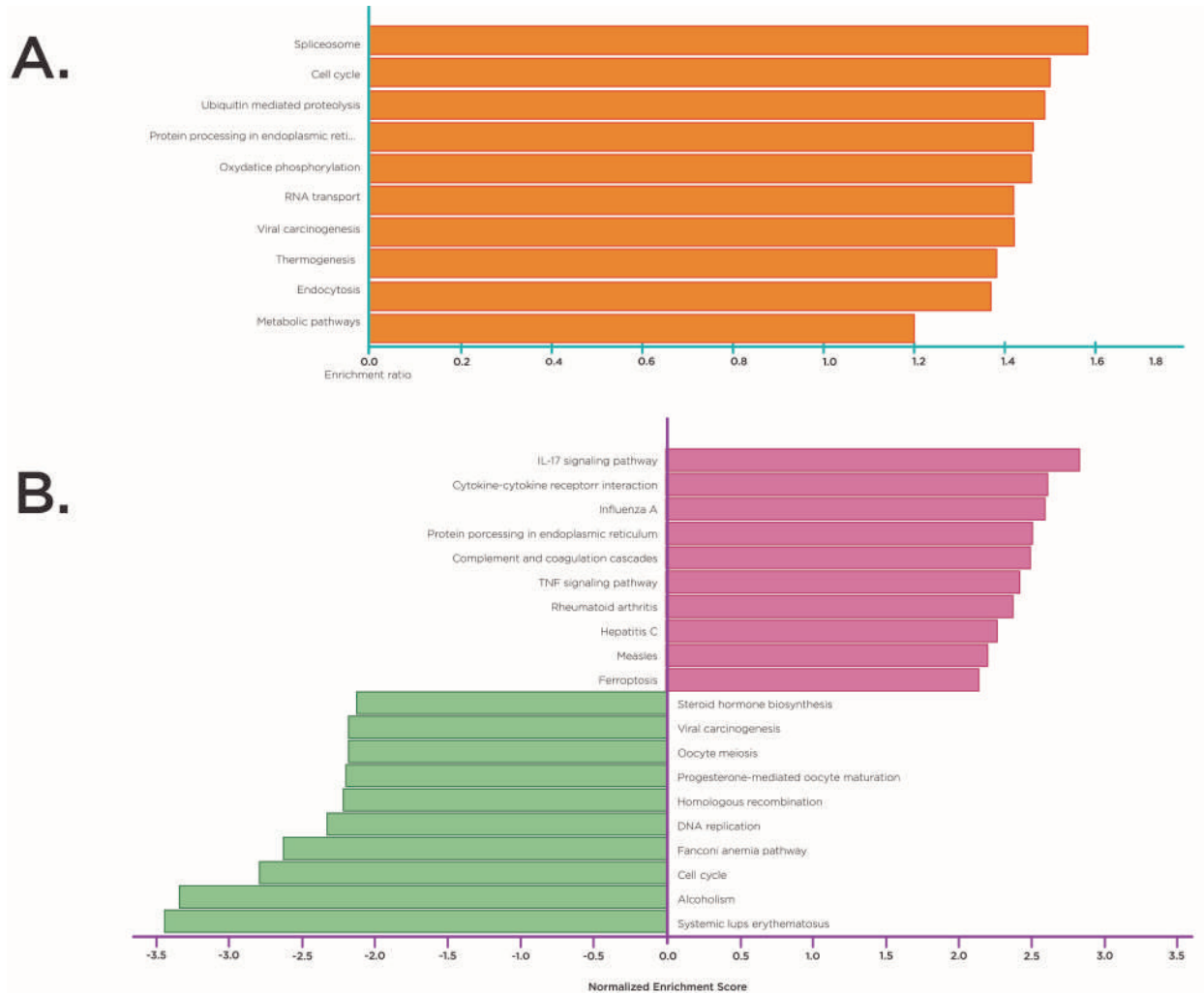
		hsa-miR-429	hsa-miR-940	hsa-miR-320c	hsa-miR-1226-3p	hsa-miR-492	hsa-miR-4721	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-940
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	GFPT2					-/+			
	GMPPB		+/-		+/-		+/-		
Glycerophospholipid metabolism	LPIN1	+/-							
	PCYT1A							+/-	
Biosynthesis of amino acids	PRPS1			+/-					
	PYCR1								+/-
		hsa-miR-429	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-940	hsa-miR-320c	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-1226-3p		
Glycerolipid metabolism	DGAT2	+/-							
	LPIN1	+/-							
Inositol phosphate metabolism	PLCB4		+/-						
	INPP5J			+/-					
Phosphatidylinositol signaling system	PLCB4		+/-						
	INPP5J			+/-					
Valine, leucine and isoleucine degradation	HMGCS1				+/-				
	ACADSB		+/-			+/-	+/-		

Para clasificar los perfiles de expresión entre el ARNm blanco y su miRNA, definimos una notación de dos componentes, el cual indica la expresión relativa. +/- muestra los casos donde el ARNm es sobreexpresado y el miRNA es subexpresado en P-MCTS con respecto a Monocultivo. -/+ representa la situación inversa.

## 8.5. Análisis funcional

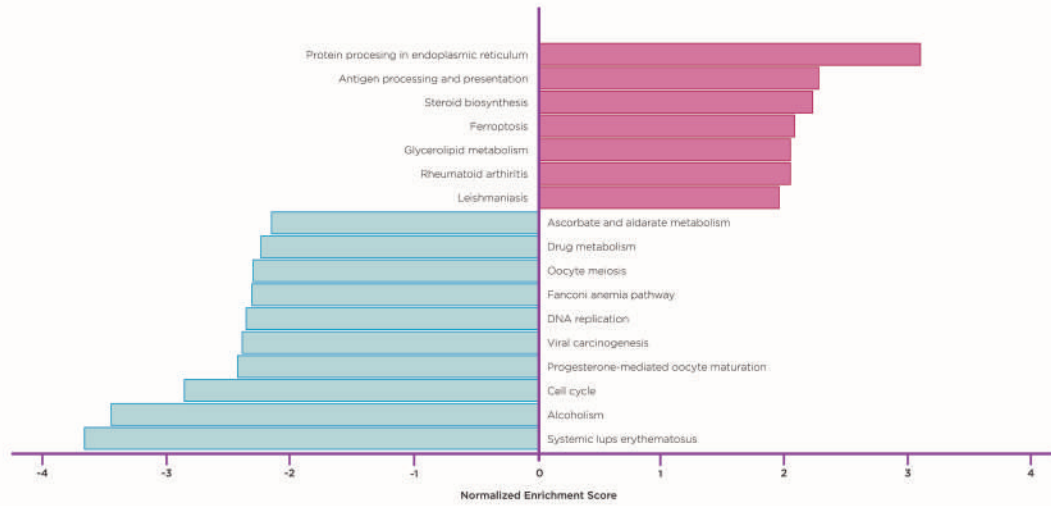
Para obtener una perspectiva global en el uso de las vías en todos los datos de ARNm, realizamos un análisis de enriquecimiento en todas las muestras juntas. Para ello, aplicamos un Análisis de Sobre Representación (ORA, por sus siglas en inglés) y seleccionamos aquellas vías con un FDR  $\leq 0.05$ . Este estudio primario nos permitió identificar las vías que cambian en todas las muestras. Curiosamente, el enriquecimiento sugirió vías involucradas en el espliceosoma, ciclo celular, proteólisis, procesamiento de proteínas, transporte de ARN, carcinogénesis, termogénesis, endocitosis y vías metabólicas (Figura 8-4). Los resultados recapitulan vías de acuerdo con la selección de las muestras, como la vía involucrada en el ciclo celular. Sin embargo, este método no nos permitió distinguir en qué condición estaba sobrerrepresentada la vía. Por lo tanto, utilizamos un enfoque complementario para lograr una visión más específica del uso de vías entre comparaciones. Para ello, llevamos a cabo un análisis de enriquecimiento por conjunto de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) utilizando diferentes conjuntos de datos para todas las comparaciones por pares. La Figura 8-4 representa algunas de las principales vías de enriquecimiento definidas en la base de datos KEGG. En términos generales, notamos que la mayoría de las vías sobrerrepresentadas conducen a respuestas inmunes anormales, recableado metabólico, división celular, subversión de las vías de señalización celular y replicación y reparación del ADN. Al comparar Q-ETMC frente a P-ETMC observamos una regulación positiva de los ARNm en las respuestas inflamatorias y la inmunosupresión y una regulación negativa de la biosíntesis de esteroides, la división celular y la replicación y reparación del ADN (Figura 8-4B). El análisis comparativo entre Q-ETMC y monocultivo mostró una regulación positiva en los ARNm que participan en la biosíntesis de esteroides, el metabolismo de los glicerolípidos y las vías involucradas en las respuestas inmunes anormales, y una regulación a la baja del metabolismo de ascorbato, aldarato y fármacos, división celular y replicación y reparación del ADN (Figura 8-4C). Tomando estos resultados juntos, notamos que las rutas enriquecidas para los métodos de cultivo de tipo proliferativo (P-ETMC y monocultivo) son muy similares en comparación con Q-ETMC. Además, Q-ETMC mantienen el enriquecimiento en vías involucradas en respuestas inmunes anormales. Finalmente, la comparación entre P-ETMC y el monocultivo mostró una regulación positiva en los ARNm que participan en el metabolismo de la arginina y prolina y una regulación negativa en las respuestas inmunitarias y las vías de señalización celular

(Figura 8-4D).

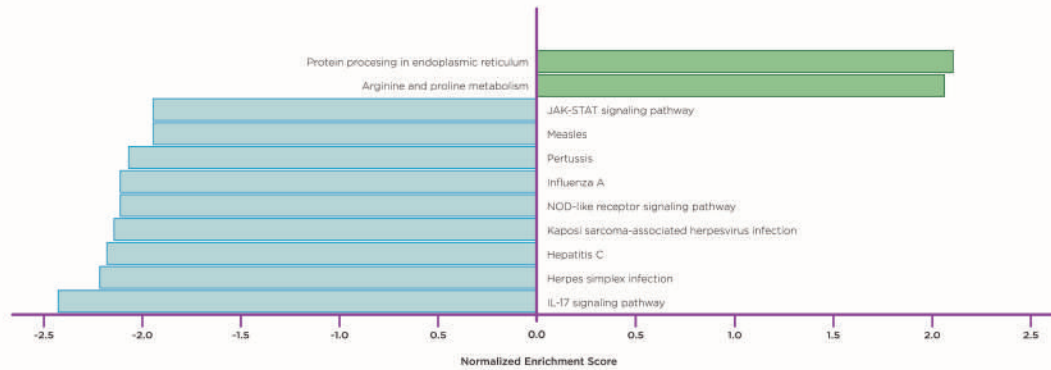


Análisis de enriquecimiento de vías. Parte 1

C.



D.



■ ■ ■ ■ FDR ≤ 0.05     
 ■ All Data     
 ■ Q-MCTS     
 ■ P-MCTS     
 ■ Monoculture

**Figura 8-4: Análisis de enriquecimiento de vías. Parte 2** Evaluación estadística de la fracción de ARNm en una vía particular que se encuentran en los ARNm ED a través de las comparaciones y en todo el conjunto de datos. A. Análisis de sobrerrepresentación (ORA). B. GSEA. Comparación entre Q MCTS y P-MCTS. C. GSEA. Comparación entre Q-MCTS y monocultivo. D. GSEA. Comparación entre P-MCTS y monocultivo. Las barras naranja, magenta, verde y azul claro muestran rutas enriquecidas estadísticamente para todos los datos, Q-MCTS, P-MCTS y monocultivo, respectivamente.

## Capítulo 9

# Discusión

Este estudio investigó las posibles interacciones regulatorias entre los miRNAs y ARNm metabólicos blanco en la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7. Este objetivo particular se llevó a cabo utilizando y aplicando simultáneamente RNA-seq y small RNA-Seq de un modelo de ETMC y monocultivo. Como resultado, se pueden destacar dos hallazgos principales. En primer lugar, proporcionamos nuevos conocimientos sobre el mecanismo regulador por el cual los miRNAs modulan los ARNm metabólicos para mantener el fenotipo canceroso de los ETMC. En segundo lugar, hemos realizado un análisis bioinformático en profundidad para caracterizar estas regulaciones de miRNAs y evaluar sus consecuencias sobre las vías que sostienen el fenotipo en condiciones de Q-ETMC, P-ETMC y monocultivo. A continuación, discutimos algunas conclusiones para cada comparación por pares de los métodos de cultivo.

### 9.1. Comparación entre Q-ETMC y P-ETMC

La comparación entre Q-ETMC y P-ETMC revela que Q-ETMC tiene principalmente una baja expresión en los miRNAs que controlan el metabolismo de los lípidos y la hexoquinasa 2 (HK2), lo que establece una alta preferencia por el uso de glicerofosfolípidos y metabolismo glucolítico. Por otro lado, en los P-ETMC se regulan a la baja algunos miRNAs que controlan la biosíntesis de aminoácidos y la fosforilación oxidativa a través del ARNm NDUFB6 (Tabla 8-1). Estos resultados concuerdan con observaciones anteriores sobre la regulación de los miRNAs y el metabolismo de las células cancerosas. Por ejemplo, HK2 es la primera enzima limitante de la glucólisis, y se ha



previsto que su actividad esté regulada por múltiples miRNAs, incluida la regulación negativa confirmada por miR-143 en líneas celulares de cáncer de mama [Jiang *et al.*, 2012]. Aquí, sugerimos una nueva interacción reguladora en el ARNm de HK2 llevada a cabo principalmente por miR-3143 y preferentemente activada en P-ETMC en comparación con Q-ETMC (Figura 9-1A). Además del metabolismo del carbono, las diferencias en el metabolismo de los aminoácidos y los lípidos se han reportado anteriormente y se observan de manera constante en este estudio, ver Figura 5A. Los lípidos son moléculas de biosíntesis esenciales para orgánulos y células. La alteración en el metabolismo de los lípidos guiada por la regulación de los miRNAs es una característica particular del metabolismo del cáncer [Hsu *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2014; Tili *et al.*, 2012]. Aquí, proponemos que miR-7974 y miR-181a-5p regulan un conjunto de ARNm implicados en el metabolismo de los lípidos, predominantemente el metabolismo de los glicerofosfolípidos. Estos miRNAs están regulados a la baja en Q-ETMC, lo que sugiere que el metabolismo de los lípidos permanece activo. Mientras tanto, el metabolismo de los lípidos es regulado a la baja en P-ETMC por la lista de miRNAs mencionados en la Tabla 8-1. Además, las células cancerosas tienen una mayor demanda de aminoácidos para satisfacer su rápida biosíntesis de proteínas, nucleótidos y lípidos, homeostasis redox y metabolismo energético. Existe evidencia de que los miRNAs regulan el catabolismo de aminoácidos en el cáncer de riñón [Liu *et al.*, 2012]. En nuestro estudio, observamos que la baja expresión de los miRNAs que regulan los ARNm de GLUL y PGAM1 en P-ETMC ayuda a su rápida proliferación, manteniendo una alta expresión en estos ARNm para conservar las reservas de serina y glutamina. En Q-ETMC, la sobreexpresión de miR-663a y miR-1184 puede regular a la baja el metabolismo de los aminoácidos para depender principalmente sólo de un metabolismo glucolítico y lipídico (Figura 9-1A). En cuanto a los hallazgos acerca de la fosforilación oxidativa se observan dos comportamientos. Uno está asociado a la sobreexpresión de ATP6V1C1 en Q-ETMC, mientras que en P-ETMC este ARNm está regulado negativamente por miR-15a-5p. El gen ATP6V1C1 codifica un componente de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa). El complejo V-ATPasa se localiza en la membrana plasmática y juega un papel importante en el crecimiento tumoral y la metástasis por el incremento en la secreción de  $H^+$ , permitiendo que las células tumorales sobrevivan a condiciones hipóxicas y el consecuente microambiente tumoral ácido [Martinez-Zaguilan *et al.*, 1993]. Además, en un modelo de cáncer de mama de ratón se demostró que el abatimiento de *Atp6v1c1* redujo la invasión y la migración [Feng *et al.*, 2013]. Con base en estos hechos, sugerimos que el recableado del programa metabólico en

Q-ETMC se debe a las condiciones hipóxicas dentro del ETMC que ayudan a adquirir un fenotipo metastásico en la subpoblación quiescente, a diferencia de su contraparte proliferativa (Figura 9-1A). Finalmente, encontramos que la dependencia en el metabolismo de N-Glicanos está guiada por dos ARNm: STT3B y MGAT5. La expresión de estos ARNm muestra un fenotipo regulador inverso. Mientras que el ARNm de STT3B está principalmente regulado a la baja en P-ETMC por un grupo de miRNAs (miR-3143, miR-671-5p y miR-454-3p), el ARNm de MGAT5 está regulado a la baja en Q-ETMC por miR-1184. La ramificación de los N-glicanos está implicada en la regulación de los niveles de glicoproteínas de superficie como los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Además, la ablación del ARNm de MGAT5 en células tumorales conduce a un fenotipo menos metastásico y menos sensible a citocinas [Lau y Dennis, 2008], y STT3B participa en la transición epitelio-mesenquimatoso (EMT) en las células cancerosas [Hsu *et al.*, 2018]. Por estas razones, sugerimos que en Q-ETMC y P-ETMC podría existir el potencial metastásico, independientemente del perfil metabólico (Figura 9-1A).

## 9.2. Comparación entre Q-ETMC y Monocultivo

La comparación entre Q-ETMC y monocultivo revela que los Q-ETMC tienen principalmente baja expresión en algunos miRNAs que controlan la biosíntesis de glicerofosfolípidos y el metabolismo glicolítico, lo que sugiere una alta preferencia por estas vías metabólicas. Por otro lado, el monocultivo regula a la baja los miRNAs que regulan el metabolismo de las purinas, el metabolismo del inositol, el metabolismo de los esfingolípidos y la biosíntesis de glicosaminoglicanos (Tabla 8-2). Los resultados obtenidos mostraron que la regulación a la baja en el metabolismo glucolítico, principalmente en HK2, está de acuerdo con informes previos de metabolismo del cáncer. Aquí, sugerimos una nueva regulación llevada a cabo por miR-362-5p sobre HK2, que se intensifica en el monocultivo y disminuye en los Q-ETMC (Figura 9-1B). Curiosamente, la regulación a la baja de HK2 es una característica frecuente de los modelos de tipo proliferativo (P-ETMC y Monocultivo), aunque está guiada por diferentes miRNAs según el método de cultivo. Estos resultados proporcionan evidencia adicional que indica que los Q-ETMC depende del metabolismo glucolítico. Además, los resultados mostraron una sobreexpresión de ARNm involucrados en el metabolismo de las purinas en el monocultivo. También sugerimos que esta vía está controlada por miR-3648, miR-663b y miR193a-5p

teniendo como blancos a ADA, AMPD2 y HPRT1, respectivamente en Q-ETMC (Figura 9-1B). Las purinas son componentes esenciales para la producción de ARN y ADN y proporcionan los cofactores y la energía para apoyar la supervivencia y proliferación celular [Yin *et al.*, 2018]. De acuerdo con nuestros hallazgos, el uso de la vía se correlaciona con la alta tasa de proliferación observada por inmunofenotipificación con Ki67 (Figura B-1), lo que sugiere su papel esencial en el monocultivo. Por otro lado, el metabolismo de la fructosa y la manosa parece tener cambios significativos entre estas condiciones. Con base en nuestro análisis, llegamos a la conclusión de que estas vías se pueden alterar por dos ARNm: KHK y GMPPB. La expresión de estos ARNm muestra un fenotipo inverso: mientras que KHK es sobreexpresado, GMPPB se regula a la baja. Este comportamiento contrario conduce a un uso poco claro de la vía. En Q-ETMC, encontramos que el ARNm de KHK está principalmente regulado a la baja por miR-3652, y el ARNm de GMPPB está regulado a la baja en monocultivo por miR-1226-3p. Esta vía podría alimentar el flujo de la vía de pentosas fosfato y la síntesis de proteínas, aumentando indirectamente el crecimiento tumoral [Port *et al.*, 2012]. Además, existe evidencia experimental que indica que las células de cáncer de mama pueden usar fructosa específicamente en ambientes deficientes de glucosa [Fan *et al.*, 2017] y la regulación al alza de KHK se correlaciona con la malignidad y la progresión del tumor [Gao *et al.*, 2018]. Además, la sobreexpresión de GMPPB se asocia con un valor pronóstico favorable en el cáncer de endometrio [Wang *et al.*, 2019]. En general, llegamos a la conclusión de que la participación individual de estos ARNm puede conducir a un fenotipo más severo para el modelo de monocultivo. Como se discutió anteriormente, observamos una alteración frecuente en el metabolismo de los lípidos a través de todas las comparaciones. Esta preferencia metabólica permanece en la comparación entre Q-ETMC contra monocultivo. Específicamente, el metabolismo de los glicerofosfolípidos está sobreexpresado en Q-ETMC. Con base en nuestro análisis bioinformático, se puede dar una posible explicación debido a la regulación de dos miRNAs. Sugerimos que miR-501-5p regula negativamente PLD3 y miR-7974 regula negativamente DGKG y PLA2G3 en monocultivo. Además, CERS6 que participa en el metabolismo de los esfingolípidos se sobreexpresa en el monocultivo y está regulado negativamente por miR-3929 en Q-ETMC, ver Figura 9-1B. Juntos, estos resultados mostraron que no existe un uso particular para el metabolismo de los lípidos en general. Sin embargo, las categorías de lípidos pueden ser exclusivas de una fase del ciclo celular, por ejemplo, el metabolismo de los glicerofosfolípidos se sobreexpresa constantemente en Q-ETMC. Finalmente, la regulación a la baja del

metabolismo de los glicosaminoglicanos en Q-ETMC se logra mediante la regulación de miR-3652 sobre NDST1 y XYLT2. Por el contrario, en el monocultivo, estos dos ARNm están sobreexpresados. Otro resultado indica que el metabolismo del inositol está regulado al alza en el monocultivo, mientras que en los Q-ETMC esta vía está regulada negativamente por miR-663b, miR-3929, miR-3648 y miR-663a. Sorprendentemente, ambas vías metabólicas se utilizan para impulsar los procesos de señalización. De hecho, los glicosaminoglicanos son parte de la matriz extracelular (MEC), los cuales conducen interacciones con factores de crecimiento y citocinas implicadas en el crecimiento y progresión del cáncer, principalmente cascadas de señalización responsables de regular la angiogénesis, invasión y metástasis [Afratis *et al.*, 2012]. Además, los ARNm involucrados en el metabolismo del inositol pueden mantener las vías de señalización dependientes de PI3K, promoviendo el crecimiento tumoral y la invasión [Tan *et al.*, 2015]. La sobrerregulación en el monocultivo para ambas vías metabólicas sugiere que esta preferencia está acompañada por las altas tasas de proliferación observadas, especialmente en este modelo de cultivo.

### 9.3. Comparación entre P-ETMC y Monocultivo

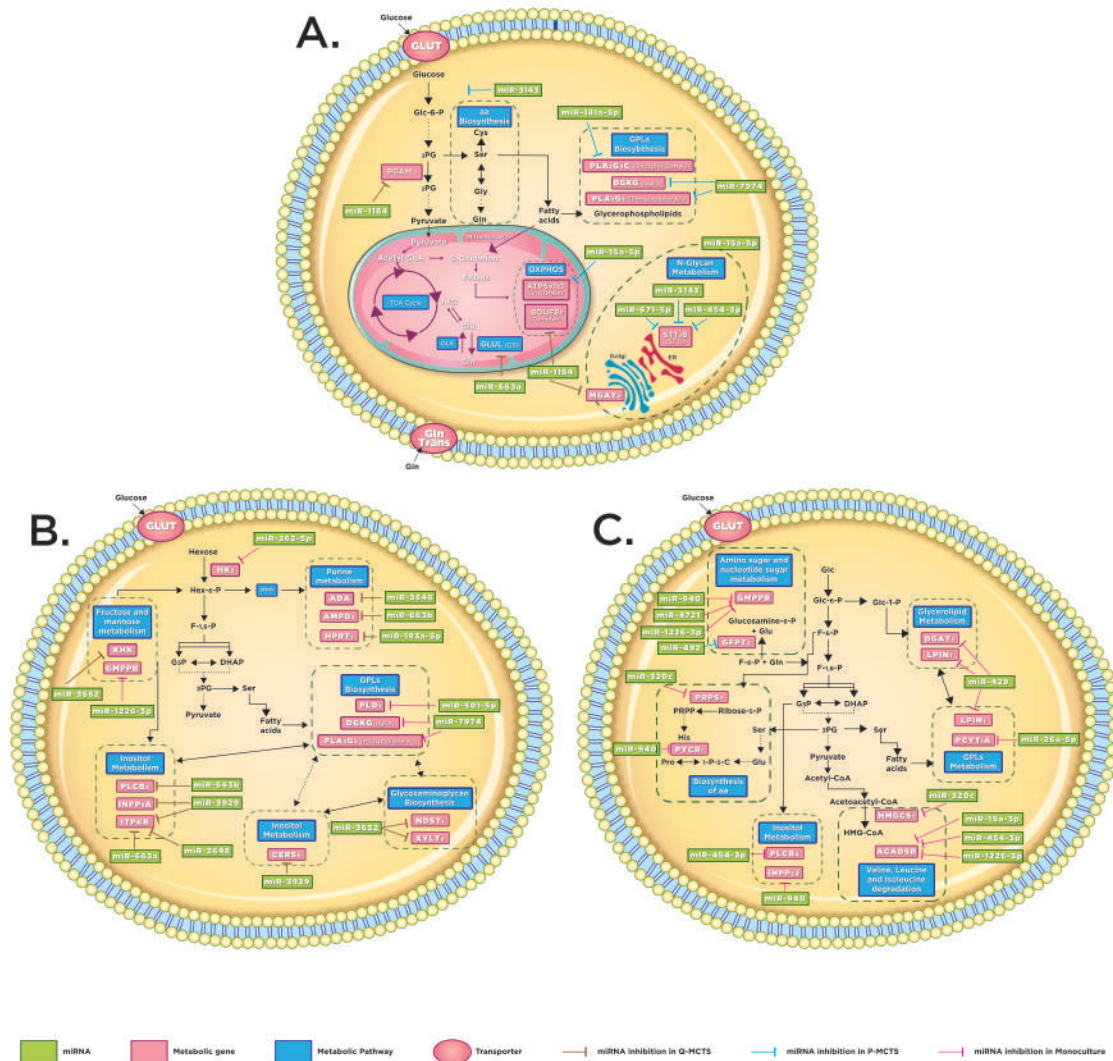
La comparación entre P-ETMC y monocultivo revela que P-ETMC principalmente tiene baja expresión en miRNAs que controlan la biosíntesis de aminoácidos, inositol, valina, leucina, isoleucina y metabolismo de lípidos. Por ejemplo, encontramos que en el monocultivo únicamente se regula negativamente el miR-492, que a su vez regula GFPT2, un ARNm que participa en el metabolismo del azúcar de nucleótidos (?). El fenotipo de esta vía metabólica está influenciado principalmente por dos ARNm: GFPT2 y GMPPB. La expresión de estos ARNm muestra un fenotipo inverso. Mientras uno se regula al alza, el otro regula a la baja su expresión. En P-ETMC, el ARNm de GFPT2 está principalmente regulado a la baja por miR-492, y el ARNm de GMPPB está regulado a la baja en monocultivo por miR-940, miR4721 y miR1226-3p. La abundancia en las pozas de nucleótidos limita la capacidad proliferativa del cáncer [Tong *et al.*, 2009], lo que sugiere que ambos modelos requieren esta vía para mantener su capacidad proliferativa, independientemente de la regulación de la vía. Además, el análisis comparativo mostró una sobreexpresión de ARNm implicados en el metabolismo de los lípidos en el P-ETMC. Principalmente, el metabolismo de glicerolípidos y glicerofosfolípidos son un resultado consistente en todas las comparaciones, mostrando una pre-

ferencia en los modelos MCTS (Q-ETMC y P-ETMC). Sin embargo, en monocultivo, esta vía está regulada negativamente por miR-429 que tiene como blanco a DGAT2, LPIN1 y miR-26a-5p que tiene como blanco a PCYT1A (Figura 5C). Estos resultados se correlacionaron con el hecho de que los niveles más altos en los perfiles lipídicos se encuentran en los tumores de mama más agresivos [Hilvo *et al.*, 2011], lo que sugiere que el metabolismo lipídico puede promover la malignidad en los modelos MCTS, a pesar de las diferencias en las tasas de proliferación. Asimismo, nuestro análisis mostró una sobreexpresión en la biosíntesis y degradación de aminoácidos en P-ETMC. Además, en monocultivo, sugerimos que la biosíntesis de aminoácidos está regulada negativamente por miR-320c y miR-940 teniendo como blanco a PRPS1 y PYCR1, respectivamente. Además, la degradación de aminoácidos está regulada negativamente por miR-320c que tiene como blanco a HMGCS1, y ACADSB está regulada negativamente por un conjunto de miRNAs; miR-19a-3p, miR-454-3p y miR-1226-3p (Figura 9-1C). Estos resultados concuerdan con un estudio de proteoma en cultivos de cáncer en 3D [Yue *et al.*, 2016], que sugiere que los cultivos de esferoides dependen en la utilización de aminoácidos. Finalmente, la sobreexpresión en el metabolismo del inositol se acompaña de la regulación positiva de PLCB4 e INPP5J en P-ETMC. Por el contrario, en el monocultivo, esta vía está regulada negativamente por miR-454-3p y miR-940, teniendo como blancos a estos dos ARNm. Estos resultados sugieren que esta vía y sus correspondientes vías de señalización alimentadas, como PI3K, pueden estar reguladas al alza en el modelo ETMC.

