



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Análisis integrativo del entrecruzamiento de apoptosis
y autofagia en cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

KARINA LÓPEZ REYES

TUTOR PRINCIPAL

DR ENRIQUE HERNÁNDEZ LEMUS
INSTITUTO NACIONAL DE MÉDICA GENÓMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA MARCELA LIZANO SOBERON
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

DR ADRIAN OCHOA LEYVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO. ENERO 2022



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.

*Los males desesperados
exigen desesperados remedios,
o jamás se curan.*
Hamlet, WILLIAM SHAKESPEARE

*El universo
no solo es mas raro de lo que suponemos,
sino mas raro de lo que podemos suponer.*
J.B.S. Haldane

*Cada objeto
que la biología estudia es un
sistema de sistemas.*
Francois Jacob

Agradecimientos

Quiero agradecer infinitamente a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

Quiero agradecer al laboratorio CSB-IG del Instituto Nacional de Medicina Genómica liderado por el Dr. Enrique Hernández Lemus, que a lo largo de este proyecto, me han brindado sus enseñanzas, comprensión y ayuda en el mundo de la biología de sistemas, pero principalmente por su empatía y solidaridad.

Agradezco a todos los involucrados en la revisión de este proyecto, a los miembros de mi comité tutor y a los miembros de mi jurado por darse el tiempo de revisar este trabajo.

Especialmente quiero agradecer a Laura Gómez, Hugo Tovar y Sergio por su extraordinaria ayuda, consejos, enseñanzas y compañía. Dicen que la vida es mejor en compañía y sin duda agradezco por haberlos conocido y compartido esta experiencia.

Índice general

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Cáncer	1
1.1.1. Características distintivas del Cáncer	3
Resistencia a la muerte celular	4
Entrecruzamiento de circuitos reguladores	5
1.2. Apoptosis y Autofagia	6
1.2.1. Apoptosis	6
Apoptosis y cáncer	9
1.2.2. Autofagia	10
Autofagia y cáncer	12
1.2.3. Entrecruzamiento entre la apoptosis y la autofagia	13
1.3. Biología de sistemas	15
1.3.1. Redes biológicas	17
Redes de regulación génica (RRG)	17
1.3.2. Análisis de vías	19
1.4. Cáncer de mama	21
1.4.1. Heterogeneidad	22
Subtipos moleculares	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25

3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo general	27
3.2. Objetivos particulares	27
4. MÉTODOS	29
4.1. Obtención de datos	30
4.1.1. Datos de expresión	31
4.1.2. Preprocesamiento	31
4.1.3. Clasificación molecular	32
4.1.4. Redes de regulación genética	32
4.2. Análisis de expresión diferencial	33
4.3. Reconstrucción de redes biológicas a partir de KEGG	33
4.4. Análisis de desregulación	34
4.5. Identificación de las vías de interés funcional	35
4.5.1. Vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia	36
4.5.2. Vías desreguladas	36
4.5.3. Vías con evidencia de dependencia estadística	37
4.6. Integración y análisis de resultados	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Datos	39
5.1.1. Clasificación molecular	39
5.1.2. Redes de regulación genética	39
5.2. Expresión diferencial	41
5.3. Vías de interés funcional	42
5.3.1. Vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia	43

5.3.2.	Vías con evidencia de IM	44
5.3.3.	Vías desreguladas	45
	Vías que cumplen los tres criterios	45
5.4.	Redes de entrecruzamiento	47
5.4.1.	Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia	47
5.4.2.	Subtipo Luminal A	49
5.4.3.	Subtipo Luminal B	51
5.4.4.	Subtipo Her2	53
5.4.5.	Subtipo Basal	55
6.	DISCUSIÓN	57
6.1.	Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia	57
6.2.	Red de entrecruzamiento del subtipo LuminalA	61
6.3.	Red de entrecruzamiento del subtipo Luminal B	63
6.4.	Red de entrecruzamiento del subtipo HER2	65
6.5.	Red de entrecruzamiento del subtipo Basal	66
7.	CONCLUSIONES	71
A.	RRG-Subtipos	87

Índice de figuras

1.1. Surgimiento del Cáncer. Tomado de [16]	2
1.2. Características distintivas del cáncer. Modificado de [54]	3
1.3. Esta red de vías está integrada por varios circuitos que regula la actividad de las células cancerosas. Tomado de [54]	6
1.4. Vía de apoptosis. Tomado de [86]	8
1.5. Vía de autofagia. Tomado de [86]	11
1.6. Entrecruzamiento entre la apoptosis y la autofagia. Tomado de [130]	14
1.7. Biología de sistemas, crea el potencial para nuevos enfoques de investigación e impulsa la innovación constante en tecnología y computación basada en biología. Tomado de https://omicscouts.com/en/disease-and-systems-biology.html	16
1.8. Representación de redes metabólicas. La descripción teórica de una vía simple (Biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas) es ilustrada. a) Red metabólica en su enfoque más completo y abstracto b) Todos los metabolitos que interactúan en la vía se consideran por igual, los enlaces entre los nodos representan las reacciones que convierten un sustrato en otro. Tomado de [8]	18
1.9. Flujo de trabajo de <i>pathifier</i> . <i>Pathifier</i> necesita de dos <i>inputs</i> , una lista de vías en un formato <i>gene sets</i> y datos biológicos de alto rendimiento (HTBD) etiquetados en dos grupos (controles y muestras). Se analiza una vía cada vez en los datos HTDB, de esta manera se obtiene un valor de PDS para cada par vía-muestra, finalizando con una matriz con todos los valores de PDS. Tomado de [42]	21

1.10. Subtipos moleculares de cáncer de mama. Los subtipos luminales son aquellos con mejor prognosis (derecha), son positivos para el receptor de estrógeno (ER) y el receptor de progesterona (PR), pero para el receptor HER2 solo el subtipo luminal B es positivo. Los subtipos HER2 y Basal son los de peor prognosis (izquierda), estos son negativos para el ER y el receptor de PR, sin embargo el receptor HER2 subtipo HER2 es positivo para HER2 mientras que el subtipo Basal es negativo y presenta mutaciones en el gen BRCA1. Tomado de [24]	23
4.1. Esquema general de la metodología. El análisis inicia con el preprocesamiento de los datos de RNAseq de las muestras seleccionadas de TCGA, de este proceso se obtiene una matriz de expresión que contiene la expresión de cada gen para cada una de las muestras; a partir de la matriz de expresión inicial se realizó subtipificación de las muestras utilizando el algoritmo PAM50. Utilizando la base de datos KEGG se realizó el análisis de entrecruzamiento y el análisis de desregulación utilizando el algoritmo Pathifier, integrando los últimos análisis se obtuvieron grupos de vías desreguladas que entrecruzan con apoptosis y autofagia por subtipo molecular. Por otro lado utilizando los datos de RNAseq se infirieron 4 RRGs por subtipo molecular e integrando estas RRGs y los vías de entrecruzamiento se obtuvieron las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia y que tienen interacciones con IM. Por último se realizó un análisis de expresión diferencial por subtipo molecular. Finalmente se integraron los resultados del análisis de desregulación, análisis de redes y expresión diferencial.	30
5.1. Red de Regulación Genética del subtipo Basal. Los enlaces representan los valores de información mutua, los nodos color rojo representan genes de apoptosis y autofagia, los nodos de color azul representan genes relacionados a los genes de apoptosis y autofagia con un valor de interacción de información mutua alto.	40
5.2. Distribución de grado de la red transcripcional del subtipo basal.	42
5.3. Diagrama de Venn que muestra los genes diferencialmente subexpresados en los subtipos tumorales contra el fenotipo sano.	43
5.4. Diagrama de Venn que muestra los genes diferencialmente sobreexpresados en los subtipos tumorales contra el fenotipo sano.	44
5.5. Mapa de calor de los valores de PDS normalizados por subtipo tumoral.	46
5.6. Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia.	48

5.7. Red de entrecruzamiento del subtipo Luminal A. En rojo está la vía transporte de ARN, en amarillo la vía ciclo celular, en verde musgo la vía de señalización de adipocitoquinas, en verde la vía de señalización de esfingolípidos, azul celeste la vía de señalización de NF-kappa B, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis.	50
5.8. Red de entrecruzamiento Luminal B. En rojo está la vía de señalización de glucagon, en amarillo la vía de señalización de fosfolipasa D, en verde la vía de señalización de esfingolípidos, en verde lima la vía del sistema de señalización de fosfatidilinositol, en azul celeste la vía de señalización de estrógenos, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis. Las interacciones que se encuentra en más de una vía estan en color negro.	52
5.9. Red de entrecruzamiento Her2. En rojo está la vía señalización de Hippo, en amarillo la vía señalización de receptores tipo Toll, en verde la vía de fagosoma, en verde lima la vía de señalización de FoxO, en azul celeste la vía de señalización de NF-kappa B, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis. Las interacciones que se encuentra en más de una vía estan en color negro.	54
5.10. Red de entrecruzamiento Basal. En rojo está la vía señalización de la longevidad, en amarillo la vía señalización de receptores tipo Toll, en verde la vía de hormonas tiroideas, en morado la vía de señalización de cAMP, en azul celeste la vía de receptores de células T, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis. Las interacciones que se encuentra en más de una vía estan en color negro.	56
6.1. Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia. Las interacciones en color rosa representan a la vía de apoptosis, las azules a la vía de autofagia y las negras se encuentran en ambas, el color de nodos representa el grado de conectividad y aquellos de mayor tamaño son los nodos de entrecruzamiento.	58
6.2. Primeros vecinos de las interacciones con IM que pertenece a las vía con mayor desregulación en la red de entrecruzamiento del subtipo luminal A. Las aristas en color azul celeste pertenecen a la vía NFκB, las de color verde a la vía de esfingolípidos, las amarillas a ciclo celular, en rosa a apoptosis y las azules a autofagia.	61
6.3. Red de entrecruzamiento en el subtipo luminal B, con una posible vía alternativa para activar al factor de transcripción CREB5. En rojo está la vía de señalización de glucagon, en amarillo la vía de señalización de fosfolipasa D, en verde la vía de señalización de esfingolípidos, en verde lima la vía del sistema de señalización de fosfatidilinositol, en azul celeste la vía de señalización de estrógenos, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis.	64

6.4.	Red de entrecruzamiento en el subtipo luminal B, específicamente apoptosis y autofagia. En azul marino autofagia y en rosa apoptosis.	65
6.5.	Primeros vecinos de la interacción con IM que pertenece a la vía con mayor desregulación en la red de entrecruzamiento del subtipo HER2. Las aristas en color rojo pertenecen a la vía Hippo, las rosas a apoptosis, las azul celeste NF κ B y las amarillas a receptores tipo Toll.	66
6.6.	Primeros vecinos de la interacción con IM que pertenece a la vía con mayor desregulación en la red de entrecruzamiento del subtipo basal. Las aristas en color rojo pertenecen a la vía de cAMP y las azules a autofagia.	68
A.1.	Red de Regulación Genética del subtipo LuminalA.	87
A.2.	Red de Regulación Genética del subtipo LuminalB.	88
A.3.	Red de Regulación Genética del subtipo Her2.	88

Índice de cuadros

5.1. Número de muestras después de la clasificación molecular.	39
5.2. Parámetros topológicos de las redes de regulación genética.	41
5.3. Número de vías que entrecruzan por cada categoría de KEGG.	43
5.4. Número de vías que entrecruzan y tienen interacciones en las RRG por cada subtipo tumoral y por cada categoría de KEGG. EAA (Vías de entrecruzamiento con apoptosis y autofagia)	45
5.5. Vías que entrecruzan, que tienen interacciones en las RRG y están muy desreguladas por cada subtipo tumoral.	46
5.6. Número de nodos y aristas en cada red de entrecruzamiento por subtipo tumoral.	47
5.7. Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo luminalA.	49
5.8. Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo luminalB.	51
5.9. Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo HER2.	53
5.10. Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo Basal.	55

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se espera que el número de casos aumente en todo el mundo. Si bien múltiples estudios han explorado la evasión de la muerte celular en el cáncer por apoptosis aun es escasa la investigación de la evasión de la muerte celular debido al entrecruzamiento de este proceso de muerte con otros.

El presente trabajo propone un marco conceptual para el estudio del entrecruzamiento de la vía de muerte (apoptosis) con las demás vías descritas en la base de datos de KEGG en diversos subtipos moleculares de cáncer de mama bajo el contexto de biología de sistemas.

A partir de la base de datos GDC se obtuvieron las lecturas provenientes de RNA-seq de 1102 tumores de cáncer de mama y 113 muestras normales. Además, se construyeron redes humanas integradas que incluyeron todas las reacciones metabólicas, interacciones proteína proteína y procesos de transporte y señalización basados en la base de datos de KEGG, a las cuales llamamos redes de entrecruzamiento, estas están construidas bajo el cumplimiento de ciertos criterios relacionados con el entrecruzamiento de apoptosis y autofagia. A partir de estos dos grupos de datos, se implementaron estrategias para la subtipificación molecular, se implementaron metodologías de análisis de datos genómicos, tales como análisis de expresión diferencial, análisis de enriquecimiento de vías e inferencia y análisis de redes transcripcionales siempre bajo el análisis del entrecruzamiento de las vías de apoptosis y autofagia.

Es de interés especial la relación de apoptosis y autofagia ya que es bien conocido que las células cancerosas no sufren apoptosis y que la evolución clonal del cáncer selecciona las células caracterizadas por su elevada actividad proliferativa y capacidad de supervivencia. Por lo que, por un lado se estudia el mecanismo que regula la muerte celular, la apoptosis y otro proceso que tiene profundos efecto sobre la viabilidad y supervivencia celular, la autofagia.

A partir de estas exploraciones se encontraron diferencias notables entre los diferentes subtipos tumorales, tanto en la desregulación de vías como en el entrecruzamiento de apoptosis y autofagia. En el presente trabajo se evidencia el enorme entrecruzamiento de apoptosis con todos los demás procesos celulares por lo que la visión simple de que la inhibición de apoptosis es un mecanismo clave de defensa contra el cáncer resulta de una simplificación excesiva.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the leading causes of death worldwide. The number of cases is expected to increase worldwide. Although multiple studies have explored the avoidance of cell death in cancer by apoptosis, there is still little research on the avoidance of cell death due to the crosstalk of this death process with others.

The present work proposes a conceptual framework for the study of crosstalk of death pathway (apoptosis) with other pathways described in KEGG database in various molecular subtypes of breast cancer under the context of systems biology.

RNA-seq readings from 1102 breast cancer tumors and 113 normal samples were obtained from the GDC database. In addition, integrated human networks were built that included all metabolic reactions, protein-protein interactions and transport and signaling processes based on the KEGG database, which we call crosstalk networks, these are built under the fulfillment of certain related criteria with the crosstalk of apoptosis and autophagy. From these two data groups, strategies for molecular subtyping were implemented, genomic data analysis methodologies were implemented, such as differential expression analysis, pathway enrichment analysis and inference and analysis of transcriptional networks always under the analysis of the crosstalk of apoptosis and autophagy pathways.

The relationship of apoptosis and autophagy is of special interest since it is well known that cancer cells do not undergo apoptosis and that the clonal evolution of cancer selects cells characterized by their high proliferative activity and survival capacity. Therefore, is studied the mechanism that regulates cell death (apoptosis) and another process that has a profound effect on cell viability and survival (autophagy) .

From these explorations, notable differences were found between the different tumor subtypes, both in the dysregulation of pathways and the crossover of apoptosis and autophagy. In the present work, the exorbitant crosstalk of apoptosis with all other cellular processes is evidenced, so the simple view that inhibition of apoptosis is a key mechanism against cancer results from an oversimplification.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en países independientemente del desarrollo económico. Se espera que el número de casos aumente en todo el mundo, debido al crecimiento y el envejecimiento de la población. Especialmente en los países menos desarrollados, en los que reside aproximadamente el 82 % de la población mundial [131].

En la misma línea, para el 2016, 15.5 millones de americanos fueron diagnosticados con algún tipo de cáncer, y las proyecciones para el año 2026 siguen en aumento con un esperado de 20.3 millones [91], estas cifras se espera que sean mayores para países en desarrollo. De ello resulta que fueran creadas múltiples instituciones en todo el mundo que buscan coordinar la investigación, con el propósito de describirlo, buscar alternativas de tratamiento y hasta la cura para el mismo.

El cáncer es una enfermedad de origen genético, a nivel fundamental, es una enfermedad de evolución de células somáticas impulsada por sucesivos cambios moleculares, que promueve una exacerbada proliferación de las células anormales que invaden otros tejidos y órganos [119]. Cada generación de células cancerosas puede adquirir un conjunto de nuevas mutaciones, y en algunos casos, las mutaciones aceleran la adquisición de otras mutaciones. Cuando una sustancia quimioterapéutica o el sistema inmunológico atacan a las células cancerosas, las células más aptas sobreviven y vuelven a dividirse. Este ciclo de mutación, selección y crecimiento excesivo genera células que están cada vez más adaptadas a la supervivencia y al crecimiento [94].

En general existen dos tipos de genes que afectan la susceptibilidad para desarrollar cáncer, y son el resultado de mutaciones somáticas: los oncogenes y los genes supresores de tumor[90].

Los oncogenes son versiones mutadas de genes normales (llamados protooncogenes) que codifican para proteínas que alteran el control de la proliferación celular. Tales mutaciones pueden alterar o deteriorar varios procesos como: la producción de factores transcripcionales,

la traducción de señales o la interacción de los factores de crecimiento con su receptor. Los anti-oncogenes también conocidos como genes supresores de tumores, son genes normales que desactivan la proliferación celular. En este caso, cuando ocurren mutaciones de pérdida de función en ambas copias del gen se evidencia el efecto [16, 145].

Frecuentemente, el cáncer surge cuando una sola célula comienza a crecer y dividirse; se desarrolla en varias etapas y requieren múltiples mutaciones. Primero, se pierde el control normal de la división celular. Después, la célula anormal (mutante) se divide para formar un microtumor (Figura 1.1). Los microtumores permanecen inactivos hasta que otras mutaciones permiten que el tumor adquiera un suministro de sangre. En este sentido, las células cancerosas emiten moléculas de señalización a los tejidos circundantes, atrayendo células endoteliales vasculares para obtener el suministro sanguíneo. Una vez que el microtumor obtiene su propio suministro de sangre, puede continuar creciendo hasta convertirse en una gran masa celular. Si el tumor permanece en un lugar, se conoce como un tumor localizado y, a menudo, puede ser extraído por un cirujano, lo que resulta en una recuperación completa. Por otro lado, como resultado de otras mutaciones, un cáncer puede ganar la capacidad de invadir otros tejidos y formar tumores secundarios, que es lo que conocemos como un tumor maligno, y son mucho más difíciles de atender [16].

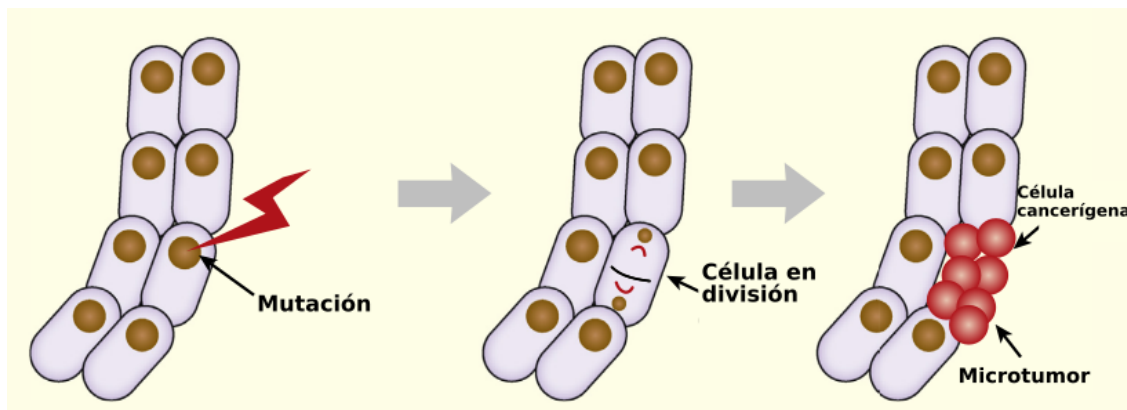


FIGURA 1.1: Surgimiento del Cáncer. Tomado de [16]

Por consiguiente, ya que el cáncer se aprovecha de la división celular, un proceso entrelazado intrínsecamente a la vida, la batalla contra el cáncer radica en encontrar la disyunción entre el crecimiento maligno y el crecimiento normal [94]. La tarea ha sido estudiada por décadas, creando modelos de la enfermedad en función de los cambios moleculares en los genes. Lo que llevó a que a comienzos del siglo XXI se publicaran ciertas reglas y principios conocidos como Características distintivas del cáncer o *The hallmarks of Cancer* [53], el establecimiento de estas características generales revolucionó la manera en la que se percibe y estudia esta enfermedad.

1.1.1. Características distintivas del Cáncer

Las características distintivas del cáncer resumen rasgos moleculares, bioquímicos y celulares (capacidades adquiridas) que promueven el desarrollo, mantenimiento y diseminación tumoral, compartidos por la mayoría de los tipos de cáncer humano (Figura 1.2).