#### 9.4. Vías de señalización alteradas

Nuestro análisis se centró principalmente en las alteraciones metabólicas; sin embargo, otras vías presentaron perturbaciones significativas para una exploración más profunda. Por ejemplo, encontramos que las vías asociadas con la división celular, la replicación y reparación del ADN se enriquecen en los modelos de tipo proliferativo (P-ETMC y Monocultivo). Como es de esperar, estos resultados concuerdan con las demandas para sostener una rápida proliferación. De manera complementaria, las respuestas inflamatorias y la inmunosupresión son vías enriquecidas para los Q-ETMC (Figura 8-4). Además, nuestro análisis evidencia que el fenotipo de Q-ETMC apunta a la sobrerrepresentación en citocinas inflamatorias, que tienen un papel clave en la progresión del cáncer a través de la estimulación de la transición epitelio-mesénquima y el aumento de la

metástasis [Diakos *et al.*, 2014]. Otro resultado importante y recurrente es la sobrerrepresentación de la ferroptosis. Esta vía se caracteriza por la acumulación dependiente del hierro de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) dentro de la célula, lo que conduce a la muerte celular. Por tanto, la activación de la ferroptosis deriva en la eliminación selectiva de algunas células tumorales [Dixon *et al.*, 2012]. Juntos, estos resultados sugieren que los Q-ETMC pueden aumentar el fenotipo invasivo. En conjunto, estas observaciones reflejan una respuesta orquestada para integrar el fenotipo del cáncer, y está de acuerdo con el hecho de que diferentes subpoblaciones tumorales pueden diversificar su tarea para mantener su crecimiento y malignidad [Muciño-Olmos *et al.*, 2020].



**Figura 9-1: Representación esquemática de las vías metabólicas alteradas.** Panorama metabólico global con la participación de los miRNAs. A. Comparación entre Q-MCTS y P-MCTS. B. Comparación entre Q-MCTS y monocultivo. C. Comparación entre P-MCTS y monocultivo. Las flechas de bloque indicadas en marrón, azul y rosa muestran la inhibición en la vía metabólica de Q-MCT, P-MCTS y Monocultivo, respectivamente.

## Capítulo 10

# Limitaciones y suposiciones importantes

A pesar de las ventajas que ofrecen los sistemas de cultivo tridimensionales (3D) sobre los modelos clásicos de monocultivo como, reproducir interacciones célula-célula, interacciones célula-matriz, la heterogeneidad intratumoral homotípica y un microambiente similar al entorno nativo de los tumores. Los modelos 3D, como los ETMC, carecen de variables importantes a considerar como la vascularización, otras estirpes celulares, por ejemplo, infiltrado de células que forman parte del sistema inmunitario e interacciones con células estromales. Este conjunto de variables limitan el alcance de los resultados obtenidos en este trabajo acerca de las interacciones regulatorias entre miRNAs y sus ARNm blanco en comparación con modelos in vivo. Además, se realizaron dos suposiciones importantes: 1.- **El ARN total extraído de los modelos enriquecidos en células proliferativas y quiescentes de ETMC no representa únicamente la población a estudiar.** Esto quiere decir que existe un ruido intrínseco de los ARNm pertenecientes a diversas subpoblaciones que difieren en la utilización del ciclo celular. La razón por la cual se utilizó la estrategia de utilizar ETMC enriquecidos en una población asociada a un estadio del ciclo celular (proliferativos y quiescentes) surgió como alternativa para solventar la inviabilidad metodológica de extraer la cantidad suficiente de ARN total de células aisladas por estadio del ciclo celular para llevar a cabo la secuenciación. 2.- **La construcción de la librería de small-RNA-seq no es exclusiva para miRNAs.** Este hecho repercutió profundamente en la cantidad de miRNAs de los cuales se obtuvo información, y en consecuencia cerca del 80 % de la totalidad de los datos corresponden a segmentos de otros RNAs pequeños. Finalmente, una de las aportaciones de este trabajo es la batería de algoritmos y programas bioinformáticos capaces de analizar simultáneamente datos de tecnologías de



RNA-seq y small-RNA-seq para obtener información acerca del comportamiento metabólico guiado por miRNAs en poblaciones celulares proliferativas y quiescentes de ETMC. Sin embargo, todas las interacciones entre miRNAs y sus ARNm blanco propuestas en este trabajo requieren una validación experimental posterior.

# Capítulo 11

## Conclusiones y perspectivas

### 11.1. Conclusiones

En el laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), particularmente el equipo bajo el cargo de la Dra. Vilma Maldonado Lagunas desarrolló y estandarizó el modelo de ETMC de MCF-7. Sin embargo, el presente trabajo doctoral aportó ligeras optimizaciones en la manera en que se puede calcular el diámetro promedio de un cultivo de ETMC. Además, se realizó una cuantificación cuantitativa por inmunofenotipificación de la proporción de células proliferativas y quiescentes en diversos tiempos de cultivo, por lo que se puede concluir lo siguiente:

- Se calculó el diámetro promedio de los ETMC durante su crecimiento a través de una paquetería informática para el análisis matemático y morfológico de imágenes (MorpholibJ).
- Se realizó la cuantificación de la proporción de células proliferativas y quiescentes en monocultivo y en ETMC a 6, 8, 17 y 19 días de edad utilizando la inmunotipificación con marcadores específicos para proliferación (Ki67) y quiescencia (p27).
- Se seleccionaron los tiempos específicos a los cuales los ETMC poseen una mayor proporción de células proliferativas (ETMC a 6 días de edad) y quiescentes (ETMC a 19 días de edad) a través de la determinación de la significancia estadística con un prueba T de las cuantificaciones de la inmunofenotipificación.

Para cuantificar los cambios en el transcriptoma de ETMC de MCF-7 se utilizaron tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, como: RNA-seq y small-RNA-seq. En contraste con lo anterior, previo a la secuenciación de alto rendimiento se realizó la extracción de RNA total del monocultivo y los modelos de ETMC enriquecidos en células proliferativas (ETMC a 6 días de edad) y quiescentes (ETMC a 19 días de edad) con una concentración mínima de 1 µg/mL. Adicionalmente, a partir de los datos generados de las tecnologías de secuenciación se diseñó y utilizó una batería de herramientas bioinformáticas capaz del análisis e interpretación enfocado a la relación de los miRNAs sobre el metabolismo. De esta manera las metas alcanzadas para esta etapa son las siguientes:

- Se realizó la extracción de ARN total sobre los modelos enriquecidos en células proliferativas (ETMC a 6 días de edad) y quiescentes de ETMC (ETMC a 19 días de edad) y el monocultivo.
- Se utilizó un conjunto de algoritmos bioinformáticos para el análisis de expresión diferencial de los datos provenientes de RNA-seq y small-RNA-seq.
- Se implementó una estrategia de análisis para obtener información acerca de las posibles interacciones regulatorias entre miRNAs y sus ARNm blanco con un impacto en el metabolismo utilizando la herramienta miRGate.
- Se realizó el análisis de enriquecimiento funcional utilizando los ARNm expresados diferencialmente con la herramienta Webgestalt.
- Se propuso un conjunto de posibles interacciones regulatorias entre miRNAs y sus ARNm blanco que impactan al metabolismo de células proliferativas y quiescentes de ETMC y el monocultivo.

Finalmente, la conclusión global del proyecto indica que:

- Se demostró que la subpoblación de células quiescentes podría tener una preferencia por el metabolismo de glicerofosfolípidos, mientras que la subpoblación de células proliferativas mantiene el funcionamiento de la fosforilación oxidativa. Ambos casos se podrían explicar a través de la sobreexpresión de algunos mRNAs que forman parte de estas vías metabólicas y la subexpresión de elementos reguladores (miRNAs) de estos mRNAs.

## 11.2. Perspectivas

A continuación se describen algunas perspectivas inmediatas acerca de las interacciones regulatorias entre miRNAs y sus ARNm blanco que impactan al metabolismo de células proliferativas y quiescentes de ETMC, y el monocultivo:

- Demostrar la coexpresión de los miRNAs y sus ARNm blanco asociados a la regulación metabólica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR).
- Probar la interacción de los miRNAs y sus ARNm blanco asociados a la regulación metabólica utilizando el ensayo de luciferasa.
- Demostrar los efectos mediados por los miRNAs sobre la expresión de la proteína de su ARNm blanco a través de la técnica de Western blot.
- Demostrar la reducción en la utilización de la vía metabólica blanco de las parejas regulatorias que cumplen con las perspectivas previas.
- Evaluar la expresión de las parejas regulatorias confirmadas con los perspectivas anteriores en modelos de pacientes con cáncer de mama de tipo luminal.
- Probar si las funciones regulatorias entre miRNAs y ARNm blanco que controlan en el metabolismo que han sido validadas en pacientes con cáncer de mama de tipo luminal pueden reducir la malignidad por el bloqueo o restablecimiento de la función de alguno de estos ejes regulatorios.
- Verificar si estos ejes de regulación son conservados en otros subtipos de cáncer de mama u otros tipos de cáncer.

Finalmente, la perspectiva de este proyecto de investigación conduce a:

- Utilizar metodologías bioinformáticas similares a las presentes en este proyecto capaces de integrar distintos tipos de tecnologías ómicas a través de modelos de biología de sistemas que permitan sugerir blancos terapéuticos o mecanismos biológicos clave en padecimientos con un mal pronóstico.

# Bibliografía

- AFRATIS, N., GIALELI, C., NIKITOVIC, D., TSEGENIDIS, T., KAROUSOU, E., THEOCHARIS, A.D., PAVÃO, M.S., TZANAKAKIS, G.N., Y KARAMANOS, N.K. (2012). Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* **279**(7):1177–1197
- AGARWAL, V., BELL, G.W., NAM, J.W., Y BARTEL, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **4**:e05005
- AKHTAR, M.M., MICOLUCCI, L., ISLAM, M.S., OLIVIERI, F., Y PROCOPIO, A.D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* **44**(1):24–44
- ANDERSON, N.M., MUCKA, P., KERN, J.G., Y FENG, H. (2018). The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell* **9**(2):216–237
- ANDRÉS-LEÓN, E., NÚÑEZ-TORRES, R., Y ROJAS, A.M. (2016). miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci. Rep.* **6**:25749
- AXTELL, M.J., WESTHOLM, J.O., Y LAI, E.C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol.* **12**(4):221
- BAAN, R., GROSSE, Y., STRAIF, K., SECRETAN, B., EL GHISSASSI, F., BOUVARD, V., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., FREEMAN, C., GALICHET, L. *et al.* (2009). A review of human carcinogens—part F: chemical agents and related occupations. *The lancet oncology* **10**(12):1143–1144
- BABIARZ, J.E., RUBY, J.G., WANG, Y., BARTEL, D.P., Y BLELLOCH, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* **22**(20):2773–2785

- BAENKE, F., PECK, B., MIESS, H., Y SCHULZE, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model. Mech.* **6**(6):1353–1363
- BARTEK, J., LUKAS, C., Y LUKAS, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(10):792–804
- BARTEL, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**(2):215–233
- BASU, A. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **19**(4):970
- BENTLEY, D.R., BALASUBRAMANIAN, S., SWERDLOW, H.P., SMITH, G.P., MILTON, J., BROWN, C.G., HALL, K.P., EVERS, D.J., BARNES, C.L., BIGNELL, H.R., BOUTELL, J.M., BRYANT, J., CARTER, R.J., KEIRA CHEETHAM, R., COX, A.J., ELLIS, D.J., FLATBUSH, M.R., GORMLEY, N.A., HUMPHRAY, S.J., IRVING, L.J., KARBELASHVILI, M.S., KIRK, S.M., LI, H., LIU, X., MAISINGER, K.S., MURRAY, L.J., OBRADOVIC, B., OST, T., PARKINSON, M.L., PRATT, M.R., RASOLONJATOVO, I.M.J., REED, M.T., RIGATTI, R., RODIGHIERO, C., ROSS, M.T., SABOT, A., SANKAR, S.V., SCALLY, A., SCHROTH, G.P., SMITH, M.E., SMITH, V.P., SPIRIDOU, A., TORRANCE, P.E., TZONEV, S.S., VERMAAS, E.H., WALTER, K., WU, X., ZHANG, L., ALAM, M.D., ANASTASI, C., ANIEBO, I.C., BAILEY, D.M.D., BANCARZ, I.R., BANERJEE, S., BARBOUR, S.G., BAYBAYAN, P.A., BENOIT, V.A., BENSON, K.F., BEVIS, C., BLACK, P.J., BOODHUN, A., BRENNAN, J.S., BRIDGHAM, J.A., BROWN, R.C., BROWN, A.A., BUERMANN, D.H., BUNDU, A.A., BURROWS, J.C., CARTER, N.P., CASTILLO, N., CHIARA E CATENAZZI, M., CHANG, S., NEIL COOLEY, R., CRAKE, N.R., DADA, O.O., DIAKOUMAKOS, K.D., DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B., EARNSHAW, D.J., EGBUJOR, U.C., ELMORE, D.W., ETCHIN, S.S., EWAN, M.R., FEDURCO, M., FRASER, L.J., FUENTES FAJARDO, K.V., SCOTT FUREY, W., GEORGE, D., GIETZEN, K.J., GODDARD, C.P., GOLDA, G.S., GRANIERI, P.A., GREEN, D.E., GUSTAFSON, D.L., HANSEN, N.F., HARNISH, K., HAUDENSCHILD, C.D., HEYER, N.I., HIMS, M.M., HO, J.T., HORGAN, A.M., HOSCHLER, K., HURWITZ, S., IVANOV, D.V., JOHNSON, M.Q., JAMES, T., HUW JONES, T.A., KANG, G.D., KERELSKA, T.H., KERSEY, A.D., KHREBTUKOVA, I., KINDWALL, A.P., KINGSBURY, Z., KOKKO-GONZALES, P.I., KUMAR, A.,

- LAURENT, M.A., LAWLEY, C.T., LEE, S.E., LEE, X., LIAO, A.K., LOCH, J.A., LOK, M., LUO, S., MAMMEN, R.M., MARTIN, J.W., McCAULEY, P.G., McNITT, P., MEHTA, P., MOON, K.W., MULLENS, J.W., NEWINGTON, T., NING, Z., LING NG, B., NOVO, S.M., O'NEILL, M.J., OSBORNE, M.A., OSNOWSKI, A., OSTADAN, O., PARASCHOS, L.L., PICKERING, L., PIKE, A.C., PIKE, A.C., CHRIS PINKARD, D., PLISKIN, D.P., PODHASKY, J., QUIJANO, V.J., RACZY, C., RAE, V.H., RAWLINGS, S.R., CHIVA RODRIGUEZ, A., ROE, P.M., ROGERS, J., ROBERT BACIGALUPO, M.C., ROMANOV, N., ROMIEU, A., ROTH, R.K., ROURKE, N.J., RUEDIGER, S.T., RUSMAN, E., SANCHES-KUIPER, R.M., SCHENKER, M.R., SEOANE, J.M., SHAW, R.J., SHIVER, M.K., SHORT, S.W., SIZTO, N.L., SLUIS, J.P., SMITH, M.A., ERNEST SOHNA SOHNA, J., SPENCE, E.J., STEVENS, K., SUTTON, N., SZAJKOWSKI, L., TREGIDGO, C.L., TURCATTI, G., VANDEVONDELE, S., VERHOVSKY, Y., VIRK, S.M., WAKELIN, S., WALCOTT, G.C., WANG, J., WORSLEY, G.J., YAN, J., YAU, L., ZUERLEIN, M., ROGERS, J., MULLIKIN, J.C., HURLES, M.E., MCCOOKE, N.J., WEST, J.S., OAKS, F.L., LUNDBERG, P.L., KLENERMAN, D., DURBIN, R., Y SMITH, A.J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**(7218):53–59
- BOLGER, A.M., LOHSE, M., Y USADEL, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**(15):2114–2120
- BONDESON, J. (2001). Everard Home, John Hunter, and Cutaneous Horns: a historical review. *The American Journal of Dermatopathology* **23**(4):362–369
- BOROUGHES, L.K. Y DEBERARDINIS, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology* **17**(4):351–359
- BOUVARD, V., BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., SECRETAN, B., GHISSASSI, F.E., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., FREEMAN, C., GALICHET, L., Y COGLIANO, V. (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* **10**(4):321–322
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R.L., TORRE, L.A., Y JEMAL, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **68**(6):394–424

- BRAY, N.L., PIMENTEL, H., MELSTED, P., Y PACHTER, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**(5):525–527
- BRENNECKE, J., STARK, A., RUSSELL, R.B., Y COHEN, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* **3**(3):e85
- BROUGHTON, J.P., LOVCI, M.T., HUANG, J.L., YEO, G.W., Y PASQUINELLI, A.E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol. Cell* **64**(2):320–333
- CAIRNS, R.A., HARRIS, I.S., Y MAK, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**(2):85–95
- CALIN, G.A. Y CROCE, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* **6**(11):857–866
- CALIN, G.A., CIMMINO, A., FABBRI, M., FERRACIN, M., WOJCIK, S.E., SHIMIZU, M., TACCIOLI, C., ZANESI, N., GARZON, R., AQEILAN, R.I., ALDER, H., VOLINIA, S., RASSENTI, L., LIU, X., LIU, C.G., KIPPS, T.J., NEGRINI, M., Y CROCE, C.M. (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(13):5166–5171
- CALIN, G.A., DUMITRU, C.D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F., Y CROCE, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(24):15524–15529
- CHAN, B., MANLEY, J., LEE, J., Y SINGH, S.R. (2015). The emerging roles of microRNAs in cancer metabolism. *Cancer Lett.* **356**(2 Pt A):301–8
- CHAN, S.Y., ZHANG, Y.Y., HEMANN, C., MAHONEY, C.E., ZWEIER, J.L., Y LOSCALZO, J. (2009). MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab.* **10**(4):273–284
- CHANDEL, N.S., BUDINGER, G.R., CHOE, S.H., Y SCHUMACKER, P.T. (1997). Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **272**(30):18808–18816



- CHANDEL, N.S., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C.E., SIMON, M.C., Y SCHUMACKER, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(20):11715–11720
- CHANG, J., NICOLAS, E., MARKS, D., SANDER, C., LERRO, A., BUENDIA, M.A., XU, C., MASON, W.S., MOLOSHOK, T., BORT, R., ZARET, K.S., Y TAYLOR, J.M. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* **1**(2):106–113
- CHELOUFI, S., DOS SANTOS, C.O., CHONG, M.M.W., Y HANNON, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* **465**(7298):584–589
- CHEN, B., LI, H., ZENG, X., YANG, P., LIU, X., ZHAO, X., Y LIANG, S. (2012). Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J. Transl. Med.* **10**:228
- CHEN, Z., LI, Y., ZHANG, H., HUANG, P., Y LUTHRA, R. (2010). Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* **29**(30):4362–4368
- CHIU, M., TAURINO, G., BIANCHI, M.G., OTTAVIANI, L., ANDREOLI, R., CIOCIOLA, T., LAGRATA, C.A.M., TARDITO, S., Y BUSSOLATI, O. (2018). Oligodendroglioma Cells Lack Glutamine Synthetase and Are Auxotrophic for Glutamine, but Do not Depend on Glutamine Anaplerosis for Growth. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(4)
- CHU, Y. Y COREY, D.R. (2012). RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther.* **22**(4):271–274
- COLOFF, J.L., MURPHY, J.P., BRAUN, C.R., HARRIS, I.S., SHELTON, L.M., KAMI, K., GYGI, S.P., SELFORS, L.M., Y BRUGGE, J.S. (2016). Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell Metab.* **23**(5):867–880
- CONESA, A., MADRIGAL, P., TARAZONA, S., GOMEZ-CABRERO, D., CERVERA, A., MCPHERSON, A., SZCZEŚNIAK, M.W., GAFFNEY, D.J., ELO, L.L., ZHANG, X., Y MORTAZAVI, A. (2016a). Erratum to: A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* **17**(1):181

- CONESA, A., MADRIGAL, P., TARAZONA, S., GOMEZ-CABRERO, D., CERVERA, A., MCPHERSON, A., SZCZEŚNIAK, M.W., GAFFNEY, D.J., ELO, L.L., ZHANG, X., Y MORTAZAVI, A. (2016b). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* **17**:13
- CRICK, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**:138–163
- CUI, M., WANG, Y., SUN, B., XIAO, Z., YE, L., Y ZHANG, X. (2014). MiR-205 modulates abnormal lipid metabolism of hepatoma cells via targeting acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1) mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**(2):270–275
- DE RIE, D., ABUGESSAISA, I., ALAM, T., ARNER, E., ARNER, P., ASHOOR, H., ÅSTRÖM, G., BABINA, M., BERTIN, N., BURROUGHS, A.M., CARLISLE, A.J., DAUB, C.O., DETMAR, M., DEVIATHAROV, R., FORT, A., GEBHARD, C., GOLDOWITZ, D., GUHL, S., HA, T.J., HARSHBARGER, J., HASEGAWA, A., HASHIMOTO, K., HERLYN, M., HEUTINK, P., HITCHENS, K.J., HON, C.C., HUANG, E., ISHIZU, Y., KAI, C., KASUKAWA, T., KLINKEN, P., LASSMANN, T., LECELLIER, C.H., LEE, W., LIZIO, M., MAKEEV, V., MATHELIER, A., MEDVEDEVA, Y.A., MEJHERT, N., MUNGALL, C.J., NOMA, S., OHSHIMA, M., OKADA-HATAKEYAMA, M., PERSOON, H., RIZZU, P., ROUDNICKY, F., SÆTROM, P., SATO, H., SEVERIN, J., SHIN, J.W., SWOBODA, R.K., TARUI, H., TOYODA, H., VITTING-SEERUP, K., WINTERINGHAM, L., YAMAGUCHI, Y., YASUZAWA, K., YONEDA, M., YUMOTO, N., ZABIEROWSKI, S., ZHANG, P.G., WELLS, C.A., SUMMERS, K.M., KAWAJI, H., SANDELIN, A., REHLI, M., FANTOM CONSORTIUM, HAYASHIZAKI, Y., CARNINCI, P., FORREST, A.R.R., Y DE HOON, M.J.L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat. Biotechnol.* **35**(9):872–878
- DEBERARDINIS, R.J. Y CHANDEL, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* **2**(5):e1600200
- DENLI, A.M., TOPS, B.B.J., PLASTERK, R.H.A., KETTING, R.F., Y HANNON, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**(7014):231–235
- DHARAP, A., POKRZYWA, C., MURALI, S., PANDI, G., Y VEMUGANTI, R. (2013). MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One* **8**(11):e79467

- DI LEVA, G., GAROFALO, M., Y CROCE, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **9**:287–314
- DIAKOS, C.I., CHARLES, K.A., MCMILLAN, D.C., Y CLARKE, S.J. (2014). Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* **15**(11):e493–503
- DIXON, S.J., LEMBERG, K.M., LAMPRECHT, M.R., SKOUTA, R., ZAITSEV, E.M., GLEASON, C.E., PATEL, D.N., BAUER, A.J., CANTLEY, A.M., YANG, W.S., MORRISON, 3RD, B., Y STOCKWELL, B.R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**(5):1060–1072
- DOHM, J.C., LOTTAZ, C., BORODINA, T., Y HIMMELBAUER, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **36**(16):e105
- EBERLÉ, D., HEGARTY, B., BOSSARD, P., FERRÉ, P., Y FOUFELLE, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**(11):839–848
- EL GHISSASSI, F., BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., SECRETAN, B., BOUVARD, V., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., FREEMAN, C., GALICHET, L. *et al.* (2009). A review of human carcinogens—part D: radiation. *The lancet oncology* **10**(8):751–752
- ENRIGHT, A.J., JOHN, B., GAUL, U., TUSCHL, T., SANDER, C., Y MARKS, D.S. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* **5**(1):R1
- EREZ, A. Y DEBERARDINIS, R.J. (2015). Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer — finding method in madness. *Nature Reviews Cancer* **15**(7):440–448
- EWELS, P., MAGNUSSON, M., LUNDIN, S., Y KÄLLER, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**(19):3047–3048
- FAN, J., KAMPHORST, J.J., MATHEW, R., CHUNG, M.K., WHITE, E., SHLOMI, T., Y RABINOWITZ, J.D. (2013). Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol. Syst. Biol.* **9**:712
- FAN, X., LIU, H., LIU, M., WANG, Y., QIU, L., Y CUI, Y. (2017). Increased utilization of fructose has a positive effect on the development of breast cancer. *PeerJ* **5**:e3804

- FANG, R., XIAO, T., FANG, Z., SUN, Y., LI, F., GAO, Y., FENG, Y., LI, L., WANG, Y., LIU, X., CHEN, H., LIU, X.Y., Y JI, H. (2012). MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J. Biol. Chem.* **287**(27):23227–23235
- FAVARO, E., RAMACHANDRAN, A., MCCORMICK, R., GEE, H., BLANCHER, C., CROSBY, M., DEVLIN, C., BLICK, C., BUFFA, F., LI, J.L., VOJNOVIC, B., PIRES DAS NEVES, R., GLAZER, P., IBORRA, F., IVAN, M., RAGOSSIS, J., Y HARRIS, A.L. (2010). MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS One* **5**(4):e10345
- FEI, X., QI, M., WU, B., SONG, Y., WANG, Y., Y LI, T. (2012). MicroRNA-195-5p suppresses glucose uptake and proliferation of human bladder cancer T24 cells by regulating GLUT3 expression. *FEBS Lett.* **586**(4):392–397
- FELLI, N., FONTANA, L., PELOSI, E., BOTTA, R., BONCI, D., FACCHIANO, F., LIUZZI, F., LULLI, V., MORSILLI, O., SANTORO, S., VALTIERI, M., CALIN, G.A., LIU, C.G., SORRENTINO, A., CROCE, C.M., Y PESCHLE, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(50):18081–18086
- FENG, S., ZHU, G., MCCONNELL, M., DENG, L., ZHAO, Q., WU, M., ZHOU, Q., WANG, J., QI, J., LI, Y.P., Y CHEN, W. (2013). Silencing of atp6v1c1 prevents breast cancer growth and bone metastasis. *Int. J. Biol. Sci.* **9**(8):853–862
- FINKEL, T. (2012). From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate. *Sci. Signal.* **5**(215):e10
- FORMAN, J.J., LEGESSE-MILLER, A., Y COLLER, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(39):14879–14884
- FRIEDMAN, R.C., H. FARH, K.K., BURGE, C.B., Y BARTEL, D.P. (2008). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* **19**(1):92–105

- GALLUZZI, L., PIETROCOLA, F., LEVINE, B., Y KROEMER, G. (2014). Metabolic Control of Autophagy. *Cell* **159**(6):1263–1276
- GAO, P., TCHERNYSHYOV, I., CHANG, T.C., LEE, Y.S., KITA, K., OCHI, T., ZELLER, K.I., DE MARZO, A.M., VAN EYK, J.E., MENDELL, J.T., Y DANG, C.V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**(7239):762–765
- GAO, W., LI, N., LI, Z., XU, J., Y SU, C. (2018). Ketohexokinase is involved in fructose utilization and promotes tumor progression in glioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**(3):1298–1306
- GARBER, M., GRABHERR, M.G., GUTTMAN, M., Y TRAPNELL, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature methods* **8**(6):469–477
- GAROFALO, M., QUINTAVALLE, C., ROMANO, G., CROCE, C.M., Y CONDORELLI, G. (2012). miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr. Mol. Med.* **12**(1):27–33
- GHOSH, S.K. (2017). Giovanni Battista Morgagni (1682–1771): father of pathologic anatomy and pioneer of modern medicine. *Anatomical Science International* **92**(3):305–312
- GREGERSEN, L.H., JACOBSEN, A., FRANKEL, L.B., WEN, J., KROGH, A., Y LUND, A.H. (2012). MicroRNA-143 down-regulates Hexokinase 2 in colon cancer cells. *BMC Cancer* **12**:232
- GROSSE, Y., BAAN, R., STRAIF, K., SECRETAN, B., EL GHISSASSI, F., BOUVARD, V., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., GALICHET, L., Y COGLIANO, V. (2009). A review of human carcinogens—Part A: pharmaceuticals. *The Lancet Oncology* **10**(1):13–14
- GUO, J., XU, N., LI, Z., ZHANG, S., WU, J., KIM, D.H., SANO MARMA, M., MENG, Q., CAO, H., LI, X., SHI, S., YU, L., KALACHIKOV, S., RUSSO, J.J., TURRO, N.J., Y JU, J. (2008). Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(27):9145–9150
- HA, M. Y KIM, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(8):509–524

- HAJDU, S.I. (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* **117**(5):1097–1102
- HALL, P.A. Y WATT, F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**(4):619–633
- HAN, Y., CHEN, J., ZHAO, X., LIANG, C., WANG, Y., SUN, L., JIANG, Z., ZHANG, Z., YANG, R., CHEN, J., LI, Z., TANG, A., LI, X., YE, J., GUAN, Z., GUI, Y., Y CAI, Z. (2011). MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One* **6**(3):e18286
- HANAHAH, D. Y WEINBERG, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**(5):646–674
- HARDIE, D.G., SCHAFFER, B.E., Y BRUNET, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* **26**(3):190–201
- HARRIS, H., MILLER, O.J., KLEIN, G., WORST, P., Y TACHIBANA, T. (1969). Suppression of Malignancy by Cell Fusion. *Nature* **223**(5204):363–368
- HARRIS, T.D., BUZBY, P.R., BABCOCK, H., BEER, E., BOWERS, J., BRASLAVSKY, I., CAUSEY, M., COLONELL, J., DIMEO, J., EFCAVITCH, J.W., GILADI, E., GILL, J., HEALY, J., JAROSZ, M., LAPEN, D., MOULTON, K., QUAKE, S.R., STEINMANN, K., THAYER, E., TYURINA, A., WARD, R., WEISS, H., Y XIE, Z. (2008). Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* **320**(5872):106–109
- HARTWELL, L.H. Y WEINERT, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**(4930):629–634
- HAYES, J., PERUZZI, P.P., Y LAWLER, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* **20**(8):460–469
- HEIDEN, M.G.V. Y VANDER HEIDEN, M.G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**(9):671–684
- HENSLEY, C.T., WASTI, A.T., Y DEBERARDINIS, R.J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J. Clin. Invest.* **123**(9):3678–3684