FIGURA 1.2: Características distintivas del cáncer. Modificado de [54]

En el 2000, Hannahan y Weinberg describieron seis características que debe presentar una célula cancerígena, esas seis reglas son: 1) Señalización proliferativa sostenida: las células adquieren una mitosis patológica a causa de la activación de oncogenes como *ras* o *myc* 2) Resistencia a la muerte celular: las células de alguna manera evitan la activación de genes o vías que normalmente permiten a las células morir 3) Invasión activa y metástasis: las células adquieren la capacidad de migrar a otros órganos y propagarse por todo el cuerpo 4) Inmortalidad replicativa habilitada: las células cancerosas adquieren la capacidad de pasar por ciclos ilimitados de crecimiento y replicación a raíz de mantener la estructura de los telómeros 5) Evasión de los supresores de crecimiento: las células cancerosas desactivan los genes supresores de tumores, que normalmente inhiben la proliferación e 6) Inducción de angiogénesis: las células cancerosas adquieren la capacidad de obtener su propio suministro de sangre y vasos sanguíneos [53]. En una revisión reciente de los mismos autores exponen que, subyacente a estas seis características, existen dos características habilitadoras: Inestabilidad genómica -mutaciones e Inflamación promotora de tumores, cruciales para que las células adquieran las seis características anteriores. Además, nos presentan otras dos características distintivas: Desregulación energética celular y Evasión inmune, las cuales relacionan al microambiente tumoral y las interacciones de señalización para que las células adquieran los fenotipos del cáncer [54]. Se ha expresado que la dependencia que el cáncer asume sobre estas características, representa la frontera entre estos conceptos y el descubrimiento de nuevas aplicaciones terapéuticas.

La característica distintiva que se aborda en este trabajo, es la resistencia a la muerte celular y los procesos asociados. Ya que la evasión de la muerte celular esta íntimamente entrelazada con las señalización proliferativa sostenida y la evasión de los supresores de crecimiento, se optó por estudiar a los circuitos reguladores entrelazados con muerte celular.

Resistencia a la muerte celular

La resistencia a la muerte celular, principalmente hace referencia a la evasión de la apoptosis. Para que una célula cancerígena pueda dividirse y crecer sin control, no solo tiene que modificar las vías de crecimiento normal, sino que también debe evadir a las vías de muerte.

La apoptosis es un proceso contrario a la proliferación celular, se considera que es un componente vital de varios procesos como el recambio celular normal, el desarrollo y funcionamiento adecuado del sistema inmunológico, el desarrollo embrionario y la muerte celular inducida por sustancias químicas [34]. Por lo que, la estructura y funcionamiento del proceso apoptótico, y las estrategias utilizadas por las células cancerosas para evadir sus acciones, continúan siendo ampliamente estudiadas en la investigación del cáncer.

Se conocen varias estrategias que limitan o evitan a la apoptosis. Por ejemplo, la pérdida de la función del gen supresor de tumores TP53, un desequilibrio en la expresión de proteínas reguladoras (proapoptóticas y antiapoptóticas), o cortocircuitos en la percepción de señales extracelulares, entre otros. A pesar de todo, los avances conceptuales desde entonces han involucrado otras formas de muerte celular que amplían los enfoques de estudio de este proceso [54].

Otro de los procesos relacionados a muerte celular lleva por nombre autofagia, este proceso se encuentra de manera basal en las células y participa en el mantenimiento de la homeostasis celular. Sin embargo, si se activa puede llevar a dos resultados contrarios, supervivencia celular o muerte, y esta totalmente relacionado con el estado celular general [54]. Cabe señalar que las investigaciones actuales, tienen datos contradictorias sobre la participación y efecto de este proceso en las células tumorales y, por lo tanto, la progresión del tumor.

Por otra parte, se ha planteado que las unidades funcionales (oncogenes y antioncogenes) de las características distintivas del cáncer no están aislados. Hanahan y Weinberg en el 2011, representan una red de circuitos integrados en donde las múltiples moléculas que afectan al cáncer y que forman parte de circuitos reguladores presentan entrecruzamientos entre ellos, de esta manera un evento oncogénico puede afectar múltiples procesos [54]. Por ejemplo, las vías donde están involucradas las cinasas PI3K, AKT y mTOR normalmente estimulan la supervivencia e inhiben a la apoptosis, sin embargo también inhiben a la autofagia [78].

Por lo común, el término circuito regulador está referido a conjuntos de *pathways* también conocidos como vías biológicas, vías metabólicas o rutas moleculares. A partir de este

momento nos referiremos a los *pathways* como vías.

Entrecruzamiento de circuitos reguladores

Las vías, son procesos a pequeña escala donde las interacciones comprenden reacciones bioquímicas, eventos de regulación y señalización, que producen una alteración en la actividad celular. Por ejemplo, una vía puede iniciar la síntesis de nuevas moléculas, iniciar o detener la transcripción de genes o estimular a una célula para moverse [20].

Se conoce que diferentes vías pueden estar actuando sinérgicamente en muchos procesos biológicos. Además ha sido reportado que, los procesos de tumorigénesis y progresión están guiados por vías en lugar de genes individuales [140], así que, se ha propuesto que el cáncer es una enfermedad basada en vías [53] y, como tal, el análisis de vías es una herramienta poderosa para comprender las complejas relaciones e interacciones que están involucradas en esta patología [5].

Directamente se puede asociar a las alteraciones genéticas de las células cancerígenas con vías que controlan los procesos mencionados anteriormente, en un contexto de distorsiones en las redes que alimentan la progresión del cáncer. En cada caso, el resultado es una red desregulada que no está sujeta a los mecanismos de control normales [122]. Particularmente, los protooncogenes y los genes supresores de tumores se sitúan en los centros neurálgicos de esas vías [94].

Por ejemplo, Ras activa una proteína llamada Mek, que a su vez, activa a Erk, que, a través de varios pasos intermedios, acelera en última instancia la división celular. También han sido ampliamente descritas otras mutaciones oncogénicas, que participan en otras vías, y afectan la expresión de ciertos genes o producen proteínas mutadas cuya actividad está desregulada, por ejemplo los receptores tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico (RTK; EGFR), las GTPasas pequeñas (Ras), las cinasas serina/treonina (Raf y Akt), las tirosina cinasas citoplásicas (Src y Abl), cinasas lipídicas (PI3Ks), así como receptores nucleares (ER) [122]. En la década pasada éstas y demás alteraciones genéticas fueron representadas en las vías, y fueron integradas en circuitos que controlan las actividades de las células cancerígenas, simultáneamente, fueron divididos en subcircuitos especializados relacionados a los *hallmarks* del cáncer (Figura 1.3) [54].

Es importante destacar que estas vías son capaces de entrecruzarse con otras y así posibilitar otros comportamientos frecuentemente complejos en las células cancerosas. El término entrecruzamiento se refiere a que dos o más vías compartan moléculas, lo que puede llevar a activación o represión cruzada o coordinada de sus funciones. A través de las cascadas más simples o las redes altamente entrelazadas, se ha encontrado que el entrecruzamiento de las vías contribuye ampliamente a los programas de desarrollo y al destino celular [139]. Por lo tanto, es apropiado analizar el entrecruzamiento de las vías desregulados e identificar las moléculas clave que median el entrecruzamiento.

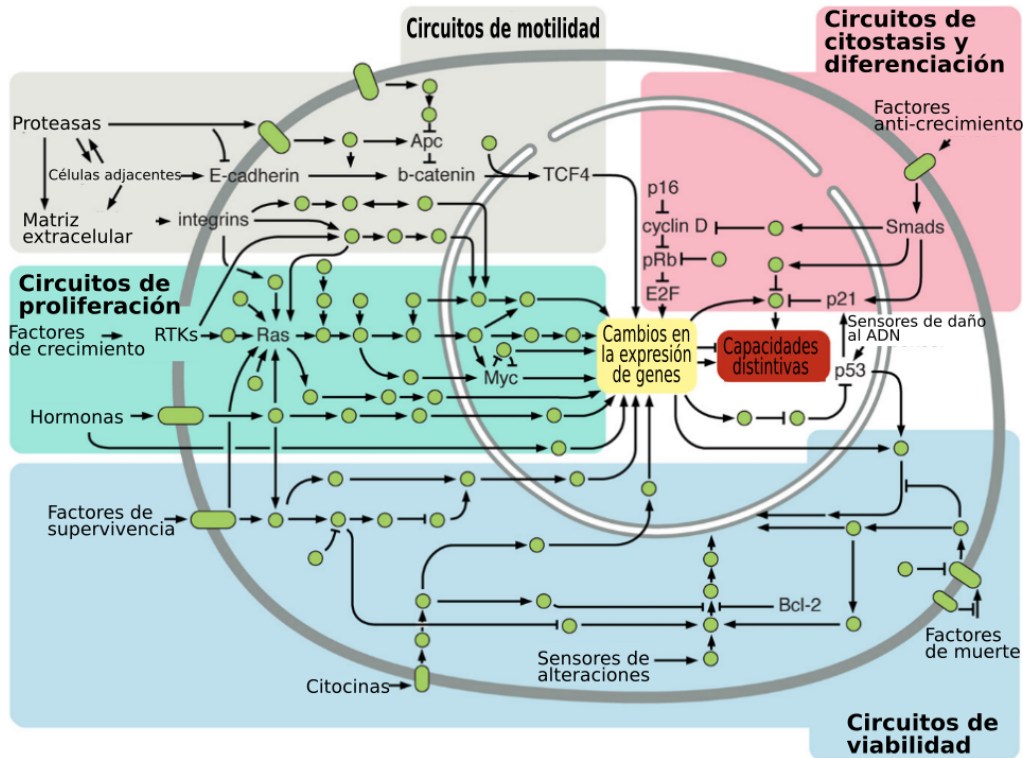


FIGURA 1.3: Esta red de vías está integrada por varios circuitos que regula la actividad de las células cancerosas. Tomado de [54]

Pero antes de explicar cómo las células cancerosas hacen esto, debemos entender cómo se produce el proceso de muerte celular en una célula normal. Los procesos de interés para este trabajo, que están asociados al circuito de viabilidad por contener factores de supervivencia y muerte son apoptosis y autofagia (Figura 1.3), los reguladores moleculares de ambas vías están interconectados; numerosos estímulos de muerte son capaces de activar cualquiera de las vías, y ambas comparten varios genes que son críticos para su respectiva ejecución. Variaciones en ambos procesos influyen múltiples procesos patológicos. Por lo que, éstos procesos y su relación con el cáncer se describen a continuación.

1.2. Apoptosis y Autofagia

1.2.1. Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular altamente conservado, participa en procesos como el desarrollo embrionario, selección neuronal y la homeostasis del sistema inmune, entre otros [57]. Por consiguiente, si el mecanismo está desregulado, o su activación es

inadecuada ya sea en tiempo o espacio, podrían surgir diversas patologías. Desde la perspectiva de las características distintivas del cáncer, la apoptosis funciona como un mecanismo supresor de tumores, sin embargo, también tiene un potencial oncogénico [12]. Por ejemplo, en la muerte de las células tumorales a través de apoptosis, las caspasas activadas rompen la fosfolipasa dependiente de calcio A2 (iPLA2) lo cual incrementa la producción de ácido araquidónico, en presencia de ciclooxigenasa 1 y 2 el ácido araquidónico es convertido a prostaglandina E2 (PGE2). Entonces la PGE2 se une a sus receptores ejerciendo su efecto proliferativo en células circundantes. Antes de ahondar en la relación de los controladores oncogénicos y los controladores apoptóticos, se describirá a la apoptosis.

Se han establecido dos vías de activación apoptóticas, la vía del receptor de la muerte (extrínseca) y la vía mitocondrial (intrínseca). Ambas vías, eventualmente convergen en la activación de caspasas, una familia de cisteín-proteasas que funcionan como moléculas efectoras de la muerte, ya que escinden una amplia gama de sustratos citoplásmicos y nucleares, lo cual llevará a la muerte celular [39]. Una vez que las caspasas son activadas los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis son: condensación y fragmentación de la cromatina por acción de endonucleasas, aumento de la densidad intracelular por la dilatación del retículo endoplasmático formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática eliminando así su contenido al medio extracelular, incremento de la concentración de calcio libre citoplasmático, translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, vesiculación de la membrana celular y desintegración de la célula en múltiples vesículas también llamados cuerpos apoptóticos, estos cuerpos pueden ser fagocitados por células vecinas, sin embargo, los macrófagos usualmente remueven las células apoptóticas antes de la fragmentación así evitando la inflamación [23].

La vía extrínseca se inicia mediante la unión de ligandos de muerte o señales de estrés extracelular, como patrones moleculares asociados a patógenos (DAMPs) o citocinas. Estas señales son sensadas y propagadas por un conjunto de receptores transmembranales, receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) también conocidos como receptores de muerte (DR), receptores Toll-like (TLR) o receptores NOD-like (NLR). En un modo simplificado, la unión ligando receptor provoca el reclutamiento de la procaspasa 8 y 10 monomérica a través de su dominio inductor de muerte (DED) a un complejo señal inductor de muerte (DISC) localizado en el dominio citoplasmático del DR, lo cual activa a proteínas que contienen dominios de muerte (TRADD Y FADD que forman parte del complejo DISC) que facilitan la homodimerización y activación de la caspasa 8 y 10. La caspasa 8 activada, escinde y activa a su vez a caspasas ejecutoras (Caspasa 3, 7) a través de su capacidad proteolítica en sitios específicos de residuos de ácido aspártico propios de las caspasas. Estas caspasas ejecutoras escinden cientos de sustratos diferentes, incluyendo a proteínas del citoesqueleto, proteínas nucleares, proteínas del metabolismo y endonucleasas, entre otras, lo que lleva a los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis previamente descritos (Figura 1.4) [3, 39].

La vía intrínseca o mitocondrial es activada en respuesta a varios estímulos intracelulares, incluyendo daño al ADN, privación de factores de crecimiento, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático, exceso de calcio citosólico, quimioterapia o radiación. Estos

estímulos convergen en la iniciación de la muerte, activando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) lo cual permite la liberación de citocromo c, que al unirse a Apaf-1 (factor 1 activador de proteínas apoptóticas) forman un complejo llamado apoptosoma, que recluta y activa a la caspasa-9, que a su vez corta y activa a las caspasas ejecutoras de muerte celular (caspasa 3 y 7) [12]. La actividad de las caspasas también es controlada por otras proteínas mitocondriales como SMAC (Segundo Activador de Caspasa derivado de Mitocondrias) y OMI (Serina peptidasa HtrA 2) que inhiben a las XIAP (Proteínas inhibidoras de apoptosis). La principal función de las proteínas XIAP es el bloqueo y degradación de las caspasas 9, 3 y 7, por ejemplo, para inhibir a la caspasa 9, el dominio BIR3 de XIAP interacciona con la forma inactiva de esta caspasa formando heterodímeros que impiden su activación evitando su unión al apoptosoma y su dimerización, además mediante la actividad E3 ligasa de su dominio RING señala mediante ubiquitinas a la caspasa 9 para su degradación por el proteosoma (Figura 1.4) [23, 157].

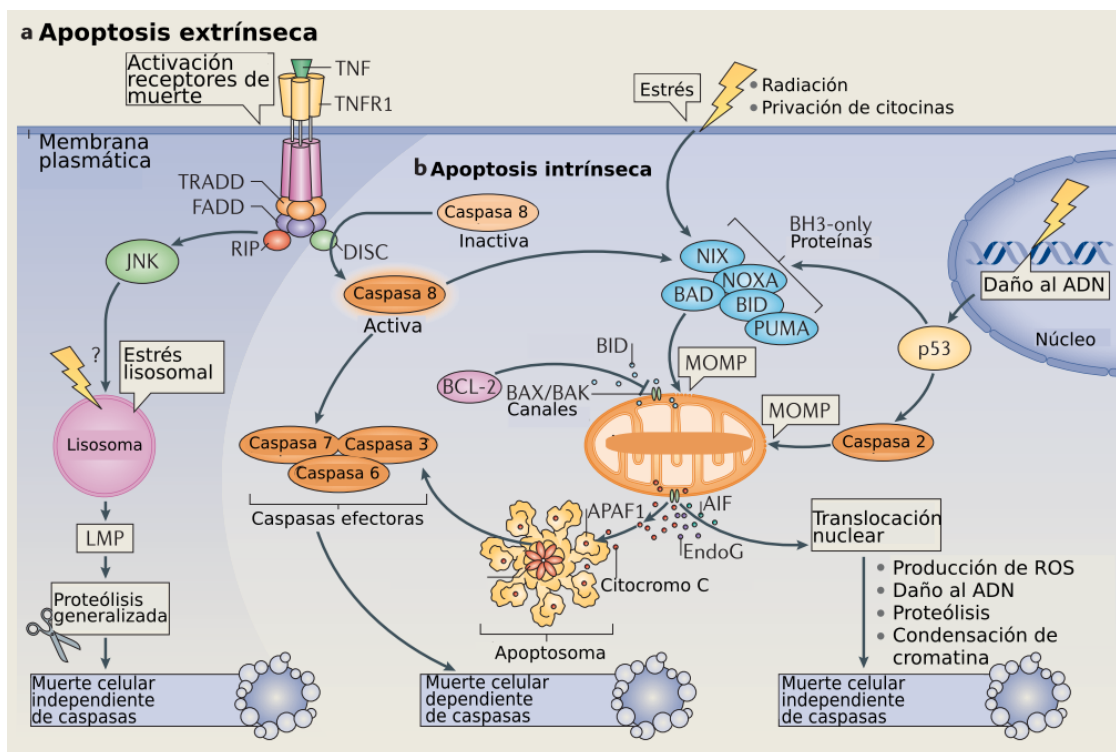


FIGURA 1.4: Vía de apoptosis. Tomado de [86]

En ambas vías hay biomoléculas sensoras y efectoras que se encargan de integrar las distintas señales interiores y exteriores de la célula estableciendo un estado de iniciación o ejecución de la apoptosis. La MOMP es considerada como una sentencia de muerte, por esta razón, está altamente regulada, principalmente por proteínas pro- y anti-apoptóticas, que pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2 subdivididas de acuerdo con su homología al compartir al menos uno de los cuatro dominios denominados BH (*Bcl-2 homology domain*). Las proteínas Bcl-2 pueden ser subdivididas en tres grupos: 1) Proteínas proapoptóticas efectoras (BAX, BAK y BOK) con 3 dominios (BH1, BH2 y BH3), las cuales tras activarse permeabilizan la membrana mitocondrial externa; 2) Proteínas antiapoptóticas Bcl-2-like

(BCL-2, BCL-X y MCL-1) con 4 dominios (BH1, BH2, BH3 y BH4) que se unen e inhiben a las proteínas efectoras y a las proteínas only-BH3, bloqueando la MOMP y la muerte celular; y 3) Proteínas proapoptóticas only-BH3 (BID, BIM y PUMA) con 1 dominio (BH3), cuya señal activa la MOMP mediante la supresión de proteínas Bcl-2-like antiapoptóticas y la activación directa de proteínas efectoras [12].

Apoptosis y cáncer

En las últimas décadas la investigación sobre el papel de la apoptosis en las células cancerosas, ha llevado a la identificación de este proceso como un mecanismo supresor de tumores. Las células cancerosas desarrollan varias estrategias para evadir la muerte celular mediante la generación de mutaciones genéticas o modificaciones epigenéticas en los moduladores clave de las vías de muerte [128]. Sin embargo, el papel de la apoptosis en el cáncer puede ser más complejo de lo que se pensaba.

Inicialmente, se ha propuesto que existe un equilibrio entre los sensores proapoptóticos y antiapoptóticos de tal manera que la apoptosis es una barrera natural que restringe a las células malignas de sobrevivir y diseminarse. No obstante, estos patrones de expresión en los pacientes con cáncer no siempre son indicadores de un pronóstico desfavorable. De hecho, algunas evidencias indican lo contrario. Por ejemplo, en cáncer de mama, el incremento en la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 está relacionado con un pronóstico favorable [75]. Particularmente cuando se correlaciona la disminución de la expresión de las proteínas proapoptóticas con un mejor pronóstico, se ha sugerido que la activación de la apoptosis puede tener funciones promotoras de tumores. Por otro lado, algunas células cancerígenas llegan a sobreexpresar proteínas antiapoptóticas para contrarrestar al estrés intrínseco, pero aun así se les considera como células preparadas para morir. Así que es importante tener en cuenta que la medición de niveles de las proteínas pro- o anti- apoptóticas no definen si la apoptosis es reprimida o promovida [12].

También ha sido ampliamente estudiada, la pérdida de la función supresora de tumores TP53, que elimina este sensor de daño de los circuitos inductores de apoptosis [54]. Cabe destacar que, no solo está involucrado en la inducción de la apoptosis, sino que también es clave en la regulación del ciclo celular, el desarrollo, la diferenciación, la transcripción de genes, la recombinación de ADN, la segregación cromosómica y la senescencia celular. Por ejemplo, en alguna situación de estrés celular, si una porción de TP53 llega a translocarse al núcleo, llevará a la trans-activación de un gran número de genes que pueden provocar adaptación al estrés, arresto del ciclo celular, autofagia y/o apoptosis [86].

Alternativamente, se ha visto que fallas en la ejecución de la apoptosis puede tener efectos oncogénicos [12]. Por ejemplo, en la apoptosis inducida por TRAIL, las células sobrevivientes sostienen un activación de caspasas lo que lleva a daños en el ADN e inestabilidad genómica [81]. En la apoptosis mitocondrial, la MOMP se considera un punto de no retorno, sin embargo no siempre es así, evidencias recientes sostienen que la MOMP puede ocurrir en

un número limitado de mitocondrias sin matar a la célula, lo que también llevará a la acumulación de daño severo al ADN con inestabilidad genómica lo que llevara a la transformación celular [69].