- HILVO, M., DENKERT, C., LEHTINEN, L., MÜLLER, B., BROCKMÖLLER, S., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., BUDCZIES, J., BUCHER, E., YETUKURI, L., CASTILLO, S., BERG, E., NYGREN, H., SYSI-AHO, M., GRIFFIN, J.L., FIEHN, O., LOIBL, S., RICHTER-EHRENSTEIN, C., RADKE, C., HYÖTYLÄINEN, T., KALLIONIEMI, O., ILJIN, K., Y ORESIC, M. (2011). Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res.* **71**(9):3236–3245
- HIRSCHEY, M.D., DEBERARDINIS, R.J., DIEHL, A.M.E., DREW, J.E., FREZZA, C., GREEN, M.F., JONES, L.W., KO, Y.H., LE, A., LEA, M.A., LOCASALE, J.W., LONGO, V.D., LYS-SIOTIS, C.A., McDONNELL, E., MEHRMOHAMADI, M., MICHELOTTI, G., MURALIDHAR, V., MURPHY, M.P., PEDERSEN, P.L., POORE, B., RAFFAGHELLO, L., RATHMELL, J.C., SIVANAND, S., VANDER HEIDEN, M.G., WELLEN, K.E., Y TARGET VALIDATION TEAM (2015). Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **35** Suppl:S129–S150
- HOFACKER, I.L., FONTANA, W., STADLER, P.F., BONHOEFFER, L.S., TACKER, M., Y SCHUSTER, P. (1994). Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* **125**(2):167–188
- HOLT, R.A. Y JONES, S.J.M. (2008). The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* **18**(6):839–846
- HORIE, T., ONO, K., NISHI, H., IWANAGA, Y., NAGAO, K., KINOSHITA, M., KUWABARA, Y., TAKANABE, R., HASEGAWA, K., KITA, T., Y KIMURA, T. (2009). MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**(2):315–320
- HSU, J.M., XIA, W., HSU, Y.H., CHAN, L.C., YU, W.H., CHA, J.H., CHEN, C.T., LIAO, H.W., KUO, C.W., KHOO, K.H., HSU, J.L., LI, C.W., LIM, S.O., CHANG, S.S., CHEN, Y.C., REN, G.X., Y HUNG, M.C. (2018). STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. *Nat. Commun.* **9**(1):1908
- HSU, P.P. Y SABATINI, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**(5):703–707

- HSU, S.H., WANG, B., KOTA, J., YU, J., COSTINEAN, S., KUTAY, H., YU, L., BAI, S., LA PERLE, K., CHIVUKULA, R.R., MAO, H., WEI, M., CLARK, K.R., MENDELL, J.R., CALIGIURI, M.A., JACOB, S.T., MENDELL, J.T., Y GHOSHAL, K. (2012). Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J. Clin. Invest.* **122**(8):2871–2883
- HUNTZINGER, E. Y IZAURRALDE, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**(2):99–110
- ICARD, P., FOURNEL, L., WU, Z., ALIFANO, M., Y LINCET, H. (2019). Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. *Trends Biochem. Sci.* **44**(6):490–501
- IPSARO, J.J. Y JOSHUA-TOR, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**(1):20–28
- ISRAELSEN, W.J., DAYTON, T.L., DAVIDSON, S.M., FISKE, B.P., HOSIOS, A.M., BELLINGER, G., LI, J., YU, Y., SASAKI, M., HORNER, J.W., BURGA, L.N., XIE, J., JURCZAK, M.J., DEPINHO, R.A., CLISH, C.B., JACKS, T., KIBBEY, R.G., WULF, G.M., DI VIZIO, D., MILLS, G.B., CANTLEY, L.C., Y VANDER HEIDEN, M.G. (2013). PKM2 Isoform-Specific Deletion Reveals a Differential Requirement for Pyruvate Kinase in Tumor Cells. *Cell* **155**(2):397–409
- ITO, K. Y SUDA, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(4):243–256
- JADVAR, H. (2016). PET of Glucose Metabolism and Cellular Proliferation in Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **57**(Suppl 3):25S–29S
- JANSSON, M.D. Y LUND, A.H. (2012). MicroRNA and cancer. *Mol. Oncol.* **6**(6):590–610
- JIANG, J.X., GAO, S., PAN, Y.Z., YU, C., Y SUN, C.Y. (2014). Overexpression of microRNA-125b sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil through inhibition of glycolysis by targeting hexokinase II. *Mol. Med. Rep.* **10**(2):995–1002
- JIANG, S., ZHANG, L.F., ZHANG, H.W., HU, S., LU, M.H., LIANG, S., LI, B., LI, Y., LI, D., WANG, E.D., Y LIU, M.F. (2012). A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells. *EMBO J.* **31**(8):1985–1998



- JOHN, B., ENRIGHT, A.J., ARAVIN, A., TUSCHL, T., SANDER, C., Y MARKS, D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* **2**(11):e363
- JOSE, C., BELLANCE, N., Y ROSSIGNOL, R. (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta* **1807**(6):552–561
- KAMPHORST, J.J., CROSS, J.R., FAN, J., DE STANCHINA, E., MATHEW, R., WHITE, E.P., THOMPSON, C.B., Y RABINOWITZ, J.D. (2013). Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**(22):8882–8887
- KAMPHORST, J.J., NOFAL, M., COMMISSO, C., HACKETT, S.R., LU, W., GRABOCKA, E., VANDER HEIDEN, M.G., MILLER, G., DREBIN, J.A., BAR-SAGI, D., THOMPSON, C.B., Y RABINOWITZ, J.D. (2015). Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res.* **75**(3):544–553
- KANEHISA, M. Y GOTO, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**(1):27–30
- KATZ, Y., WANG, E.T., AIROLDI, E.M., Y BURGE, C.B. (2010). Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. *Nature methods* **7**(12):1009–1015
- KELM, J.M., TIMMINS, N.E., BROWN, C.J., FUSSENEGGER, M., Y NIELSEN, L.K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.* **83**(2):173–180
- KERTESZ, M., IOVINO, N., UNNERSTALL, U., GAUL, U., Y SEGAL, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* **39**(10):1278–1284
- KHVOROVA, A., REYNOLDS, A., Y JAYASENA, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**(2):209–216
- KIM, S.K., NAM, J.W., RHEE, J.K., LEE, W.J., Y ZHANG, B.T. (2006). miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinformatics* **7**:411

- KIM, Y.K. Y NARRY KIM, V. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO Journal* **26**(3):775–783
- KLEIN, G. (1988). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Acta Oncol.* **27**(4):427–437
- KOZOMARA, A. Y GRIFFITHS-JONES, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **39**(Database issue):D152–7
- KREK, A., GRÜN, D., POY, M.N., WOLF, R., ROSENBERG, L., EPSTEIN, E.J., MACMENAMIN, P., DA PIEDADE, I., GUNSALUS, K.C., STOFFEL, M., Y RAJEWSKY, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**(5):495–500
- KROEMER, G. Y POUYSSEGUR, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer’s Achilles’ heel. *Cancer Cell* **13**(6):472–482
- KUMAR, M.S., PESTER, R.E., CHEN, C.Y., LANE, K., CHIN, C., LU, J., KIRSCH, D.G., GOLUB, T.R., Y JACKS, T. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev.* **23**(23):2700–2704
- ŁABAJ, P.P., LEPARC, G.G., LINGGI, B.E., MARKILLIE, L.M., WILEY, H.S., Y KREIL, D.P. (2011). Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics* **27**(13):i383–i391
- LAI, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3’ UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* **30**(4):363–364
- LAMBERTZ, I., NITTNER, D., MESTDAGH, P., DENECKER, G., VANDESOMPELE, J., DYER, M.A., Y MARINE, J.C. (2010). Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death & Differentiation* **17**(4):633–641
- LANGMEAD, B. Y SALZBERG, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**(4):357–359
- LANNING, N.J., LOOYENGA, B.D., KAUFFMAN, A.L., NIEMI, N.M., SUDDERTH, J., DEBERARDINIS, R.J., Y MACKEIGAN, J.P. (2014). A mitochondrial RNAi screen defines cellular

- bioenergetic determinants and identifies an adenylate kinase as a key regulator of ATP levels. *Cell Rep.* **7**(3):907–917
- LAPLANTE, M. Y SABATINI, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* **149**(2):274–293
- LAU, K.S. Y DENNIS, J.W. (2008). N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* **18**(10):750–760
- LEE, R.C., FEINBAUM, R.L., Y AMBROS, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5):843–854
- LEWIS, B.P., SHIH, I.H., JONES-RHOADES, M.W., BARTEL, D.P., Y BURGE, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* **115**(7):787–798
- LI, S.C., CHAN, W.C., HU, L.Y., LAI, C.H., HSU, C.N., Y LIN, W.C. (2010). Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics* **96**(1):1–9
- LI, X., CHEN, Y.T., JOSSON, S., MUKHOPADHYAY, N.K., KIM, J., FREEMAN, M.R., Y HUANG, W.C. (2013). MicroRNA-185 and 342 inhibit tumorigenicity and induce apoptosis through blockade of the SREBP metabolic pathway in prostate cancer cells. *PLoS One* **8**(8):e70987
- LIAO, Y., SMYTH, G.K., Y SHI, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**(7):923–930
- LIAO, Y., WANG, J., JAEHNIG, E.J., SHI, Z., Y ZHANG, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* **47**(W1):W199–W205
- LIEN, E.C., LYSSIOTIS, C.A., Y CANTLEY, L.C. (2016). Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res.* **207**:39–72
- LIU, G.Y. Y STORZ, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**(5):479–496
- LIU, B., LI, J., Y CAIRNS, M.J. (2014). Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics* **15**(1):1–19
- LIU, W., LE, A., HANCOCK, C., LANE, A.N., DANG, C.V., FAN, T.W.M., Y PHANG, J.M. (2012). Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and

- metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(23):8983–8988
- LU, J., GETZ, G., MISKA, E.A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., SWEET-CORDERO, A., EBERT, B.L., MAK, R.H., FERRANDO, A.A., DOWNING, J.R., JACKS, T., HORVITZ, H.R., Y GOLUB, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043):834–838
- LUKASIK, A., WÓJCIKOWSKI, M., Y ZIELENKIEWICZ, P. (2016). Tools4miRs – one place to gather all the tools for miRNA analysis. *Bioinformatics* **32**(17):2722–2724
- MACHEDA, M.L., ROGERS, S., Y BEST, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.* **202**(3):654–662
- MALUMBRES, M. Y BARBACID, M. (2006). Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer Cell* **9**(1):2–4
- MALUMBRES, M. Y BARBACID, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**(3):153–166
- MANDUJANO-TINOCO, E.A., GARCIA-VENZOR, A., MUÑOZ-GALINDO, L., LIZARRAGA-SANCHEZ, F., FAVELA-OROZCO, A., CHAVEZ-GUTIERREZ, E., KRÖTZSCH, E., SALGADO, R.M., MELENDEZ-ZAJGLA, J., Y MALDONADO, V. (2017). miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1864**(10):1642–1655
- MANIATAKI, E. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development* **19**(24):2979–2990
- MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W.E., ATTIYA, S., BADER, J.S., BEMBEN, L.A., BERKA, J., BRAVERMAN, M.S., CHEN, Y.J., CHEN, Z., DEWELL, S.B., DU, L., FIERRO, J.M., GOMES, X.V., GODWIN, B.C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C.H., IRZYK, G.P., JANDO, S.C., ALLENQUER, M.L.I., JARVIE, T.P., JIRAGE, K.B., KIM, J.B., KNIGHT, J.R., LANZA, J.R., LEAMON, J.H., LEFKOWITZ, S.M., LEI, M., LI, J., LOHMAN, K.L., LU, H., MAKHIJANI, V.B., MCDADE, K.E., MCKENNA, M.P., MYERS, E.W., NICKERSON, E., NOBILE, J.R., PLANT, R., PUC, B.P., RONAN, M.T., ROTH, G.T., SARKIS, G.J., SIMONS, J.F., SIMPSON, J.W.,

- SRINIVASAN, M., TARTARO, K.R., TOMASZ, A., VOGT, K.A., VOLKMER, G.A., WANG, S.H., WANG, Y., WEINER, M.P., YU, P., BEGLEY, R.F., Y ROTHBERG, J.M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**(7057):376–380
- MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E., PEIRIS-PAGÉS, M., PESTELL, R.G., SOTGIA, F., Y LISANTI, M.P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**(1):11–31
- MARTINEZ-ZAGUILAN, R., LYNCH, R.M., MARTINEZ, G.M., Y GILLIES, R.J. (1993). Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am. J. Physiol.* **265**(4 Pt 1):C1015–29
- MATHUPALA, S.P., KO, Y.H., Y PEDERSEN, P.L. (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer’s stygian link to the “Warburg Effect” and a pivotal target for effective therapy. *Semin. Cancer Biol.* **19**(1):17–24
- MAYERS, J.R., WU, C., CLISH, C.B., KRAFT, P., TORRENCE, M.E., FISKE, B.P., YUAN, C., BAO, Y., TOWNSEND, M.K., TWOROGER, S.S., DAVIDSON, S.M., PAPAGIANNAKOPOULOS, T., YANG, A., DAYTON, T.L., OGINO, S., STAMPFER, M.J., GIOVANNUCCI, E.L., QIAN, Z.R., RUBINSON, D.A., MA, J., SESSO, H.D., GAZIANO, J.M., COCHRANE, B.B., LIU, S., WACTAWSKI-WENDE, J., MANSON, J.E., POLLAK, M.N., KIMMELMAN, A.C., SOUZA, A., PIERCE, K., WANG, T.J., GERSZTEN, R.E., FUCHS, C.S., VANDER HEIDEN, M.G., Y WOLPIN, B.M. (2014). Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat. Med.* **20**(10):1193–1198
- MCCARTHY, D.J., CHEN, Y., Y SMYTH, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* **40**(10):4288–4297
- MCCRACKEN, A.N. Y EDINGER, A.L. (2013). Nutrient transporters: the Achilles’ heel of anabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **24**(4):200–208
- MEIJER, H.A., SMITH, E.M., Y BUSHELL, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.* **42**(4):1135–1140

- MENENDEZ, J.A. Y LUPU, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**(10):763–777
- MERSEY, B.D., JIN, P., Y DANNER, D.J. (2005). Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in a cell. *Hum. Mol. Genet.* **14**(22):3371–3377
- METALLO, C.M., GAMEIRO, P.A., BELL, E.L., MATTAINI, K.R., YANG, J., HILLER, K., JEWELL, C.M., JOHNSON, Z.R., IRVINE, D.J., GUARENTE, L., KELLEHER, J.K., VANDER HEIDEN, M.G., ILIOPOULOS, O., Y STEPHANOPOULOS, G. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* **481**(7381):380–384
- MORRIS, K.V. Y MATTICK, J.S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics* **15**(6):423–437
- MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B.A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L., Y WOLD, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**(7):621–628
- MUCIÑO-OLMOS, E.A., VÁZQUEZ-JIMÉNEZ, A., AVILA-PONCE DE LEÓN, U., MATADAMAS-GUZMAN, M., MALDONADO, V., LÓPEZ-SANTAELLA, T., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A., Y RESENDIS-ANTONIO, O. (2020). Unveiling functional heterogeneity in breast cancer multicellular tumor spheroids through single-cell RNA-seq. *Sci. Rep.* **10**(1):12728
- MUKHERJEE, S. *El emperador de todos los males: Una biografía del cáncer*. DEBATE (2014)
- MULLEN, A.R., WHEATON, W.W., JIN, E.S., CHEN, P.H., SULLIVAN, L.B., CHENG, T., YANG, Y., MARSTON LINEHAN, W., CHANDEL, N.S., Y DEBERARDINIS, R.J. (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* **481**(7381):385–388
- MURPHY, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* **417**(1):1–13
- MURRAY, A.W. Y HUNT, T. *The Cell Cycle: An Introduction*. Oxford University Press on Demand (1993)

- NAGALAKSHMI, U., WANG, Z., WAERN, K., SHOU, C., RAHA, D., GERSTEIN, M., Y SNYDER, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**(5881):1344–1349
- NIGG, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(1):21–32
- OKADA, C., YAMASHITA, E., LEE, S.J., SHIBATA, S., KATAHIRA, J., NAKAGAWA, A., YONEDA, Y., Y TSUKIHARA, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* **326**(5957):1275–1279
- ORR, A.L., VARGAS, L., TURK, C.N., BAATEN, J.E., MATZEN, J.T., DARDOV, V.J., ATTLE, S.J., LI, J., QUACKENBUSH, D.C., GONCALVES, R.L.S., PEREVOSHCHIKOVA, I.V., MICHAEL PETRASSI, H., MEEUSEN, S.L., AINSCOW, E.K., Y BRAND, M.D. (2015). Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III. *Nature Chemical Biology* **11**(11):834–836
- PASQUINELLI, A.E., REINHART, B.J., SLACK, F., MARTINDALE, M.Q., KURODA, M.I., MALLER, B., HAYWARD, D.C., BALL, E.E., DEGNAN, B., MÜLLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E., Y RUVKUN, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**(6808):86–89
- PATRA, K.C., WANG, Q., BHASKAR, P.T., MILLER, L., WANG, Z., WHEATON, W., CHANDEL, N., LAAKSO, M., MULLER, W.J., ALLEN, E.L., JHA, A.K., SMOLEN, G.A., CLASQUIN, M.F., BROOKS ROBEY, R., Y HAY, N. (2013). Hexokinase 2 Is Required for Tumor Initiation and Maintenance and Its Systemic Deletion Is Therapeutic in Mouse Models of Cancer. *Cancer Cell* **24**(3):399
- PAUL, P., CHAKRABORTY, A., SARKAR, D., LANGTHASA, M., RAHMAN, M., BARI, M., SINGHA, R.K.S., MALAKAR, A.K., Y CHAKRABORTY, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of Cellular Physiology* **233**(3):2007–2018
- PAVLOVA, N.N. Y THOMPSON, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism* **23**(1):27–47

- PEARCE, E.L., POFFENBERGER, M.C., CHANG, C.H., Y JONES, R.G. (2013). Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science* **342**(6155):1242454–1242454
- PESCHIAROLI, A., GIACOBBE, A., FORMOSA, A., MARKERT, E.K., BONGIORNO-BORBONE, L., LEVINE, A.J., CANDI, E., D’ALESSANDRO, A., ZOLLA, L., FINAZZI AGRÒ, A., Y MELINO, G. (2013). miR-143 regulates hexokinase 2 expression in cancer cells. *Oncogene* **32**(6):797–802
- PLANAS-SILVA, M.D. Y WEINBERG, R.A. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(6):768–772
- POILLET-PEREZ, L. Y WHITE, E. (2019). Role of tumor and host autophagy in cancer metabolism. *Genes Dev.* **33**(11-12):610–619
- POLLEN, A.A., NOWAKOWSKI, T.J., SHUGA, J., WANG, X., LEYRAT, A.A., LUI, J.H., LI, N., SZPANKOWSKI, L., FOWLER, B., CHEN, P. *et al.* (2014). Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nature biotechnology* **32**(10):1053
- PORPORATO, P.E., PAYEN, V.L., PÉREZ-ESCUREDO, J., DE SAEDELEER, C.J., DANHIER, P., COPETTI, T., DHUP, S., TARDY, M., VAZEILLE, T., BOUZIN, C., FERON, O., MICHIELS, C., GALLEZ, B., Y SONVEAUX, P. (2014). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Reports* **8**(3):754–766
- PORT, A.M., RUTH, M.R., Y ISTFAN, N.W. (2012). Fructose consumption and cancer: is there a connection? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **19**(5):367–374
- POTTEN, C.S. Y LOEFFLER, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**(4):1001–1020
- PUISSÉGUR, M.P., MAZURE, N.M., BERTERO, T., PRADELLI, L., GROSSO, S., ROBBERSERMESANT, K., MAURIN, T., LEBRIGAND, K., CARDINAUD, B., HOFMAN, V., FOURRE, S., MAGNONE, V., RICCI, J.E., POUYSSÉGUR, J., GOUNON, P., HOFMAN, P., BARBRY, P., Y MARRI, B. (2011). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ.* **18**(3):465–478



- REINHART, B.J., WEINSTEIN, E.G., RHOADES, M.W., BARTEL, B., Y BARTEL, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**(13):1616–1626
- REUTER, J.A., SPACEK, D.V., Y SNYDER, M.P. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Mol. Cell* **58**(4):586–597
- RIVENZON-SEGAL, D., BOLDIN-ADAMSKY, S., SEGER, D., SEGER, R., Y DEGANI, H. (2003). Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int. J. Cancer* **107**(2):177–182
- ROBEY, I.F., STEPHEN, R.M., BROWN, K.S., BAGGETT, B.K., GATENBY, R.A., Y GILLIES, R.J. (2008). Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells. *Neoplasia* **10**(8):745–756
- RÖHRIG, F. Y SCHULZE, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16**(11):732–749
- RUBY, J.G., JAN, C.H., Y BARTEL, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**(7149):83–86
- SAETROM, O., SNØVE, JR, O., Y SAETROM, P. (2005). Weighted sequence motifs as an improved seeding step in microRNA target prediction algorithms. *RNA* **11**(7):995–1003
- SCHLOSS, J.A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat. Biotechnol.* **26**(10):1113–1115
- SECRETAN, B., STRAIF, K., BAAN, R., GROSSE, Y., EL GHISSASSI, F., BOUVARD, V., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., FREEMAN, C., GALICHET, L., Y COGLIANO, V. (2009). A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet Oncology* **10**(11):1033–1034
- SHIH, C. Y WEINBERG, R.A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**(1):161–169
- SIEGEL, R.L., MILLER, K.D., Y JEMAL, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* **70**(1):7–30

- SIKAND, K., SINGH, J., EBRON, J.S., Y SHUKLA, G.C. (2012). Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin are targets of miR-644a. *PLoS One* **7**(10):e47510
- SIMS, D., SUDBERY, I., ILOTT, N.E., HEGER, A., Y PONTING, C.P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics* **15**(2):121–132
- SINGH, P.K., MEHLA, K., HOLLINGSWORTH, M.A., Y JOHNSON, K.R. (2011). Regulation of Aerobic Glycolysis by microRNAs in Cancer. *Mol. Cell. Pharmacol.* **3**(3):125–134
- SONESON, C., LOVE, M.I., Y ROBINSON, M.D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res.* **4**:1521
- STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., WAMELINK, M.M.C., CAMPBELL, K., CHEUNG, E., OLIN-SANDOVAL, V., GRÜNING, N., KRÜGER, A., ALAM, M.T., KELLER, M.A., BREITENBACH, M., BRINDLE, K.M., RABINOWITZ, J.D., Y RALSER, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* **90**(3):927–963
- STRAIF, K., BENBRAHIM-TALLAA, L., BAAN, R., GROSSE, Y., SECRETAN, B., EL GHISSASSI, F., BOUVARD, V., GUHA, N., FREEMAN, C., GALICHET, L., Y COGLIANO, V. (2009). A review of human carcinogens—Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *The Lancet Oncology* **10**(5):453–454
- STROUHAL, E. (1976). Tumors in the remains of ancient Egyptians. *Am. J. Phys. Anthropol.* **45**(3 pt. 2):613–620
- TAN, J., YU, C.Y., WANG, Z.H., CHEN, H.Y., GUAN, J., CHEN, Y.X., Y FANG, J.Y. (2015). Genetic variants in the inositol phosphate metabolism pathway and risk of different types of cancer. *Sci. Rep.* **5**:8473
- TANAKA, H., SASAYAMA, T., TANAKA, K., NAKAMIZO, S., NISHIHARA, M., MIZUKAWA, K., KOHTA, M., KOYAMA, J., MIYAKE, S., TANIGUCHI, M., HOSODA, K., Y KOHMURA, E. (2013). MicroRNA-183 upregulates HIF-1 $\alpha$  by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. *J. Neurooncol.* **111**(3):273–283

- TANG, H., LEE, M., SHARPE, O., SALAMONE, L., NOONAN, E.J., HOANG, C.D., LEVINE, S., ROBINSON, W.H., Y SHRAGER, J.B. (2012). Oxidative stress-responsive microRNA-320 regulates glycolysis in diverse biological systems. *FASEB J.* **26**(11):4710–4721
- TANZER, A. Y STADLER, P.F. (2004). Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of Molecular Biology* **339**(2):327–335
- THORENS, B. Y MUECKLER, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**(2):E141–5
- TILI, E., MICHAÏLLE, J.J., LUO, Z., VOLINIA, S., RASSENTI, L.Z., KIPPS, T.J., Y CROCE, C.M. (2012). The down-regulation of miR-125b in chronic lymphocytic leukemias leads to metabolic adaptation of cells to a transformed state. *Blood* **120**(13):2631–2638
- TONG, X., ZHAO, F., Y THOMPSON, C.B. (2009). The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**(1):32–37
- VALOUEV, A., ICHIKAWA, J., TONTHAT, T., STUART, J., RANADE, S., PECKHAM, H., ZENG, K., MALEK, J.A., COSTA, G., MCKERNAN, K., SIDOW, A., FIRE, A., Y JOHNSON, S.M. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res.* **18**(7):1051–1063
- VAN ROOIJ, E. (2011). The art of microRNA research. *Circ. Res.* **108**(2):219–234
- VEENSTRA, T.D. (2021). Omics in Systems Biology: Current Progress and Future Outlook. *Proteomics* **21**(3-4):e2000235
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D.R., Y BERNEMAN, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**(3):131–149
- VETTORE, L., WESTBROOK, R.L., Y TENNANT, D.A. (2020). New aspects of amino acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer* **122**(2):150–156
- VOLINIA, S., CALIN, G.A., LIU, C.G., AMBS, S., CIMMINO, A., PETROCCA, F., VISIONE, R., IORIO, M., ROLDO, C., FERRACIN, M., PRUEITT, R.L., YANAIHARA, N., LANZA, G., SCARPA, A., VECCHIONE, A., NEGRINI, M., HARRIS, C.C., Y CROCE, C.M. (2006). A microRNA

- expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**(7):2257–2261
- VOLINIA, S., GALASSO, M., SANA, M.E., WISE, T.F., PALATINI, J., HUEBNER, K., Y CROCE, C.M. (2012). Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(8):3024–3029
- WANG, Z., GERSTEIN, M., Y SNYDER, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**(1):57–63
- WANG, Z.H., ZHANG, Y.Z., WANG, Y.S., Y MA, X.X. (2019). Identification of novel cell glycolysis related gene signature predicting survival in patients with endometrial cancer. *Cancer Cell Int.* **19**:296
- WARBURG, O.H. *Ueber den stoffwechsel der tumoren: arbeiten aus dem Kaiser Wilhelm-institut für biologie* (1926)
- WEINBERG, F., HAMANAKA, R., WHEATON, W.W., WEINBERG, S., JOSEPH, J., LOPEZ, M., KALYANARAMAN, B., MUTLU, G.M., BUDINGER, G.R.S., Y CHANDEL, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(19):8788–8793
- WEINHOUSE, S., WARBURG, O., BURK, D., Y SCHADE, A.L. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* **124**(3215):267–272
- WHEELER, D.A. Y WANG, L. (2013). From human genome to cancer genome: The first decade. *Genome Research* **23**(7):1054–1062
- WIGHTMAN, B., HA, I., Y RUVKUN, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**(5):855–862
- WILLIAMS, G.H. Y STOEBER, K. (2007). Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**(6):672–679

- XIAO, J., LIN, H.Y., ZHU, Y.Y., ZHU, Y.P., Y CHEN, L.W. (2016). MiR-126 regulates proliferation and invasion in the bladder cancer BLS cell line by targeting the PIK3R2-mediated PI3K/Akt signaling pathway. *Onco. Targets. Ther.* **9**:5181–5193
- XIE, M., LI, M., VILBORG, A., LEE, N., SHU, M.D., YARTSEVA, V., ŠESTAN, N., Y STEITZ, J.A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell* **155**(7):1568–1580
- XU, W., SAN LUCAS, A., WANG, Z., Y LIU, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics* **15 Suppl 7**:S4
- YAN, T. Y YE, X.X. (2019). MicroRNA-328-3p inhibits the tumorigenesis of bladder cancer through targeting ITGA5 and inactivating PI3K/AKT pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(12):5139–5148
- YANG, J.S., MAURIN, T., ROBINE, N., RASMUSSEN, K.D., JEFFREY, K.L., CHANDWANI, R., PAPAPETROU, E.P., SADELAIN, M., O'CARROLL, D., Y LAI, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**(34):15163–15168
- YANG, X., CHENG, Y., LI, P., TAO, J., DENG, X., ZHANG, X., GU, M., LU, Q., Y YIN, C. (2015). A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis. *Tumour Biol.* **36**(1):383–391
- YAP, T.A., GERLINGER, M., FUTREAL, P.A., PUSZTAI, L., Y SWANTON, C. (2012). Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci. Transl. Med.* **4**(127):127ps10
- YIN, J., REN, W., HUANG, X., DENG, J., LI, T., Y YIN, Y. (2018). Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Front. Immunol.* **9**:1697
- YING, S.Y. (editor). *MicroRNA Protocols, Methods in Molecular Biology*, tomo 936. Humana Press, Totowa, NJ (2013)
- YOUNG, R.M., ACKERMAN, D., QUINN, Z.L., MANCUSO, A., GRUBER, M., LIU, L., GIANNOUKOS, D.N., BOBROVNIKOVA-MARJON, E., DIEHL, J.A., KEITH, B., Y SIMON, M.C. (2013).

- Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* **27**(10):1115–1131
- YUE, D., LIU, H., Y HUANG, Y. (2009). Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Curr. Genomics* **10**(7):478–492
- YUE, X., LUKOWSKI, J.K., WEAVER, E.M., SKUBE, S.B., Y HUMMON, A.B. (2016). Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Comparison of 2D and 3D Colon Cancer Cell Culture Models. *J. Proteome Res.* **15**(12):4265–4276
- ZETTERBERG, A. Y LARSSON, O. (1985). Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**(16):5365–5369
- ZHANG, F. Y DU, G. (2012). Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J. Biol. Chem.* **3**(8):167–174
- ZHANG, H., KOLB, F.A., JASKIEWICZ, L., WESTHOF, E., Y FILIPOWICZ, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**(1):57–68
- ZHANG, J., ZHOU, W., LIU, Y., LIU, T., LI, C., Y WANG, L. (2018). Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncology Letters* **15**(5):7215–7220
- ZHANG, Y. Y YANG, J.M. (2013). Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention. *Cancer Biol. Ther.* **14**(2):81–89
- ZHANG, Z., ZHANG, J., LI, J., GENG, H., ZHOU, B., ZHANG, B., Y CHEN, H. (2020). miR-320/ELF3 axis inhibits the progression of breast cancer via the PI3K/AKT pathway. *Oncol. Lett.* **19**(4):3239–3248
- ZIEMANN, M., KASPI, A., Y EL-OSTA, A. (2016). Evaluation of microRNA alignment techniques. *RNA* **22**(8):1120–1138
- ZU, X.L. Y GUPPY, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**(3):459–465

## Apéndice A

### Diámetro de los ETMC

**Tabla A-1:** Distribución del diámetro de los ETMC en las réplicas biológicas

**N1**

Days	Average Diameter	Standard deviation	Measured MCTS
4	126.870	11.977	44
7	170.349	19.443	46
11	214.119	25.258	43
15	288.848	44.480	24
17	346.606	47.933	23
19	380.369	38.020	16

**N2**

Days	Average Diameter	Standard deviation	Measured MCTS
4	131.006	21.220	97
7	152.172	19.781	81
11	184.810	31.036	64
15	219.371	32.042	67
17	251.161	42.757	69
19	270.921	43.351	48

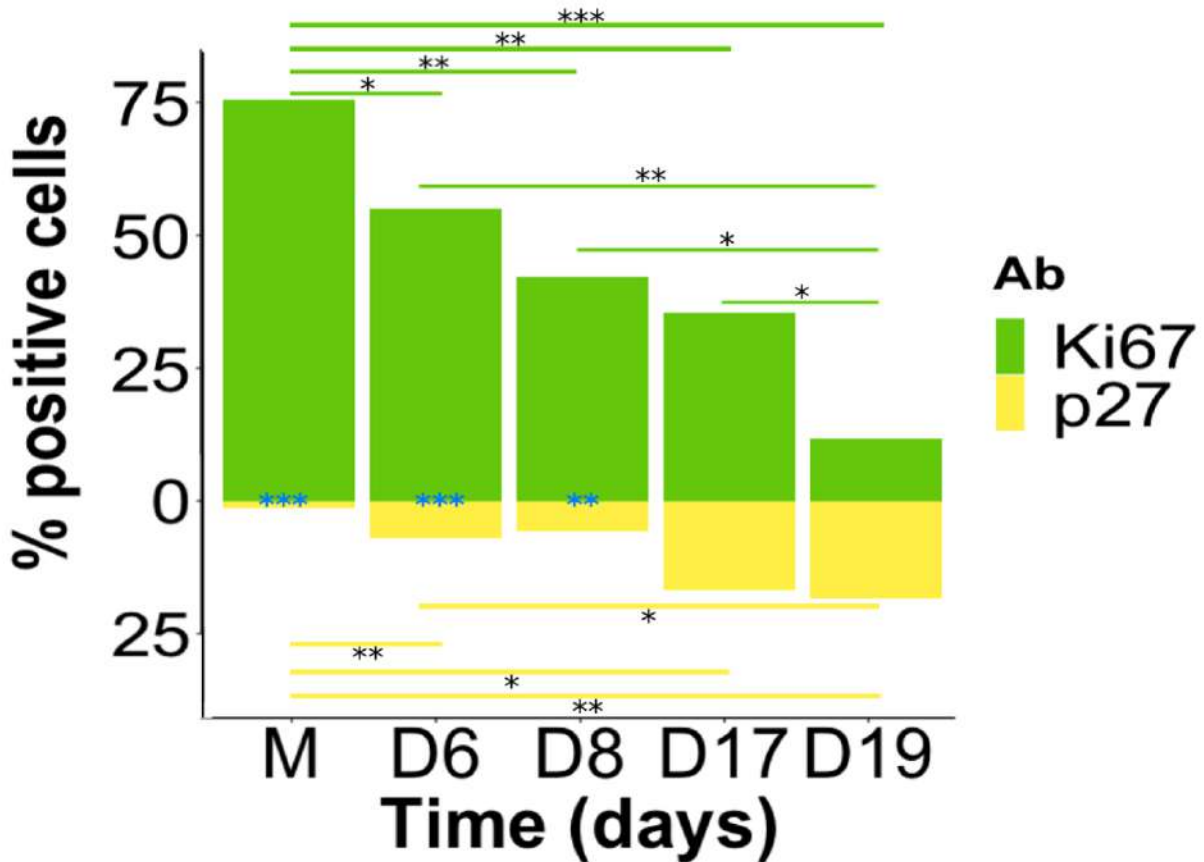
**N3**

Days	Average Diameter	Standard deviation	Measured MCTS
4	136.730	16.985	116
7	172.518	19.874	100
11	213.887	29.749	97
15	241.138	45.192	109
17	383.577	40.192	91
19	391.268	41.091	82



## Apéndice B

# Diferencias de los datos de citometría en cultivo



**Figura B-1: Diferencias estadísticas en las condiciones de cultivo.** Inmunofenotipificación de las subpoblaciones de ETMC en todas las condiciones temporales: Monocultivo (M) y ETMC en día 6, 8, 17 y 19 para las mediciones sin procesar. Las comparaciones estadísticas entre las condiciones temporales para Ki67 y p27 se representan en líneas verdes y líneas amarillas, respectivamente. Además, el asterisco negro y azul representa el nivel de significancia en la comparación entre la condición temporal y dentro de la condición temporal, respectivamente. Las diferencias estadísticas se calculan utilizando una prueba t con igualdad de varianzas y los resultados estadísticamente significativos se muestran a continuación: **Ki67** : M-D6:  $P=0.015$  ( $t=4.0905$ ;  $df=4$ ), M-D8:  $P=0.0026$  ( $t=6.6971$ ;  $df=4$ ), M-D17:  $P=0.0026$  ( $t=6.6937$ ;  $df=4$ ), M-D19:  $P=0.000462$  ( $t=10.52$ ;  $df=4$ ), D6-D19:  $P=0.00409$  ( $t=5.9169$ ;  $df=4$ ), D8-D19:  $P=0.014$  ( $t=4.1897$ ;  $df=4$ ) and D17-D19:  $P=0.042$  ( $t=2.9495$ ;  $df=4$ ). **p27** : M-D6:  $P=0.00724$  ( $t=-5.0491$ ;  $df=4$ ), M-D17:  $P=0.02$  ( $t=-3.7705$ ;  $df=4$ ), M-D19:  $P=0.006$  ( $t=-5.3701$ ;  $df=4$ ) and D6-D19:  $P=0.0368$  ( $t=-3.0839$ ;  $df=4$ ). **Ambos** : M:  $P=3.60E-06$  ( $t=35.873$ ;  $df=4$ ), D6:  $P=5.248E-04$  ( $t=10.178$ ;  $df=4$ ) and D8:  $P=0.00263$  ( $t=6.6695$ ;  $df=4$ ).

# Producción científica



# MicroRNAs Regulate Metabolic Phenotypes During Multicellular Tumor Spheroids Progression

Erick Andrés Muciño-Olmos<sup>1,2</sup>, Aarón Vázquez-Jiménez<sup>1</sup>, Diana Elena López-Esparza<sup>3</sup>, Vilma Maldonado<sup>4</sup>, Mahara Valverde<sup>5</sup> and Osbaldo Resendis-Antonio<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup> Human Systems Biology Lab, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> PhD Program in Biomedical Sciences, UNAM, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup> Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"—Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>4</sup> Epigenetic Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico, <sup>5</sup> Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Institute for Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, <sup>6</sup> Coordinación de La Investigación Científica -Red de Apoyo a La Investigación, UNAM, Mexico City, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Xinmin Li,  
University of California, Los Angeles,  
United States

### Reviewed by:

Hirofumi Yoshino,  
Kagoshima University, Japan  
Yukio Naya,  
Teikyo University Chiba Medical  
Center, Japan

### \*Correspondence:

Osbaldo Resendis-Antonio  
oresendis@inmegen.gob.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Genetics,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 11 July 2020

**Accepted:** 03 November 2020

**Published:** 04 December 2020

### Citation:

Muciño-Olmos EA,  
Vázquez-Jiménez A,  
López-Esparza DE, Maldonado V,  
Valverde M and Resendis-Antonio O  
(2020) MicroRNAs Regulate Metabolic  
Phenotypes During Multicellular  
Tumor Spheroids Progression.  
*Front. Oncol.* 10:582396.  
doi: 10.3389/fonc.2020.582396

During tumor progression, cancer cells rewire their metabolism to face their bioenergetic demands. In recent years, microRNAs (miRNAs) have emerged as regulatory elements that inhibit the translation and stability of crucial mRNAs, some of them causing direct metabolic alterations in cancer. In this study, we investigated the relationship between miRNAs and their targets mRNAs that control metabolism, and how this fine-tuned regulation is diversified depending on the tumor stage. To do so, we implemented a paired analysis of RNA-seq and small RNA-seq in a breast cancer cell line (MCF7). The cell line was cultured in multicellular tumor spheroid (MCTS) and monoculture conditions. For MCTS, we selected two-time points during their development to recapitulate a proliferative and quiescent stage and contrast their miRNA and mRNA expression patterns associated with metabolism. As a result, we identified a set of new direct putative regulatory interactions between miRNAs and metabolic mRNAs representative for proliferative and quiescent stages. Notably, our study allows us to suggest that miR-3143 regulates the carbon metabolism by targeting hexokinase-2. Also, we found that the overexpression of several miRNAs could directly overturn the expression of mRNAs that control glycerophospholipid and N-Glycan metabolism. While this set of miRNAs downregulates their expression in the quiescent stage, the same set is upregulated in proliferative stages. This last finding suggests an additional metabolic switch of the above mentioned metabolic pathways between the quiescent and proliferative stages. Our results contribute to a better understanding of how miRNAs modulate the metabolic landscape in breast cancer MCTS, which eventually will help to design new strategies to mitigate cancer phenotype.

**Keywords:** cancer metabolism, miRNA-mRNA interaction, multicellular tumor spheroids, bioinformatics, miRNA target prediction

## INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides in size that are related to critical regulatory functions in a plethora of biological processes, associated with healthy and dysfunctional physiological states (1, 2). The most common and well-documented functions of miRNAs are to be endogenous negative regulators of the translation and contribute to the mRNAs instability. This regulatory capacity is carried out through direct base pairing to the target sites in the 3' untranslated regions of an mRNA (3). To date, there are more than 1,900 mature human miRNAs according to the latest build (build 22) of the Sanger Centre miRNA database miRBase (<http://www.mirbase.org>). To highlight their regulatory relevance, last estimations suggest that this set of miRNAs target at least 60% of human mRNAs (4). For this reason, miRNAs have surged as crucial post-transcriptional regulators whose dysregulation can be tightly associated with aberrant gene expression in complex human diseases such as cancer (5).

In cancer research, there are a myriad of publications uncovering the role of miRNAs during their pathogenesis and progression (6, 7). Despite their broad dysregulation, miRNAs can be functionally classified as oncogenes or tumor suppressors (8). This fact leads to most of the human tumors present a unique pattern of expression, setting a large and complex network of interactions between oncogenes being activated and the loss of various tumor suppressors. Regardless of this variation in the genetic profiles, these interactions between oncogenes and tumor suppressors can directly or indirectly induce metabolic alterations that favor the survival and growth of the tumoral cells (9). For instance, there is experimental evidence that miRNA-143 down-regulates Hexokinase 2 (*HK2*) which promotes cancer progression and the reduction in glucose metabolism (10). Hence, miRNAs participate in the control of metabolic reprogramming by regulating the expression of mRNAs whose protein products regulate directly metabolic machinery (11, 12). Despite the substantial progress in this area, we still need to complete the puzzle and establish the role of miRNAs on metabolic rewiring into cancer progression and how this could be exploited as therapeutic targets in cancer.

A major impediment in cancer treatment is the drug resistance due to the heterogeneous subpopulations of cells within the tumor with different cell-cycle phases (13, 14). The cell cycle is the mechanism associated with proliferation, cellular division and DNA replication. It is mainly divided into four phases: G1-phase where proteins necessary for S-phase progression are accumulated, the S-phase period where DNA synthesis occurs, the G2-phase where proteins required for mitosis are produced and the M-phase phase where mitosis and separation occurs (15). Also, cells may occasionally exit from the cell-cycle and enter a phase of quiescence called the G0-phase (16). With this in mind, models that closely resemble human cancer cell-cycle heterogeneity are essential for understanding the growth mechanisms and for the development of new treatments. For this reason, MultiCellular Tumor Spheroids (MCTS) models have been used to study and reproduce the gradients between proliferating and quiescent cells, cell-cell interaction, low drug penetration and resistance of quiescent cells located in the deepest and hypoxic regions (17–19).

In the present study, we proceeded with a experimental and computational pipeline to report new plausible miRNA-mRNA pairs interactions involved in the metabolic rewiring of cancer, using an *in vitro* MCTS model of a luminal A breast cancer cell line (MCF7), the most prevalent subtype in women worldwide (20). To explore the regulatory effect of miRNAs over metabolism, we accomplished a longitudinal study of the MCTS in a period of 19 days of progression. In this interval of time, the MCTS owns cell populations with different cell cycle stages, particularly proliferative and quiescent cells, which can provide differences in the metabolic phenotype as time passes. Using this model, we conducted a whole transcriptome analysis, including RNAs and small-RNAs, to describe how miRNAs influence metabolism. Our paired analysis of RNAseq and small RNAseq allowed us to conclude that whereas glycerophospholipid and glucose metabolism are down-regulated in proliferative enriched MCTS, oxidative phosphorylation, and amino acid biosynthesis is down-regulated in quiescent enriched MCTS. Overall our study highlighted the crucial role of miRNAs to guide the metabolic phenotype in MCF7 MCTS. Notably, the set of miRNAs modulating the expression of various metabolic mRNAs seems to be a promising avenue to design new *in vitro* strategies to mitigate the malignant phenotype in cancer.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Procedures

#### MCF7 Monoculture

Breast cancer cell line MCF7 (ATCC HTB-22TM, Manassa, VA, USA) was grown in DMEM (ATCC 30-2002, Manassa, VA, USA) containing 4 mM L-glutamine, 4,500 mg/L glucose, 1 mM sodium pyruvate, and 1,500 mg/L sodium. Media was supplemented with 10% v/v of FBS (ATCC 30-2020, Manassa, VA, USA). The media was replaced every 2 days with fresh media. Cells were incubated under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. For all experiments, 70–80% confluent monoculture with less than 9 passages were used. MCF7 cell line was validated using STR analysis.

#### Generation and Disaggregation of Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) Cultures from MCF7

The generation of MCTS was carried out using a liquid overlay technique. A single-cell suspension of MCF7 at a density of  $1 \times 10^6$  cells was loaded into 12.5 cm<sup>2</sup> suspension culture flasks (UltraCruz sc-200257, Tex, USA) containing 5 mL of L-15 media (ATCC 30-2008, Manassa, VA, USA) supplemented with 5% v/v of FBS. Flasks were placed in an orbital incubator at 37°C under constant orbital shaking of 59 rpm for 6 and 19 days (21). The media was replaced every 2 days with fresh media.

For disaggregation, the 6 and 19 day-old MCTS were harvested and transferred to 1.5 mL tubes. The MCTS were washed with PBS 1X (VWR 97062-732, PA, USA). Accutase (Invitrogen 00-4555-56, CA, USA) was added and the reaction was carried out for 45 min. at 37°C with orbital shaking. Every 5 min. the MCTS were mixed gently by pipetting during the accutase reaction. To ensure optimal disaggregation, Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1mM EDTA) solution was added for 5 min at 37°C. The trypsin reaction was stopped by adding media with FBS in a 1:1 ratio. Finally, cells were

collected by centrifugation and were suspended in 0.1% BSA in PBS (Cell Signaling Technology BSA #9998, USA) solution.

### MCTS Diameter Distribution

Diameter distribution of MCTS at 4, 7, 11, 15, 17, and 19 day-old time was estimated by two steps. First, we took photos directly to the MCTS culture, ensuring that almost all MCTS are positioned at the center of the flask. Photos were taken using a Nikon Eclipse TS100 Inverted Microscope. Following this, the images were analyzed through the MorphLibJ package to directly estimate the Feret diameter of all the MCTS in each picture (22). The Feret diameter value reported in **Figure 1** represents the mean value of all MCTS properly measured for each time point. The diameter distribution was calculated for three independent MCTS cultures using the time points mentioned above (**Table S1**).

### MCTS Culture Time Points Selection

To evaluate the abundance of cells in proliferative and quiescent stages inside the MCTS through time, we selected four-time points: 6, 8, 17, and 19 days. The first two time points (6 and 8 days) of MCTS culture were chosen because after 6 days almost every cell has been aggregated to form an MCTS. The next two time points were picked because after 20 days of MCTS culture necrotic population started to appear, a condition that was avoided in our study.

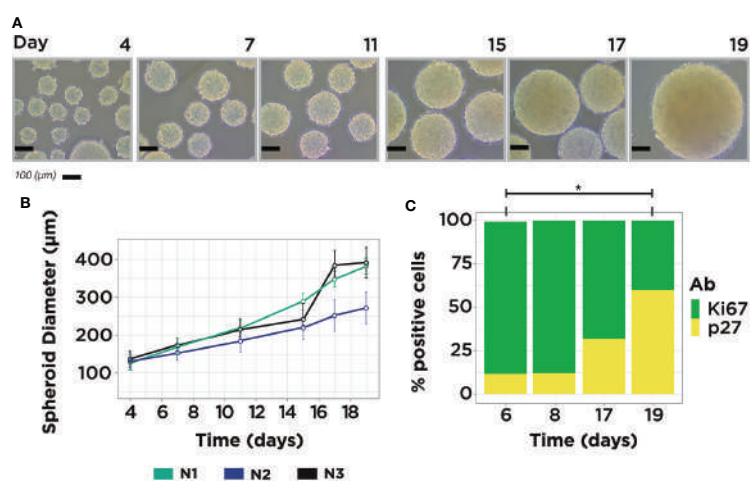
### Immunophenotyping

The 6-, 8-, 17-, and 19-day old MCTS cultures were disaggregated as described in *Generation and Disaggregation of Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) Cultures from MCF7* section. Therefore, we took an aliquot of  $3 \times 10^6$  cells of each MCTS culture. Fixation was carried out using PFA 4% for 10 min. at room temperature and rinsing three times with PBS 1X. Subsequently, the permeabilization was accomplished by adding ice-cold methanol (90%) during 30 min. in ice. Previous to the antibody staining, the methanol was removed

by washing with PBS 1X and  $1 \times 10^6$  cells were aliquoted. Then, the cells were rinsed with 3 mL of incubation buffer (0.1% BSA in PBS) three times. Staining was made by resuspending the cells with the Ki67-Alexa Fluor® 488 Conjugate (CST 11882, Massachusetts, USA) and p27-PE Conjugate (CST 12184, Massachusetts, USA) primary antibodies (1:50) and incubating for 1 h at room temperature. Before cell cytometry analysis, cells were resuspended in 500  $\mu$ L of PBS 1X. Finally, the immunophenotyping was done in a FACSAria Cell Sorter.

### RNA Extraction Method for MCTS and Monoculture

Total RNA was isolated from MCF7 monoculture, 6- and 19-day old MCTS by a TRIzol (Invitrogen, CA, USA) adapted protocol. Particular adjustments previous to the TRIzol extraction were made for both culture conditions. In the monoculture, we used a 70–80% confluent culture, then we poured 1 mL of TRIzol directly to the culture dish and homogenized until all cells were detached from the dish. This step was assisted by the use of a scraper. In the 6- and 19-day old MCTS culture, the MCTS were retrieved by centrifugation and resuspended in 1 mL of TRIzol. The solution was homogenized vigorously until there were no cellular lumps. The subsequent steps described below were used for both culture conditions. We added 10  $\mu$ L of triton 2% (Merck T8787, St. Louis, USA) and incubated for 10 min. at room temperature. Next, we added 200  $\mu$ L of chloroform, mixed through inversion and incubated for 5 min. at room temperature. Tubes were centrifuged at 12,000 rpm during 15 min. at 18°C. The aqueous phase was retrieved, we added 0.25  $\mu$ L of glycogen as co-precipitation reagent (ThermoFisher R0561, Waltham, USA) and isopropanol was added in a 1:1 ratio (regarding TRIzol). The mixture was homogenized gently, incubated for 20 min. at  $-20^\circ\text{C}$  and centrifuged at 13,000 rpm during 45 min. at 18°C. Finally, the pellet was washed three times with ethanol 75%, dissolved in ultrapure DDW (not treated with DEPC) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .



**FIGURE 1 |** MCF7 MCTS Model. **(A)** Representative images from MCF7 MCTS culture showing size differences along time. **(B)** MCTS diameter distribution measurements, average MCTS measure per time point = 67,  $n = 3$ . **(C)** Immunophenotyping of MCTS subpopulations with flow cytometry using Ki67 and p27 markers in four temporal conditions: day 6, 8, 17, and 19. The expression of both markers showed statistical difference in the comparison between days 6 and 19. Single asterisk indicates a statistical difference,  $P < 0.05$  (unpaired t-test with equality of variances in normalized measurements,  $t = \pm 4.4629$ ;  $df = 4$ ).

## RNA-Seq and Small RNA-Seq Library Construction and Sequencing

Previous to the library construction we ensured that all RNA samples have a minimum amount of 1  $\mu\text{g}$  and the integrity value of the samples have a RIN  $>7$ . The NGS was performed on total RNA isolated as described in the previous section using the NextSeq platform (Illumina, Inc.). The library construction for RNA-Seq and small RNA-Seq was made following the TruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina, Inc.) and the CD Small RNA Library Prep Kit (Illumina, Inc.), respectively. The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository and accession number can be found below: ArrayExpress, Accession: E-MTAB-9741 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-9741/>)

## Bioinformatic Analysis

### Quality Determination and Pre-Processing

All the FASTQ files undergo quality evaluation using FastQC software version 3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The resulting output files were summarized using the MultiQC tool (23). Only RNA-Seq FASTQ files were pre-processed to remove low-quality information in the 3' and 5' end using Trimmomatic version 0.36 (24).

### Alignment and Entity Quantification

For RNA-Seq FASTQ pre-processed files, the alignment was made using Kallisto version 0.43.1 (25). The results were summarized using the tximport package in R (26). For small RNA-Seq the alignment was made using Bowtie2 version 2.3.2 (27) with the parameters suggested in (28) and the human genome GRCh38 construction. The resulting SAM files were summarized using FeatureCounts (29) with the hsa.gff file from miRBase v22.

### Exploratory Analysis and Differential Expression Analysis

The processed data was inspected for normalized data through principal component analysis (PCA) plot (**Figure S1**). The differential expression analysis was carried out with edgeR package (30) version 3.26.8 for RNA-Seq and small RNA-Seq reads.

### miRNAs Target Prediction for Metabolic mRNAs

To only obtain the Differential Expressed (DE) metabolic mRNAs in each condition, we filtered the DE mRNAs using the KEGG metabolic pathways gene list using an FDR  $<0.05$  threshold. Next, we used DE miRNAs and the metabolic DE mRNAs mentioned before to obtain the plausible miRNAs-mRNA pairs calculated with miRGate (31). From miRGate analyses we only used the predictions from Targetscan algorithm and the experimental validated miRNA-mRNA pairs for further filters. We filtered the plausible pairs when the  $\log_2\text{FC}$  has an inverse value between miRNAs and the metabolic mRNAs. Finally, the selected pairs were filtered to those who appear at least two times in a metabolic pathway.

### Pathway Enrichment Analysis

Pathway enrichment analysis was done using two different methods within Webgestalt (32). First method consists of taking the full mRNA list into an over-representation analysis

(ORA). Second, gene set enrichment analysis (GSEA) was made using the mRNA differential expressed with a FDR  $<0.05$ . We used the KEGG, GO, Panther, and wikipathway datasets.

## RESULTS

### MCTS Culture as a Model of Proliferation and Quiescence

To explore the possible interaction between miRNAs and mRNAs of metabolic genes in cancer, we carried out a MCTS culture with the breast cancer cell line MCF7. We mainly used the human luminal A (ER+, PR+, HER2-) cell line due to its high incidence in women breast cancer patients worldwide (20). In this MCTS model, MCF7 cell suspension was loaded on non-adherent plates to stimulate cell-cell adhesion and promote well-rounded spherical structures. This experimental model, and its implemented protocols, facilitated the tracking of the progression of the MCTS and ensured the production of large batches of MCTS on diverse time points (**Figure 1A**). The Feret Diameter reported in **Figure 1B**, is the average value of MCTS measurements in each time point (**Table S1**). To select the optimal time point where the MCTS is mainly enriched in a cell cycle phase, we assess the presence of a standard marker for proliferation (Ki67) and quiescence (p27) in four-time points using immunophenotyping. Also, to contrast the differences across a classical culture method, we included a 2D model (monoculture) along all the study to compare against a proliferative enriched MCTS and quiescent enriched MCTS. We applied a t-test analysis over the relative composition of the proliferative and quiescent population in monoculture and MCTS to identify two sample times to proceed with NGS data analysis. The statistical analysis showed significant differences in some samples between the expression of Ki67 and p27 (**Figure S2**). As a result of this study, we found that only the comparison between MCTS at 6- and 19-day old showed statistical differences in both cell cycle markers (**Figure 1C**). Consequently, these time points were selected to carry on the transcriptome and small-RNA profiling. These results indicate that MCTS 6-day old are primarily enriched in proliferative cells (P-MCTS), and MCTS 19-day old are principally enriched in quiescent cells (Q-MCTS).

### Bioinformatics Analysis of RNA-Seq and Small RNA-Seq

To date, few computational tools can simultaneously accomplish the analysis of RNA-Seq and small RNA-Seq. Among these algorithms, miARma-Seq provides a multiprocess analysis tool that can undergo these restraints and allow the study of expression profiles of miRNAs and their targeted mRNAs (33). A study combining mRNA and miRNA sequencing can undoubtedly supply a proper framework to assess pair-wise connections between miRNAs and metabolic targets mRNAs. With this aim in mind, we implemented some changes in the original miARma-Seq pipeline, using the best-suited tools for each processing module. The two significant changes in the pipeline were performed in the alignment tool for RNA-Seq data and the enrichment tool. Thus, we set Kallisto and Webgestalt as the new processing tools (**Figure 2**). An in-deep description of the adjustments made for each processing module is described in the methods section. In brief, our pipeline is

integrated by a set of modules which embraces classical steps for each technology (mRNA and microRNA) such as quality check, alignment, differential expression, target prediction, and functional analysis. A global view of the entire pipeline implemented in this paper is depicted in **Figure 2**.

### Differential Expression Analysis and Metabolic mRNAs Target Prediction

In this section, we pursue two aims: explore how miRNA and mRNAs expression changes among conditions; and identify potential miRNAs-mRNA regulatory mechanisms at a metabolic level. To assess the changes in RNA expression profiles among the samples, we obtained the Differential Expressed (DE) profile of mRNAs and miRNAs for each pair-wise comparison among P-MCTS, Q-MCTS, and monoculture condition. From a statistical point of view, we used an FDR <0.05 as a criteria to select those mRNAs and miRNAs differentially expressed between conditions. As a result, we identified a total of 1,289 mRNAs and 35 miRNAs differentially expressed among all pairwise conditions. Particularly, the comparison between P-MCTS and monoculture showed no significant results. Therefore, to get insight of the regulation differences we used only for this comparison a p-value <0.05. By doing so, 15 unique miRNAs were added to the analysis. **Figure 3A** summarize the set of DE mRNAs and miRNAs obtained per comparison with the considerations indicated above.

In order to disentangle the metabolic rewiring accomplished by miRNAs, we carried out a filter within the DE mRNAs to just obtain the subset of mRNAs that codify for metabolic machinery. This last analysis was accomplished by using the KEGG metabolic pathways gene set (34). Subsequently, miRGate was used to characterize *in silico* potential regulatory interactions between the DE metabolic mRNAs and the miRNAs. As a result of this bioinformatic analysis, 32 mRNAs and 24 miRNAs were selected as miRNA-RNAs interactions obtained with the considerations described in the miRNAs target prediction for metabolic mRNAs section. To dissect which of these miRNAs-mRNAs regulatory interactions between miRNAs and metabolic mRNAs are unique or shared across the cultured conditions, we visually recap their comparison in **Figure 3B**. As shown in this last figure, the numerical distribution and percentage of miRNA and their predicted DE mRNA targets shared and specific for each condition are shown in **Figure 3B**. In the next section, we present an in-deep analysis over these pairs of miRNAs-mRNA interactions and its possible functional consequences.

### Metabolic mRNAs-miRNAs Pairs Functions

In the previous section, we identified a set of 24 miRNAs and 32 mRNAs that could have a regulatory effect in the metabolic pathways for the three comparisons. Based on this set of 24 miRNAs and 32 mRNAs, in this section we explored their pattern of expression and their possible influence on signaling and metabolic pathways for each pairwise condition, see **Tables 1–3**. In general terms, miRNA-mRNA pairs could influence different signaling and metabolic pathways, obtained as described in *miRNAs Target Prediction for Metabolic mRNAs* section. For instance, in the comparison between Q-MCTS and P-MCTS, we observed an upregulation of mRNAs in fatty acids and lipid metabolism. Also, we noted a downregulation of the

biosynthesis of amino acids. Furthermore, mRNAs participating in glycolysis, oxidative phosphorylation, and glycan metabolism do not show a particular preference for a comparison due to the disparity in the pathway usage (**Table 1**). Comparative analysis between Q-MCTS and monoculture showed an up-regulation in mRNAs participating in lipid metabolism, particularly the glycerophospholipid metabolism. Notably, although we had a different set of DE mRNAs in each condition, we observed that mRNAs in glycerophospholipid metabolism remain up-regulated in Q-MCTS with respect to all comparisons.