Como hemos dicho antes, se sabe que la hiperactivación de las vías Ras-ERK y PI3K-Akt por mutaciones oncogénicas, altera el equilibrio a favor de las señales antiapoptóticas, contribuyendo así a la supervivencia de las células tumorales y la expansión anormal de las células más allá de los límites normales del tejido [122], esto último evidencia el hecho de que moléculas de otras vías pueden impactar a su vez en muchas otras.

La autofagia y la apoptosis frecuentemente acontecen en la misma célula, la mayoría de las veces en secuencia en donde la autofagia precede a la apoptosis, como estrategia de adaptación y para hacer frente al estrés [86]; así que, entre la variedad de mecanismos que evitan la apoptosis, la compleja relación entre las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia son el tema de estudio de este trabajo.

1.2.2. Autofagia

La macro-autofagia es un proceso omnipresente en células eucariotas y ocurre a niveles basales. Involucra el aislamiento de partes citoplasmáticas en vesículas de doble membrana (autofagosomas), las cuales se fusionan con lisosomas para formar autolisosomas, en donde el contenido es degradado [35]. Fisiológicamente es una estrategia y mecanismo para la sobrevivencia celular bajo condiciones de estrés y tiene un rol importante en el desarrollo normal, diferenciación y remodelación tisular. Sin embargo, cuando está sobreactivado bajo ciertas circunstancias, el exceso de autofagia lleva a la muerte celular, entonces es considerado como una modalidad de muerte celular, aunque aun no está del todo claro el papel de la autofagia en la muerte celular. La autofagia a menudo se desencadena a través de complejas relaciones de transducción de señales, por la falta de nutrientes, energía, ROS, hipoxia, estímulos farmacológicos, daño mitocondrial y estrés del retículo endoplasmático (RE), por lo que alteraciones en la maquinaria de autofagia pueden conducir a diversas condiciones patológicas [128].

La autofagia o autogestión, es un proceso celular en donde los componentes celulares como las proteínas o incluso los organelos completos son secuestrados en lisosomas para su degradación [92]. La autofagia se lleva a cabo en varios pasos que incluye: iniciación, elongación/cierre de la membrana y fusión con lisosomas, y se ejecuta mediante una serie de genes altamente conservados denominados genes relacionados con la autofagia (*ATG*). El paso de inicio comienza con el aislamiento de membrana desde la membrana externa de las mitocondrias, el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC), el aparato de Golgi, los endosomas de reciclaje o la membrana plasmática. El inicio está regulado por el complejo ULK1 (*ATG13*, *ULK1/2*, *FIP200* y *ATG101*), el cual está funcionalmente acoplado al regulador negativo de la autofagia (complejo mTORC1; *DEPTOR*, *RAPTOR*, *PRAS40*, *mLST8*) y el complejo PI3K de clase III (*vPS34*, *Beclin1*, *ATG14L*, *p150*), el cual está inactivado por proteínas antiapoptóticas *Bcl-2* [113]. Bajo condiciones de ayuno, la actividad

de mTORC1 se suprime, lo que lleva a la disociación y la activación del complejo ULK1, a su vez, el complejo PI3K de clase III genera fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en el sitio de la formación del fagóforo para el reclutamiento de ATG adicionales (ATG9 y VMP1) y el inicio del siguiente paso. El proceso de elongación/cierre de la membrana es controlado mediante dos vías de conjugación tipo ubiquitina que conjugan ATG12 con ATG5 y LC3 con la fosfatidiletanolamina (PE). La conjugación de ATG12 a ATG5 está regulada por las actividades E1 y E2 de ATG7 y ATG10. El complejo ATG12-ATG5 después se asocia con ATG16 para formar un complejo multimérico que se localiza en la superficie externa de la membrana autofagosomal. Posteriormente, la proteína LC3 es conjugada a la PE por ATG7 y ATG3, y el complejo ATG12-ATG5-ATG16 promueve la lipidación de LC3 por PE en la membrana, de esta manera la LC3-PE (LC3-II) se localiza en las membranas interna y externa del autofagosoma. Finalmente, el autofagosoma se fusiona con los lisosomas a través de proteínas tipo-SNARE, lo que lleva a la formación del autolisosoma y la degradación de la carga (Figura 1.5) [86].

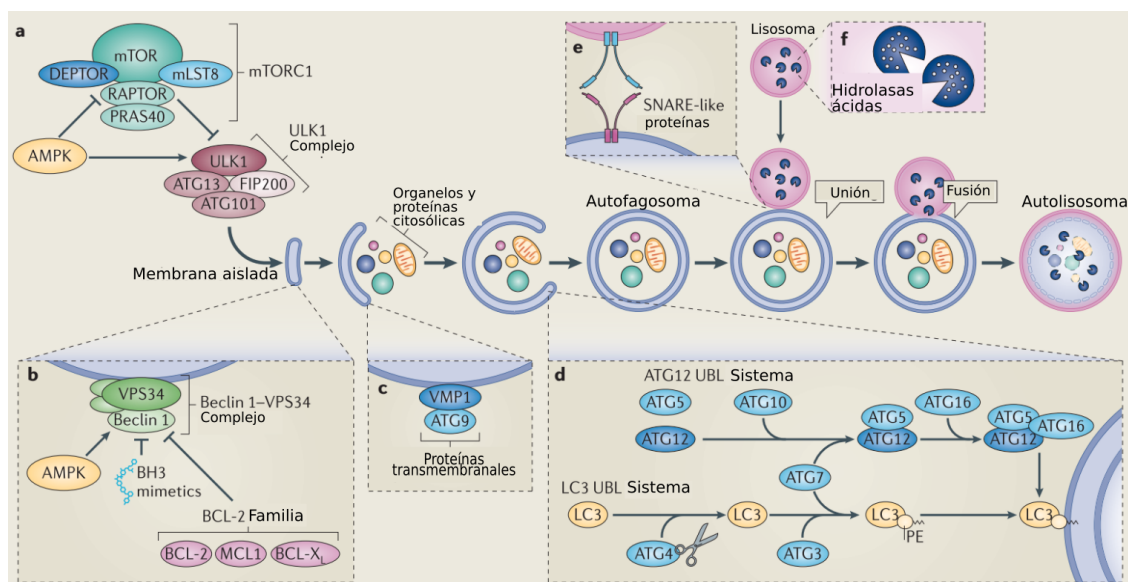


FIGURA 1.5: Vía de autofagia. Tomado de [86]

Desde un punto de vista bioquímico, esta imagen es aún más compleja ya que las proteínas ATG se encuentran en una encrucijada de vías metabólicas importantes: detección de aminoácidos regulada por el complejo mTOR, contenido intracelular de ATP sentido por AMPK y con el mecanismo de señalización de estrés por HIF. Todas estas vías podrían activar/desactivar las proteínas ATG, para obtener un “efecto homeostático”. En otros términos, el “estado basal” de la autofagia en una célula depende estrictamente del estrés metabólico, energético o ambiental [117].

Autofagia y cáncer

La autofagia tiene un papel complejo en el cáncer, y su función es dependiente de varios factores biológicos como, el tipo de tumor, el oncogén conductor y la constelación de genes supresores de tumorales mutados, entre otros [73].

Varias investigaciones han mostrado que la autofagia puede actuar como supresor de tumores así como promotor tumoral. En particular, es importante evaluar si las células malignas dependen de la autofagia para superar el estrés metabólico y energético durante la carcinogénesis o, por el contrario, la autofagia (y la muerte celular asociada a la autofagia) es un proceso esencial para bloquear la carcinogénesis. Recientemente, el neologismo “on-cophagy” se ha acuñado para describir el papel de la autofagia en el cáncer, refiriéndose a la estrecha conexión entre la biología, la terapia del cáncer y la autofagia [117].

Inicialmente se consideró a la autofagia como un mecanismo supresor de tumores, basándose en investigaciones en donde la delección de genes autofágicos en modelos animales generó la iniciación de neoplasias. Específicamente, la delección de una copia del gen *Becn1* genera una autofagia parcialmente atenuada con el resultado de múltiples neoplasias. Por el contrario, la delección completa del gen *Atg5* y por lo tanto la inhibición completa de autofagia, genera el desarrollo de neoplasias benignas solamente en el hígado, demostrando una susceptibilidad dependiente de tipo de tejido y la necesidad de una autofagia intacta para la progresión a un estado maligno. Particularmente, en el 50 % de los casos de cáncer de mama, el gen *Becn1* está eliminado monoalélicamente, por lo que se ha sugerido que una expresión adecuada del gen es crucial para su función supresora [73].

Otra evidencia de la función supresora de tumores fue hecha por Mathew [87] y colaboradores, mostraron que la acumulación de p62 en respuesta al estrés metabólico es un fenotipo en células tumorales con autofagia defectuosas. Las células con autofagia defectuosa causan acumulación de mitocondrias dañadas, estrés oxidativo y activación de la respuesta a daño del ADN, lo cual se atribuye directamente a la persistencia de p62, lo que sugiere que un control de calidad de proteínas defectuoso puede contribuir a tumorigénesis. También ha sido planteado que la autofagia es activada sobre la inducción aguda de senescencia y contribuye a su establecimiento, esto último importante para la rápida remodelación de proteínas requeridas para hacer una transición eficiente de un estado proliferativo a uno senescente. Particularmente evaluaron un subconjunto de genes de la autofagia y otros relacionados, se encuentran sobreexpresados *LC3-II*, *ULK3*, *ATG1*, *FoxO3a* y el complejo *mTOR* (*mTORC1* y *mTORC2*), estos están involucrados en la inducción de autofagia durante la senescencia [152]. En cambio, ya que la autofagia es una respuesta al estrés y un mecanismo de supervivencia, es viable que también contribuya a la supervivencia de las células tumorales, fomenta la agresividad y la resistencia a la terapia. Por ejemplo, Degenhardt [26] y colaboradores demostraron que en el interior de un tumor, en donde hay deficiencia de oxígeno y nutrientes, las células tienden a manifestar grados superiores de autofagia en comparación a las células de las orillas. A su vez, existen evidencias que sugieren que la autofagia tiene un efecto protector, degradando a la caspasa 8 y por lo tanto inhibiendo a la muerte celular, así que en este caso, la inhibición de la autofagia puede re-sensibilizar a células tumorales a

muerte celular por el agente terapéutico particular [83].

Como ya se mencionó, la autofagia también puede considerarse como una modalidad de muerte celular, en donde la muerte celular depende de autofagia pero no es la causa directa. El término muerte celular autofágica (ACD), acuñado en 2004, indica un escenario en el que el aumento de las vacuolas autofágicas sella el destino de la célula. Sin embargo, una disminución o falta de autofagia puede ser igualmente perjudicial y es necesaria una clara discrepancia para dilucidar en qué contexto la autofagia afecta el bienestar celular. Por consiguiente, dependiendo del entorno molecular, la apoptosis a menudo interacciona de manera equilibrada con la autofagia para servir como mecanismo de supervivencia o muerte [130]. Así que, en la siguiente sección proporcionaremos una caracterización de su entrecruzamiento molecular.

1.2.3. Entrecruzamiento entre la apoptosis y la autofagia

Partiendo del hecho de que diferentes vías pueden estar actuando sinérgicamente en muchos procesos biológicos, y que además ya se identificó a las modalidades de muerte y supervivencia como procesos no aislados, se proseguirá a la presentación de evidencia actual, sobre las moléculas iniciadoras y efectoras, vías y sitios subcelulares como mediadores clave, ya sea constituyendo módulos comunes, o alternativamente funcionando como un interruptor, que permite a las células decidir qué ruta tomar. La apoptosis ha sido estudiada por décadas y se considera como el principal mecanismo que regula la muerte celular, entre sus moléculas clave se encuentran las caspasas, sin embargo, se ha encontrado que las caspasas también sirven como moduladores de la autofagia [89]. Las señales pro-apoptóticas activan a las caspasas para ejecutar la apoptosis, sin embargo, la escisión de proteínas ATG mediada por caspasa no siempre resulta en productos de desecho inactivos; en cambio, varios fragmentos ATG adquieren nuevas propiedades, que pueden diferir enormemente de las de sus isoformas iniciales de tamaño completo y, en consecuencia, afectan la apoptosis y la autofagia de numerosas maneras. Por ejemplo, una isoforma de la proteasa ATG4 (ATG4D) es otro sustrato de la caspasa3, se ha demostrado que la escisión de ATG4D por la caspasa3 ocurre en el motivo N-terminal DEVD63K, esta acción devuelve un producto truncado (Δ N63K-ATG4D) con una actividad mejorada sobre las reacciones de procesamiento de Atg8 y en las de deslipidación de Atg8-PE, por lo que la isoforma truncada resultante promueve la autofagia. Por el contrario, cuando se sobreexpresó Δ N63K-ATG4D, contribuía a la apoptosis. Este efecto citotóxico posiblemente se deba a la combinación de los niveles aumentados de Δ N63K-ATG4D y su mayor afinidad por las mitocondrias dañadas lo que llevaría a la posterior liberación de factores proapoptóticos en el citosol [134].

Asimismo, se conoce que una proteína antiapoptótica conocida como CFLAR ó FLIP (proteína reguladora de apoptosis tipo-caspasa), funciona como un regulador negativo de la autofagia (Figura 1.6). CFLAR compite con LC3 por la unión con ATG3 y así evitar la elongación de los autofagosomas mediados por ATG3. Sin embargo, en condiciones de estrés, la atenuada interacción ATG3-LC3 puede inducir autofagia de todas maneras [89].

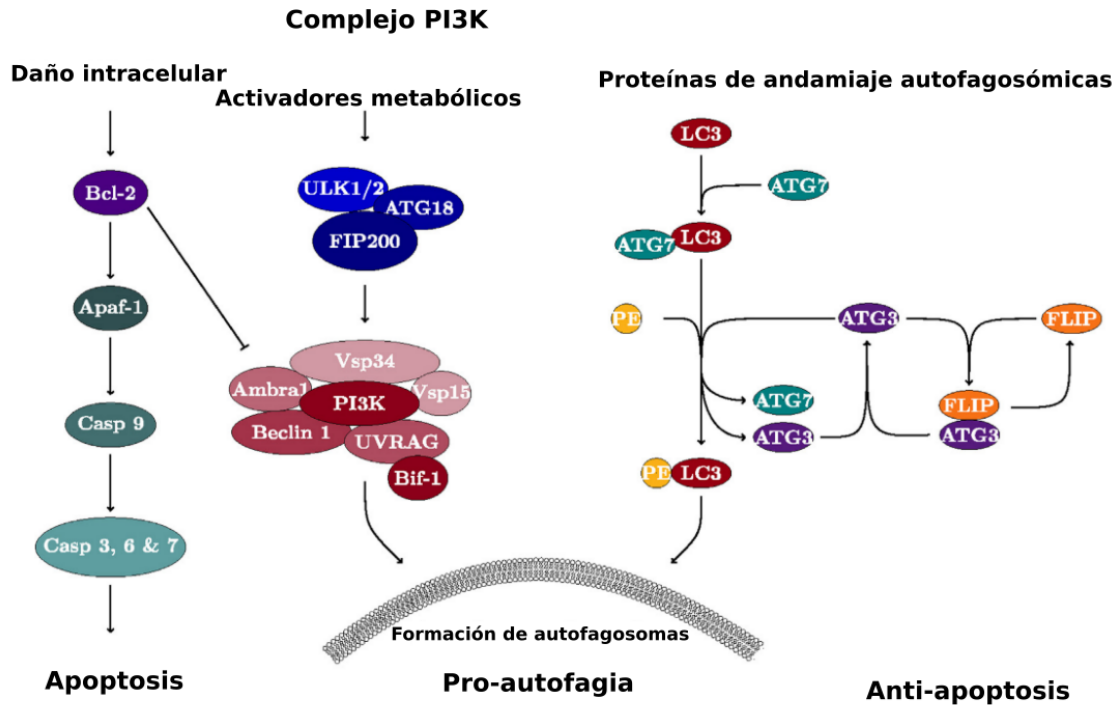


FIGURA 1.6: Entrecruzamiento entre la apoptosis y la autofagia. Tomado de [130]

Cabe destacar que recientemente se ha revelado que existen intersecciones entre los circuitos reguladores que rigen la autofagia y la apoptosis. Por ejemplo, la vía de señalización que implica las cinasas PI3K, AKT y mTOR, que es estimulada por señales de supervivencia para bloquear la apoptosis, inhiben de manera similar a la autofagia. Otra interconexión entre estas dos vías reside en la proteína Beclin-1, la cual es un regulador apoptótico que pertenece a la subfamilia de proteínas BH3, el dominio BH3 le permite unirse a las proteínas Bcl-2/Bcl-xL (antiapoptóticas). Las proteínas BH3 acopladas al sensor de estrés pueden desplazar a Beclin-1 de su asociación con Bcl-2/Bcl-xL, permitiendo que Beclin-1 desencadene la autofagia, del mismo modo pueden liberar a Bax y Bak proapoptóticas para desencadenar la apoptosis (Figura 1.6). Por lo tanto, las proteínas BH3 transductoras de estrés (por ejemplo, Bid, Bad, Puma) pueden inducir apoptosis y/o autofagia dependiendo del estado fisiológico de la célula [44].

Particularmente en el cáncer de mama, los enlaces funcionales entre apoptosis y autofagia, están relacionados con los reguladores clásicos de apoptosis, como Bid, Bcl-2 y caspasas, antes mencionados. Sin embargo, recientemente un estudio ha identificado el factor nuclear *kappa* B (NFκB), el factor regulador de interferón-1 (IRF1) y la proteína de unión a la caja X (TBP) como nuevas proteínas clave que regulan Bcl-2 y Beclin 1 [35, 17]. Por otro lado, las moléculas ejecutoras de autofagia como las catepsinas lisosomales también pueden regular a la apoptosis. Si las catepsinas son liberadas al citoplasma en respuesta a estímulos de muerte, la catepsina D puede activar a la proteína proapoptótica Bax la cual dispara la liberación del factor inductor de la apoptosis desde la mitocondria, también, la catepsina like-papain

puede escindir proteínas proapoptóticas como Bid promoviendo la apoptosis e inhibiendo la autofagia. Cabe resaltar que todas estas evidencias fueron detectadas con modelos celulares de cáncer de mama [35].

Estos ejemplos nos llevan a considerar la vasta interacción entre las vías metabólicas y las vías de señalización que rigen el destino celular [48]. En donde, también existen subsistemas, como los puntos de control mitocondriales, los puntos de control metabólico, el punto de control de la autofagia, entre otros. La extensa conectividad de subredes aumenta aún más esta complejidad. Debido a que la relación entre estos puntos de control es tan profunda e intrincada, y no se pueden disociar entre sí, se necesita un enfoque integrativo, que incluya el entrecruzamiento entre los circuitos antes mencionados [130], un enfoque de sistemas respaldaría esta noción, así que el enfoque a utilizar en este trabajo se describe a continuación.

1.3. Biología de sistemas

A medida que las tecnologías genómicas avanzan y se vuelven más asequibles, nuestra comprensión de cómo la inestabilidad genómica da forma a los diversos fenotipos tumorales se verá enormemente mejorada. Sin embargo, hay un abismo entre nuestra comprensión del genoma del cáncer y nuestra capacidad para traducir estos conocimientos en mejores resultados para los pacientes [151].

Esta problemática, ha sido abordada en las últimas décadas por medio de la secuenciación de nueva generación (NGS), la cual ha demostrado tener un mejor desempeño mostrando una mayor precisión, resolución y sensibilidad. Entre las técnicas NGS más utilizadas se encuentra el análisis transcriptómico RNA-seq que permite cuantificar y secuenciar el transcriptoma completo de un tejido o tipo celular, generando grandes cantidades de información biológica. Para el procesamiento de estos datos se hace necesario utilizar métodos más eficientes que sean capaces de integrar la enorme cantidad de datos obtenidos y así hacer frente a los problemas de interés biológico [138]. Aquí es donde entra en juego la disciplina conocida como Biología de Sistemas.

La biología de sistemas es una disciplina de reciente creación que estudia las interacciones complejas dentro de los elementos que componen los sistemas biológicos a partir de su estructura y organización. La biología de sistemas busca conjuntar los datos obtenidos con tecnologías masivas (ómicas), el extenso cuerpo de información documental disponible a través de tecnologías de la información, y las herramientas físico-matemáticas necesarias para su análisis [60]. Es decir, esta disciplina combina datos experimentales cuantitativos de redes moleculares complejas con modelado computacional. Este último, se refiere a las representaciones matemáticas y virtuales del sistema biológico de interés en la computadora, donde hay una correspondencia entre partes del sistema biológico y partes del modelo [68].

Los componentes centrales de un flujo de trabajo en biología de sistemas son: (1) Obtención de datos de alta dimensión (genómica, transcriptómica, etc.), ya sea experimentalmente

o de la literatura existente; (2) Métodos computacionales para la integración y contextualización de los datos; y (3) El campo de aplicación para el refinamiento iterativo del modelo computacional a través de experimentos adicionales (“modelo como hipótesis”) [33] (Figura 1.7). Así que, se debe observar, medir y modelar sistemas completos para capturar propiedades emergentes. Sin embargo, el reduccionismo y el pensamiento sistémico no son exclusivos u opuestos. Es necesario comprender los componentes de un sistema y su funcionamiento integrado.