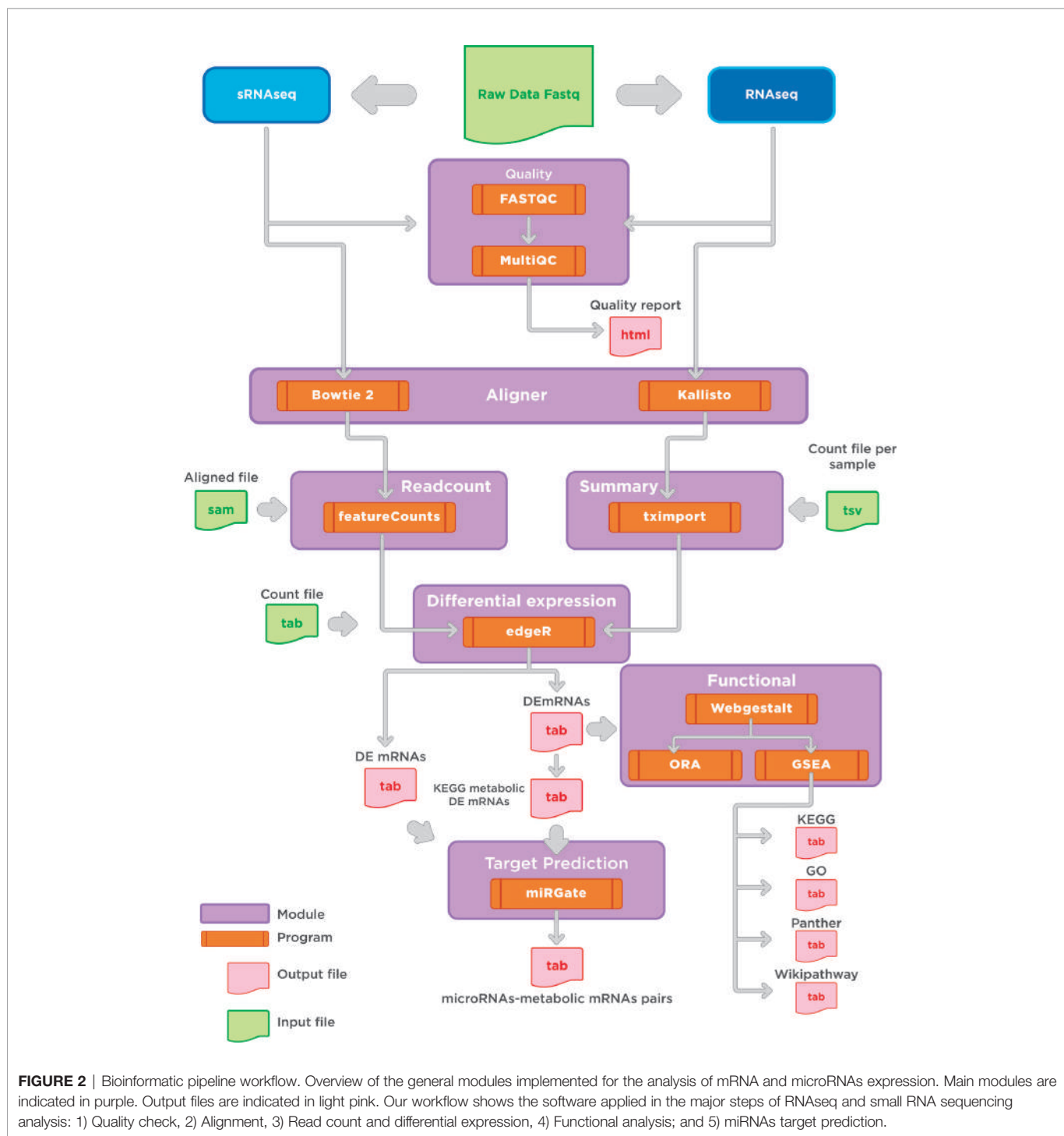
Among the exclusive overexpressed pathways in monoculture, we stand out the inositol phosphate metabolism, purine metabolism, glycosaminoglycan metabolism, and pathways such as calcium and sphingolipid signaling pathways. The carbon metabolism for this comparison also showed differences in pathway usage (**Table 2**). Finally, the comparison between P-MCTS and monoculture showed a preference for the biosynthesis and degradation of the amino acids, the inositol metabolism, and glycerophospholipid metabolism in P-MCTS. The monoculture condition does not show a particular pathway usage for this comparison; however there is an overexpression in *GFPT2*, suggesting a UDP sugar metabolism preference (**Table 3**).

### Functional Analysis

To obtain a global perspective in the pathways usage in the whole mRNA data, we accomplished a gene set enrichment analysis over all the samples together. To this end, we applied an Over Representation Analysis (ORA) and selected those pathways with an FDR ≤0.05. This primary study allowed us to identify pathways that change over all the samples. Interestingly the enrichment suggested pathways involved in the spliceosome, cell cycle, proteolysis, protein processing, RNA transport, carcinogenesis, thermogenesis, endocytosis, and metabolic pathways (**Figure 4A**). The results recapitulate pathways according to the selection of the samples, such as the cell cycle. However, this method did not allow us to distinguish in which condition the pathway was over-represented. Thus, we use a complementary approach to achieve a more specific insight into the pathways usage between comparisons. We carried out a GSEA using different datasets for all pairwise comparisons. **Figures 4B–D** depicts some of the main enrichment pathways defined in the KEGG database. In general terms, we noted that most overrepresented pathways lead to abnormal immune responses, metabolic rewiring, cell division, subversion of cellular signaling pathways, and DNA replication and repair. When comparing Q-MCTS vs. P-MCTS, we observed an up-regulation of mRNAs in inflammatory responses and immune suppression and a downregulation of steroid biosynthesis, cell division, and DNA replication and repair (**Figure 4B**).

Comparative analysis between Q-MCTS and monoculture showed an up-regulation in mRNAs participating in steroid biosynthesis, glycerolipid metabolism and pathways involved in abnormal immune responses, and a downregulation of ascorbate, aldarate and drug metabolism, cell division, and DNA replication and repair (**Figure 4C**). Taking these results together, we noticed that the enriched pathways for the proliferative-like culture methods (P-MCTS and monoculture) are very similar when compared to Q-MCTS. Besides, Q-MCTS maintains the enrichment in pathways involved in abnormal immune responses. Finally, the comparison



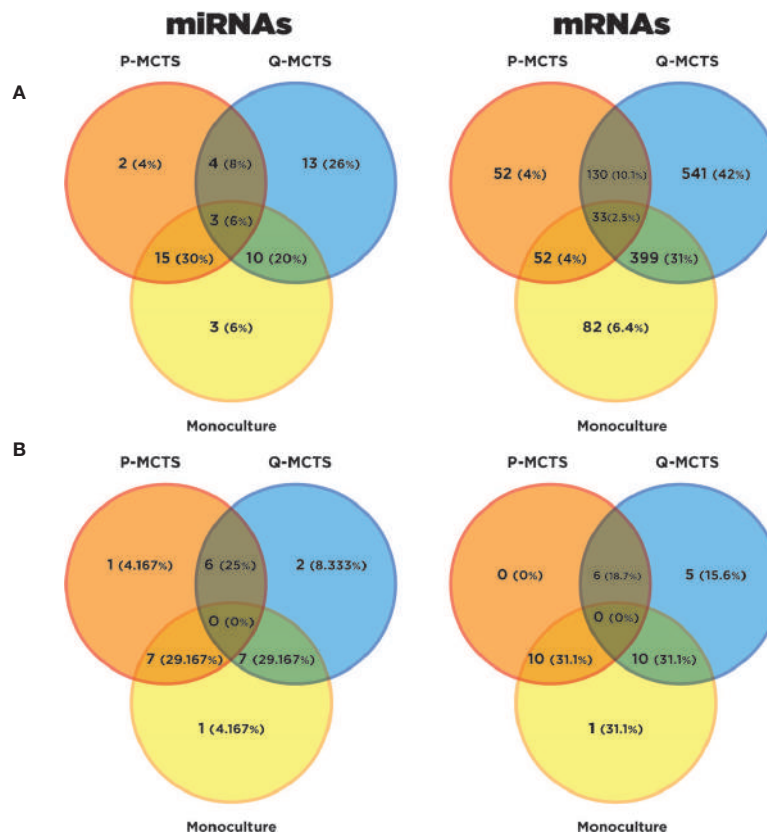


between P-MCTS and monoculture showed an up-regulation in mRNAs participating in arginine and proline metabolism and a downregulation in the immune responses and the cellular signaling pathways (Figure 4D).

## DISCUSSION

This study investigated the possible regulatory interactions between miRNAs and its metabolic mRNAs targets in the

human breast cancer cell line MCF7. This aim was particularly carried out by applying and analyzing simultaneously RNA-seq and small RNA-Seq of MCTS and monoculture. As a result, two main findings can be highlighted. First, we provide new insights into the regulatory mechanism by which miRNAs modulate metabolic mRNAs to sustain cancer MCTS. Second, we have accomplished an in-depth bioinformatics analysis to characterize these miRNA regulations, and evaluate their consequences over pathways sustaining phenotype in Q-MCTS, P-MCTS, and



**FIGURE 3 |** Differential Expression Analysis Overview. **(A)** Venn diagram resulting from the DE mRNAs and DE miRNAs in the conditions comparisons with a specified threshold. Orange, blue, and yellow represent the DE mRNAs in P-MCTS, Q-MCTS and monoculture conditions respectively. **(B)** Venn diagram resulting from the DE metabolic mRNAs subset and DE miRNAs after the target prediction with paired information using miRGate.

monoculture conditions. In the following, we discuss and draw some conclusions for each pairwise culture comparison.

### Q-MCTS vs. P-MCTS Comparison

The comparison between Q-MCTS and P-MCTS reveals that Q-MCTS primarily have low expression in miRNAs that control the lipid metabolism and hexokinase 2 (HK2), setting a high preference for glycerophospholipid and glycolytic metabolism usage. On the other hand, P-MCTS down-regulates some miRNAs that control the biosynthesis of amino acids and oxidative phosphorylation through the targeting of *NDUFB6* mRNA (**Table 1**). These results agreed with previous observations dealing with miRNAs and cancer cell metabolism. For instance, HK2 is the first rate-limiting enzyme of glycolysis, and its activity has been predicted to be regulated by multiple miRNAs including the confirmed negative regulation by miR-143 in breast cancer cell lines (12). Here, we suggested a new regulatory interaction in HK2 mRNA mainly carried out by miR-3143 and preferentially activated in P-MCTS when compared with Q-MCTS (**Figure 5A**).

In addition to the carbon metabolism, differences in the amino acid and lipid metabolism have been reported before and consistently observed in this study, see **Figure 5A**. Lipids are essential biosynthesis molecules for organelles and cells. The disturbance in lipid metabolism guided by miRNA regulation is a particular feature of

cancer metabolism (35–37). Here, we propose that miR-7974 and miR-181a-5p regulate a set of mRNAs implicated in the lipid metabolism, predominantly the glycerophospholipid metabolism. These miRNAs are downregulated in Q-MCTS suggesting that the lipid metabolism remains active. Meanwhile the lipid metabolism is downregulated in P-MCTS by the list of miRNAs mentioned in **Table 1**. Moreover, cancer cells have an increased demand for amino acids to meet their rapid biosynthesis of proteins, nucleotides and lipids, redox homeostasis, and energy metabolism. There is evidence that miRNAs regulate amino acid catabolism in kidney cancer (38). In our study, we observed that the low expression of miRNAs regulating *GLUL* and *PGAM1* mRNAs in P-MCTS assists their rapid proliferation, maintaining a high expression in these mRNAs to conserve the serine and glutamine pools. In Q-MCTS, the overexpression of miR-663a and miR-1184 can downregulate the amino acid metabolism to mainly depend only on a glycolytic and lipid metabolism (**Figure 5A**).

Regarding the oxidative phosphorylation findings, the overexpression of *ATP6VIC1* in Q-MCTS, while in P-MCTS this mRNA is downregulated by miR-15a-5p. The *ATP6VIC1* gene encodes a component of vacuolar ATPase (V-ATPase). The V-ATPase complex is located at the plasma membrane and plays an important role in tumor growth and metastasis by the increment in H<sup>+</sup> secretion, granting tumor cells to survive in hypoxic

**TABLE 1 |** Pathways affected by the mRNA-miRNA pairs for the comparison between Q-MCTS and P-MCTS.

		hsa-miR-7974	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-663a	hsa-miR-1184	hsa-miR-3648	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-3143	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-15a-5p
Glycerophospholipid metabolism	DGKG	+/-								
	PLA2G3	+/-								
Ether lipid metabolism	PLA2G4C		+/-							
	PLA2G3	+/-								
Arachidonic acid metabolism	PLA2G4C		+/-							
	PLA2G3	+/-								
Linoleic acid metabolism	PLA2G4C		+/-							
	PLA2G3	+/-								
Alpha-Linolenic acid metabolism	PLA2G4C		+/-							
	PLA2G3	+/-								
Ras signaling pathway	PLA2G4C		+/-							
	PLA2G3	+/-								
Phospholipase D signaling pathway	DGKG	+/-								
	PLA2G4C		+/-							
Choline metabolism in cancer	DGKG	+/-								
	PLA2G4C		+/-							
Phosphatidylinositol signaling system	DGKG	+/-								
	ITPKB			-/+	-/+	-/+				
N-Glycan biosynthesis	MGAT5				-/+					
	STT3B						+/-	+/-	+/-	
Oxidative phosphorylation	ATP6V1C1									+/-
	NDUFB6				-/+					
Glycolysis/Gluconeogenesis	HK2							+/-		
	PGAM1				-/+					
Biosynthesis of amino acids	GLUL			-/+						
	PGAM1				-/+					

To classify the profiles of expression between mRNA target and miRNA, we defined a two-component notation, which indicates their relative expression. Red shows the cases where mRNA overexpress and miRNA downregulate their expressions in Q-MCTS with respect to P-MCTS (+/-). Green means the inverse situation and it was denoted as (-/+).

conditions and the consequent acidic tumor microenvironment (39). Also, in a mouse breast cancer model was shown that the *Atp6v1c1* knockdown reduced invasion and migration (40). Based on these facts, we suggest that the rewiring of the metabolic program in Q-MCTS is due to the hypoxic conditions within the MCTS that aid in acquiring a metastatic phenotype in the quiescent subpopulation, unlike of its proliferative counterpart (Figure 5A).

Finally, we found that the dependence in the N-Glycan metabolism is guided by two mRNAs: *STT3B* and *MGAT5*. The expression of these mRNAs show an inverse regulatory phenotype. While *STT3B* mRNA is mainly down-regulated in P-MCTS by a group of miRNAs (miR-3143, miR-671-5p, and miR-454-3p), *MGAT5* mRNA is down-regulated in Q-MCTS by miR-1184. The branching of the N-Glycans is implicated in the regulation of surface levels of glycoproteins such as the epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor-β (TGF-β) receptors. Also, the ablation of *MGAT5* mRNA in tumor cells leads to less metastatic and less responsive to cytokines phenotype (41), and *STT3B* participates in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells (42). For these reasons, we suggested that in Q-MCTS and P-MCTS the metastatic potential could exist, no matter the metabolic profile (Figure 5A).

### Q-MCTS vs Monoculture Comparison

The comparison between Q-MCTS and monoculture reveal that Q-MCTS primarily has low expression in some miRNAs that control the glycerophospholipid biosynthesis and the glycolytic

metabolism, suggesting a high preference for these metabolic pathways. On the other hand, monoculture down-regulates miRNAs regulating purine metabolism, inositol metabolism, sphingolipid metabolism, and glycosaminoglycan biosynthesis (Table 2). The obtained results showed that the down-regulation in the glycolytic metabolism, mainly in HK2 is in agreement with previous cancer metabolism reports. Here, we suggested a new regulation carried out by miR-362-5p on HK2, which is intensified in monoculture and diminished in Q-MCTS (Figure 5B). Intriguingly, the down-regulation of HK2, is a frequent feature for the proliferative-like models (P-MCTS and Monoculture), although it is guided by different miRNAs depending on the culture method. These results supply additional evidence pointing out that the Q-MCTS depends on a glycolytic metabolism.

Additionally, the results showed an overexpression of mRNAs of the purine metabolism in the monoculture. We also suggested that this pathway is controlled by miR-3648, miR-663b, and miR193a-5p targeting *ADA*, *AMPD2*, and *HPRT1*, respectively in Q-MCTS (Figure 5B). The purines are essential components for RNA and DNA production and provide the cofactors and energy to support cell survival and proliferation (43). In concordance with our findings, the pathway usage correlates with the high proliferative rate seen by immunophenotyping with Ki67 (Figure S2), suggesting its essential role in monoculture.

On the other hand, fructose and mannose metabolism seems to have significant changes between these conditions. Based on our analysis, we concluded that these pathways can be altered by two

**TABLE 2 |** Pathways affected by the mRNA-miRNA pairs for the comparison between Q-MCTS and monoculture.

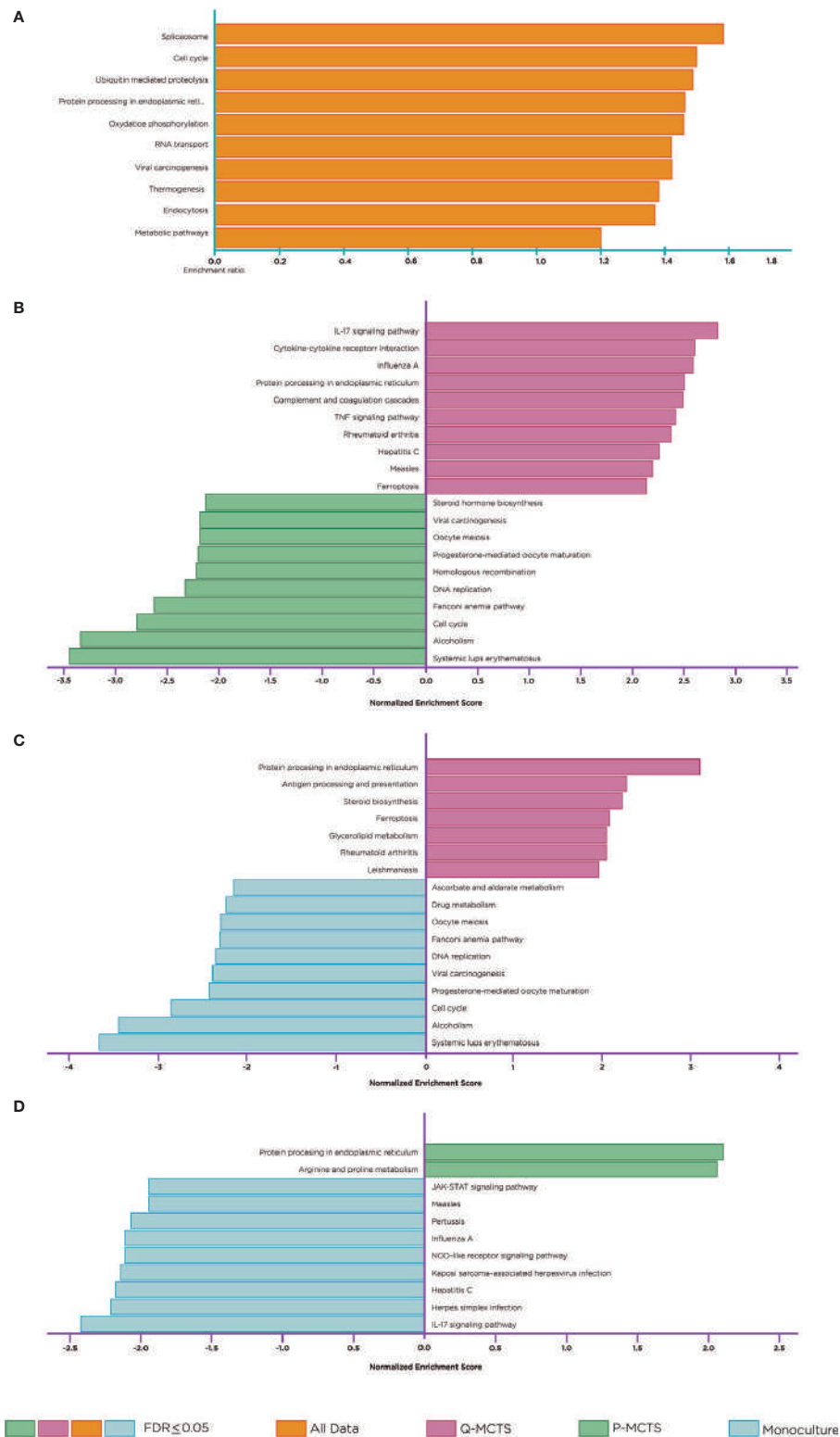
		hsa-miR-7974	hsa-miR-3929	hsa-miR-663a	hsa-miR-3648	hsa-miR-663b	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-3652	hsa-miR-1226-3p
Phosphatidylinositol signaling system	DGKG	+/-									
	INPP5A		-/+								
	ITPKB		-/+	-/+	-/+						
	PLCB3					-/+					
Glycerophospholipid metabolism	DGKG	+/-									
	PLA2G3	+/-									
	PLD3						+/-				
Inositol phosphate metabolism	INPP5A		-/+								
	ITPKB		-/+	-/+	-/+						
	PLCB3					-/+					
Purine metabolism	AMPD2					-/+					
	HPRT1						-/+				
	ADA				-/+						
Fructose and mannose metabolism	HK2							+/-		-/+	
	KHK									-/+	+/-
	GMPPB										+/-
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate/heparin	XYLT2									-/+	
	NDST1									-/+	
Phospholipase D signaling pathway	DGKG	+/-									
	PLCB3					-/+					
Ether lipid metabolism	PLA2G3	+/-									
	PLD3						+/-				
	HK2							+/-			
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	GMPPB										+/-
	HK2							+/-			
Carbohydrate digestion and absorption	PLCB3					-/+					
	ITPKB		-/+	-/+	-/+						
Calcium signaling pathway	PLCB3					-/+					
	PLCB3					-/+					
Sphingolipid signaling pathway	CFRS6		-/+								

In the figure, we defined a two-component notation to classify the profiles of expression between mRNA target and miRNA, which indicates their relative expression. Red indicates the cases where mRNA overexpress and miRNA downregulate their expressions in Q-MCTS with respect to monoculture (+/-). Green indicates the inverse situation and it was denoted as (-/+).

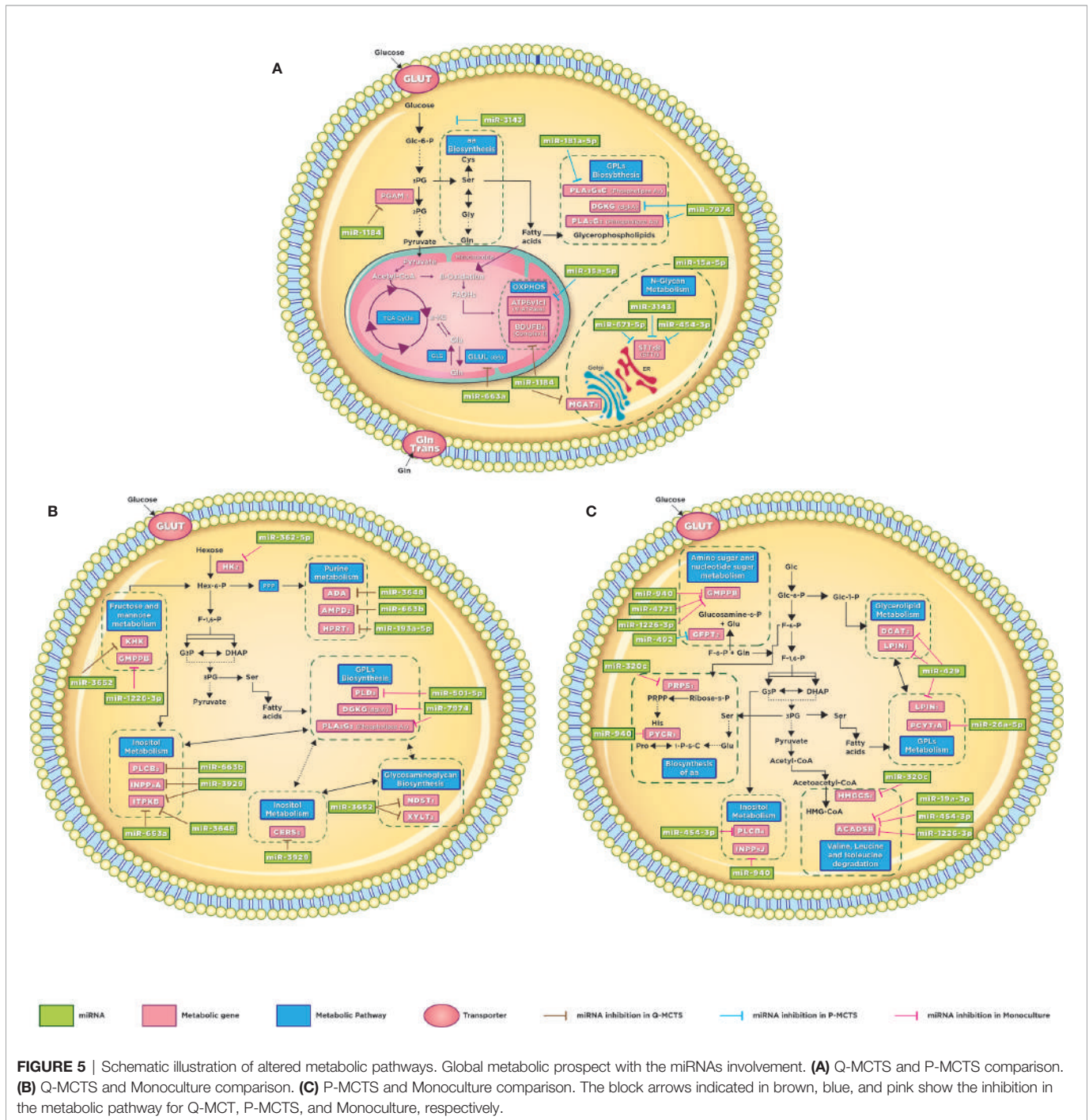
**TABLE 3 |** Pathways affected by the mRNA-miRNA pairs for the comparison between P-MCTS and monoculture.

		hsa-miR-429	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-940	hsa-miR-320c	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-1226-3p	hsa-miR-492	hsa-miR-4721	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-940
Glycerolipid metabolism	DGAT2	+/-									
	LPIN1	+/-									
Inositol phosphate metabolism	PLCB4		+/-								
	INPP5J			+/-							
Phosphatidylinositol signaling system	PLCB4		+/-								
	INPP5J			+/-							
Valine, leucine and isoleucine degradation	HMGCS1				+/-						
	ACADSB		+/-			+/-	+/-				
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	GFPT2							-/+			
	GMPPB			+/-			+/-		+/-		
Glycerophospholipid metabolism	LPIN1	+/-									
	PCYT1A									+/-	
Biosynthesis of amino acids	PRPS1				+/-						
	PYCR1										+/-

To classify the profiles of expression between mRNA target and miRNA, we defined a two-component notation, which indicates their relative expression. Red shows the cases where mRNA overexpress and miRNA downregulate their expressions in P-MCTS with respect to monoculture (+/-). Green means the inverse situation, and it was denoted as (-/+).



**FIGURE 4 |** Pathway Enrichment Analysis. Statistical evaluation of the fraction of mRNAs in a particular pathway found in the DE mRNAs across comparisons and in the whole dataset. **(A)** Over-representation analysis. **(B)** GSEA. Comparison between Q-MCTS and P-MCTS. **(C)** GSEA. Comparison between Q-MCTS, and monoculture. **(D)** GSEA. Comparison between P-MCTS and monoculture. Orange, magenta, green and light blue bars show statistically enriched pathways for all data, Q-MCTS, P-MCTS, and monoculture, respectively.



mRNAs: *KHK* and *GMPPB*. The expression of these mRNAs shows an inverse phenotype: while *KHK* upregulates its expression, *GMPPB* downregulates its expression. This contrary behavior leads to an unclear pathway usage. In Q-MCTS, we found that *KHK* mRNA is mainly down-regulated by miR-3652, and *GMPPB* mRNA is down-regulated in monoculture by miR-1226-3p. This pathway could fuel the pentose phosphate flux and protein synthesis, indirectly increasing tumor growth (44). Also, there is experimental evidence indicating that fructose can be used by breast cancer cells specifically in glucose-deficiency environments (45)

and the upregulation of *KHK* correlates with tumor malignancy and progression (46). Moreover, *GMPPB* overexpression is associated with a favorable prognostic value in endometrial cancer (47). Overall, we concluded that individual participation of these mRNAs may lead to a more severe phenotype for the monoculture model.

As discussed earlier, we observed a frequent disturbance in lipid metabolism through all comparisons. This metabolic preference remains in the comparison between Q-MCTS vs monoculture. Specifically, the glycerophospholipid metabolism is overexpressed

in Q-MCTS. Based on our bioinformatics analysis, a possible explanation can be given due to the regulation on two miRNAs. We suggest that miR-501-5p down-regulates *PLD3* and miR-7974 down-regulates *DGKG* and *PLA2G3* in monoculture. Furthermore, *CERS6* participating in the sphingolipid metabolism is overexpressed in monoculture, and is down-regulated by miR-3929 in Q-MCTS, see **Figure 5B**. Together these results showed that there is no particular usage for the lipid metabolism in general. However, the lipid categories can be exclusive to a cell cycle phase, for instance, the glycerophospholipid metabolism being constantly overexpressed in Q-MCTS.

Finally, the down-regulation of Glycosaminoglycan metabolism in Q-MCTS is accomplished through the regulation of miR-3652 over *NDST1* and *XYLT2*. Conversely, in monoculture, these two mRNAs are overexpressed. Another result indicates that the inositol metabolism is up-regulated in monoculture, whereas in Q-MCTS this pathway is down-regulated by miR-663b, miR-3929, miR-3648, and miR-663a. Remarkably, both metabolic pathways are used to fuel signaling processes. In fact, glycosaminoglycans are part of the extracellular matrix (ECM), which conducted interactions with growth factors and cytokines implicated in cancer growth and progression, mainly signaling cascades responsible for regulating angiogenesis, invasion, and metastasis (48). Also, the mRNAs involved in the inositol metabolism can sustain the PI3K-dependent signaling pathways, promoting tumor growth and invasiveness (49). The up-regulation in monoculture for both metabolic pathways suggests that this preference is followed by the high proliferation rates observed, especially in this culture model.

### P-MCTS vs Monoculture Comparison

The comparison between P-MCTS and monoculture reveals that P-MCTS primarily has low expression in miRNAs that control the biosynthesis of amino acids, inositol, valine, leucine, isoleucine, and lipid metabolism. For instance, we found that the monoculture solely down-regulates miR-492, which in turn regulates *GFPT2*, a mRNA participating in amino and nucleotide sugar metabolism (**Table 3**). The phenotype in this metabolic pathway is mainly influenced by two mRNAs: *GFPT2* and *GMPPB*. The expression of these mRNAs shows an inverse phenotype. While one upregulates, the other downregulates its expression. In P-MCTS, *GFPT2* mRNA is mainly down-regulated by miR-492, and *GMPPB* mRNA is down-regulated in monoculture by miR-940, miR4721, and miR-1226-3p. The abundance of the nucleotide pools limits the cancer proliferative capacity (50), suggesting that both models require this pathway to maintain their proliferative capacity, regardless of the pathway regulation.

Additionally, the comparative analysis showed an overexpression of mRNAs involved in the lipid metabolism in the P-MCTS. Mainly, the glycerolipid and glycerophospholipid metabolism are a consistent result across all comparisons, showing a preference in the MCTS models (Q-MCTS and P-MCTS). However, in monoculture this pathway is down-regulated by miR-429 targeting *DGAT2*, *LPIN1*, and miR-26a-5p targeting *PCYT1A* (**Figure 5C**). These results correlated with the fact that the highest levels in lipid profiles are found in the most aggressive breast tumors (51), suggesting that the

lipid metabolism can promote malignancy in the MCTS models, despite the differences in the proliferation rates.

Likewise, our analysis showed an overexpression in the biosynthesis and degradation of amino acid in P-MCTS. Additionally, in monoculture, we suggested that the amino acid biosynthesis is down-regulated by miR-320c and miR-940 targeting *PRPS1* and *PYCR1*, respectively. Also, the amino acid degradation is down-regulated by miR-320c targeting *HMGCS1*, and *ACADSB* is down-regulated by a set of miRNAs; miR-19a-3p, miR454-3p, and miR-1226-3p (**Figure 5C**). These results agree with a proteome study in 3D cancer cultures (52), which suggest that spheroid cultures rely on amino acid utilization.

Finally, the overexpression in the inositol metabolism is accompanied by the up-regulation of *PLCB4* and *INPP5J* in P-MCTS. Conversely, in monoculture, this pathway is down-regulated by miR-454-3p and miR-940, targeting these two mRNAs. These results suggest that this pathway and their corresponding fueled signaling pathways, such as PI3K, may be upregulated in the MCTS model.

### Altered Signaling Pathways

Our analysis mainly focused on metabolic alterations; however, other pathways presented significant perturbations to explore more deeply. For instance, we found that pathways associated with cell division, DNA replication and repair are enriched in the proliferative-like models (P-MCTS and Monoculture). As we expected, these results are in agreement with the demands for sustaining a rapid proliferation. Complementary, inflammatory responses and immune suppression are enriched pathways for the Q-MCTS (**Figure 4**). Furthermore, our analysis makes evidence that Q-MCTS phenotype points to the overrepresentation in inflammatory cytokines, which have a key role in cancer progression *via* the stimulation of the epithelial-to-mesenchymal transition, and augmentation of metastasis in cancer (53). Another important and recurrent result is the overrepresentation of the ferroptosis. This pathway is characterized by iron-dependent accumulation of reactive oxygen species (ROS) within the cell, leading to cell death. Therefore, activation of ferroptosis derives in a selective elimination of some tumor cells (54). Together, these results suggest that the Q-MCTS can selectively enhance an invasive phenotype. As a whole, these observations mirror an orchestrated response to integrate the cancer phenotype, and it is in agreement with the fact that different tumor clonal subpopulations can diversify their task to maintain their growth and malignancy (14).

### Outlook

Metabolic reprogramming plays an essential role in tumor development and metastasis. Besides, targeting cancer metabolism remains a great promise in developing anti-cancer therapies. As we propose here, several miRNAs may be controlling various metabolic pathways during MCTS progression. Although the model used in this study has limitations and the suggested interactions require subsequent experimental validation, we postulate the presence of new miRNAs-mRNA interactions that can modulate the metabolic landscape in the different cell populations that coexist during MCTS growth. In this context, other reports showed that miRNAs deregulation does not alter the

growth in normal cells, but it has a reduction in the growth of cancer cells (55–57). Although the progress in the effectiveness of miRNAs/anti-miRs delivery *in vivo* is still a major obstacle in clinics, our results highlight the miRNAs associated with metabolic changes in breast cancer as possible markers in peripheral blood since they are less labile than mRNAs and as therapeutic targets in cancer. Likewise, many functional activities of miRNAs and targets are unknown during tumor progression, so it is important to study them to understand how tumor cells propitiate its phenotype. Hopefully, our approaches and findings can be useful to verify experimentally these microRNA-mRNA interactions and explore their pragmatic implications for developing more effective cancer treatments that will target metabolic alteration within tumor subpopulations.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: ArrayExpress, Accession: E-MTAB-9741 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-9741/>).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

EM-O and OR-A designed the project and developed the methods. EM-O performed the experiments and the bioinformatic analysis. EM-O and AV-J developed the functional analysis.

## REFERENCES

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* (2004) 116:281–97. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Tüfekci KU, Öner MG, Meuwissen RLJ, Genç Ş. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *miRNomics: MicroRNA Biol Comput Anal* (2014) 1107:33–50. doi: 10.1007/978-1-62703-748-8\_3
- Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discovery* (2013) 12:847–65. doi: 10.1038/nrd4140
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* (2005) 120:15–20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* (2014) 20:460–9. doi: 10.1016/j.molmed.2014.06.005
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* (2005) 435:834–8. doi: 10.1038/nature03702
- Zaheer U, Faheem M, Qadri I, Begum N, Yassine HM, Al Thani AA, et al. Expression profile of MicroRNA: An Emerging Hallmark of Cancer. *Curr Pharm Des* (2019) 25:642–53. doi: 10.2174/1386207322666190325122821
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* (2014) 9:287–314. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715
- Chen B, Li H, Zeng X, Yang P, Liu X, Zhao X, et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J Transl Med* (2012) 10:228. doi: 10.1186/1479-5876-10-228
- Fang R, Xiao T, Fang Z, Sun Y, Li F, Gao Y, et al. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J Biol Chem* (2012) 287:23227–35. doi: 10.1074/jbc.M112.373084

EM-O, AV-J, OR-A, VM, MV, and DL-E contributed with discussions in all sections. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

The authors thank the financial support from an internal grant of the National Institute of Genomic Medicine.

## ACKNOWLEDGMENTS

OR-A thanks to the financial support coming from INMEGEN México. EM-O is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 735969. Thanks to the training and support in the MCTS culture procedures to Dr. Edna Ayerim Mandujano-Tinoco and Dr. Alfredo Garcia-Venzor, to Linda Nelly Patiño Uriostegui for FACs analysis, to José Luis Cruz Colin for his support in cell culture and Alfredo Mendoza-Vargas for his support in the sequencing protocols (Instituto Nacional de Medicina Genómica).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.582396/full#supplementary-material>

- Ahmad A, Aboukameel A, Kong D, Wang Z, Raz A, Sarkar FH. Abstract 3361: Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells. *Tumor Biol* (2011) 71(9):3400–9. doi: 10.1158/1538-7445.am2011-3361
- Jiang S, Zhang L-F, Zhang H-W, Hu S, Lu M-H, Liang S, et al. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells. *EMBO J* (2012) 31:1985–98. doi: 10.1038/emboj.2012.45
- Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* (2001) 7:2168–81.
- Muciño-Olmos EA, Vázquez-Jiménez A, de León UA-P, Matadamas-Guzman M, Maldonado V, López-Santaella T, et al. Unveiling functional heterogeneity in breast cancer multicellular tumor spheroids through single-cell RNA-seq. *Sci Rep* (2020) 10:1–16. doi: 10.1038/s41598-020-69026-7
- Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* (1998) 35:461–78. doi: 10.1177/030098589803500601
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *J Clin Oncol* (2005) 23:9408–21. doi: 10.1200/jco.2005.01.5594
- Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* (2015) 17:1–15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004
- Laurent J, Frongia C, Cazales M, Mondesert O, Ducommun B, Lobjois V. Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer* (2013) 13:73. doi: 10.1186/1471-2407-13-73
- Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* (2000) 36:193–207. doi: 10.1016/S1040-8428(00)00086-X
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* (2018) 68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492



21. Mandujano-Tinoco EA, Garcia-Venzor A, Muñoz-Galindo L, Lizarraga-Sanchez F, Favela-Orozco A, Chavez-Gutierrez E, et al. miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* (2017) 1864:1642–55. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.023
22. Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* (2016) 32:3532–4. doi: 10.1093/bioinformatics/btw413
23. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* (2016) 32:3047–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354
24. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (2014) 30:2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
25. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* (2016) 34:525–7. doi: 10.1038/nbt.3519
26. Soneson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* (2015) 4:1521. doi: 10.12688/f1000research.7563.1
27. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* (2012) 9:357–9. doi: 10.1038/nmeth.1923
28. Ziemann M, Kaspi A, El-Osta A. Evaluation of microRNA alignment techniques. *RNA* (2016) 22:1120–38. doi: 10.1261/rna.055509.115
29. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* (2014) 30:923–30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
30. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* (2012) 40:4288–97. doi: 10.1093/nar/gks042
31. Andrés-León E, González Peña D, Gómez-López G, Pisano DG. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database* (2015) 2015:bav035. doi: 10.1093/database/bav035
32. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res* (2019) 47:W199–205. doi: 10.1093/nar/gkz401
33. Andrés-León E, Núñez-Torres R, Rojas AM. miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci Rep* (2016) 6:25749. doi: 10.1038/srep25749
34. Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* (2000) 28:27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27
35. Hsu S-H, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* (2012) 122:2871–83. doi: 10.1172/JCI63539
36. Cui M, Wang Y, Sun B, Xiao Z, Ye L, Zhang X. MiR-205 modulates abnormal lipid metabolism of hepatoma cells via targeting acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* (2014) 444:270–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.051
37. Tili E, Michaille J-J, Luo Z, Volinia S, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. The down-regulation of miR-125b in chronic lymphocytic leukemias leads to metabolic adaptation of cells to a transformed state. *Blood* (2012) 120:2631–8. doi: 10.1182/blood-2012-03-415737
38. Liu W, Le A, Hancock C, Lane AN, Dang CV, Fan TW, et al. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc Natl Acad Sci* (2012) 109:8983–8. doi: 10.1073/pnas.1203244109
39. Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H (+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol* (1993) 265:C1015–29. doi: 10.1152/ajpcell.1993.265.4.C1015
40. Feng S, Zhu G, McConnell M, Deng L, Zhao Q, Wu M, et al. Silencing of atp6v1c1 prevents breast cancer growth and bone metastasis. *Int J Biol Sci* (2013) 9:853–62. doi: 10.7150/ijbs.6030
41. Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* (2008) 18:750–60. doi: 10.1093/glycob/cwn071
42. Hsu J-M, Xia W, Hsu Y-H, Chan L-C, Yu W-H, Cha J-H, et al. STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. *Nat Commun* (2018) 9:1908. doi: 10.1038/s41467-018-04313-6
43. Yin J, Ren W, Huang X, Deng J, Li T, Yin Y. Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Front Immunol* (2018) 9:1697. doi: 10.3389/fimmu.2018.01697
44. Port AM, Ruth MR, Istfan NW. Fructose consumption and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* (2012) 19:367–74. doi: 10.1097/med.0b013e328357f0cb
45. Fan X, Liu H, Liu M, Wang Y, Qiu L, Cui Y. Increased utilization of fructose has a positive effect on the development of breast cancer. *PeerJ* (2017) 5:e3804. doi: 10.7717/peerj.3804
46. Gao W, Li N, Li Z, Xu J, Su C. Ketohexokinase is involved in fructose utilization and promotes tumor progression in glioma. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 503:1298–306. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.040
47. Wang Z-H, Zhang Y-Z, Wang Y-S, Ma X-X. Identification of novel cell glycolysis related gene signature predicting survival in patients with endometrial cancer. *Cancer Cell Int* (2019) 19:1–13. doi: 10.1186/s12935-019-1001-0
48. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J* (2012) 279:1177–97. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x
49. Tan J, Yu C-Y, Wang Z-H, Chen H-Y, Guan J, Chen Y-X, et al. Genetic variants in the inositol phosphate metabolism pathway and risk of different types of cancer. *Sci Rep* (2015) 5:8473. doi: 10.1038/srep08473
50. Tong X, Zhao F, Thompson CB. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* (2009) 19:32–7. doi: 10.1016/j.gde.2009.01.002
51. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Müller B, Brockmöller S, Seppänen-Laakso T, et al. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res* (2011) 71:3236–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3894
52. Yue X, Lukowski JK, Weaver EM, Skube SB, Hummon AB. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Comparison of 2D and 3D Colon Cancer Cell Culture Models. *J Proteome Res* (2016) 15:4265–76. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00342
53. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* (2014) 15:e493–503. doi: 10.1016/s1470-2045(14)70263-3
54. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* (2012) 149:1060–72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042
55. Hatzia Apostolou M, Polytrachou C, Iliopoulos D. miRNAs link metabolic reprogramming to oncogenesis. *Trends Endocrinol Metab* (2013) 24:361–73. doi: 10.1016/j.tem.2013.03.002
56. Drakaki A, Hatzia Apostolou M, Iliopoulos D. Therapeutically Targeting MicroRNAs in Liver Cancer. *Curr Pharm Des* (2012) 19:1180–91. doi: 10.2174/138161213804805658
57. Chan B, Manley J, Lee J, Singh SR. The emerging roles of microRNAs in cancer metabolism. *Cancer Lett* (2015) 356:301–8. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.011

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Muciño-Olmos, Vázquez-Jiménez, López-Esparza, Maldonado, Valverde and Resendis-Antonio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



OPEN

# Unveiling functional heterogeneity in breast cancer multicellular tumor spheroids through single-cell RNA-seq

Erick Andrés Muciño-Olmos<sup>1,2,7</sup>, Aarón Vázquez-Jiménez<sup>2,7</sup>, Ugo Avila-Ponce de León<sup>2,3</sup>, Meztli Matadamas-Guzman<sup>1,2</sup>, Vilma Maldonado<sup>5</sup>, Tayde López-Santaella<sup>4</sup>, Abrahan Hernández-Hernández<sup>4</sup>✉ & Osbaldo Resendis-Antonio<sup>2,6</sup>✉

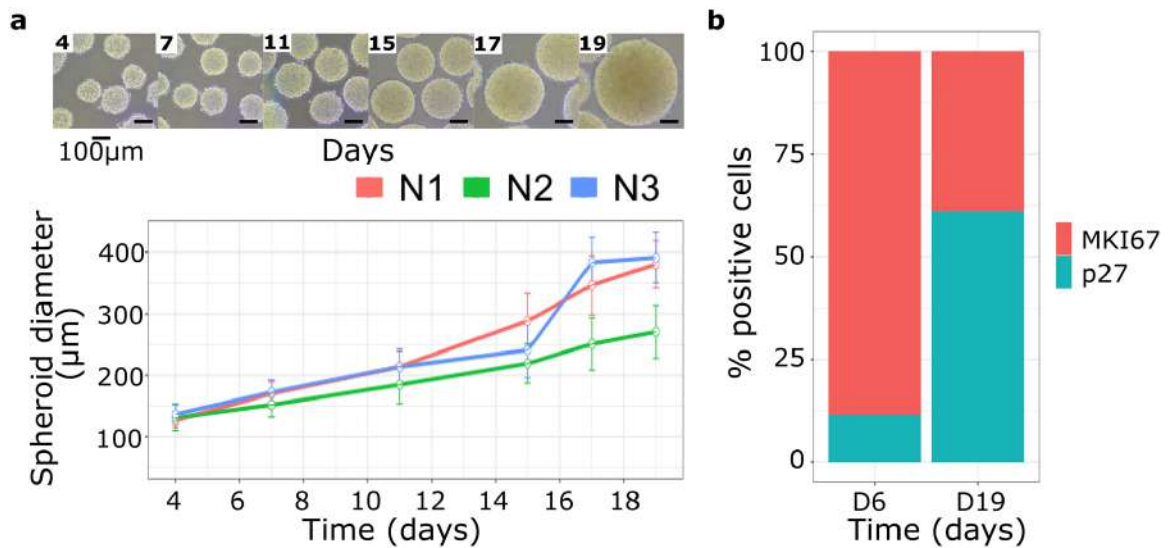
Heterogeneity is an intrinsic characteristic of cancer. Even in isogenic tumors, cell populations exhibit differential cellular programs that overall supply malignancy and decrease treatment efficiency. In this study, we investigated the functional relationship among cell subtypes and how this interdependency can promote tumor development in a cancer cell line. To do so, we performed single-cell RNA-seq of MCF7 Multicellular Tumor Spheroids as a tumor model. Analysis of single-cell transcriptomes at two-time points of the spheroid growth, allowed us to dissect their functional relationship. As a result, three major robust cellular clusters, with a non-redundant complementary composition, were found. Meanwhile, one cluster promotes proliferation, others mainly activate mechanisms to invade other tissues and serve as a reservoir population conserved over time. Our results provide evidence to see cancer as a systemic unit that has cell populations with task stratification with the ultimate goal of preserving the hallmarks in tumors.

Cancer studies have established that tumors are complex and heterogeneous systems. These properties are grounded on genetic variations and diverse microenvironmental conditions that induce sizable differences in gene expression profiles, surface biomarkers, metabolism, growth rates, morphology, metastatic potential and response to therapy at a single cell level<sup>1,2</sup>. From a clinical point of view, intratumoral (inside tumors) and inter-tumoral (between tumors) heterogeneity are critical factors that influence diagnosis outcomes and treatments in patients<sup>1,3</sup>. Given their relevance, the understanding of tumor heterogeneity has emerged as a fundamental aim to improve treatment efficiency<sup>4</sup>.

To portray cancer intratumoral heterogeneity in human tissues, tumor microenvironment and their cellular population have been depicted in genome atlases for different cancer types<sup>5-7</sup>. Notwithstanding the relevance of these atlases, big challenges into experimental designs come across to survey heterogeneity in human biopsies. For instance, proper cell dissociation methods must be implemented to reduce the risk of altering the transcriptional landscape<sup>8</sup>. Additionally, it is hard to trace tumor dynamics due to invasive procedures and the inherent risk to patients<sup>9</sup>. Interestingly, to overcome previous limitations, xenograft and organoid models have been used to emulate the temporal and three-dimensional organization of complex cell populations<sup>10</sup>.

On the other hand, intratumoral heterogeneity is an intricate property that influences even isogenic models providing complementary pro-survival functional roles, called functional heterogeneity<sup>11,12</sup>. Functional heterogeneity is hard to be evaluated in the previously described models because of tumor complex interactions<sup>9</sup>. To get the functional heterogeneity basics and design optimal treatments to overcome cancer, in vitro studies are the

<sup>1</sup>PhD Program in Biomedical Sciences, UNAM, Mexico City, Mexico. <sup>2</sup>Human Systems Biology Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>PhD Program in Biological Sciences, UNAM, Mexico City, Mexico. <sup>4</sup>Biología de Células Individuales (BIOCELIN), Laboratorio de Investigación en Patología Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico. <sup>5</sup>Epigenetic Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 Mexico City, Mexico. <sup>6</sup>Coordinación de La Investigación Científica -Red de Apoyo a La Investigación, UNAM, Mexico City, Mexico. <sup>7</sup>These authors contributed equally: Erick Andrés Muciño-Olmos and Aarón Vázquez-Jiménez. ✉email: abrahan.hernandez@himfg.edu.mx; oresendis@inmegen.gob.mx



**Figure 1.** (a) Multicellular Cancer Tumor Spheroids of breast cancer cell line MCF7 diameter along time. We performed three independent biological replicates of the MCF7-MCTS culture kinetic denoted as N1, N2 and N3. Points and bars represent the average Feret diameter with their respective standard deviation for each replicate and time-point. Values can be found in Supplementary Table S1. (b) Immunophenotyping with flow cytometry analysis measuring MKI67 and p27 biomarkers at days 6 and 19, expression of both markers for the two-time points showed statistical difference with a  $p$  value  $< 0.05$  using a non-paired t-student test with equality of variances.

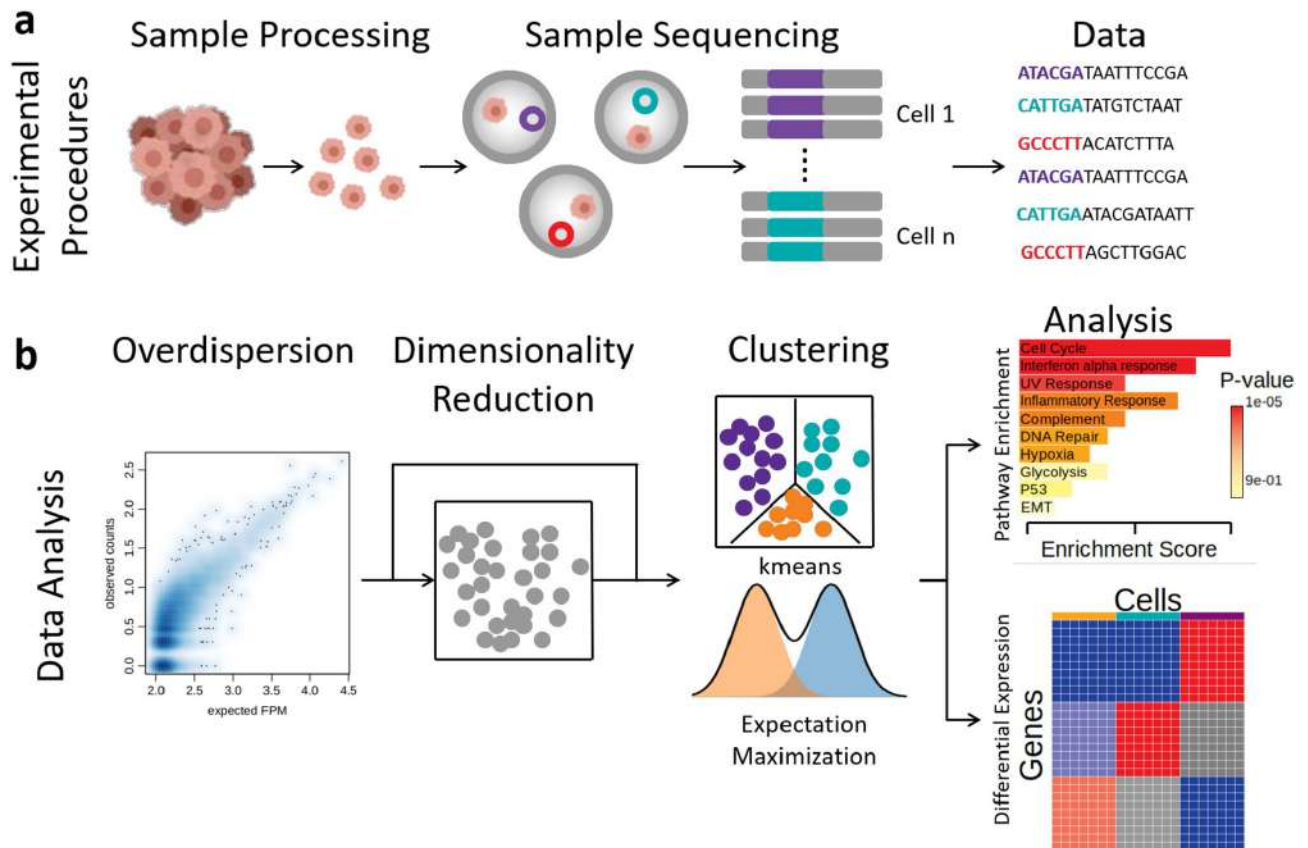
gold standard to build a comprehensive assessment of cancer development. Additionally, they are one of the best options to perform longitudinal studies. This approach has been used to study glioblastoma clonal drug resistance by the cooperation of two sensitive clones<sup>12</sup>. In vitro models establish a valuable platform for the experimental assessment of testable hypotheses emerging from quantitative approaches, particularly those related to selected mechanisms associated with therapeutic applications<sup>13</sup>.

Conversely, monolayer in vitro models lack the three-dimensional organization that is fundamental in cancer<sup>9</sup>. Otherwise, multicellular tumor spheroids (MCTS) are scaffold-free self-assembled aggregates of isogenic cancer cells displaying an intermediate complexity between monolayer cell cultures and in vivo solid tumors<sup>14</sup>. MCTS develop a heterogeneous microenvironment that leads to the generation of proliferative, quiescent, and necrotic/apoptotic subpopulations<sup>15,16</sup>. This in vitro cancer model is valuable as they mimic the first avascular stages of tumor formation, and exhibit aggressiveness features such as multicellular resistance, migration, and invasion<sup>17</sup>. Additionally, it provides an experimental framework to carry out tumor growth, hypoxia, migration-invasion, drug screening, and radiosensitivity studies<sup>15,18</sup>. Furthermore, the similarities between MCTS and tumors, plus their experimental advantages, such as reproducibility and evaluations at several time points, makes them an appealing model to unravel their heterogeneous composition of clonal subpopulations at different stages of growth and figure out their functional interrelationship.

In this paper, we present the analysis of the functional heterogeneity that promotes tumor survival for an in vitro model. To this end, we used the MCF7 cell line, a well-established in vitro model of invasive luminal A subtype of breast cancer with HR+/HER2- phenotype, which has been useful to dissect breast cancer mechanisms<sup>19-21</sup>. On top of that, luminal A subtype represents the most frequent cancer among women worldwide<sup>22-25</sup>. To characterize functional heterogeneity in tumor development, we carried out a two-time points study during the growth of MCF7 MCTS. Our experimental design allowed us to obtain the gene expression profile of 364 single cells collected at 6 and 19 days of growth. To describe undergoing functional pathways and cellular processes for each cell subpopulation, we performed an integrative data-driven approach combining clustering algorithms, single-cell differential gene expression analysis, and gene set enrichment analysis. Our data revealed that despite the temporal progression of MCTS, they were permanently integrated by three major cellular subpopulations with complementary functional properties: proliferative, invasive/evasive, and a reservoir. Therefore, we postulate that self-organized subpopulations emerge as functional stratification mechanisms to ensure tumor progression. This single-cell study on MCF7 provides the foundations for viewing cancer as a collaborative ecosystem that drives different and complementary hallmarks enhancing and promoting tumor survival during the temporal evolution of the tumor.

## Results

**Polarized processes through biomarkers expression.** MCF7 multicellular tumor spheroids (MCF7 MCTS) allowed us to study in vitro the relationship between functional heterogeneity and tumor progression. MCF7 MCTS were cultured for 19 days, and their diameter distribution was measured by image analysis of photos taken to the culture flask at three independent culture kinetics in different days of progression. Average Feret diameter and their respective standard deviation are shown for every time-point and replicate (Fig. 1a). For



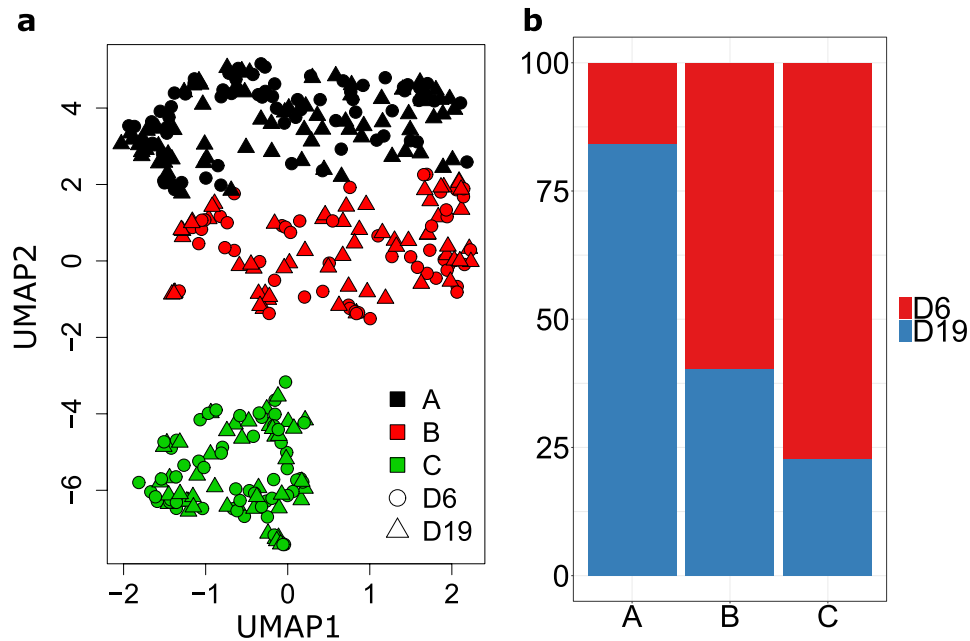
**Figure 2.** Methodological layout. **(a)** Experimental procedure to obtain single-cell transcriptome data from MCTS. **(b)** Data analysis pipeline followed to obtain the functional heterogeneity description.

each measurement, the number of quantified spheroids varied from 16 to 116, with an average diameter ranging between 126 and 391  $\mu\text{m}$  (Supplementary Table S1). In all cases, measured diameters did not exceed 450  $\mu\text{m}$ , the limit-size that spheroids can reach with a low rate of necrotic cores produced due to oxygen and nutrient gradients; nevertheless, samples from the 19th day still had necrotic cores but qualitatively in less proportion<sup>26</sup>.

As can be seen in Fig. 1a, MCTS diameter increased linearly with time. As tumors increase in size, cellular composition changes as a natural evolution of the disease. In order to survey tumor heterogeneity over time, we evaluated the expression of MKI67 and p27. MKI67 is a common proliferation biomarker expressed only during active phases of the cell cycle<sup>27</sup>, whereas p27 is a cell cycle arrest biomarker<sup>28</sup>. MCTS were properly aggregated on day 6 and reached their growth capabilities on day 20. After day 20, almost all spheroids developed necrotic cores, as already established<sup>26</sup>. Using immunophenotyping with flow cytometry, we found major differences of MKI67 and p27 biomarkers between the 6-day (D6) and the 19-day (D19) spheroids (Supplementary Figure S1). We noticed that almost all cells conforming D6 spheroids overexpressed MKI67 compared with D19 spheroid cells. On the contrary, D19 cells overexpressed p27 (Fig. 1b). Our data showed that our MCTS model comprised two subpopulations with differences in their functionality over time. Therefore, based on the expression of p27 and MKI67, we found a proliferative enriched tumor and a quiescent enriched tumor in D6 and D19 spheroids, respectively. To get more insights about this heterogeneity and the transcriptional differences in subpopulations, we performed single-cell RNA-seq of D6 and D19 MCF7 MCTS.

**Insights of functional heterogeneity.** To elucidate the connection between subpopulation composition and task diversification in tumors, we performed single-cell RNA-seq from MCF7 MCTS at 6 and 19 days of development. First, MCTS were disaggregated, filtered to exclude dead cells, encapsulated in drops, and the RNA of isolated single cells was labeled. Then, next-generation sequencing technology was applied to obtain single-cell gene expression profiles (13,589 genes) of 364 cells in both time points. Secondly, to obtain ongoing cellular processes, the overdispersion of gene expression for all cells was computed, and cells were clustered without a predefined number of clusters. Finally, we applied gene set enrichment and differentially expression analyses to describe and characterize functional heterogeneity. The methodological layout followed is depicted in Fig. 2.

*Clustering single-cell data to identify subpopulations in MCF7 MCTS.* Aiming to identify subpopulations in MCTS, the distance matrix of overdispersion was projected into the bidimensional UMAP space (Uniform Manifold Approximation and Projection)<sup>29</sup> (Fig. 3a). Dimensionality reduction projection suggested that there is no separation between time samples. Therefore, we combined all the data and grouped using the K-means clustering algorithm. By doing so, cells with similar characteristics were grouped despite differences in time samples.



**Figure 3.** (a) Data clustering using K-means algorithm. Three clusters (black, red, green points) were identified and represented on a 2D UMAP plot. Circles and triangles represent the sample time of days 6 and 19, respectively. (b) Normalized proportion of cells from D6 and D19 time points in each cluster.