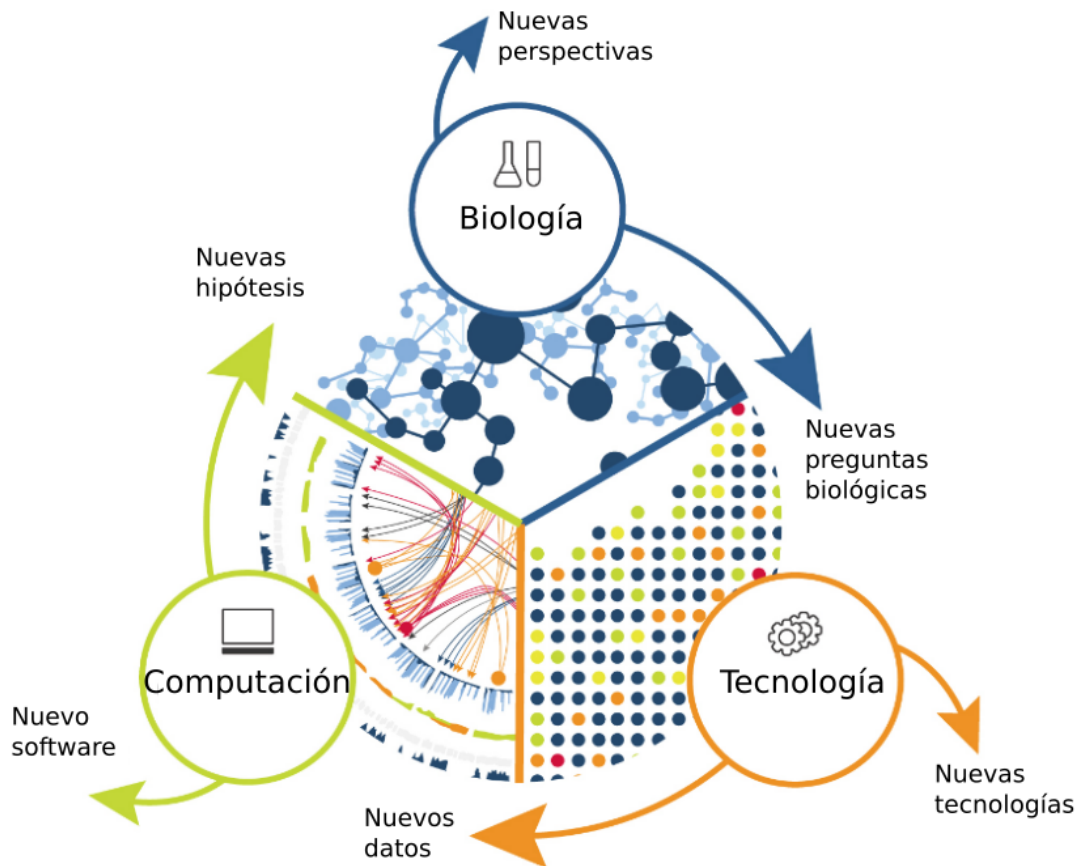


FIGURA 1.7: Biología de sistemas, crea el potencial para nuevos enfoques de investigación e impulsa la innovación constante en tecnología y computación basada en biología. Tomado de <https://omicscouts.com/en/disease-and-systems-biology.html>

En la actualidad, el estudio del cáncer desde la biología de sistemas es un área de mucho interés, ya que en el cáncer intervienen muchos factores, lo que lo hace un sistema complejo. Además, Hanahan y Weinberg en el 2000, mencionan que el cáncer es una enfermedad de vías, por lo que tratar de ubicar dichos factores dentro de su contexto biológico es deseable.

A continuación se revisarán las herramientas y los enfoques que se utilizaron en este trabajo.

1.3.1. **Redes biológicas**

Uno de los principales enfoques a utilizar en este trabajo es la construcción y análisis de redes. A la fecha, está claro que una función biológica, rara vez puede atribuirse a una molécula individual [8], por lo contrario, se atribuyen a conjuntos de moléculas relacionadas entre sí. Estas son llamadas redes biológicas.

Una red es llamada formalmente como un grafo, está formado por un conjunto de nodos y aristas. Una aproximación posible al estudio de las redes consiste en utilizar técnicas de teoría de grafos (cuantificando diferentes propiedades de la conectividad de la red) para obtener información general de la estructura y su implicación en el funcionamiento global del modelo de estudio [126].

La representación matemática de las redes biológicas no es trivial. Las interacciones físicas entre las moléculas, como las interacciones proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y proteína-metabolito, pueden representarse fácilmente utilizando la nomenclatura arista-nodo. Sin embargo, también pueden considerarse interacciones funcionales más complejas dentro de esta representación. Por ejemplo, los elementos de reacciones químicas, como los sustratos se pueden representar como los nodos de una red metabólica y las aristas como las reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas que transforman un metabolito en otro (Figura 1.8). Además, ninguna de estas redes es independiente, sino que forman una "red de redes" responsable del comportamiento celular.

Otro de los enfoques a utilizar en este trabajo es la construcción de redes de regulación genética a través de modelos probabilísticos.

Redes de regulación génica (RRG)

Dado que la regulación génica eucariota está organizada jerárquicamente con proteínas producto de genes regulados que a su vez regulan la expresión de otros genes, las redes de correlación gen-gen proporcionan la primera visión a escala genómica de la regulación génica en diversos contextos, como la embriogénesis, la hematopoyesis, la oncogénesis y la inflamación [126].

Una red de regulación génica se puede definir como una representación del estado celular basada en la teoría de redes, la cual permite definir las relaciones entre los genes de un grupo de células lo más homogéneo posible [58]. Estas también se conocen como redes de coexpresión o correlación, están basadas en datos de expresión génica, los nodos representan genes y las aristas coexpresión [58]. Dos genes están conectados por una arista si sus actividades tienen asociación significativa sobre una serie de medidas de expresión. Se identifican cuáles genes tienden a mostrar un parámetro de expresión coordinado a través de un grupo de muestras [25].

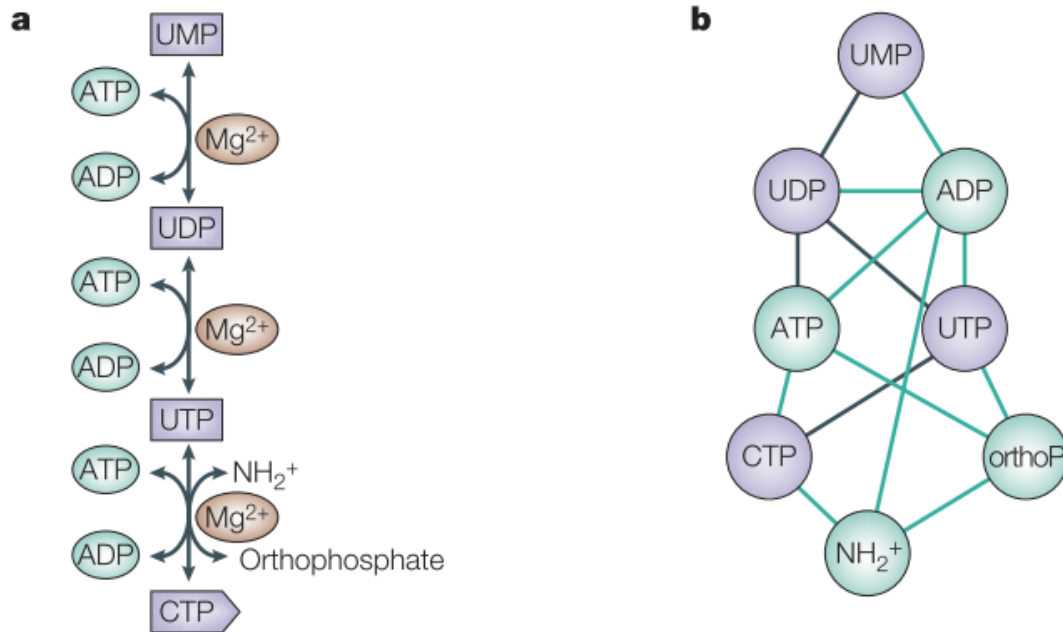


FIGURA 1.8: Representación de redes metabólicas. La descripción teórica de una vía simple (Biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas) es ilustrada. a) Red metabólica en su enfoque más completo y abstracto b) Todos los metabolitos que interactúan en la vía se consideran por igual, los enlaces entre los nodos representan las reacciones que convierten un sustrato en otro. Tomado de [8]

Además, la fortaleza de estas redes está relacionada con su capacidad para resaltar genes que impulsan mecanismos moleculares detrás de procesos biológicos específicos y la identificación de las vías que están funcionalmente involucradas en el sistema de estudio y los reguladores clave de las vías o módulos identificados [30].

Entre los métodos predominantemente utilizados, para la inferencia de redes de coexpresión se encuentran los algoritmos de agrupamiento y los algoritmos basados en relaciones probabilísticas, como las redes bayesianas y los basados en información mutua respectivamente [58].

Información mutua

La información mutua (IM) es una medida de la dependencia estadística basada en la teoría de la información, que permite seleccionar las variables representativas del fenómeno e inferir redes a partir de conjuntos de datos con relaciones no lineales y gran cantidad de ruido, como es el caso de los datos genómicos [58].

La aplicación de la IM para relacionar los perfiles de expresión entre parejas de genes tiene ciertas implicaciones matemáticas. La entropía de Shannon-Weaver es máxima para las variables uniformemente distribuidas, por lo tanto es una propiedad que se relaciona con la capacidad predictiva de una distribución. Esta medida se puede aplicar de forma condicional

para medir la incertidumbre de un par de variables cuando una de ellas es conocida, por lo tanto la entropía condicional entre un par de variables es máxima cuando sus distribuciones son estadísticamente independientes [58]. Bajo esta definición, la entropía de un conjunto de genes aumentaría en la medida que su expresión se distribuyera de manera aleatoria en el experimento. En cambio, la reducción en la entropía condicional de la distribución conjunta de una variable con respecto a su entropía marginal es lo que se conoce como IM. Debido a la relación que existe entre IM y la entropía de Shannon como medida de la dependencia estadística, la IM entre los valores de expresión de una pareja de genes es igual a cero sólo si son estadísticamente independientes, y diferente de cero cuando hay una asociación entre ambos genes; lo que significa que el conocer el perfil de expresión de uno de ellos nos permite obtener información de otros que no podríamos conocer a partir de perfiles individuales. Debido a que la IM es simétrica, las redes inferidas por medio de ésta medida son no dirigidas [41].

Para obtener las redes de regulación genéticas, se utilizará el algoritmo conocido como ARACNe (Algorithm for the Reconstruction of Accurate Cellular Networks), el cual calcula las interacciones como la dependencia estadística o IM entre el perfil de expresión de una pareja de mARNs.

El tipo de interacciones físicas identificadas por ARACNe, correspondientes a las dependencias estadísticas no siempre son claras. Esto debido a que, las mediciones de abundancia de mARN sirven como un proxy para las especies moleculares que interactúan (es decir, las concentraciones de proteínas activadas). Por ejemplo, en el trabajo original de Margolin y colaboradores (2006) explican que si la actividad de un factor de transcripción esta medida principalmente por una enzima activadora, en lugar de por cambios en su nivel de abundancia de mARN, se espera que ARACNE identifique las dependencias entre esta enzima y los genes objetivo del factor de transcripción. Por lo tanto, se espera que algunas interacciones de las RRGs correspondan a las interacciones de una red proteína-proteína [85].

1.3.2. **Análisis de vías**

El análisis de vías también es conocido como análisis de enriquecimiento funcional. El propósito principal es analizar los datos obtenidos de tecnologías de alto rendimiento, detectando grupos relevantes de genes que están alterados en muestras problema en comparación a muestras control. Por lo que intentan superar el problema de interpretar listas grandes de genes diferencialmente expresados, pero aislados del contexto biológico. Algunos de los elementos necesarios para realizar el análisis de vías son los siguientes: datos cuantitativos representativos del modelo de estudio (RNAseq), conocimiento biológico almacenado en bases de datos (KEGG, EcoCyc, REACTOME) y el equipo computacional junto con las pruebas estadísticas y los algoritmos necesarios que nos permitan extraer las relaciones entre los datos y el conocimiento previo [42].

Existen diferentes métodos para realizar este tipo de análisis, entre estos se encuentran, los de primera generación también conocido como análisis de sobre-representación en el que

se pueden detectar vías relevantes si la proporción de genes expresados diferencialmente excede la proporción de genes que podrían esperarse al azar. Los de segunda generación también conocidos como los de puntaje de clase funcional, se basan en que no solo los grandes cambios en la expresión génica tienen efectos significativos en una vía, sino que los cambios coordinados entre todos los genes que componen a la vía tienen un impacto en el estado general de este. Y por último, tenemos a los de tercera generación los cuales están basados en la topología de las vías, este toma en cuenta las interacciones encontradas entre todos los elementos de la vía, por lo que ayudaran a interpretar los cambios correlacionados entre los elementos que lo conforman [42].

El método a usar en este trabajo es de segunda generación, el algoritmo de este tipo lleva por nombre *Pathifier* el cual es descrito a continuación.

Pathifier [31] es un algoritmo semi supervisado, que utiliza toda la información disponible de las mediciones experimentales de los niveles de expresión de los genes para evaluar la deregulación de vías para una condición con respecto a un control [42]. El algoritmo *Pathifier* realiza un análisis de componentes principales, evaluando la expresión de los genes pertenecientes a un determinada vía en un sistema de coordenadas creando una nube de puntos. Posteriormente, los puntos son usados para calcular una curva principal, usando a las muestras control para determinar el punto inicial del centroide. Finalmente, los puntos que corresponden a las muestras son proyectados a su punto más cercano en la curva principal asignando un valor PDS (“Puntaje de Deregulación de Vía”), que toma valores entre 0 y 1, que corresponde a la distancia relativa desde la proyección de la muestra al punto inicial en el centroide. Lo que quiere decir, es que los valores de PDS cercanos a 0 representan valores de expresión similares al grupo control y los valores cercanos a 1 representan a las muestras cuya expresión muestra las mayores diferencias respecto al control [31] (Figura 1.9).

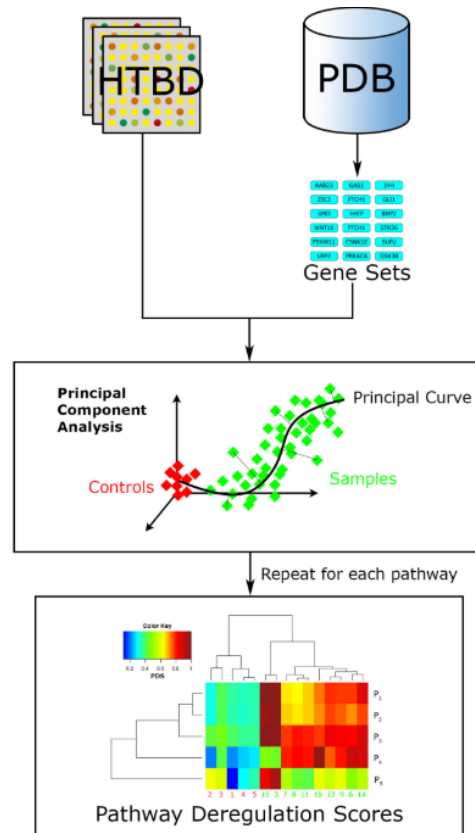


FIGURA 1.9: Flujo de trabajo de *pathifier*. *Pathifier* necesita de dos *inputs*, una lista de vías en un formato *gene sets* y datos biológicos de alto rendimiento (HTBD) etiquetados en dos grupos (controles y muestras). Se analiza una vía cada vez en los datos HTDB, de esta manera se obtiene un valor de PDS para cada par vía-muestra, finalizando con una matriz con todos los valores de PDS. Tomado de [42]

1.4. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado entre las mujeres en la gran mayoría de los países en el mundo. Aunque alguna vez se consideró una enfermedad de las mujeres occidentales, más de la mitad (52%) de los nuevos casos de cáncer de mama y el 62% de las muertes se producen en los países en desarrollo [28].

En México, con una población un poco mayor de 100 millones de habitantes, el cáncer de mama es uno de los desafíos más importantes para la salud de la mujer adulta. Representa una pesada carga de muertes prematuras, ya que 60% de las mujeres que mueren tiene entre 30 y 59 años de edad [74]. Actualmente las tasas de mortalidad por cáncer de mama han aumentado reflejando tendencias de incidencia crecientes y en algunos casos, acceso limitado al tratamiento [37].

El cáncer de mama se puede definir como un grupo heterogéneo de neoplasias originadas en las células del tejido mamario, principalmente en las células que bordean los ductos lácteos y los lóbulos que les proveen la leche a los ductos [107].

El cáncer de mama ha sido ampliamente caracterizado a nivel molecular y se han identificado diversas fuentes de variación biológicas, heredadas y adquiridas, que contribuyen a su iniciación y progresión. Esto se refleja en la heterogeneidad celular y molecular que se traduce a una respuesta terapéutica dispar.

1.4.1. Heterogeneidad

El término heterogeneidad hace referencia a las variaciones genéticas y fenotípicas que son observadas entre tumores de diferente tejido y tipo celular (heterogeneidad intertumoral) y también dentro de los tumores individuales (heterogeneidad intratumoral). Esta heterogeneidad tiene implicaciones significativas para guiar la toma de decisiones clínicas en el tratamiento del cáncer [115].

El estudio de la heterogeneidad intertumoral en cáncer de mama ha dado como resultado una clasificación molecular basada en perfiles de expresión génica resultado por ejemplo, de los trabajos de Perou [105] y Sorlie [127]. Estos estudios fueron los primeros en demostrar que los cánceres de mama con receptor de estrógeno (ER) positivo y ER negativo son enfermedades biológicamente distintas con respecto a su análisis molecular, a partir de éstos se implementó el algoritmo PAM50 (Prediction Analysis of Microarrays), basado en una firma molecular de 50 genes se identificaron varios subtipos. La clasificación molecular fue establecida usando métodos computacionales que evalúan similitudes entre los perfiles de expresión génica de muestras individuales, de una corte de cáncer de mama. Los clusters fueron identificados basándose en los patrones de genes altamente expresados [115]. Cuatro son los subtipos moleculares más ampliamente descritos, cada uno de ellos con características biológicas y clínicas particulares [102]. Estos subtipos son: Luminal A, Luminal B, HER2+ y Basal, el presente trabajo se enfoca en estos, los cuales son descritos a continuación.

Subtipos moleculares

En general los subtipos luminales están caracterizados por alta expresión de genes particulares de las células luminales de la mama que incluyen ER, receptor de progesterona (PR) y las citoqueratinas (CK). Se asocian con un buen pronóstico y excelente supervivencia a largo plazo (aproximadamente del 80 % al 85 % de supervivencia a 5 años). Los subtipos HER2+ y Basal-like están caracterizados por una baja o ausencia de expresión de los genes ER y PR. Son difíciles de tratar y se asocian a un mal pronóstico (aproximadamente del 50 % al 60 % de supervivencia a 5 años) (Figura 1.10) [22].

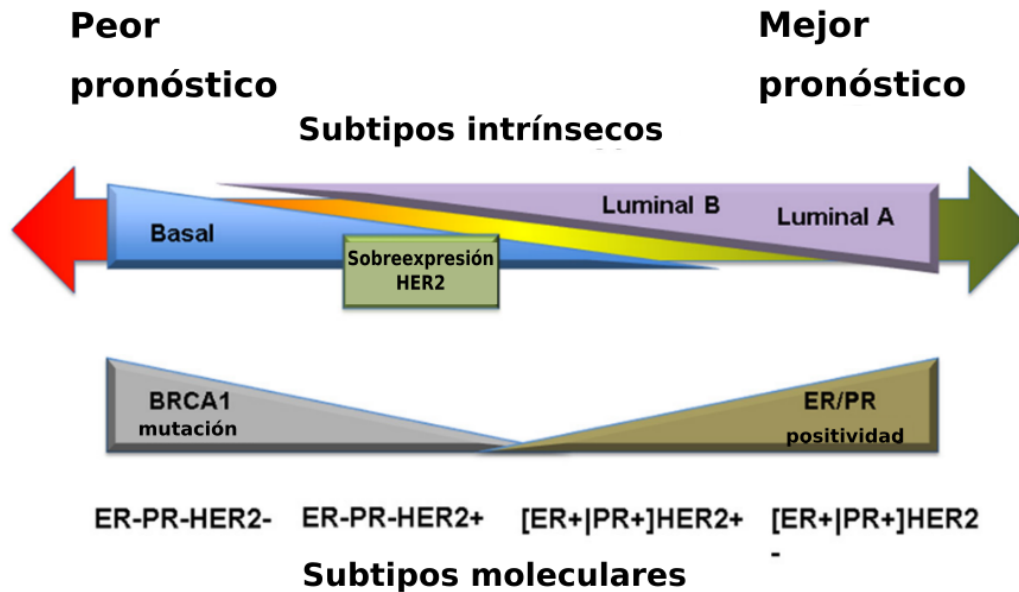


FIGURA 1.10: Subtipos moleculares de cáncer de mama. Los subtipos luminales son aquellos con mejor pronóstico (derecha), son positivos para el receptor de estrógeno (ER) y el receptor de progesterona (PR), pero para el receptor HER2 solo el subtipo luminal B es positivo. Los subtipos HER2 y Basal son los de peor pronóstico (izquierda), estos son negativos para el ER y el receptor de PR, sin embargo el receptor HER2 subtipo HER2 es positivo para HER2 mientras que el subtipo Basal es negativo y presenta mutaciones en el gen BRCA1. Tomado de [24]

- **Luminal A:** es el subtipo más común, representa aproximadamente el 40 % de todos los cánceres de mama. Típicamente tienen alta expresión de genes relacionados con ER, ESR1, XBP1 y baja expresión de genes HER2 y aquellos relacionados con la proliferación. Además mutaciones en los genes PIK3CA, MAP3KI, GATA3 y FOXA1.
- **Luminal B:** representa aproximadamente el 20 % de todos los cánceres de mama. Tienen una menor expresión de genes relacionados con ER, expresión variable de los genes HER2 y mayor expresión de los genes relacionados con la proliferación. El principal gen mutado es TP53, y también muestran inestabilidad genética.
- **HER2+:** HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano y cabe resaltar que se comporta como un oncogen. Este subtipo representa aproximadamente el 10-15 % de todos los cánceres de mama. Se caracteriza por una alta expresión de los genes HER2, FGFR4 y EGFR, mutaciones en los genes TP53, PIK3CA, APOBEC y CCND1.
- **Basal:** representan aproximadamente el 15-20 % de todos los cánceres de mama. Se caracteriza por una baja expresión de los genes luminal, HER2 y una alta expresión de un grupo de genes de proliferación, además exhibe algunas características de células mio-epiteliales de mama. Aunque la mayoría de los cánceres de mama de tipo basal

son triple negativos (ER-negativo, PR-negativo, HER2-negativo), no todos los triples-negativos son basales. Presentan una alta expresión de citoqueratinas de alto peso molecular (CK 5/6 y 17) junto con EGFR, c-KIT, FOXC1, mutaciones frecuentes de TP53 , RB1, BRCA1, laminina y la proteína de unión a ácidos grasos 7, además tiene un alto índice de proliferación.

En estudios posteriores, ha sido re-evaluada la clasificación molecular utilizando otras plataformas transcriptómicas incluyendo qPCR, mostrando gran reproducibilidad lo que sugiere que estos subtipos son biológicamente robustos [108]. Sin embargo, además de que cada subtipo tiene ciertas mutaciones asociadas, hay una diversidad en la naturaleza, número y distribución de las mismas. Muchos de las vías que adquieren mutaciones somáticas han sido pobremente estudiadas, por ejemplo, en cáncer de mama al menos seis o siete mutaciones específicas han sido identificadas, sin embargo solo una o dos están asociadas a procesos biológicos [98].

Ya que una meta terapéutica en el cáncer es inducir la muerte celular, bloqueando los factores que la inhiben e induciéndola con fármacos quimioterapéuticos o radioterapia y la mayoría de los fármacos antineoplásicos son inductores directos o indirectos de muerte [39], se propone explorar las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia en cáncer de mama.

La autofagia y la apoptosis frecuentemente acontecen en la misma célula, la mayoría de las veces en secuencia en donde la autofagia precede a la apoptosis, como estrategia de adaptación y para hacer frente al estrés [86]; así que, entre la variedad de mecanismos que evitan la apoptosis, la compleja relación entre las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia son el tema de estudio de este trabajo.

Capítulo 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es una patología que implica desregulación metabólica y hormonal, inestabilidad genómica, inflamación, respuesta inmune anormal, reordenamientos cromosómicos, mutaciones, anomalías de expresión génica y entrecruzamiento entre vías [59]. Lo anterior se refleja en heterogeneidad y por ende en respuesta dispar a la terapia. Si uno observa el transcriptoma de una célula, la identidad celular es determinada por la red génica regulatoria y cada estado molecular corresponde a cierto fenotipo que puede ser inferido desde los perfiles de expresión génica [144].

La vida de la célula está basada en su metabolismo, las alteraciones en el metabolismo pueden llevar a disfunciones celulares que usualmente se traducen a enfermedades. Este puede ser estudiado a través del estudio de las relaciones entre los procesos celulares los cuales están definidos en las vías (de señalización, metabólicas y de regulación genética). Las vías están compuestas por un conjunto de moléculas, o bien proteínas, por ejemplo, enzimas, transportadores, factores de transcripción, proteínas de señalización, o todas las reacciones metabólicas (compuestos y enzimas), que están involucradas en un proceso celular. Esta representación ha sido usada para encontrar principios de organización en torno a diferentes procesos celulares o para resaltar diferentes vías asociadas a enfermedades [45].

En este sentido, recordemos que comúnmente las vías trabajan juntas para realizar tareas y que el cáncer es una enfermedad basada en vías [53], y como tal, el análisis de estas es una herramienta poderosa para comprender las complejas relaciones e interacciones que están involucradas en el cáncer. Además, como representaciones de la biología molecular de la célula, no es sorprendente que muchas de las diversas vías que participan en la célula compartan muchas moléculas entre sí, pudiendo presentar entrecruzamientos [5]. Estas intersecciones no son triviales, ya que los procesos involucrados con una función fisiológica (o patológica) puede estar funcionando de tal manera que la alteración en una vía, conduce a la alteración en muchas otras.

Ya que los mecanismos que propician la evasión de la muerte están particularmente representados en dos vías (apoptosis y autofagia), en el presente trabajo se propone realizar

un análisis que identifique las vías desreguladas que entrecruzan con apoptosis y autofagia por subtipo tumoral. Además se hará un modelo de redes para la identificación de los diferentes genes co-expresados asociados en los puntos de entrecruzamiento de apoptosis y autofagia, con el fin de identificar los puntos de encuentro que pueden estar involucrados en la evasión de la muerte celular en cáncer de mama; en este contexto nuestra pregunta de investigación es la siguiente.

¿Cuáles son los puntos del entrecruzamiento con apoptosis y autofagia que podrían asociarse a la evasión de la muerte celular en cáncer de mama?

Capítulo 3

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar el entrecruzamiento de las vías de regulación de la apoptosis y autofagia para identificar los puntos de encuentro que podrían estar involucrados en la evasión de la muerte celular en el cáncer de mama.

3.2. Objetivos particulares

- Identificar el entrecruzamiento de las vías de regulación de la apoptosis y autofagia.
- Identificar subgrupos de vías asociados a apoptosis y autofagia que estén desregulados en cada subtipo tumoral.
- Identificar los genes co-expresados asociados a las moléculas de entrecruzamiento en cada subtipo tumoral.
- Integrar la evidencia de desregulación y co-expresión en las redes de entrecruzamiento en cada subtipo tumoral.

Capítulo 4

MÉTODOS

La metodología general para realizar el análisis integral del entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia en cáncer de mama se encuentra en el siguiente esquema (Figura 4.1). A continuación se describe brevemente la metodología utilizada en este trabajo.

El objetivo de este trabajo está relacionado con el uso de conocimiento acumulado en bases de datos, en este caso las vías de KEGG, para el análisis de datos transcriptómicos (RNAseq). En conjunto, estos dos tipos de información se utilizaron para realizar los siguientes análisis. Primero se buscaron las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia (AA) utilizando exclusivamente los conjuntos de moléculas que integran a las vías. Posteriormente, a partir de las matrices de los transcritos pertenecientes a cada subtipo tumoral, se implementó el algoritmo ARACNe obteniendo RRG(s). Después, se implementó el algoritmo *Pathifier*, para realizar un análisis de desregulación de las vías de interés. Y finalmente, utilizando criterios de los diferentes análisis, se seleccionaron e integraron (incluyendo los DEGs obtenidos de un análisis de expresión diferencial) un grupo de 5 vías. Se buscan evidencias, que podrían estar relacionadas con la evasión de la muerte celular por apoptosis por el entrecruzamiento entre diferentes vías, entre estas, de especial interés autofagia por su antagónica relación con apoptosis.

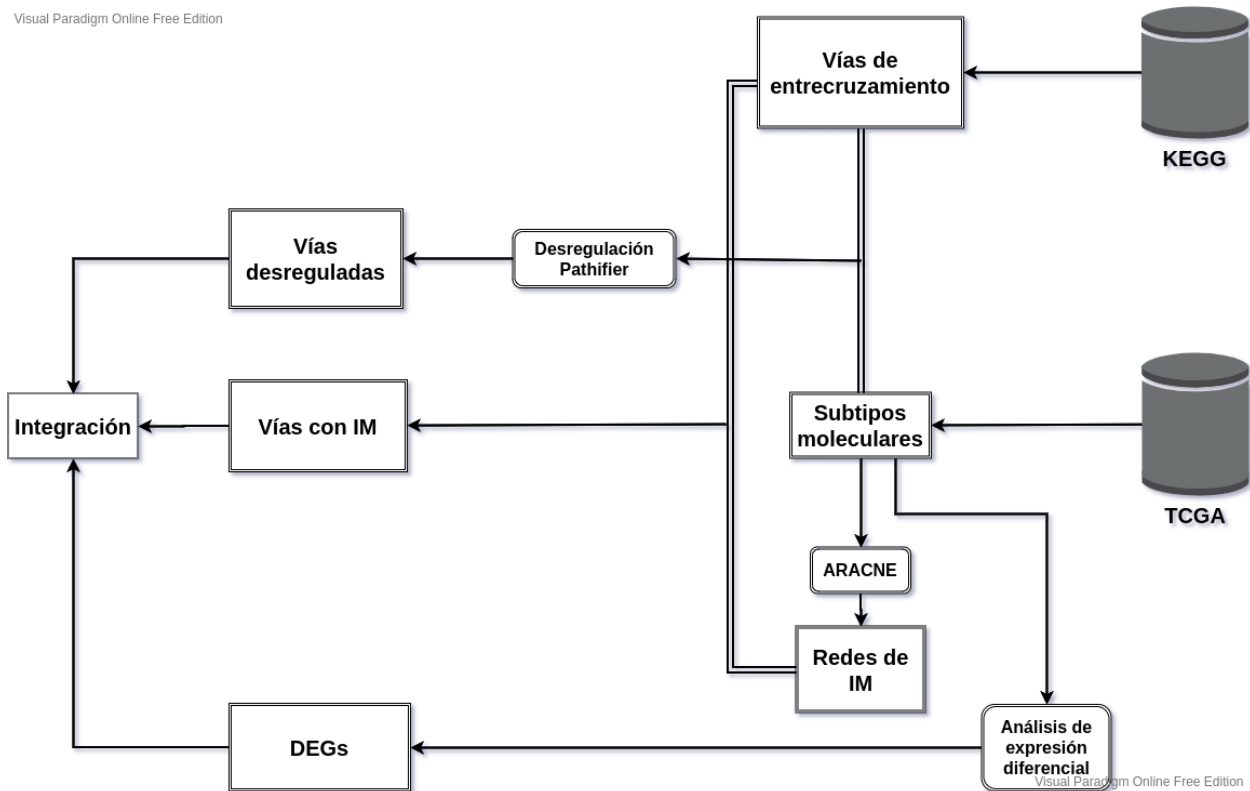


FIGURA 4.1: Esquema general de la metodología. El análisis inicia con el preprocesamiento de los datos de RNAseq de las muestras seleccionadas de TCGA, de este proceso se obtiene una matriz de expresión que contiene la expresión de cada gen para cada una de las muestras; a partir de la matriz de expresión inicial se realizó subtipificación de las muestras utilizando el algoritmo PAM50. Utilizando la base de datos KEGG se realizó el análisis de entrecruzamiento y el análisis de desregulación utilizando el algoritmo Pathifier, integrando los últimos análisis se obtuvieron grupos de vías desreguladas que entrecruzan con apoptosis y autofagia por subtipo molecular. Por otro lado utilizando los datos de RNAseq se infirieron 4 RRGs por subtipo molecular e integrando estas RRGs y los vías de entrecruzamiento se obtuvieron las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia y que tienen interacciones con IM. Por último se realizó un análisis de expresión diferencial por subtipo molecular. Finalmente se integraron los resultados del análisis de desregulación, análisis de redes y expresión diferencial.

4.1. Obtención de datos

La obtención de los datos, su procesamiento, subtipificación así como la inferencia de redes de regulación genética (RRG) se realizó por el grupo de investigación "Biología de Sistemas Computacional/Genómica Integrativa" (CSBIG) perteneciente al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN); cada etapa se describe en las siguientes secciones.

4.1.1. Datos de expresión

La información experimental se obtuvo del repositorio público *Genomic Data Commons* (GDC), el cual pertenece a un programa de investigación del *National Cancer Institute* (NCI). La misión del GDC es proporcionar a la comunidad que realiza investigación en cáncer, un repositorio de datos unificado que permita compartir datos en apoyo a la medicina de precisión [49].

Desde el portal de GDC se obtuvieron los datos de expresión para las muestras de cáncer de mama primario y las muestras control correspondientes a tejido sano adyacente al tejido tumoral. Estos datos pertenecen a individuos de sexo femenino. Se eligieron los datos provenientes de la secuenciación del RNA mensajero (mRNA) realizada con tecnología IlluminaHiSeq - Nivel 3, los cuales fueron descargados en forma de *Raw counts*.

4.1.2. Preprocesamiento

La secuenciación de alto rendimiento (RNAseq), implica mapear fragmentos de ADNc secuenciado a un genoma de referencia, por lo que el número de lecturas asignadas a un gen se usa para cuantificar su expresión. Para convertir los conteos en un valor informativo de expresión génica se necesita la normalización. En general, se transforman las distribuciones de los datos haciéndolas comparables. Para ello, se corrigen ciertos sesgos inherentes de la tecnología que afectan la cuantificación, como, la longitud del transcrito, el contenido de CG y la profundidad de la secuenciación [36].

Se han propuesto muchos esquemas de normalización para tener en cuenta los sesgos entre muestras, y se han hecho varios intentos para determinar la mejor estrategia. Sin embargo, la elección depende de los supuestos válidos para los datos [143], así que es recomendable una análisis exploratorio y la comparación entre varios enfoques y de diferentes paquetes especializados.

En la primera parte del procesamiento de los datos, se integraron todos los archivos de *raw counts*, tomando en cuenta que la matriz resultante tuvieran la misma dimensión y la misma notación en formato ensembl (Biomart, *Homo sapiens* - GRCh38.p2).

Posteriormente se normalizaron los datos, para esto se utilizaron scripts personalizados junto con los siguientes paquetes de R:

- **NOIseq**: Es un paquete de R para el análisis de datos de RNA-seq. Este paquete fue utilizado para el control de calidad global de las secuencias con el objetivo de evaluar varios aspectos. Se evaluó la abundancia y la distribución relativa del biotipo, también la distribución de los conteos por muestra y por factores experimentales, así como la saturación, osea el número de genes detectados (*conteos* > 0) por muestra en diferentes profundidades de secuenciación con simulaciones de NOISeq. También, se probaron

diferentes gráficos de detección de sesgos, como longitud media de genes, el contenido de GC y contenido de ARN.

- EDAsq: este paquete se utilizó para la eliminación del efecto *batch*, así como para el filtrado de los genes con *conteosmedios* < 10 . La estrategia de normalización, para la longitud y contenido de CG se utilizó *Full quantile* y TMM para la normalización entre muestras.
- ARSyN: el paquete ARSyN se utilizó para la reducción de ruido multidimensional utilizando parámetros predeterminados. Esta estrategia es útil para eliminar el ruido sistemático y/o los efectos por lotes. Básicamente, descompone la matriz de expresión en una suma de matrices de acuerdo con un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el diseño experimental más el término de error aleatorio. Luego, cada matriz puede ser analizada por PCA y reconstruida utilizando solo los primeros valores propios que explican más del 75 % de los datos, más su error apropiado. La matriz de expresión filtrada resultaría de restar a la matriz de expresión original, el error de cada reconstrucción de la matriz de factores más la señal del término de error aleatorio.

Finalmente, se obtuvo una matriz de expresión de transcritos normalizada para cada categoría (tumor y control), en donde en las columnas tenemos a las muestras y en las filas a los transcritos.

4.1.3. Clasificación molecular

Posteriormente se realizó la subtipificación de las muestras tumorales utilizando el algoritmo PAM50. PAM50 analiza los perfiles de expresión de 50 genes y su resultado final es la clasificación de cada muestra en uno de los 5 subtipos tumorales con relevancia clínica, denominados LuminalA, LuminalB, HER2, Normal-like y Basal. El algoritmo PAM50 fue implementado en lenguaje R utilizando el paquete *pbcmc* (Permutation-Based Confidence for Molecular Classification), disponible en la página de los autores <http://www.bioconductor.org/packages/3.8/bioc/html/pbcmc.html>.

4.1.4. Redes de regulación genética

Para inferir las redes de regulación genética (RRG) para cada subtipo tumoral establecido, se implementó el algoritmo ARACNE paralelizado, el cual usa los valores de expresión de los datos de RNAseq.

La implementación de ARACNE paralelizado se encuentra disponible en <https://github.com/CSB-IG/parallel-aracne>. El algoritmo se ejecutó en una unidad de súper-computo con un CPU Intel Xeon E5-2650 v2 con 32 núcleos a 2.60GHz con 384 GB disponibles en RAM. La matriz resultante del cálculo de Información Mutua (IM) para cada par

de genes es una matriz cuadrada de tamaño $n \times n$, donde n es el número de genes analizados ($n = 14,474$).

4.2. Análisis de expresión diferencial

La expresión diferencial expone las diferencias en la abundancia de los mismos genes entre dos o varias condiciones. Se busca proporcionar una magnitud y confianza estadística de esta diferencia [123].

Existen distintos métodos para realizar un análisis de expresión diferencial para datos de RNA-seq, y pueden ser agrupados en dos categorías: paramétricos y no paramétricos. Los métodos paramétricos, asumen que la expresión de cada gen sigue una distribución particular, como una distribución Poisson o binomial negativa, por ejemplo, DEseq, edgeR y limma son algunos paquetes de esta categoría. Por el contrario, los métodos no paramétricos capturan mas detalles de la distribución, ya que toman en consideración que la distribución de los datos no puede ser definida por un conjunto finito de parámetros, por ejemplo, los paquetes NOIseq y SAMseq [19]. Se debe tomar en cuenta que, la elección del enfoque a usar, puede tener un efecto en los resultados del análisis de expresión diferencial y ninguna herramienta es óptima en todas las circunstancias. Sin embargo, son extensas las evaluaciones de todas las herramientas, en éstas, se recomienda que se tome en cuenta el número de replicas así como la heterogeneidad entre las muestras para la elección de la herramienta [123]. Varios estudios coinciden en que limma tiene un buen desempeño en muchas circunstancias, por lo que es la herramienta de elección en este trabajo. Particularmente, el paquete limma es una librería de Bioconductor, basado en modelos lineales generalizados.

En el análisis de expresión diferencial se realizaron cuatro comparaciones, una por cada subtipo tumoral. Cada comparación se realizó entre las muestras pertenecientes a un subtipo tumoral determinado y las muestras control. Para ello se utilizaron los datos de expresión de RNaseq previamente normalizados y subtipificados y se implementó el paquete limma. Se consideraron diferencialmente expresados aquellos conjuntos de genes que presentan un *log-fold change* mayor a 0.5, y que presentan un estadístico B mayor a 5. El equipo empleado para este análisis fue un procesador IntelCore i5-7300HQ con 12 GB disponibles en RAM. Los paquetes ggplot2 y dplyr de Bioconductor se utilizaron para la visualización de resultados y manejo de datos.

4.3. Reconstrucción de redes biológicas a partir de KEGG

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), como su nombre lo indica es una enciclopedia de genes y genomas, formada por varias bases de datos que condensa conocimiento biológico. Particularmente, KEGG tiene como objetivo principal la asignación de significados funcionales a genes y genomas, a nivel molecular y de grado más elevado. En

este último nivel, las funciones están representadas por redes de interacciones moleculares, reacciones y relaciones en forma de mapas. El contenido de KEGG se deriva de artículos de investigación publicados, etiquetas de medicamentos y otros documentos reglamentarios utilizados en la sociedad. La información es extraída y actualizada periódicamente por medio de curación manual [70].

Los mapas de las vías de KEGG son gráficos que representan redes de moléculas responsables de funciones celulares específicas, son generados manualmente con un software llamado KegSketch. De este procedimiento resultan los archivos KEGG Markup Language (KGML) y los archivos de configuración de cada mapa (conf), estos archivos contienen elementos llamados *entry* que representan los nodos (genes, compuestos, enzimas o grupos) y elementos que representan los enlaces en forma de *relation* (ECrel, PPrel, GErel y PCrel) y *reaction* (reversibles o irreversibles). Las *relations* de tipo ECrel representan interacciones enzima-enzima, las PPrel representan interacciones proteína-proteína, las GErel representan interacciones de expresión génica (Factor de transcripción y blanco), y las de tipo PCrel representan relaciones proteína-compuesto. Cabe resaltar que existen 2 tipos de vías dependiendo de los elementos que contengan, las primeras son las vías reguladoras también conocidas como redes de interacción proteína-proteína, las cuáles tienen elementos *entry* y *relation* con todos los tipos antes mencionados, las segundas son las vías metabólicas que pueden contener interacciones proteína-proteína así como reacciones químicas, entonces, estarían compuestas por elementos *entry*, *relation* y *reaction* (<https://www.kegg.jp/kegg/xml/docs/>). A partir de estos archivos se prosiguió a extraer la información y así generar las redes biológicas por cada mapa de KEGG.

El procedimiento para la reconstrucción de las redes fue el siguiente:

1. Descarga de los archivos KGML y conf por medio de la herramienta API propia de la base de datos de KEGG, para el organismo *Homo sapiens* con código hsa.
2. Parseo de cada archivo KGML y conf con scripts personalizados implementados en lenguaje python, para extraer todos los elementos de interés, nodos (genes, compuestos, enzimas o grupos) y enlaces (relaciones y reacciones), además se extrajo la cantidad y nombre de la vía en la que participa cada relación o reacción (si una interacción participaba en más de una vía se optó por asignar un NA).
3. A partir del parseo se generaron las redes en formato SIF (simple interaction format) que consiste en tablas de tipo nodo - interacción - nodo.