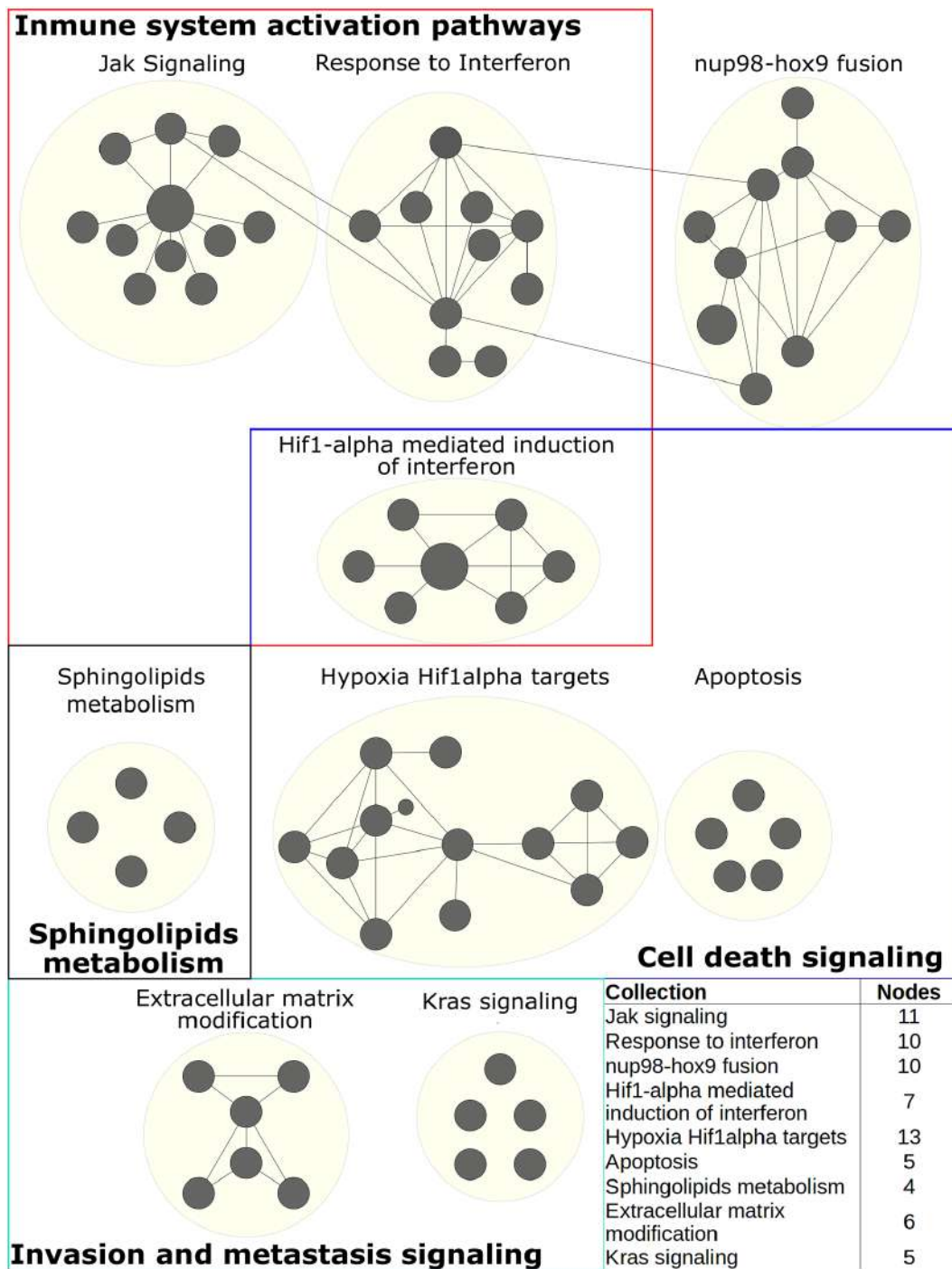
Three clusters, each one with different proportions of cells from D6 and D19 samples (Fig. 3b). Cluster A had around 85% of D19 cells, Cluster C around 80% of D6 cells, and cluster B had a homogeneous mix of D6 and D19 cells. Consequently, the three subpopulations coexisted throughout MCTS development. Although the clustering methods established similarities and differences in data, there was no information about the functional roles of cells grouped in each cluster.

*Characterization of clusters and mapping their biological functionality.* We evaluated the functional composition across clusters by pathway enrichment analysis. Using the GSEA tool<sup>30</sup>, we evaluated the correlation between our data and established gene sets to find overrepresented biological pathways. For Cluster A the number of positive enriched pathways was 344 with an FDR < 0.05 and a *p* value < 0.01. Supplementary Figure S2 shows the barplot for the 15 enriched gene sets of the MSigDB hallmark collection; interestingly, results suggest an activation of the immune system response. See Supplementary Table S2 for a full list of the enriched pathways.

In order to visualize and capture the global scope of the activated biological functions positively associated with Cluster A, we built a network based on the enriched pathways and the number of genes shared between them. We focused our analysis on pathways that shared a fraction of genes among them. Therefore, 71 of the total genesets were associated into different collections describing general processes. Enriched pathways for every collection are shown in Supplementary Table S3. Figure 4 shows the enriched map for the overall positive enriched pathways to Cluster A compared with the other two clusters. Every node represents an enriched pathway, and its size indicates the number of overexpressed genes in the specific geneset. To represent interconnectivity and genes overlapping between pathways, we computed the Jaccard index between the set of genes integrating each pair of pathways. When the Jaccard index was above 0.4, we connected the nodes indicating that both pathways shared at least 40% of their genes. Finally, yellow circles represent a common process by the association of similar enriched pathways in higher-level processes given a specific biological function.

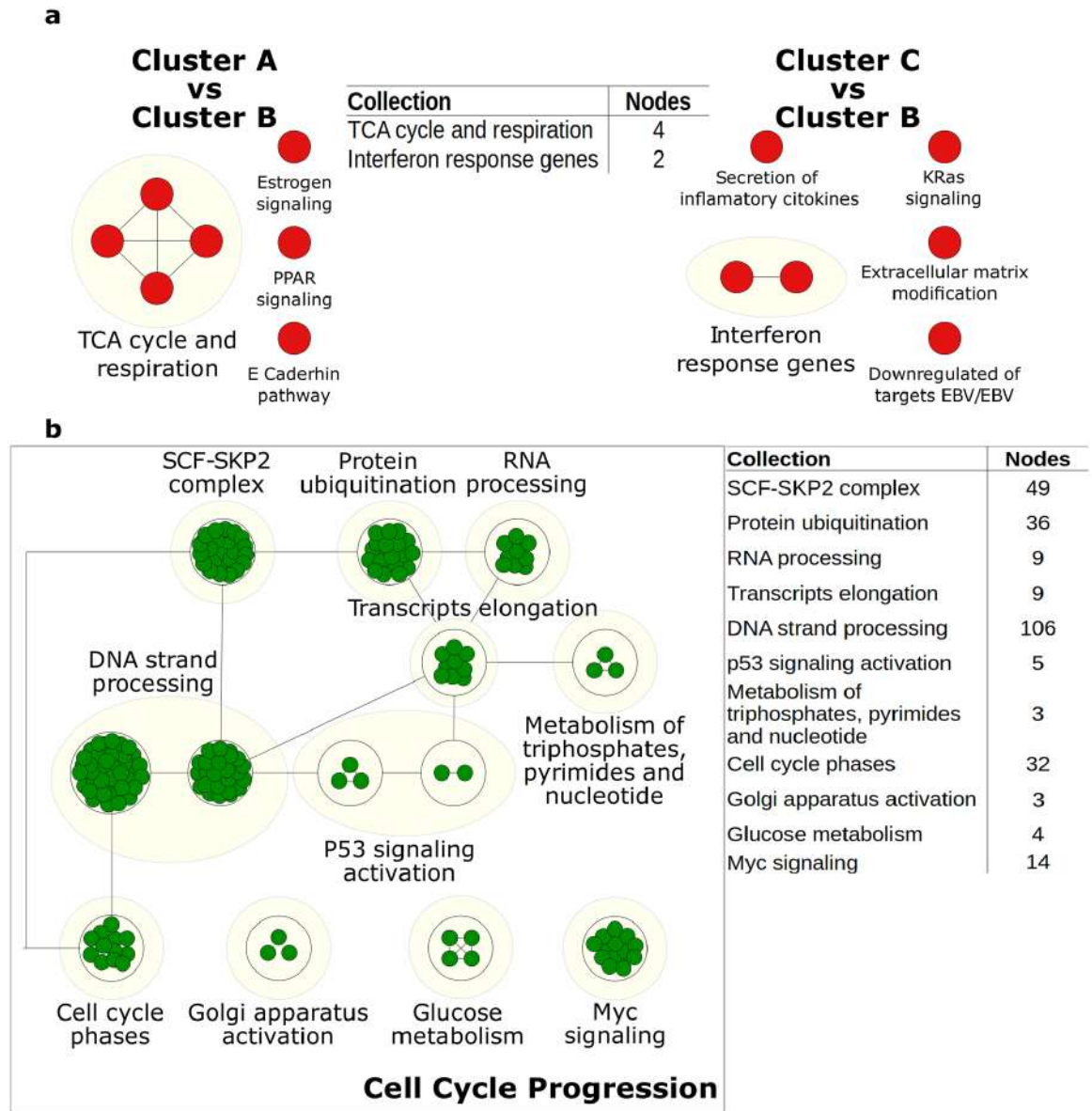
Overall enriched pathways for Cluster A were summarized in four categories: (1) Activation of immune processes. (2) Sphingolipids metabolism. (3) Invasion and metastasis; and (4) Cell death signaling pathways. The Activation of immune processes category had 28 overexpressed gene sets that mainly enclosed genes activated by the interferon pathway, HIF1-alpha, and the overactivation of the Jak signaling pathway. The Sphingolipids Metabolism category had four pathways, and it had the gene SPHK1 as a leading-edge gene. In concordance with this result, there is evidence that human breast cancer presents a dysregulation in sphingolipids metabolism<sup>31</sup>. Particularly, SPHK1 protein catalyzes the phosphorylation of sphingosine process associated with the mediation of pro-survival signaling and metastasis<sup>32</sup>. The Invasion and Metastasis category had 11 overexpressed gene sets that were associated with the extracellular matrix modification pathways and the activation of the KRAS signaling pathway. Finally, the Cell Death category comprised pathways of hypoxia and apoptosis. The Nup98-hox9 process has not been categorized. Besides, dysregulation of HOX genes can occur due to their fusion to nucleoporin (NUP98) and has been associated with malignant transformation<sup>33</sup>. Given our findings, we suggest Cluster A might have an invasive and pro-survival role.

Cluster B enrichment only showed an overall pathway related to interferon responsive genes. Therefore, to explore and associate a particular phenotype and identify an ongoing process, we performed pathway enrichment



**Figure 4.** Positive enriched map for Cluster A. Each black circle (node) represents a pathway, circle size represents the number of genes represented between the gene sets and data. Links between pathways were established when 2 pathways had a Jaccard index > 0.4, given the expressed genes. Colour squares denote a category that comprises several collections (yellow circles) with shared biological function. The embedded table shows the number of pathways enriched in each collection. All the enriched pathways had an FDR < 0.05 and a *p* value < 0.01.

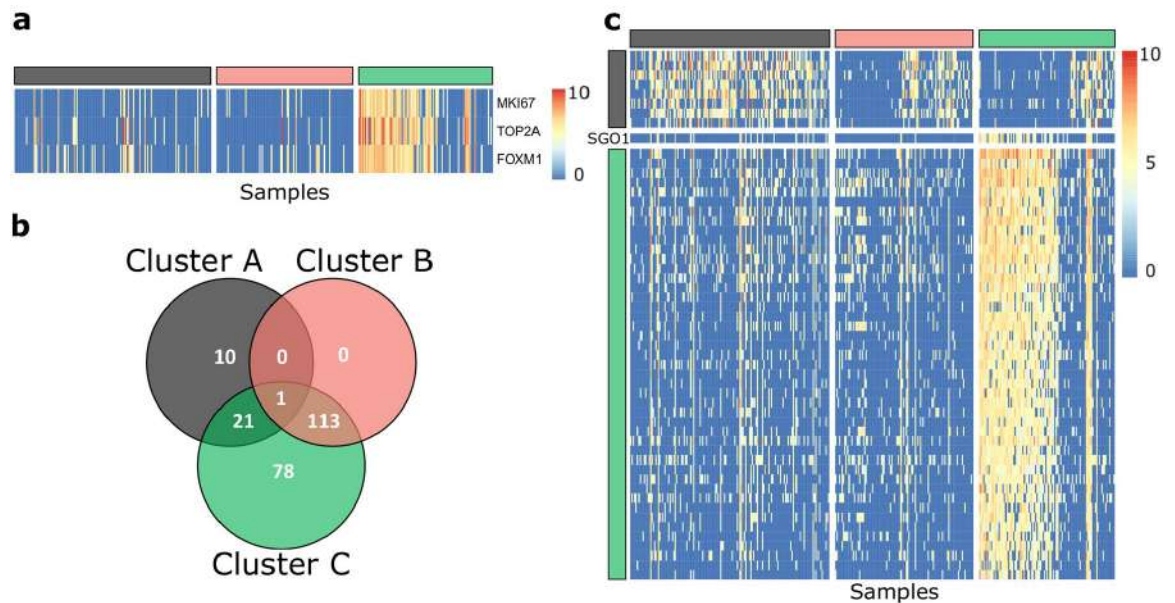
by pairs (Fig. 5a and Supplementary Figure S3). Enrichment analysis for Cluster B versus Cluster A showed seven positive correlated pathways with an FDR < 0.05 and *p* value < 0.01. Under this comparison, there is an overactivation of the TCA cycle and electron transport chain genes. Also, we observed an enrichment of genes related to transcriptional activation under estrogens stimuli and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). Finally, cell adhesion processes might be taken part in this cluster as E-cadherin is typically expressed in epithelial cells<sup>34</sup>. On the other hand, Cluster B vs Cluster C comparison had 6 positive enriched pathways. Cluster B displayed similar results to Cluster A, such as the activation of genes related to interferon and cytokines



**Figure 5.** Positive enriched maps, each green and red circles are nodes that represent a pathway. Yellow circles related a collection with a biological function; tables show the number of pathways enriched in every collection. Links between pathways were established when 2 pathways or collections had a Jaccard index > 0.4 by the expressed genes. All the enriched pathways have an FDR < 0.05 and a *p* value < 0.01. (a) Enriched pathways for cluster B given the paired-comparison with other clusters. (b) Enriched pathways for cluster C, black square associate all collections with a high-end biological process.

secretion. In addition, pathways of extracellular matrix modification and KRAS were overexpressed. Despite that enriched gene sets are limited due to Cluster B similarities in their gene expression profiles with the other clusters, the variability in data cannot be explained just by two clusters hence Cluster B is important to be considered as a unique subgroup. According to the polarized results of Cluster B, we hypothesize the existence of a transition subpopulation or reservoir with a backup function. All the positive enriched pathways are shown in Supplementary Table S4, Supplementary Table S5 and Supplementary Figure S3.

Regarding Cluster C, we found 445 positive enriched pathways with an FDR < 0.05 and a *p* value < 0.01, 274 of them belong to 11 collections that point to one big category: cell cycle progression. Supplementary Figure S4 shows the barplot for the 22 enriched gene sets of the hallmarks and KEGG MSigDB collections, the full list of the enriched pathways and the enriched pathways for every collection are presented in Tables S6 and S7. Interestingly, Cluster C enriched map and their pathways collections (Fig. 5b) showed upregulation of every phase of the cell cycle, compared to clusters A and B. Therefore, processes like DNA replication, transcription, and translation with their particular maturation were happening in Cluster C cells. In agreement, genes regulated by p53 and Myc have differential roles linked to cell proliferation. This cluster seems to be metabolizing macromolecules like glucose and phosphate bases. It supplies evidence of a direct relationship between cell cycle activation/progression and metabolism of amino acids, purine, and pyrimidine. Consequently, there are insights that Cluster C cells



**Figure 6.** Differentially expressed genes. (a) Heatmap of genes TOP2A, MKI67, and FOXM1. Log fold change  $> 1.5$  and  $p < 0.05$ . Colors yellow and red represent the low and high expression, respectively. (b) Venn diagram for the differentially expressed genes for every cluster. c. Heatmap of the marker genes for each cluster with a  $|\log_2(\text{FC})| > 2$  and a  $p < 0.01$  (empirical  $p$  value estimation). Rows are the markers genes for every cluster and columns are the cluster samples.

were proliferating. We confirmed the expression of MKI67, FOXM1, and TOP2A as proliferation markers<sup>35</sup> in our gene expression data for Cluster C (Fig. 6a). Altogether, we identified that clusters A and C were associated with specific functional pathways, while Cluster B remained as an undefined group.

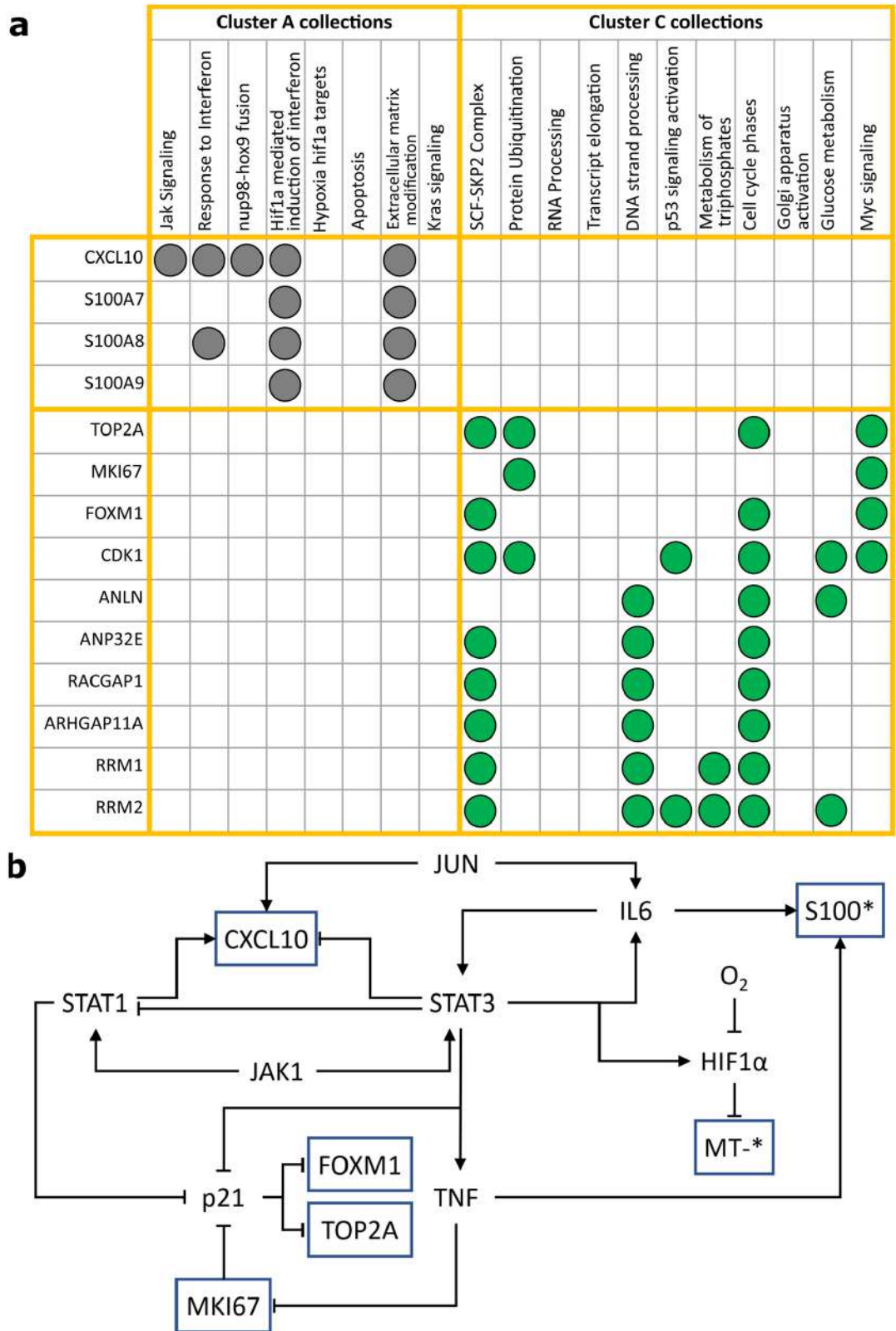
**Differential gene expression analysis.** To identify differentially expressed genes on the three clusters previously described, expression of each gene in every cluster was compared pairwise and filtered using a  $|\log_2(\text{FC})| > 1.5$  and a  $p$  value  $< 0.01$ . Figure 6b shows the Venn diagram using the results of every comparison (Supplementary Table S8). As a result, we found a total of 223 up and downregulated genes corresponding to 3.71% of the entire set of evaluated genes. Among them, the expression profile of 89 genes was specific for clusters and not conditional for a specific pairwise comparison. These genes may be candidates to be markers genes of each cluster. In particular, we found that SGO1, a gene related to centromeric cohesion in mitosis<sup>36</sup>, is differentially expressed in all clusters (center of the Venn diagram). Figure 6c shows the landscape of the 55 overexpressed genes with the most significant log-ratios among clusters ( $|\log_2(\text{FC})| > 2$ , Supplementary Table S9).

**Key genes in functional heterogeneity.** So far, enriched pathways gave us insight into particular processes, and the differentially expressed analysis allowed us to know which genes had the highest expression among clusters. To be able to set the differentially expressed genes that govern the enriched pathways, we linked the above results. We matched the differentially expressed genes and the leading-edge genes with the most recurrence in collections described in the enriched maps for each cluster (Figs. 4 and 5).

Figure 7a shows the differentially expressed genes for cluster A and C that correlates with the enriched collections. The most overrepresented gene for Cluster A was CXCL10, which shapes the enrichment core for several associated collections: extracellular matrix modification, Jak signaling, response to interferon, nup98-hox9 fusion, and HIF1-alpha mediated induction of interferon (Figs. 4 and 7a). In summary, these functions described immune and migration-related processes. For instance, CXCL10 and its receptor CXCR3 play an essential role in metastasis in various cancer cells, including colorectal carcinoma cells, colon cancer, prostate cancer, melanoma, and glioma<sup>37</sup>. Moreover, CXCL10 is overexpressed in breast cancer, and their expression is positively correlated with advanced tumor stages<sup>38</sup>. Additionally, S100 genes (S100A7, S100A8, and S100A9) were pointed out as important according to our results, particularly S1008. They are associated with several Cluster A collections: response to interferon (S100A8), Hif1a mediated induction of interferon (S100A7, S100A8, and S100A9) and extracellular modifications (S100A7, S100A8, and S100A9). These genes may represent a link between inflammatory and metastatic processes. Even though these proteins are usually expressed in myeloid cells, such as neutrophils and macrophages, there is experimental evidence showing their overexpression in breast cancer<sup>39</sup>. We could not find a key gene in Cluster B because it was poorly pathway enriched and only had one differentially expressed gene.

Cluster C had well-known proliferation markers (MKI67, TOP2A, FOXM1, CDK1) as part of the enrichment core for this cluster (Figs. 6 and 7a). Moreover, ANLN, ANP32E, RACGAP1, and ARHGAP11A were also differentially expressed and are implicated in proliferation. Nevertheless, ANLN overexpression increases the migratory capacity of cells in breast cancer<sup>40</sup>. ANP32E-miR-141 axis participates in the regulation of cell proliferation,





**Figure 7.** (a) Association graph between differentially expressed genes (rows) and the collections obtained for the enriched maps. Circles indicate strongly enriched genes in a collection. Gray and green circles represent collections for clusters A and C, respectively. (b) Proposed interaction mechanism based on literature association with IPA. Arrows indicate activation and bars inhibition. The genes in blue squares are the ones overexpressed in the clusters. S100\* encloses S100A7, S100A8 and S100A9. MT-\* encloses genes related to respiratory chain (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-RNR1, MT-ND4L, MT-ND5, and MT-ND2).

	K-means		EM	
	UMAP	Var	UMAP	Var
A	342	253	184	23
B	1	0	47	20
C	446	441	144	20
D	–	–	6	493
E	–	–	2	–
F	–	–	302	–
G	–	–	466	–

**Table 1.** Number of enriched pathways by GSEA tool. Two clustering methods were used (K-means and EM) in two spaces, one dimensionally reduced (UMAP) and another without any reduction process (Var). The numbers represent the number of enriched pathways (FDR < 0.05 and  $p$  value < 0.01). Ndash symbol (–) represents the non-existence of that particular cluster. Gray, red, and green associate clusters with similarities based on the enriched pathways given a Jaccard Index equal to 0.7.

migration, and invasion in breast cancer cell lines<sup>40,41</sup>. RACGAP1 inhibits cell migration in Basal-like Breast Cancer cell lines, while ARHGAP11A promotes it<sup>42</sup>. Furthermore, other relevant genes are RRM1 and RRM2 due to their correlation to the metabolism of triphosphates. Both genes are the catalytic subunits of ribonucleotide reductase (RNR) that set the limiting step in dNTP synthesis, a process needed for proliferation. To expand this result, Cluster C cells overexpressed mitochondrial genes that are part of the respiratory complexes (MT-ND3, MT-ATP6, MT-CO2, MT-ND4, MT-CYB, MT-CO3, MT-ND2, MT-CO1, MT-ND5, and MT-RNR1) related to mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). Therefore, these observations suggest a metabolic rewiring among this subpopulation, needed to meet energy demands in the cancer cell<sup>43,44</sup>.

In conclusion, we found genes in subpopulations that might rule some cancer hallmarks in MCTS, ranging from metabolic rewiring to global functions like proliferation and migration. Our results highlight the question if there is a motif capable of regulating all cluster processes.

**Depicting a regulation motif.** To investigate if the previously described genes are interconnected between them and propose a possible genetic circuit that modulates MCF7 MCTS subpopulations, we identified upstream regulators interconnected with several identified genes, using the upstream regulators tool in Ingenuity Pathway Analysis software (IPA). So, we only considered mitochondrial genes, S100 family genes, CXCL10, FOXM1, TOP2A, and MKI67. As a result, we found eight upstream interacting genes (HIF1A, STAT1, STAT3, IL6, p21, JUN, TNF, and JAK1) and oxygen that might be the central regulation core. The motif with their regulatory associations is depicted in Fig. 7b. Arrows and bar-end connectors indicate activation and inhibition, respectively. Measured genes are shown in blue contour. Notably, most of these genes are cancer master regulators, and here we supply evidence that all subpopulations together shape a functional heterogeneity core.

**Robustness of the functional heterogeneity.** Previous results indicated functional heterogeneity among cell subgroups. To discard an induced bias due to dimensionality reduction and clustering methods, we repeated the analysis using the entire multivariable space and expectation-maximization (EM) clustering algorithm. EM is an unsupervised nonparametric method of classification that does not define a priori the number of clusters in the samples<sup>45</sup>. To ensure robust physiological interpretations, we applied four combinatorial analyses by considering two clustering algorithms (K-means and EM) into the full variance space (Var) and the UMAP projection. Each gene set enrichment analysis was performed with the same gene sets collection. Table 1 shows the number of enriched pathways with an FDR < 0.05 and a  $p$  value < 0.01 for all analyses, no additional restrictions were set for the enrichment score.

As Table 1 depicts, there are differences in the number of enriched pathways obtained for each combination of projected space and clustering methods. Meanwhile, UMAP and K-means suggested the presence of three main clusters, the number of clusters obtained from the EM algorithm using UMAP space was seven. Despite the EM algorithm being able to identify more clusters than K-means, we noted that the enriched pathways obtained suggests a functional correspondence between methodologies. To compare our previous findings with this new classification, we calculated the degree of association among clusters through the Jaccard index of the enriched pathways. Jaccard index was empirically fixed at 0.7 because it was the highest value where associations were found. Despite the different number of clusters obtained for each approach, we found consistency between them. For instance, clusters A, B, and C in EM-UMAP analysis correspond to A in the K-means analyses. D and E are related to B, and Clusters F and G are correlated to C. As Cluster B does not have a particular enriched pathway, we associated clusters with an undefined function. Table 1 shows the clusters obtained for each method, and colors indicate similar functional subpopulations; gray, red, and green cells correspond to the invasive, reservoir, and proliferation subpopulations, respectively. So, despite the differences in the number of clusters, the results described do not change, and it is possible to extract similar conclusions. These findings give us the confidence that results do not depend on a particular method.

On the other hand, to ensure the robustness of these findings we validated our results on a parallel study applying RNAseq with the same experimental setup. Despite the differences in their scope, we concluded that in general terms, both technologies are in agreement to identify crucial processes being altered during the spheroid progression, such as immune systems activation, cell cycle progression, and proliferative pathways (data not shown).

In conclusion, MCF7 MCTS single-cell analysis showed that isogenic cancer cells have different functions to ensure tumor progression. Determining that functions among cancer cells within a tumor is important to know why some cancer cells are resistant to treatments, causing cancer relapses in patients.

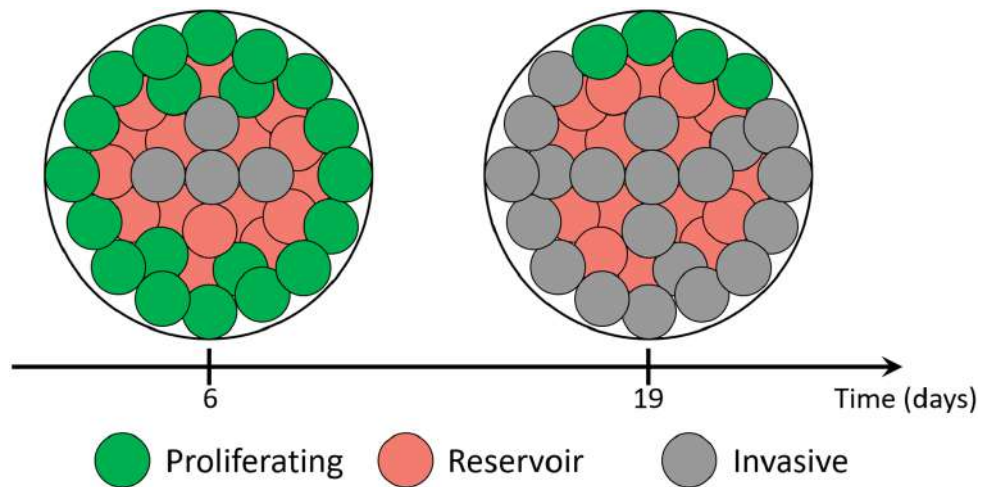
## Discussion

With the purpose to unveil functional heterogeneity during tumor progression, we examined the transcriptome of single cells from MCF7 MCTS at two-time points of tumor spheroid progression. Notably, our analysis allowed us to typify three time-invariant subgroups, each one with a particular functionality and genetic signature. As MCTS increases in size, oxygen and nutrients gradients are broadened, leading to a nutrient deprivation for cells closer to the spheroid core. Although we chose 19 days MCTS, they had nutrient deprivation even when they did not reach their maximum diameter. This phenomena leads us to believe that there were two ruling biological processes in our data, proliferation, and quiescence, one for each sampling time (Fig. 1b). In contrast with this hypothesis, we found three polarized states placed in independent subpopulations (Fig. 3a). Two of them majorly dominated by cells of a respective sample (clusters A and C) and a third one (Cluster B) with almost 30% of cells from both samples (Fig. 3b). Therefore, we concluded that there is not a unique biological process for a specific time point, several subpopulations coexist and might work together across time.