4.4. Análisis de desregulación

Para poder identificar las vías que presentan desregulación a nivel transcripcional en los diferentes subtipos moleculares, se implementó el algoritmo de tipo *Functional Class Scoring* conocido como *Pathifier* [31].

Se empleó la versión disponible en la siguiente liga <https://github.com/AngelCampos/Pathifier-Tool-Kit> la cual esta basada en la versión stand-alone disponible para descarga en la página del autor (véase referencia [31]).

Para este análisis se utilizaron los datos de expresión por subtipo tumoral en comparación con los de muestras control y los conjuntos de genes pertenecientes a cada vía de la base de datos de KEGG. De las vías elegidos, se filtraron todos aquellos que tuvieran menos de 4 genes y que tuvieran más genes que el número de muestras ya que el método esta basado en el ajuste de curvas que capturan la variación y reduce los errores en el ajuste, para ello se necesita contar con los datos suficientes que permitan tales cálculos.

Pathifier analiza las vías, una a la vez, y asigna a cada muestra y vía una puntuación. La puntuación, estima el grado en que la vía y la muestra se desvían de lo normal. Para determinar esta puntuación de desregulación de la vía (PDS), se utilizan los niveles de expresión de los genes en cada muestra, y se grafican en un espacio multidimensional; todo el conjunto de muestras forma una nube de puntos, a la cual se le calcula la “curva principal” que captura la variación de esta nube. A continuación, se proyecta cada muestra en la curva y el PDS se define como la distancia a la curva, medida a lo largo de la curva, desde las muestras normales hasta las muestras problema.

En general, se busca integrar los datos de expresión de todos los genes que conforman a una vía con un solo valor de desregulación para cada muestra. *Pathifier* asigna una calificación de desregulación (PDS) de 0 a 1. Valores cercanos a 0 son calculados para muestras con niveles de expresión similares a las muestras control de tejido sano, mientras que las muestras con valores de PDS más altos poseen diferencias mayores en sus niveles de expresión en comparación con el grupo control. El equipo empleado para este análisis fue un procesador IntelCore i5-7300HQ con 12 GB disponibles en RAM.

De este análisis resulto una matriz con los valores de PDS por subtipo tumoral, con las muestras en columnas y las vías en las filas. A partir de estas matrices se realizaron los análisis posteriores.

4.5. Identificación de las vías de interés funcional

Teniendo en mente que las vías son sistemas biológicos integrados por múltiples moléculas (desde proteínas como enzimas, transportadores, factores de transcripción) los cuáles interaccionan entre ellos. También que los procesos que afectan a los fenotipos tumorales están relacionados con un comportamiento *Network-like*, ya que existe una dependencia entre las vías que se enredan a través de eventos de entrecruzamiento [60]. Y que, la relación *input-output* en las vías no esta controlado por una molécula, pero sí por la estructura y dinámica de las vías [21]. Es de interés en este trabajo, delimitar a aquellas vías y moléculas que puedan estar impactando sobre apoptosis y autofagia.

Se definieron como vías de interés a aquéllos que cumplan con los tres criterios de inclusión listados a continuación, los cuales son descritos en las secciones siguientes:

1. Vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia.
2. Vías desreguladas.
3. Vías con evidencia de dependencia estadística.

4.5.1. Vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia

Para identificar a las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia, se siguió el siguiente procedimiento:

1. A partir de las redes biológicas generadas, se condensaron todos los genes que pertenecen a las vías apoptosis y autofagia (AA).
2. Se buscaron iterativamente cada uno de los genes de AA en cada red biológica previamente generada.
3. Si se encontraba algún gene AA en una vía determinada, se etiquetaba como positiva para el criterio de inclusión 1.
4. Y por último se generaba un archivo con el nombre de todas las vías de entrecruzamiento.

4.5.2. Vías desreguladas

Una vez terminado el análisis de desregulación de todas las vías de KEGG según el subtipo tumoral. Se prosiguió a normalizar las matrices (muestras tumorales) con base en las vías con los valores de PDS correspondientes, para así poder hacer comparaciones entre subtipos y seleccionar aquellas que tengan los mayores valores de desregulación.

El método de elección para la normalización fue *Z-score* <https://www.codecademy.com/articles/normalization>, esta es una estrategia de normalización de datos que elude los valores atípicos también conocidos como *outliers*. La fórmula para la normalización del *Z-score* se presenta a continuación:

$$Z = \frac{\text{valor} - \mu}{\sigma}$$

En la formula, μ es el valor medio y σ es la desviación estándar para la variable correspondiente (PDS). Si un valor es exactamente igual a la media de todos los valores para esa variable, se normalizará a 0. Si está por debajo de la media, será un número negativo y, si está por encima de la media, será positivo. El tamaño de los números positivos o negativos está determinado por la desviación estándar de la variable original. Si los datos no normalizados tuvieran una gran desviación estándar, los valores normalizados estarán más cercanos a 1.

La normalización, selección y visualización de las vías más desreguladas, se implemento en lenguaje R con scripts personalizados. El equipo empleado para este análisis fue un procesador IntelCore i5-7300HQ con 12 GB disponibles en RAM. El procedimiento y las herramientas utilizadas fueron las siguientes:

1. Para la normalización se utilizó el paquete de R - som, con los parámetros predeterminados (<https://cran.r-project.org/web/packages/som/som.p>).
2. Una vez teniendo los valores normalizados, se obtuvo la mediana para todas las vías y se ordenaron de mayor a menor, para seleccionar solo aquellos valores más altos.
3. Finalmente, se empleó el paquete *ggplot2* para la visualización del análisis de desregulación en forma de mapas de calor.

4.5.3. Vías con evidencia de dependencia estadística

Ya que las RRGs describen la comunicación entre genes incluyendo implícitamente todos los procesos de regulación dentro de las células vivas y, por lo tanto, dan una descripción completa de la regulación celular proyectada en la regulación genética. Se optó por utilizar estas interacciones como evidencia de que la expresión coordinada de estos genes, está relacionada con el proceso biológico propio de esa vía, y por lo tanto podrían tener un impacto, a través del proceso de entrecruzamiento con apoptosis y autofagia.

Para conocer las vías que contienen interacciones con evidencia de coexpresión por subtipo tumoral, se realizó un script personalizado que ejecuta el siguiente procedimiento:

1. Relaciona los genes de las vías que entrecruzan con AA con los de las redes transcripcionales según la notación de cada red, utilizando un diccionario de notaciones.
2. Extrae todas las interacciones pertenecientes a cada red y las almacena según el tipo (red transcripcional o red biológica).
3. Busca las interacciones de las redes biológicas en las redes transcripcionales.
4. Si existe coincidencia de interacción, entonces se genera un archivo con el nombre de la vía junto con la interacción de correspondencia.

4.6. Integración y análisis de resultados

A partir de los análisis anteriores, se seleccionó el top 5 de las vías que cumplieran los tres criterios. Las redes de KEGG reconstruidas pertenecientes a las 5 vías seleccionados, se condensaron en un solo archivo SIF junto con las redes de AA, por subtipo tumoral.

De las redes resultantes, se utilizó el software *Cytoscape* (Version 3.7.1) para crear las visualizaciones de todas las redes. A estas visualizaciones, se les agregó color a los enlaces según la vía a que pertenecen y si participan en mas de una vía estas aparecen en color negro; para resaltar la influencia relativa de los genes, se adicionaron los genes diferencialmente expresados (DEGs), el color de los nodos es relativo a su valor de *log-fold change*, azul para los valores negativos y rojo para los valores positivos. Con el mismo software, se realizaron análisis topológicos estándar usando la herramienta *NetworkAnalyzer*, para obtener el grado de conexión de cada gen y otros parámetros de interés.

Los resultados por subtipo tumoral se compararon con la literatura, buscando alguna relación con la evasión de muerte celular a través de entrecruzamientos.

Capítulo 5

RESULTADOS

5.1. Datos

Los datos de expresión descargados del portal de GDC corresponden en total a 1215 muestras, 1102 tumores y 113 muestras normales.

5.1.1. Clasificación molecular

Partiendo del conjunto de datos de expresión normalizados, se prosiguió a la clasificación molecular utilizando el algoritmo PAM50, de tal análisis el número de muestras por subtipo se puede apreciar en la siguiente tabla (Cuadro 5.1). Algunas muestras no cumplieron con las condiciones de expresión de los 50 genes, por lo que los análisis subsiguiente se realizaron con un total de 738 muestras tumorales y 113 muestras control.

Subtipo tumoral	Número de muestras
Luminal A	217
Luminal B	193
Her2	106
Basal	222
Total	738

CUADRO 5.1: Número de muestras después de la clasificación molecular.

5.1.2. Redes de regulación genética

La inferencia de las RRG con las matrices de expresión de mRNA usando el algoritmo ARACNe y la metodología escrita anteriormente, resultó en 4 RRG, una por subtipo tumoral. Los valores de p calculados para todas las interacciones inferidas son menores a 1×10^{-8} .

Recordemos que para la construcción de estas redes, los dos criterios clave fueron, que nos quedaríamos con todas aquellas interacciones en donde interviniera algún gen de apoptosis o autofagia y solo aquellas con los valores altos de información mutua. Estas redes filtradas por anotación funcional, permiten hacer análisis de mayor significado biológico sobre la red. En particular, para identificar aquellos transcritos que tienen una función en las vías y que están relacionadas con los genes de apoptosis y autofagia. En la siguiente figura 5.1 se muestra la RRG del subtipo Basal, las redes de los subtipo Her2, LuminalA y LuminalB se encuentran en el Apéndice A.

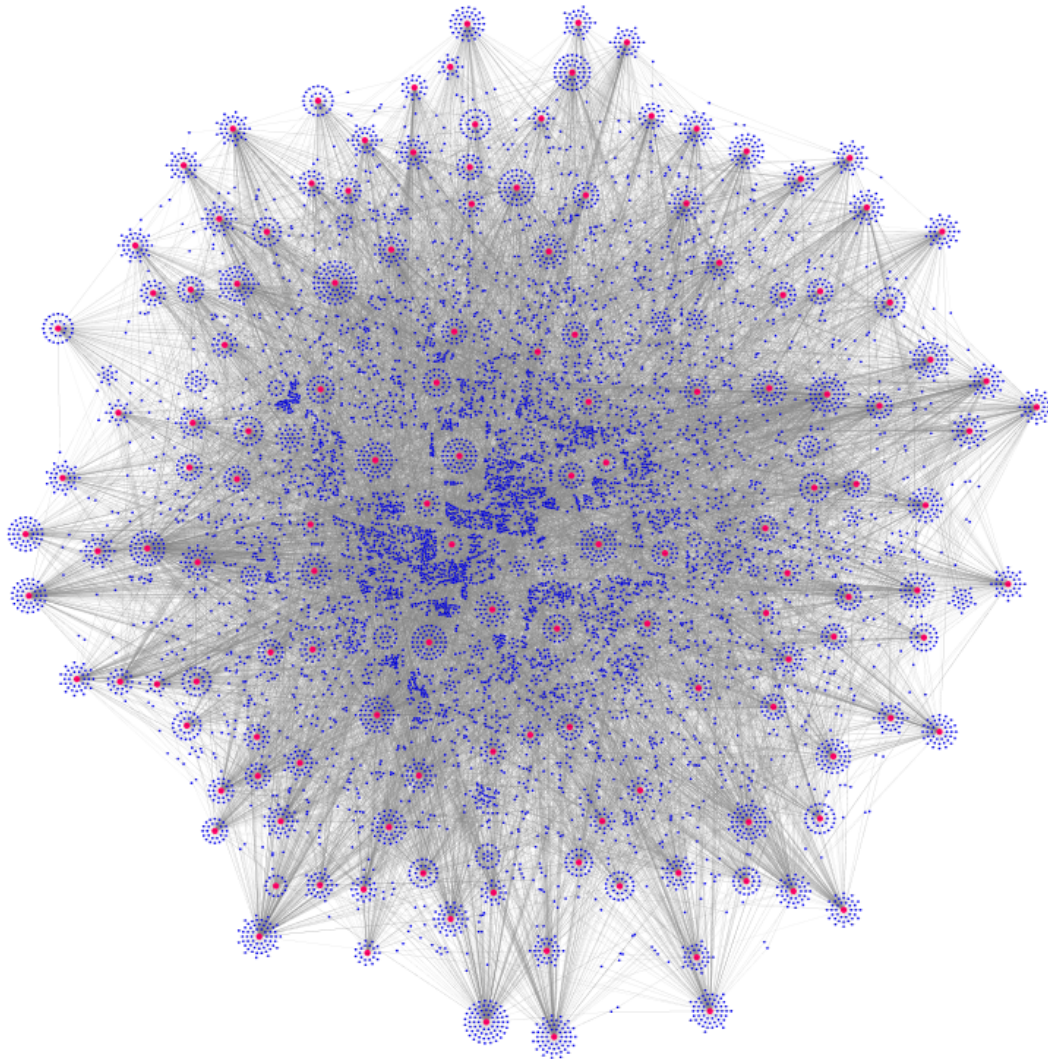


FIGURA 5.1: Red de Regulación Genética del subtipo Basal. Los enlaces representan los valores de información mutua, los nodos color rojo representan genes de apoptosis y autofagia, los nodos de color azul representan genes relacionados a los genes de apoptosis y autofagia con un valor de interacción de información mutua alto.

Los parámetros topológicos globales de las 4 redes se muestran en el siguiente cuadro 5.2. Se puede observar que el número de nodos y de enlaces se encuentra en el mismo orden de

magnitud para los cuatro subtipos, lo que sostiene la comparabilidad de las redes inferidas.

Parámetro	Control	LumA	LumB	Her2	Basal
Nodos	8,213	9,828	9,979	10,382	10,066
Aristas	20,000	10,000	10,000	10,000	10,000

CUADRO 5.2: Parámetros topológicos de las redes de regulación genética.

El análisis de los parámetros topológicos de las redes nos permite estudiar propiedades relevantes sobre las dinámicas que pueden producir la transmisión de información a lo largo de la red y robustez en su funcionamiento [8].

La distribución de conectividad de redes biológicas de diversos organismos a través de los reinos de la vida usualmente siguen una distribución de ley de potencias, lo cual significa que se consideran como redes libres de escala. Las redes libres de escala suelen manifestar un comportamiento de red de mundo pequeño, es decir, se puede llegar a cualquier nodo desde cualquier otro nodo en una pequeña cantidad de pasos. Además, se ha demostrado que las redes libres de escala son tolerantes a los errores, pero vulnerables a los ataques directos, en otras palabras, las redes se disgregan cuando una pequeña fracción de los nodos más relevantes son removidos del sistema pero la estructura es muy estable a un gran número de perturbaciones aleatorias [1]. Por otro lado, el valor de grado de cada nodo es el número de nodos con los que el primero se conecta y este puede ser utilizado como una medida de influencia de dicho nodo en la red: un gen con un valor de grado alto tendrá muchas conexiones, y por lo tanto su estado influye mucho más en la red [8].

En la siguiente figura 5.2 se muestra la distribución de grado, del subtipo Basal. Observamos que esta sigue un comportamiento de redes libres de escala, con un número alto de nodos que se conecta con un número bajo de nodos, mientras que un número muy pequeño de nodos se conecta con una gran cantidad de nodos, lo mismo se observa en cada red de los otros tres subtipos, (las otras gráficas se muestran en el anexo 1). Cabe resaltar que los genes que pertenecen a apoptosis y autofagia, se encuentran entre los nodos con un valor de grado alto como se puede visualizar en la figura 5.1, los nodos de apoptosis y autofagia esta resaltados en color rojo. En este sentido, la modulación de un nodo de alto grado puede tener un mayor efecto en la modificación del fenotipo.

5.2. Expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial ayuda a identificar las bases moleculares de las diferencias fenotípicas, particularmente son un punto central para el estudio de los fenotipos patológicos y la identificación de diferencias con el fenotipo sano.

En la figura 5.3 y 5.4 se muestra el número de genes diferencialmente expresados, separados en subexpresados y sobreexpresados en los diferentes subtipos tumorales.

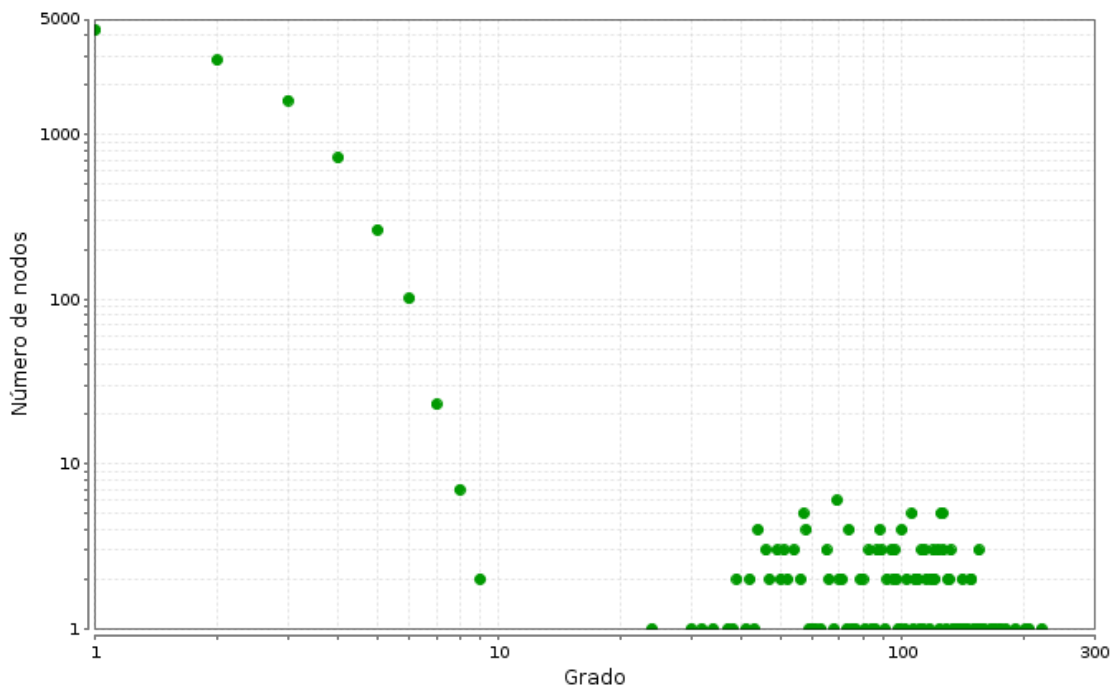


FIGURA 5.2: Distribución de grado de la red transcripcional del subtipo basal.

En estas figuras podemos observar que los fenotipos cancerosos muestran marcadas diferencias a nivel transcripcional con el fenotipo sano. Se aprecia que la mayor parte de los transcritos desregulados se encuentran compartidos entre los diferentes subtipos moleculares: la desregulación de estas moléculas parece estar asociada a procesos generales del cáncer de mama. Por otro lado, podemos observar que existen moléculas desreguladas que no se asocian a un subtipo, presentándose todas las combinaciones hasta tener moléculas subexpresadas o sobreexpresadas únicamente en un subtipo molecular. Estas moléculas estarán asociadas a las diferencias existentes entre subtipos moleculares, hasta explicar características específicas de cada uno de los subtipos moleculares. Llama la atención que, el subtipo luminalA tiene mayor número de genes subexpresados que sobreexpresados, en luminalB y HER2 ocurre lo contrario, mientras que el subtipo Basal tiene un número equivalente.

5.3. Vías de interés funcional

Como ya se mencionó se tomaron en cuenta varios criterios para la selección de las vías que serían estudiadas a nivel del entrecruzamiento con apoptosis y autofagia. Uno de ellos fue el análisis de entrecruzamiento, seguido de la búsqueda de interacciones en las RRG y por último el análisis de enriquecimiento, a continuación se muestran los resultados de cada criterio.

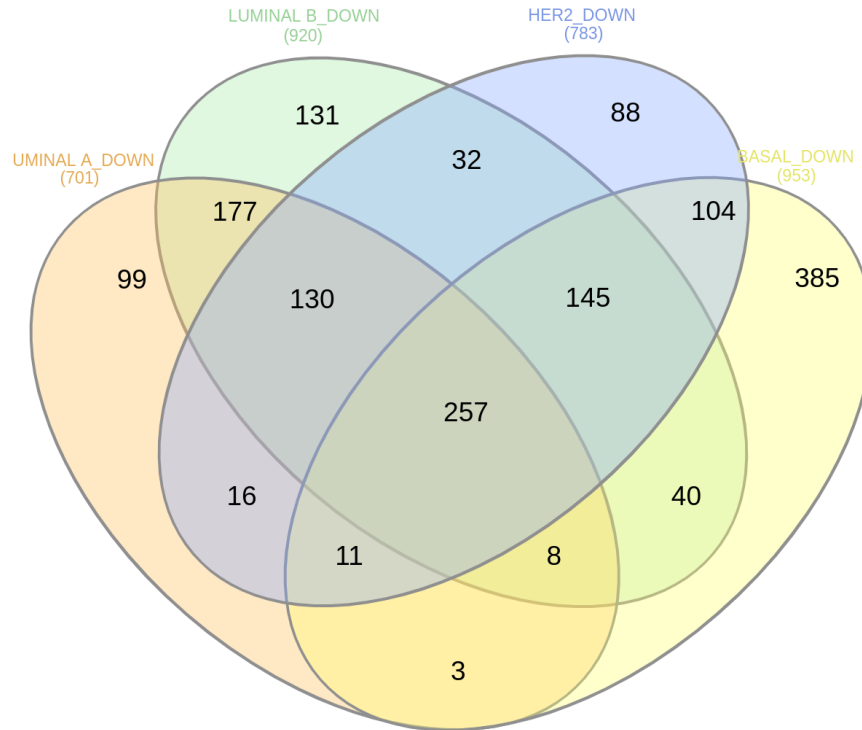


FIGURA 5.3: Diagrama de Venn que muestra los genes diferencialmente subexpresados en los subtipos tumorales contra el fenotipo sano.

5.3.1. Vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia

La base de datos KEGG cuenta con 318 vías que pertenecen al organismo *Homo sapiens*. Después del análisis de entrecruzamiento, un total de 202 vías entrecruzan con apoptosis y autofagia (AA). En el siguiente cuadro 5.3 se muestra el número de vías de entrecruzamiento por cada categoría de KEGG.

Categoría de KEGG	Total de vías	Vías de entrecruzamiento
Metabolismo	86	5
Procesamiento de la información genética	22	7
Procesos celulares	21	18
Procesamiento de la información ambiental	32	25
Sistemas del Organismo	72	68
Enfermedades Humanas	85	79
Total	318	202

CUADRO 5.3: Número de vías que entrecruzan por cada categoría de KEGG.

Como se puede apreciar dentro de las vías de KEGG que entrecruzan con AA están

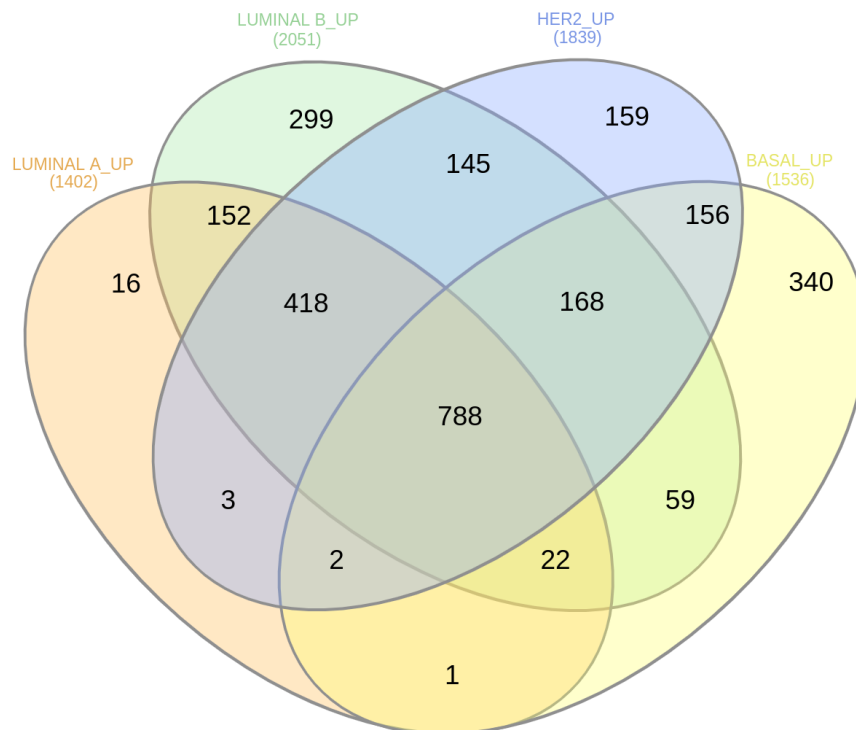


FIGURA 5.4: Diagrama de Venn que muestra los genes diferencialmente sobreexpresados en los subtipos tumorales contra el fenotipo sano.

ampliamente representadas las aquellos que pertenecen a las categorías: Procesos celulares, Procesamiento de la información ambiental, Sistemas del Organismo y Enfermedades Humanas.

5.3.2. Vías con evidencia de IM

Después de conocer las vías que entrecruzan con AA, en el siguiente cuadro 5.4 se muestran las vías que entrecruzan con AA y que además alguna de sus interacciones se encuentra dentro de las RRG por subtipo tumoral.

Como se puede apreciar dentro de las vías de KEGG que entrecruzan con AA y con alguna de sus interacciones representada en las RRG se mantienen representadas vías que pertenecen a las categorías: Procesos celulares y Procesamiento de la información ambiental.

Categoría KEGG	Total vías	EAA	LumA	LumB	Her2	Basal
Metabolismo	86	5	0	0	0	0
Procesamiento información genética	22	7	1	1	1	1
Procesos celulares	21	18	7	9	5	10
Procesamiento información ambiental	32	25	10	14	10	12
Sistemas del Organismo	72	68	14	16	17	23
Enfermedades Humanas	85	79	11	14	18	23
Total	318	202	43	54	51	69

CUADRO 5.4: Número de vías que entrecruzan y tienen interacciones en las RRG por cada subtipo tumoral y por cada categoría de KEGG. EAA (Vías de entrecruzamiento con apoptosis y autofagia)

5.3.3. Vías desreguladas

Las diferencias a nivel de vías pueden resultar más reveladoras para estudiar diferencias entre fenotipos, especialmente si lo que se busca es eventualmente llegar a restaurar las condiciones fisiológicas saludables (por ejemplo, mediante modulación farmacológica) [42].

El análisis de desregulación con Pathifier se realizó con 70 vías de KEGG, correspondientes a las vías que cumplieron con los criterios anteriores. El análisis resultó en una matriz por subtipo tumoral que representa el nivel de desregulación para cada una de las muestras (columnas) en cada una de las 70 vías analizadas (filas) con una calificación de 0 a 1. A partir de estas matrices, para facilitar la interpretación de los resultados y la selección de aquellos vías más desreguladas, se realizó un análisis de normalización y se obtuvo la mediana para cada vía. De esta normalización resultó el siguiente mapa de calor (Figura 5.5). Los colores de la barra izquierda, de amarillos a blancos denotan un menor nivel de desregulación en comparación con anaranjados a rojos en los cuales predominan valores más altos de desregulación.

Se puede observar que cada subtipo tumoral presenta distintos patrones de desregulación (Figura 5.5). De manera generalizada el número de vías desreguladas aumenta conforme la agresividad tumoral, particularmente el subtipo Basal contiene el mayor número de vías desreguladas. Apoptosis se va desregulando según aumenta la agresividad tumoral, mientras que la desregulación de autofagia se mantiene estable en todos los subtipos. Además, llama la atención que el agrupamiento jerárquico asemeja según su valor de desregulación a los subtipos luminalA y Her2, y a Basal y LuminalB.

Vías que cumplen los tres criterios

En la siguiente cuadro 5.5 se presenta el top5 de las vías que cumplen con los tres criterios, por subtipo tumoral. A partir de estas se realizaron las redes de entrecruzamiento.

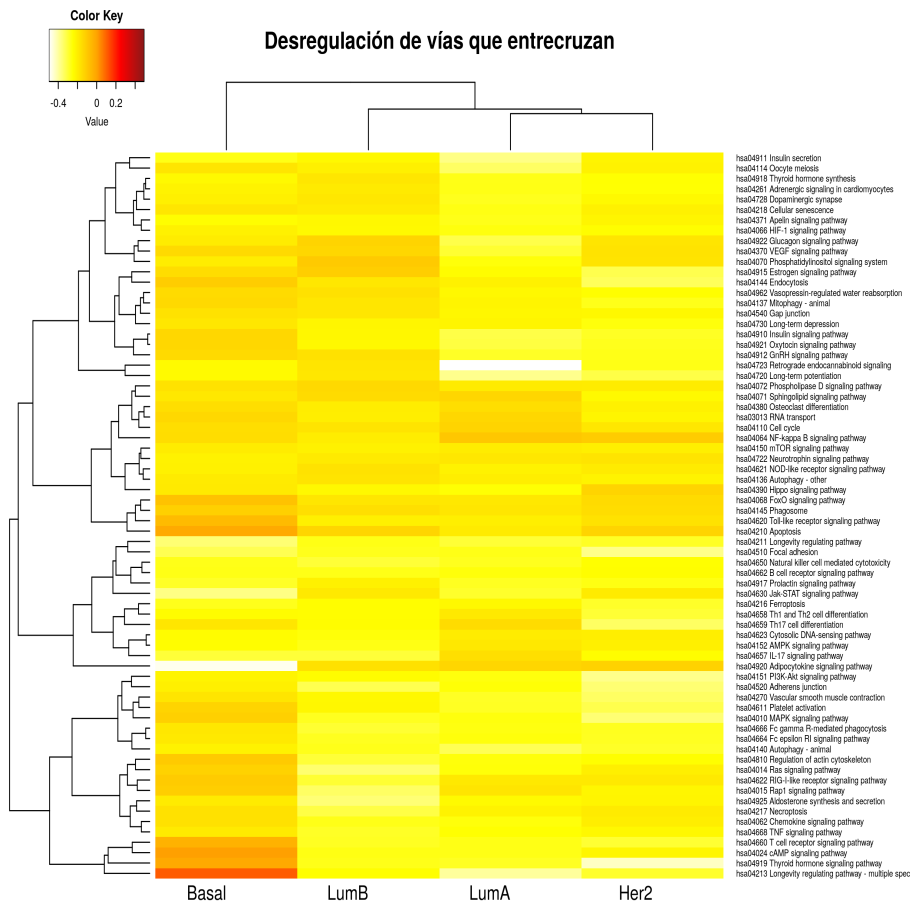


FIGURA 5.5: Mapa de calor de los valores de PDS normalizados por subtipo tumoral.

LuminalA	LuminalB
Vía de señalización de NF-kappa B Vía de señalización de adipocitoquinas Ciclo celular Vía de señalización de esfingolípidos Transporte de ARN	Vía de señalización de estrógenos Sistema de señalización de fosfatidilinositol Vía de señalización de glucagon Vía de señalización de esfingolípidos Vía de señalización de fosfolipasa D
Her2	Basal
Vía de señalización de NF-kappa B Vía de señalización de Hippo Vía de señalización de FoxO Fagosoma Vía de señalización de receptores tipo Toll	Vía de regulación de la longevidad Vía de señalización de cAMP Vía de señalización de hormonas tiroideas Vía de señalización de receptores de células T Vía de señalización de receptores tipo Toll

CUADRO 5.5: Vías que entrecruzan, que tienen interacciones en las RRG y están muy desreguladas por cada subtipo tumoral.

5.4. Redes de entrecruzamiento

Las redes de entrecruzamiento describen la comunicación que existe entre conjuntos de vías asociadas a procesos biológicos particulares. Estas redes de entrecruzamiento resultan útiles para contextualizar procesos biológicos individuales, identificando otros procesos que pueden tener una influencia sobre uno, o bien ser influenciados por el mismo. A continuación se presentan las redes de entrecruzamiento, construidas de la colección de vías de KEGG.

En estas redes están integradas las 5 vías que cumplieron los tres criterios junto con apoptosis y autofagia, además contienen las interacciones con evidencia de coexpresión resaltadas (líneas gruesas).

Cada red contiene diferente número de nodos y aristas de acuerdo al siguiente cuadro 5.6. Las aristas están coloreadas de acuerdo a la vía que pertenecen, aquellas que participan en más de una se encuentran en color negro. Los nodos están enriquecidos de acuerdo a la expresión diferencial y aquellos que median el entrecruzamiento entre AA se aprecian de mayor tamaño.

	LuminalA	LuminalB	Her2	Basal
Nodos	526	582	556	638
Aristas	2655	3714	2324	3049

CUADRO 5.6: Número de nodos y aristas en cada red de entrecruzamiento por subtipo tumoral.

5.4.1. Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia

El primer objetivo de este trabajo se enfoca en identificar el entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia, en la figura 5.6 se muestra la red de entrecruzamiento entre AA, el entrecruzamiento se da a partir de 33 moléculas resaltadas en color amarillo. Apoptosis se observa con sus aristas en color rosa, autofagia en color azul y aquellas que encontramos en ambos procesos en color negro. La red cuenta con 237 nodos y 698 aristas. Se puede observar que en cada uno de estos nodos de entrecruzamiento es posible llegar a uno u otro de los procesos, sin embargo, aquellos con interacciones negras que pertenecen a ambos es importante definir en que momento podrían estar influyendo en uno u otro de los procesos de estudio, además resulta interesante indagar si los nodos de entrecruzamiento son nodos con alta influencia en la red.

Ya que el grado de conectividad de los nodos, refleja la influencia de los mismos en la red, en la red de entrecruzamiento entre AA (figura 5.6) podemos observar que según el grado de conectividad solo dos de los genes de entrecruzamiento tienen mayor influencia, estos son BCL2 y BCL2L1. Los que pertenecen a autofagia son ATG13, ULK1, ULK2, AKT1S1, DEPTOR, MLST8, MTOR, RPTOR, GABARAPL2, GABARAPL1 y GABARAP. Los que

pertenecen a apoptosis son RELA, NFKB1, BIRC2, BIRC5, XIAP, CAP3, CASP7, CASP9, GZMB, BID y TP53.

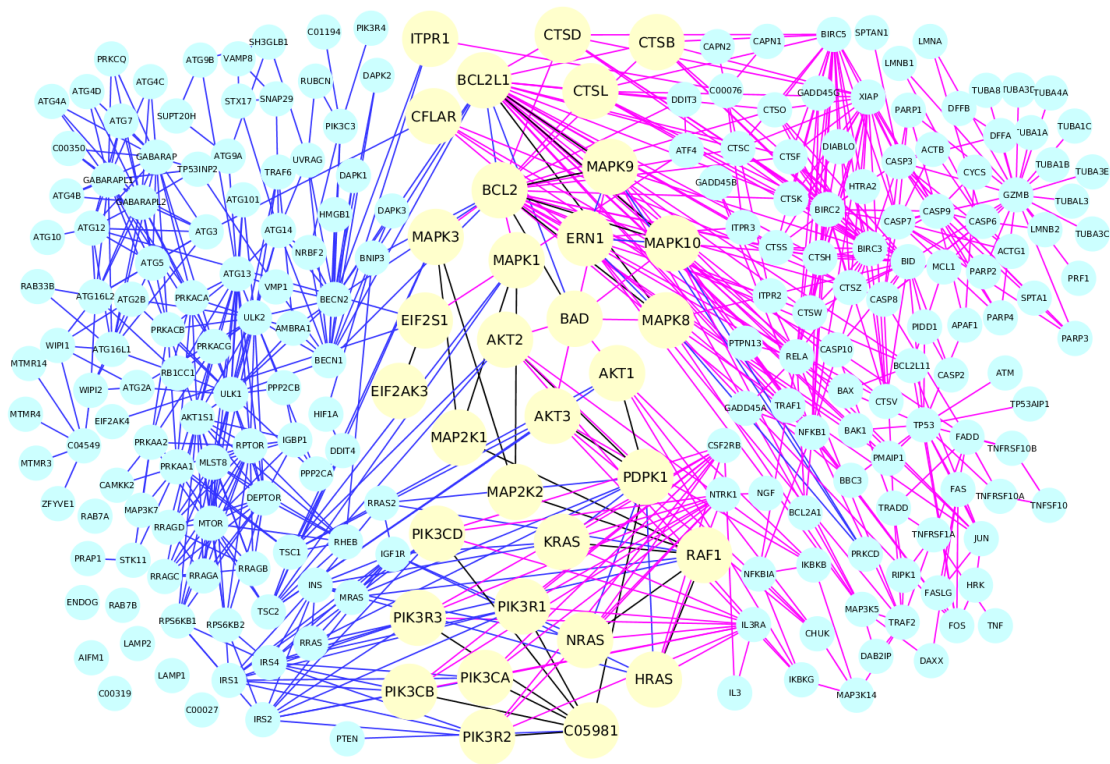


FIGURA 5.6: Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia.

5.4.2. Subtipo Luminal A

El cuadro 5.7 contiene las interacciones de las vías de interés que se encuentran en las RRG para el subtipo luminalA. Para los propósitos de este trabajo, serán consideradas como interacciones con evidencia de coexpresión. Son 11, las cuáles están distribuidas en los diferentes vías, es interesante que en este subtipo tumoral solo se encuentra representada una molécula de apoptosis, además no hay interacciones que participen en más de una vía.

Interacciones	Vía
EIF3B - EIF2S1 EIF2B2 - EIF2S1	hsa03013 Transporte de ARN
TRAF6 - TRAF5 NFKB2 - NFKB1	hsa04064 Vía de señalización de NF-kappa B
PPP2R5C - AKT1 PPP2R3C - BCL2	hsa04071 Vía de señalización de esfingolípidos
GADD45G - CCNB3	hsa04110 Ciclo celular
PRKAA1 - RPTOR PRKACA - AKT1S1 AMBRA1 - TRAF6	hsa04041 Autofagia
CAMKK2 - PRKAB1	hsa04920 Vía de señalización de adipocitoquinas

CUADRO 5.7: Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo luminalA.

La red de entrecruzamiento para el subtipo luminalA se muestra a continuación en la figura 5.7.

Se puede apreciar que en el entrecruzamiento con AA de cada una de las interacciones con evidencia de coexpresión, la mayoría de las moléculas no tiene cambios en su expresión, a excepción de la subexpresión de GADD45G y CCNB3 de ciclo celular que entrecruzan con apoptosis a través de NFKB1 y RELA, y la sobreexpresión de PRKAA1 que pertenece a autofagia y entrecruza con la vía de adipocitoquinas a través de ACACB y SLC2A1 las cuáles también tienen un cambio.

Por otro lado de las 33 moléculas de entrecruzamiento entre AA, las que tienen un cambio en la expresión son las siguientes. Se encuentran subexpresados KRAS, PIK3R2, PIK3R3, CTSD y EIF2AK3, y se encuentran sobreexpresados CFLAR, AKT3 y PRK3R1.

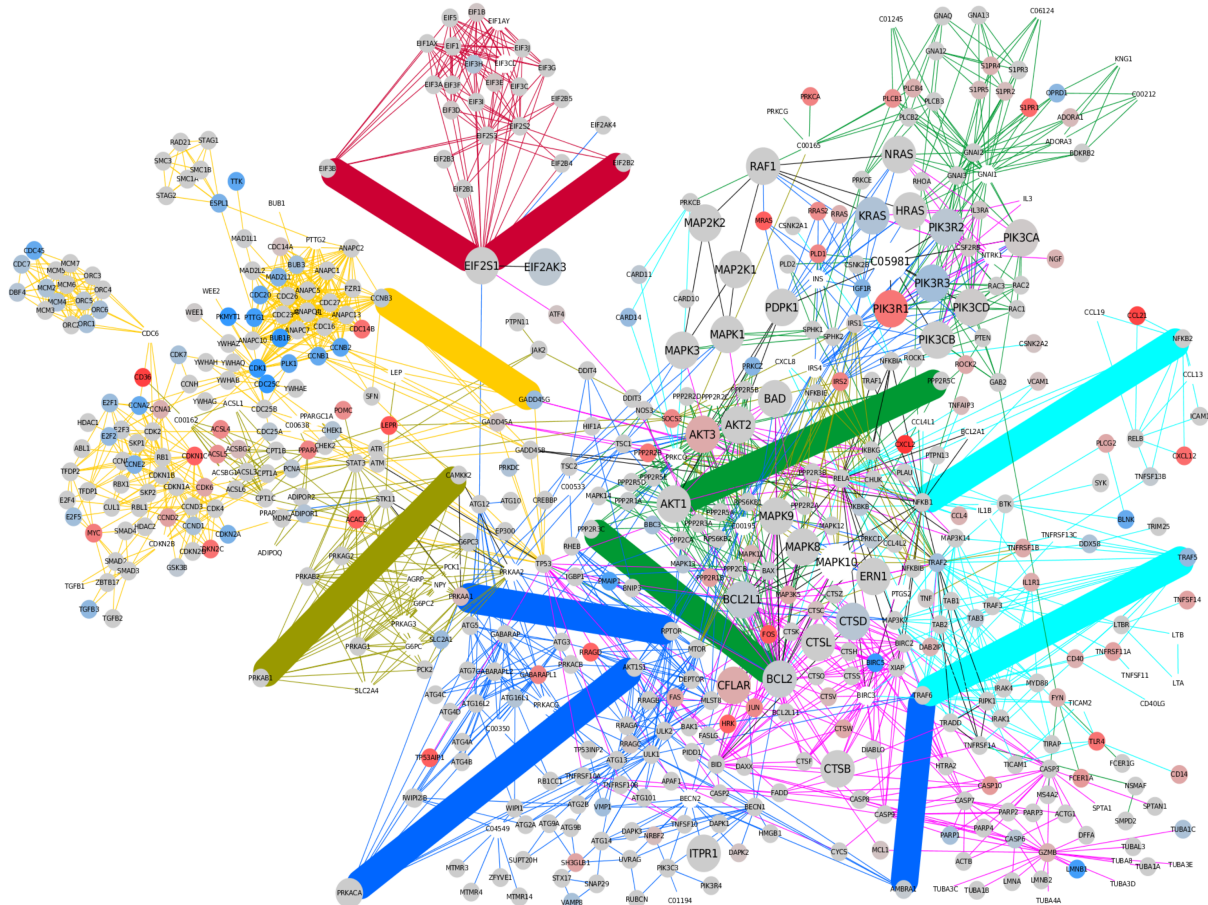


FIGURA 5.7: Red de entrecruzamiento del subtipo Luminal A. En rojo está la vía transporte de ARN, en amarillo la vía ciclo celular, en verde musgo la vía de señalización de adipocitoquinas, en verde la vía de señalización de esfingolípidos, azul celeste la vía de señalización de NF-kappa B, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis.