With the purpose to describe each subpopulation and their respective function, we performed gene-set enrichment and differentially expressed genes analysis. First, Cluster A enriched pathways comprised of several collections enlighten a strong activation of the immune system (Fig. 4). JAK/STAT signaling pathway has an anti-tumor defense and the maintenance of an active and long-term immune response<sup>46</sup>. As well, interferon response is praised as an important effector of anti-tumor immunity, capable of suppressing tumor growth<sup>47</sup>. However, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) facilitates tumor initiation and increases tumor fitness<sup>47</sup>. In addition, the immune response activation has been associated with metastasis and survival improvement driven by the induction of JAK/STAT3 pathway in several cancer types<sup>48</sup>. This immune activity is part of immune surveillance by presenting tumor-associated antigens, so tumor cells can be whipped out<sup>49</sup>. Nevertheless, immune cells recruitment is part of immune evasion<sup>50</sup>. As a first stage of it, tumor cells are recognized to be killed by T cells, NK cells, and macrophages. After the elimination stage, there is immunoediting in the major histocompatibility complex (MHC), followed by an evasion of tumor cells induced by immune selection<sup>51–53</sup>. In agreement with this, pathways related to antigen cross-presentation of the MHC1 were overrepresented in Cluster A (Supplementary Table S2). Although our model could only reproduce the beginning of the immune evasion process due to the lack of other immune response components, it gave useful information about their initiation. In addition, CXCL10 and S100 genes were linked to invasion and immune control (Fig. 7a). CXCL10 has a leading role in modulating cellular migration in the mouse breast cancer cell line 4T1<sup>54</sup>. Their immune role is mediated by the axis STAT1/IFN- $\gamma$  leading to the polarization of macrophages to M1 and the recruitment of T and NK cells due to the secretion of proinflammatory cytokines<sup>55,56</sup>. On the other side, S100 genes codes for proteins of a calcium-binding receptor family. Evidence relates them to proliferation, metastasis, and immune evasion in breast cancer<sup>57</sup>. In ER+ breast cancer, S100A7 limits the proliferation and motility of tumor cells by downregulating the  $\beta$ -catenin/TCF4 pathway<sup>58</sup>. Moreover, the heterodimer S100A8/S100A9 enhances epithelial-mesenchymal transition. It binds with RAGE forming a stabilized SNAIL via NF $\kappa$ B, which provides a perfect niche for tumor cell invasion<sup>59</sup>. Additionally, S100A7, S100A8, and S100A9 recruit tumor-associated macrophages (TAM) to promote a microenvironment for immune evasion<sup>60,61</sup>. All together supports that Cluster A orchestrates immune evasion and invasion.

Results related to Cluster B are not clear enough to be associated with a unique function. Given the exploration we made, Cluster B shared characteristics from clusters A and C. Given their functionality closeness with the others clusters, a well-reasoned explanation is that this cluster is an intermediate state which leads to having a multipotent reservoir subpopulation. Moreover, this speculation should be validated in future work.

Regarding Cluster C, results indicated a classical cancer proliferating subpopulation. Cluster C overexpressed genes and pathways involved in the cell cycle progression, which is associated with the development and continued growth of cancers (Fig. 5b). Interestingly, it expressed genes with a double-edged function. ANLN, ANP32E,



**Figure 8.** Change in the MCF7 MCTS subpopulations proportions over time. Every color represents a typified cluster.

RACGAP1, and ARHGAP11A genes have an impact on the migration phenotype<sup>40,41</sup> and they promote cellular proliferation. However, Cluster C was not associated with cell migration and invasion. This can be related to the fact that cells have latent phenotypes waiting for the correct stimuli to be manifested. This latency state of a particular population (in our experimental setup) may represent a transition pivot between the different clusters. On the whole, Cluster C is leading the important survival role of proliferating.

In terms of metabolism, the major functional differences were found between clusters A and C which impact the way they meet their energetic and metabolite demands. Contrastingly, results suggested Cluster A cells undergo glycolytic activity, while Cluster C cells overexpressed mitochondrial genes that conform respiratory complexes associated with OXPHOS (Supplementary Table S5). Although the glycolytic pathway is bio-energetically less efficient, it allows the adaptation to fluctuating oxygen availability and enables fast ATP production<sup>43,62</sup>, it is used in the presence or absence of oxygen and is associated with a malignant phenotype<sup>63,64</sup>. Moreover, some tumor cells use OXPHOS to produce energy and metabolites for pyrimidine biosynthesis<sup>65</sup>, which is related to the triphosphate metabolism, that maintains the correct levels of dNTPs for DNA replication and repair. dNTP synthesis is rate-limited by the reduction of ribonucleoside di- or tri- phosphates, carried out by RNR<sup>66</sup>. Cluster C overexpressed the RNR catalytic units (RRM1 and RRM2), and there is evidence that their inhibition is correlated to an increase in the migratory and metastatic potential<sup>67,68</sup>, as seen in Cluster A. We explain the representation of glycolytic pathways in our data due to the Warburg effect and to oxygen concentration on the spheroid layer. Given our results, we can expand the idea that glycolysis and OXPHOS are present in the same tumor accordingly with subpopulation functionality. So, these results agree that a common feature during cancer progression is metabolic rewiring<sup>44,69</sup>.

During cancer therapy, proper targeting of cell populations is one of the major challenges to optimize treatments. Overall, our study contributes with a proper heterogeneous model to identify targeted subpopulations. Development of cancer models capable of including heterogeneity is a major aim to balance between the optimal outcome of treatment and low risk of toxicity in patients. For example, although there are drugs that target IFN- $\gamma$ /CXCL10 pathway<sup>70</sup>, there are other subpopulations of cells with different properties that lead to tumor survival; the inhibition of both OXPHOS and glycolysis simultaneously in MCF7 and MDA-MB-231 cells with tamoxifen and glycolysis inhibitors increases the induced cytotoxicity<sup>71</sup>. So, functional heterogeneity must be taken into account in future clinical therapies.

So far, we identified that Cluster A had invasive and immune-adaptive characteristics, Cluster B remained as a backup subpopulation, and Cluster C promoted proliferation. All three together coexist with synergism, a feature developed as a survival strategy<sup>72</sup>. And possibly all subpopulations are regulated by a master complex motif (Fig. 7b). At this stage, several questions remain open for future studies like the motif robustness, how all cells transmit information about their microenvironment and the way these key role players can be affected to have a more efficient therapy regime.

Finally, one of our outstanding queries was the role of time in the MCF7 MCTS formation. We concluded that time determines the proportions of the three different subpopulations. Our results support the idea that metastasis is not the ultimate event in cancer, all processes have a systematic organization without a hierarchy as suggested in cancer development<sup>72</sup>. In agreement with our results, studies in glioblastoma solid tumors and cell lines demonstrate the existence of subpopulations with invasive and proliferative phenotype gene signatures<sup>73,74</sup>. Hence, the maintenance of clonal heterogeneity is an intrinsic property, where clones coordinate cooperatively growth, drug sensitivity, and motility<sup>12</sup>. Meanwhile, the proportion of proliferative and invasive subpopulations shifts with time, notably the reservoir remains constant (Fig. 8). The reservoir subpopulation might be an essential player in generating new tumors due to their shared characteristics with other clusters. Also, it is the most challenging to characterize because it does not have a differential marker even to develop a drug against him.

Single-cell studies had focused on describing intratumor heterogeneity by depicting the different cell subpopulations that structure a tumor. This global description had been conducted to find therapeutic targets and

to make the first steps to unveil mechanisms in cancer development among cell subtypes. Here, we concluded that in an isogenic population a cooperative task stratification takes place. Each subpopulation is functionally non-redundant but complementary to support the tumor survival. Finally, it is important to highlight the main limitation of this study and their subsequent conclusions lay on their inability to include more realistic tumor micro environment variables; such as, vascularization, epithelial-mesenchymal transition, interaction with other cells in tissues and the constraints imposed by the tumor microenvironment. Moreover, the major difference given time progression is the proportion, so the occurrence probability of every function changes according to the tumoral microenvironment. The present study draws one of the heterogeneity foundations in cancer and opens several lines of research worth pursuing in future work. It would be worthwhile to consider the depicted functional heterogeneity in the development treatment schemes considering the existence of multiple populations with unique characteristics, with the ultimate goal to increase treatment efficacy.

## Methods

**Experimental procedures.** *Monolayer cell culture.* Breast cancer cell line MCF7 (ATCC HTB-22TM) was grown in DMEM (ATCC 30-2002) containing 4 mM L-glutamine, 4500 mg/L glucose, 1 mM sodium pyruvate, and 1500 mg/L sodium. Media was supplemented with 10% v/v of FBS (ATCC 30-2020). Cells were incubated under a humidified atmosphere with 5% CO and 95% air at 37°C. For all experiments, 70–80% confluent monolayer cultures with less than 9 passages were used. MCF7 cell line was validated using STR analysis.

*Generation and disaggregation of Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) Cultures from MCF7.* The generation of spheroids was carried out using a liquid overlay technique. A single-cell suspension of MCF7 at a density of  $1 \times 10^6$  cells was loaded into 12.5 cm<sup>2</sup> suspension culture flasks (UltraCruz sc-200257) containing 5 mL of L-15 media (ATCC 30-2008) supplemented with 5% v/v of FBS. Flasks were placed in an orbital incubator at 37°C under constant orbital shaking of 59 rpm for 6 and 19 days<sup>26</sup>.

*MCTS diameter distribution.* The average and standard deviation of the MCTS Feret diameter were estimated by taking pictures directly to the spheroid flask during the culture kinetic. Pictures were obtained using a Nikon Eclipse TS 100 Inverted Microscope. We processed the images using MorphLibJ package<sup>75</sup>. The procedure above was performed for each biological replicate. We reported the average diameter, the standard deviation and the number of spheroids properly measured for each time point (Supplementary Table S1).

*MCF7 MCTS disaggregation.* For disaggregation, the 6 and 19 day-old spheroids were transferred to 1.5 mL tubes. The spheroids were washed with PBS 1X (VWR 97062-732). Accutase (Invitrogen 00-4555-56) was added and the reaction was carried out for 45 min at 37°C with orbital shaking. Every 5 min the spheroids were gently pipetted. To ensure optimal disaggregation, Trypsin–EDTA (0.25% Trypsin, 1 mM EDTA) solution was added for no more than 5 min at 37°C. The trypsin reaction was stopped by adding media with FBS in a 1:1 ratio. Cells were collected by centrifugation and suspended in 0.1% BSA in PBS (CST BSA #9998) solution.

*MCTS culture time points selection.* To capture cell heterogeneity four-time points were selected to explore the abundance of cells enriched on proliferative and quiescent populations. The first time point was 6 days of culture because MCTS were properly formed and aggregated. The next time point was selected exploiting MCF7 duplication time ~ 36 h, so the next point was 8. At 20 days of MCTS culture 90% of the sample had necrotic cores and maximum volume was reached, while samples taken from the 19th day still had necrotic cores, but in less proportion<sup>26</sup>. Therefore, we chose 24 and 48 h earlier (17 and 19 days) that the experimental model gets through its limits.

*Sorting of cellular subpopulation from MCTS time points.* After MCTS disaggregation of the 6, 8, 17, and 19 day-old spheroids. Cells were transferred to 1.5 mL tubes and suspended in 500 µL of PBS 1X (VWR 97,062–732). For MCTS fixation 500 µL of paraformaldehyde 4% w/v solution was added and the reaction was carried out for 10 min at room temperature. We removed the paraformaldehyde by washing 3 times with PBS 1X. MCTS samples were stored at 4 °C for a maximum period of 24 h after proceeding with permeabilization. For permeabilization, 450 µL of methanol 99.9% (MERK 34860-100ML-R) previously chilled in ice was added to the cells and the reaction was carried out for 30 min in ice. Before proceeding with immunostaining  $1 \times 10^6$  permeabilized cells were transferred to 15 mL centrifuge tubes (Corning CLS430055-100EA). Cells were washed twice with 3 mL of 5% w/v BSA-PBS solution. Cells from all-time point samples were immunostained by adding the proliferation (MKI67: Cell-signaling 11882) and quiescent marker (p27: Cell-signaling 12184) according to manufacturer procedure. Finally, cell sorting was done in a FACSAria Cell Sorter.

*Isolation of single cells from MCF7 spheroids cultures.* All scRNAseq procedures suggest a viable population higher than 90%. To this end, the viability of cells in suspensions was increased by removing dead cells with the dead cell removal kit (Miltenyi Biotec Inc. Order No. 130-100-008). Briefly, cells were centrifuged at 1500 rpm, resuspended and loaded into a LS column. Living cells were eluted with 12 mL of the binding buffer. Finally, cells were pelleted and resuspended in 1 mL of 0.1% BSA in PBS. Cell concentration and viability were assessed using trypan blue with the TC20TM automated cell counter.

*Single-Cell RNA-Seq Library Construction and Sequencing.* Cell suspension from the previous step was diluted to a final concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells/mL with 0.1% BSA in PBS, and at least 6 µL of these final dilution sus-

pension were needed as Input for the Bio-Rad ddSEQ Single-Cell Isolator (Illumina Bio-Rad SureCell WTA 3' Library Prep). As viability and cell numbers are critical, three technical replicates of assessment were performed with the TC20 counter to ensure optimal conditions, i.e., cell viability > 90% and  $2.5 \times 10^6$  cell/mL. Then, two technical replicates, of 6 and 19 day-old spheroids respectively, were loaded onto the 4-sample cartridge for the ddSEQ. Isolation of single cells, library preparation, and sequencing were performed according to the manufacturer's reference guide (Illumina Bio-Rad SureCell WTA 3' Library Prep Reference Guide). Sequencing was performed with a NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Cycles) to an attainable depth of 500,000 reads per cell.

*Processing mRNA Sequencing Data.* Raw sequencing data were processed and aligned to the human genome (hg19) following Romagnoli et al.<sup>76</sup> and Tian et al.<sup>77</sup>.

**Data analysis.** All statistical and bioinformatic data analysis was performed with R version 3.6. We excluded cells that had less than 1000 sequenced genes and genes with zero counts in all cells. Overall, we used 13,589 genes within 364 cells from the two-time points of spheroid progression. To estimate the number of cells required to represent the proportions shown in Fig. 1b, we used a sample-size statistical model for estimating the proportion of proliferative cells in spheroids. We estimated that a sample size of 115 and 255 cells was required to reproduce the proportions of proliferative cells observed at 6 and 19 days, respectively. We considered a margin of error of 5% with a confidence level of 90%. We experimentally obtained 134 and 230 cells for D6 and D19 spheroids, respectively. Thus, the number of cells experimentally measured has statistical support for representing the subpopulations.

*Clustering and dimensionality reduction.* Clustering was performed in three steps. First, we calculated the over-dispersion of each gene following Fan et al.<sup>78</sup>. Second, using the top N over-dispersed genes the distance matrix was computed as 1-Pearson-correlation of all cells. Finally, clustering was done with the following considerations.

Two matrices were used as input for cluster formation as parallel analyses. The first one was the distance matrix previously described; the second one was obtained by reducing the distance matrix to two dimensions with UMAP<sup>29</sup> implemented in the “umap” R package with 300 iterations. To determine the clusters in both input matrices we used K-means and Expectation–Maximization (EM) algorithms. Optimum cluster number (k) for K-means was obtained using the maximum value of the second derivative of the sum of squared error for multiple k values on the elbow plot. EM algorithm was implemented with the “mclust” R package<sup>79</sup>.

*Gene number selection.* Each gene affects data clustering, as more considered it is harder to find similarities and differences between samples. However, considering a small amount of them wiped out subtle but significant properties in the sample. All the results were obtained by selecting the top 6,000 most over-dispersed genes. Therefore, selected genes comprised 68% of the total variance of data.

*Pathway enrichment analysis.* Pathway enrichment analysis was done using the Gene set enrichment analysis (GSEA)<sup>30</sup> available at <https://software.broadinstitute.org/gsea/>. Considered gene sets were obtained from the MsigDB database (<https://www.msigdb.org>). We used the hallmarks<sup>80</sup> and curated (C2) datasets. Statistical significance was assigned with an FDR < 0.05 and *p* value < 0.01. Since the analysis was done in pairwise comparisons, positive enriched pathways for one group were negative enriched pathways for the other and vice versa. Therefore, the negatively enriched pathways were implicitly considered.

*Enriched map construction.* Enriched maps were constructed with pathway enrichment analysis information. The description of every statistically significant enriched pathway was matched to find the most 3 representative words. Pathways with shared genes were favored to be considered in the same group. We computed the Jaccard index to find connections between different nodes, when it was greater than 0.4 a connection was settled. This threshold in the Jaccard index means that we set a relation when 40% of genes are contained in both gene sets. This value is recommended in Cytoscape software. A preliminary map was constructed with Cytoscape and refined with our own algorithms.

*Differential expression analysis.* Differential expression analysis was performed with package SCDE<sup>81</sup> for R, using a  $|\log_2(\text{FC})| > 1.5$  and a *p* value < 0.01. Heatmaps were constructed taking the logarithmic transformation of the genes count table plus one.

*Correlating enriched pathways with differentially expressed genes.* The link between analyses was done in two steps: First, we extracted the most recurrent leading edges genes of the gene set analysis for every collection described in the enriched maps. Second, we quantified the number of hits for the differentially expressed genes into the most representative genes for each collection of step one, genes with the most hits were set as key genes.

*Regulation Motif.* We used IPA software which correlates desired genes into a built-in scientific literature database. We ranked the expression data of every comparison by  $\log_2(\text{FC})$  and *p* value, and subsequently, we loaded the data into IPA core analysis. Taking hand of the IPA upstream regulators tool, we associated upstream molecules to the expression data. Then, we took only the regulators that were interconnected with several genes.

## Data availability

Raw data are available through the Gene Expression Omnibus (GEO) with accession number GSE145633. All code used for analysis is available at <https://github.com/resendislab/scPipeline>.

Received: 19 March 2020; Accepted: 1 July 2020

Published online: 29 July 2020

## References

- Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2018).
- Goldman, S. L. *et al.* The Impact of Heterogeneity on Single-Cell Sequencing. *Front. Genet.* **10**, 8 (2019).
- Ramón, Y. *et al.* Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J. Mol. Med.* **98**, 161–177 (2020).
- Kim, H. *et al.* High-resolution deconstruction of evolution induced by chemotherapy treatments in breast cancer xenografts. *Sci. Rep.* **8**, 17937 (2018).
- Puchalski, R. B. *et al.* An anatomic transcriptional atlas of human glioblastoma. *Science* **360**, 660–663 (2018).
- Tirosh, I. *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* **352**, 189–196 (2016).
- Wagner, J. *et al.* A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell* **177**, 1330–1345.e18 (2019).
- Tung, P.-Y. *et al.* Batch effects and the effective design of single-cell gene expression studies. *Sci. Rep.* **7**, 39921 (2017).
- González-Silva, L., Quevedo, L. & Varela, I. Tumor functional heterogeneity unraveled by scRNA-seq technologies. *Trends Cancer Res.* **6**, 13–19 (2020).
- Bleijis, M., van de Wetering, M., Clevers, H. & Drost, J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* **38**, e101654 (2019).
- Seth, S. *et al.* Pre-existing functional heterogeneity of tumorigenic compartment as the origin of chemoresistance in pancreatic tumors. *Cell Rep.* **26**, 1518–1532.e9 (2019).
- Davis, J. B. *et al.* A new model isolates glioblastoma clonal interactions and reveals unexpected modes for regulating motility, proliferation, and drug resistance. *Sci. Rep.* **9**, 17380 (2019).
- Diener, C., Muñoz-Gonzalez, F., Encarnación, S. & Resendis-Antonio, O. The space of enzyme regulation in HeLa cells can be inferred from its intracellular metabolome. *Sci. Rep.* **6**, 28415 (2016).
- Lazzari, G., Couvreur, P. & Mura, S. Multicellular tumor spheroids: a relevant 3D model for the in vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. *Polymer Chem.* **8**, 4947–4969 (2017).
- Weiswald, L.-B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17**, 1–15 (2015).
- Dufau, I. *et al.* Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC Cancer* **12**, 15 (2012).
- Imamura, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* **33**, 1837–1843 (2015).
- Ho, W. Y., Yeap, S. K., Ho, C. L., Rahim, R. A. & Alitheen, N. B. Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PLoS ONE* **7**, e44640 (2012).
- Lee, A. V., Oesterreich, S. & Davidson, N. E. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, djv073 (2015). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>.
- Booms, A., Coetzee, G. A. & Pierce, S. E. MCF-7 as a model for functional analysis of breast cancer risk variants. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **28**, 1735–1745 (2019).
- Holliday, D. L. & Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* **13**, 215 (2011).
- Ess, S. M. *et al.* Impact of subtypes and comorbidities on breast cancer relapse and survival in population-based studies. *Breast* **41**, 151–158 (2018).
- Subik, K. *et al.* The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **4**, 35–41 (2010).
- Villarreal-Garza, C. *et al.* Molecular subtypes and prognosis in young mexican women with breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **17**, e95–e102 (2017).
- Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
- Mandujano-Tinoco, E. A. *et al.* miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1864**, 1642–1655 (2017).
- Bruno, S. & Darzynkiewicz, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* **25**, 31–40 (1992).
- James, M. K., Ray, A., Leznova, D. & Blain, S. W. Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 498–510 (2008).
- McInnes, L., Healy, J., Saul, N. & Großberger, L. UMAP: uniform manifold approximation and projection. *J. Open Source Softw.* **3**, 861 (2018).
- Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15545–15550 (2005).
- Nagahashi, M. *et al.* High levels of sphingolipids in human breast cancer. *J. Surg. Res.* **204**, 435–444 (2016).
- Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 33–50 (2018).
- Borrow, J. *et al.* The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP96 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat. Genet.* **12**, 159–167 (1996).
- Andrews, J. L., Kim, A. C. & Hens, J. R. The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast Cancer Res.* **14**, 203 (2012).
- Milde-Langosch, K. *et al.* Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **137**, 57–67 (2013).
- Nasim, N. *et al.* Assessment of SGO1 and SGO1-AS1 contribution in breast cancer. *Hum. Antibodies* **27**, 279–284 (2019).
- Wu, Q., Dhir, R. & Wells, A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol. Cancer* **11**, 3 (2012).
- Jafarzadeh, A. *et al.* Higher circulating levels of chemokine CXCL10 in patients with breast cancer: Evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. *Cancer Biomark.* **16**, 545–554 (2016).
- McKiernan, E., McDermott, E. W., Evoy, D., Crown, J. & Duffy, M. J. The role of S100 genes in breast cancer progression. *Tumour Biol.* **32**, 441–450 (2011).
- Magnusson, K. *et al.* ANLN is a prognostic biomarker independent of Ki-67 and essential for cell cycle progression in primary breast cancer. *BMC Cancer* **16**, 904 (2016).
- Li, P. *et al.* Downregulation of miRNA-141 in breast cancer cells is associated with cell migration and invasion: involvement of ANP32E targeting. *Cancer Med.* **6**, 662–672 (2017).

42. Lawson, C. D. *et al.* Rho GTPase transcriptome analysis reveals oncogenic roles for rho GTPase-activating proteins in basal-like breast cancers. *Cancer Res.* **76**, 3826–3837 (2016).
43. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
44. Frezza, C. Metabolism and cancer: the future is now. *Br. J. Cancer* **122**, 133–135 (2020).
45. Yang, M.-S., Lai, C.-Y. & Lin, C.-Y. A robust EM clustering algorithm for Gaussian mixture models. *Pattern Recognit.* **45**, 3950–3961 (2012).
46. Villarino, A. V., Kanno, Y. & O’Shea, J. J. Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. *Nat. Immunol.* **18**, 374–384 (2017).
47. Mojic, M., Takeda, K. & Hayakawa, Y. The dark side of IFN- $\gamma$ : its role in promoting cancer immunoevasion. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 89 (2018).
48. Owen, K. L., Brockwell, N. K. & Parker, B. S. JAK-STAT signaling: a double-Edged Sword of immune regulation and cancer progression. *Cancers* **11**, 2002 (2019).
49. Shankaran, V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
50. Bates, J. P., Derakhshandeh, R., Jones, L. & Webb, T. J. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer* **18**, 556 (2018).
51. Gatti-Mays, M. E. *et al.* If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer* **5**, 37 (2019).
52. van der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T. & Melief, C. J. M. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 219–233 (2016).
53. Lin, Y., Xu, J. & Lan, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 76 (2019).
54. Jin, W. J. *et al.* NF- $\kappa$ B signaling regulates cell-autonomous regulation of CXCL10 in breast cancer 4T1 cells. *Exp. Mol. Med.* **49**, e295 (2017).
55. Tymoszek, P. *et al.* High STAT1 mRNA levels but not its tyrosine phosphorylation are associated with macrophage infiltration and bad prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* **14**, 257 (2014).
56. Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S. & Proost, P. Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Front. Immunol.* **8**, 1970 (2017).
57. Bresnick, A. R., Weber, D. J. & Zimmer, D. B. S100 proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 96–109 (2015).
58. Deol, Y. S., Nasser, M. W., Yu, L., Zou, X. & Ganju, R. K. Tumor-suppressive effects of psoriasis (S100A7) are mediated through the  $\beta$ -catenin/T cell factor 4 protein pathway in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 44845–44854 (2011).
59. Yin, C. *et al.* RAGE-binding S100A8/A9 promotes the migration and invasion of human breast cancer cells through actin polymerization and epithelial-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res. Treat.* **142**, 297–309 (2013).
60. Nasser, M. W. *et al.* S100A7 enhances mammary tumorigenesis through upregulation of inflammatory pathways. *Cancer Res.* **72**, 604–615 (2012).
61. Cheng, P. *et al.* Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J. Exp. Med.* **205**, 2235–2249 (2008).
62. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482 (2008).
63. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899 (2004).
64. Simões, R. V. *et al.* Metabolic plasticity of metastatic breast cancer cells: adaptation to changes in the microenvironment. *Neoplasia* **17**, 671–684 (2015).
65. Bajzikova, M. *et al.* Reactivation of dihydroorotate dehydrogenase-driven pyrimidine biosynthesis restores tumor growth of respiration-deficient cancer cells. *Cell Metab.* **29**, 399–416.e10 (2019).
66. Aird, K. M. & Zhang, R. Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. *Cancer Lett.* **356**, 204–210 (2015).
67. Gautam, A. & Bepler, G. Suppression of lung tumor formation by the regulatory subunit of ribonucleotide reductase. *Cancer Res.* **66**, 6497–6502 (2006).
68. Gautam, A., Li, Z.-R. & Bepler, G. RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene* **22**, 2135–2142 (2003).
69. Diener, C. & Resendis-Antonio, O. Personalized prediction of proliferation rates and metabolic liabilities in cancer biopsies. *Front. Physiol.* **7**, 644 (2016).
70. Rashighi, M. & Harris, J. E. Interfering with the IFN- $\gamma$ /CXCL10 pathway to develop new targeted treatments for vitiligo. *Ann. Transl. Med.* **3**, 343 (2015).
71. Daurio, N. A. *et al.* AMPK activation and metabolic reprogramming by tamoxifen through estrogen receptor-independent mechanisms suggests new uses for this therapeutic modality in cancer treatment. *Cancer Res.* **76**, 3295–3306 (2016).
72. Tabassum, D. P. & Polyak, K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 473–483 (2015).
73. Arozarena, I. & Wellbrock, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 377–391 (2019).
74. Tirosh, I. *et al.* Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma. *Nature* **539**, 309–313 (2016).
75. Legland, D., Arganda-Carreras, I. & Andrey, P. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* **32**, 3532–3534 (2016).
76. Romagnoli, D. *et al.* ddSeeker: a tool for processing Bio-Rad ddSEQ single cell RNA-seq data. *BMC Genomics* **19**, 960 (2018).
77. Tian, L. *et al.* scPipe: A flexible R/Bioconductor preprocessing pipeline for single-cell RNA-sequencing data. *PLoS Comput. Biol.* **14**, e1006361 (2018).
78. Fan, J. *et al.* Characterizing transcriptional heterogeneity through pathway and gene set overdispersion analysis. *Nat. Methods* **13**, 241–244 (2016).
79. Fraley, C. & Raftery, A. E. MCLUST: software for model-based clustering, density estimation and discriminant analysis. <https://doi.org/10.21236/ada459792> (2002).
80. Liberzon, A. *et al.* The molecular signatures database hallmark gene set collection. *Cell Syst.* **1**, 417–425 (2015).
81. Kharchenko, P. V., Silberstein, L. & Scadden, D. T. Bayesian approach to single-cell differential expression analysis. *Nat. Methods* **11**, 740–742 (2014).

## Acknowledgements

O.R.A. thanks to the financial support coming from INMEGEN México. A.H.H. is supported by the grants of Hospital Infantil de México Federico Gómez HIM/2018/079 SSA 1518 and by the direct funding of Patronato del Hospital Infantil de México Federico Gómez. The authors thank Alfredo Mendoza Vargas and the sequencing facility at INMEGEN for the technical support in samples processing. Erick Andrés Muciño-Olmos is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México



(UNAM) and has received CONACyT fellowship 735969. Meztli L Matadamas-Guzman is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 735736. Ugo Avila Ponce de León is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 774988.

### Author contributions

E.M.O. performed the experiments, A.V.J. performed Data Analysis. O.R.A. supervised the research. E.M.O., A.V.J., V.M. and O.R.A. contributed to the experimental design. A.V.J., E.M.O., M.M.G., U.A.P., A.H.H. and O.R.A. wrote and discussed the main manuscript. T.L.S. and A.H.H. contributed with the Single-cell RNA-seq methodology. All authors reviewed the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69026-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.H.-H. or O.R.-A.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020