5.4.3. Subtipo Luminal B

El cuadro 5.8 contiene las interacciones de las vías de interés que se encuentran en las RRG para el subtipo luminalB. Son 10, las cuáles están distribuidas en los diferentes vías, es interesante que en este subtipo tumoral hay interacciones que participen en más de una vía, la cual es PRKACA - CREB5, esta participa en la vía de estrógenos y glucagon.

Interaction	Vía
PIK3R2 - SYNJ1	Sistema de señalización de fosfatidilinositol
INSR - PIK3R1	hsa04072 Vía de señalización de fosfolipasa D
SUPT20H - ATG9A BECN1 - NRBF2 ATG10 - ATG12	hsa04041 Autofagia
CFLAR - CASP8	hsa04210 Apoptosis
PRKACA - CREB5	hsa04145 hsa04922 Vía de señalización de glucagon
ATF4 - EP300	hsa04922 Vía de señalización de glucagon
GNAI3 - NRAS PPP2R5C - AKT1	hsa04071 Vía de señalización de esfingolípidos

CUADRO 5.8: Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo luminalB.

La red de entrecruzamiento para el subtipo luminalB se muestra a continuación en la figura 5.8. Se observa que este subtipo contiene un mayor número de moléculas sobreexpresadas (ver Figura 5.4)

Se puede apreciar que en el entrecruzamiento con AA de cada una de las interacciones con evidencia de coexpresión, la mayoría de las moléculas no tiene cambios en su expresión, de 20 solo 4 tienen un cambio de sobreexpresión, éstas son: PIK3R1, esta molécula también media el entrecruzamiento entre AA a través de CSF2RB, NTRK1, IL3RA, IRS4, IRS1, IRS2 y AKT3; NRBF2, tiene relación con algunos genes que median el entrecruzamiento entre AA (ATG14, BECN1 y PIK3C3); CFLAR, esta molécula también media el entrecruzamiento entre AA a través de CASP10, CASP8, RELA, NFkB1 y ATG3; y CREB5.

De las 33 moléculas de entrecruzamiento entre AA, las que tienen un cambio en la expresión son las siguientes. Se encuentran subexpresados KRAS y PIK3R3. Se encuentran sobreexpresados CFLAR, AKT3, PRK3R1 y PIK3CD.

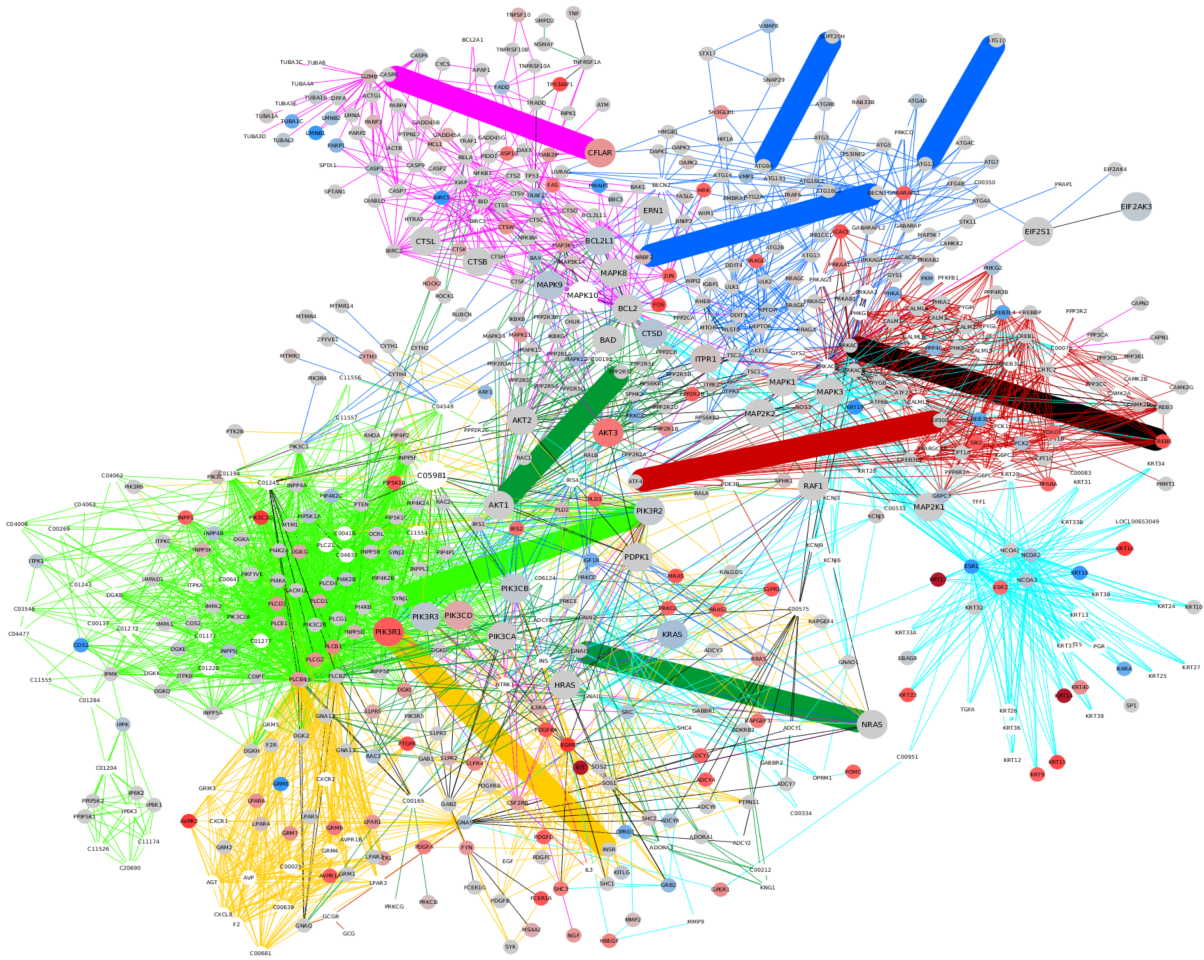


FIGURA 5.8: Red de entrecruzamiento Luminal B. En rojo está la vía de señalización de glucagon, en amarillo la vía de señalización de fosfolipasa D, en verde la vía de señalización de esfingolípidos, en verde lima la vía del sistema de señalización de fosfatidilinositol, en azul celeste la vía de señalización de estrógenos, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis. Las interacciones que se encuentra en más de una vía estan en color negro.

5.4.4. Subtipo Her2

El cuadro 5.9 contiene las interacciones de las vías de interés que se encuentran en las RRG para el subtipo Her2. Son 9, las cuáles están distribuidas en las diferentes vías. Es interesante que en este subtipo tumoral también hay interacciones que participen en más de una vía, la cual es BIRC2 - NFKB1, esta participa en la vía de NFkB y Apoptosis.

Interacción	Vía
BIRC2 - NFKB1	hsa04064 Vía de señalización de NF-kappa B hsa04210 Apoptosis
HOMER2 - PIK3CA	hsa04068 Vía de señalización de FoxO
AMBRA1 - TRAF6	hsa04041 Autofagia
DYNC1H1 - TUBA1A	hsa04145 Fagosoma
CFLAR - CASP8 CTSW - BIRC5	hsa04210 Apoptosis
BIRC5 - TEAD3 BIRC2 - YAP1	hsa04390 Vía de señalización de Hippo
MAPK11 - FOS	hsa04620 Vía de señalización de receptores tipo Toll

CUADRO 5.9: Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo HER2.

La red de entrecruzamiento para el subtipo Her2 se muestra a continuación en la figura 5.9. Se puede apreciar que en cada una de las interacciones con evidencia de coexpresión, solo 10 moléculas de 20 tiene cambios en su expresión, se encuentran sobreexpresados: HOMER2, PIK3CA, TRAF6, TUBA1A, CFLAR, CTSW, BIRC2, YAP1, MAPK11 y FOS. Mientras que solo BIRC5 se encuentra subexpresado.

De las 33 moléculas del entrecruzamiento entre AA, 6 se encuentran sobreexpresadas, éstas son: PIK3R1, AKT3, BCL2, CFLAR, ITPR1 y PIK3CA. Y 8 se encuentran subexpresados KRAS, EIF2AK3, PIK3R3, PIK3R2, AKT1, CTSB, CTSD y BCL2L1.

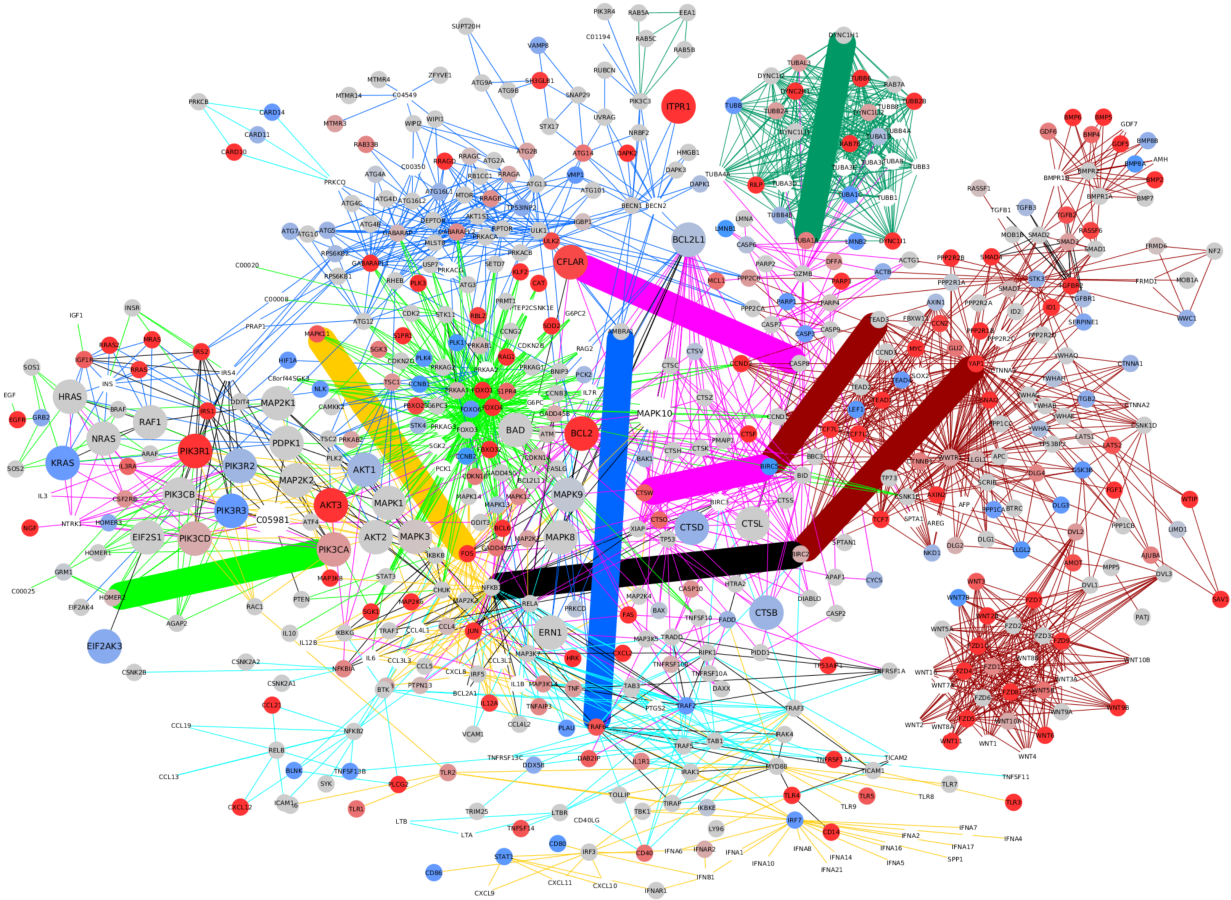


FIGURA 5.9: Red de entrecruzamiento Her2. En rojo está la vía señalización de Hippo, en amarillo la vía señalización de receptores tipo Toll, en verde la vía de fagosoma, en verde lima la vía de señalización de FoxO, en azul celeste la vía de señalización de NF-kappa B, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis. Las interacciones que se encuentra en más de una vía están en color negro.

5.4.5. Subtipo Basal

El cuadro 5.10 contiene las interacciones de las vías de interés que se encuentran en las RRG para el subtipo Basal. Son 8, las cuáles están distribuidas en las diferentes vías. Es interesante que en este subtipo tumoral también hay interacciones que participen en más de una vía, las cuales son NFKB1 - NFKBIA - IKBKB, estas participan en la vía de señalización de cAMP, la vía de Apoptosis, la vía de señalización de receptores de células T y receptores tipo Toll.

Interacción	Vía
NFKB1 - NFKBIA	hsa04620 Vía de señalización de receptores tipo Toll hsa04210 Apoptosis hsa04660 Vía de señalización de receptores de células T hsa04024 Vía de señalización de cAMP
PRKACB - GRIN1	hsa04024 Vía de señalización de cAMP
AMBRA1 - TRAF6	hsa04140 Autofagia
CFLAR - CASP8 CTSZ - BCL2L1	hsa04210 Apoptosis
IKBKB - NFKBIA	hsa04210 Apoptosis hsa04660 Vía de señalización de receptores de células T hsa04620 Vía de señalización de receptores tipo Toll
FOXO3 - ATG5	hsa04213 Vía de regulación de la longevidad
PIK3CB - ATP1B3	hsa04919 Vía de señalización hormonas tiroideas

CUADRO 5.10: Interacciones de las vías que cumplen los tres criterios y están representadas en las RRG para el subtipo Basal.

La red de entrecruzamiento para el subtipo Her2 se muestra a continuación en la figura 5.10. Se puede apreciar que en cada una de las interacciones con evidencia de coexpresión, solo 6 moléculas de 16 tiene cambios en su expresión, se encuentran sobreexpresados: GRIN1, TRAF6 y CFLAR. Mientras que ATG5, PIK3CB y ATP1B3 se encuentra subexpresados.

De las 33 moléculas del entrecruzamiento entre AA, 5 se encuentran sobreexpresadas, éstas son: PIK3R1, BCL2, MAPK3, CFLAR y ITPR1. Y 8 se encuentran subexpresados CTSB, CTSD, KRAS, PIK3CB, PIK3R3, PIK3R2, NRAS y MAP2K2.

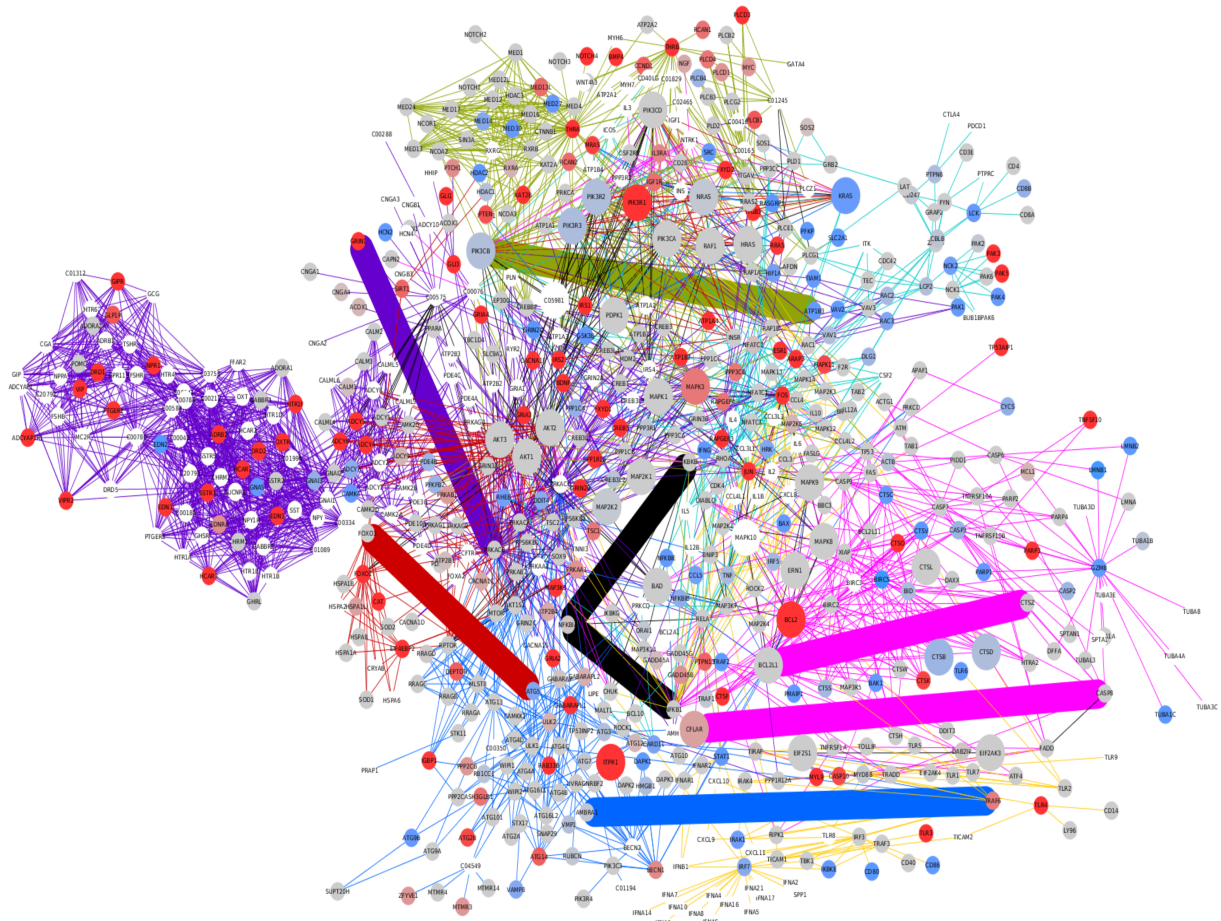


FIGURA 5.10: Red de entrecruzamiento Basal. En rojo está la vía señalización de la longevidad, en amarillo la vía señalización de receptores tipo Toll, en verde la vía de hormonas tiroideas, en morado la vía de señalización de cAMP, en azul celeste la vía de receptores de células T, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis. Las interacciones que se encuentra en más de una vía están en color negro.

Capítulo 6

DISCUSIÓN

Cada célula regula su propia muerte de acuerdo a las señales que recibe del exterior o del interior. Por lo que, el destino celular depende del diálogo de señales moleculares que mantienen con células vecinas así como con el medio circundante [116]. Así que, desde el punto de vista de una célula cancerígena, cuando una célula se multiplica debe recibir constantes señales de supervivencia para no auto-destruirse. Estas señales podrían estudiarse a partir de conjuntos de genes desregulados que alteran simultáneamente algunas funciones biológicas como la apoptosis. Se ha demostrado que los métodos basados en redes son efectivos para detectar las correlaciones entre vías (o genes) y fenotipos de enfermedades a partir de datos experimentales de alto rendimiento [52].

En este trabajo, la conexión entre estos conjuntos de genes se estudio a través del entrecruzamiento de apoptosis y autofagia con diversas vías en cáncer de mama. La información respecto a esta conceptualización puede contribuir a comprender la interdependencia inherente entre las vías y podría mejorar la comprensión de las alteraciones en los subtipos de cáncer de mama con algún potencial terapéutico.

6.1. Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia

El entrecruzamiento entre estos dos mecanismos se basa en varias premisas. La primera es la existencia de señales estimulantes similares que pueden activar o inhibir a AA [147]. Como ya se mencionó, cuando se reconstruyó la red de entrecruzamiento entre estas dos vías nos percatamos que de las 33 moléculas que median el entrecruzamiento, 21 de éstas forman parte de dos vías: la vía de señalización MAPK (JNK) y la vía de señalización PI3K-Akt. Lo cual indica que estos dos mecanismos están intrincadamente regulados. Y su papel en cáncer es sumamente relevante ya que son las vías alteradas con mayor frecuencia, una alta proporción de tumores albergan múltiples mutaciones en estos genes [54].

Las moléculas de entrecruzamiento de la vía JNK (MAPK8, MAPK9 y MAPK10) tienen un efecto PRO-AA, esto quiere decir que pueden activar a autofagia y también a apoptosis. Las de la vía MAPK (HRAS, KRAS, NRAS, RAF1, MAPK1, MAPK3, MAP2K1 y MAP2K2) y las de la vía PI3K-Akt (PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PDPK1, AKT1, AKT2 y AKT3) tienen un efecto dual, pueden activar o inhibir dependiendo del contexto de señalización. Se ha demostrado que ambos procesos pueden coexistir y antagonizarse o pro-moverse entre sí, lo que da como resultado diferentes efectos sobre el destino celular [122, 147].

La segunda premisa se basa en la interacción de algunas moléculas que pertenecen solo a estas dos vías. Entre estas tenemos a 11 moléculas. Aquellas que promueven a ambos procesos son ERN1, EIF2AK3, EIF2S1, BAD, ITPR1, CTSD, CTSL y CTSB. Y aquellas que pueden inhibir a ambos procesos son CFLAR, BCL2 y BCL2L1. La importancia de las moléculas inhibitorias puede ser visualizada en la red de entrecruzamiento, principalmente BCL2 y BCL2L1 tienen un alto grado de conectividad. En la Figura 6.1 podemos observar a la red de entrecruzamiento de AA con los nodos coloreados según su grado de conectividad, en esta resaltan por su influencia dos de los genes de entrecruzamiento, estos son BCL2 y BCL2L1. Se ha reportado que los miembros de la familia BCL2 son centrales para las diferentes formas de muerte celular, tanto en apoptosis como en autofagia [17].

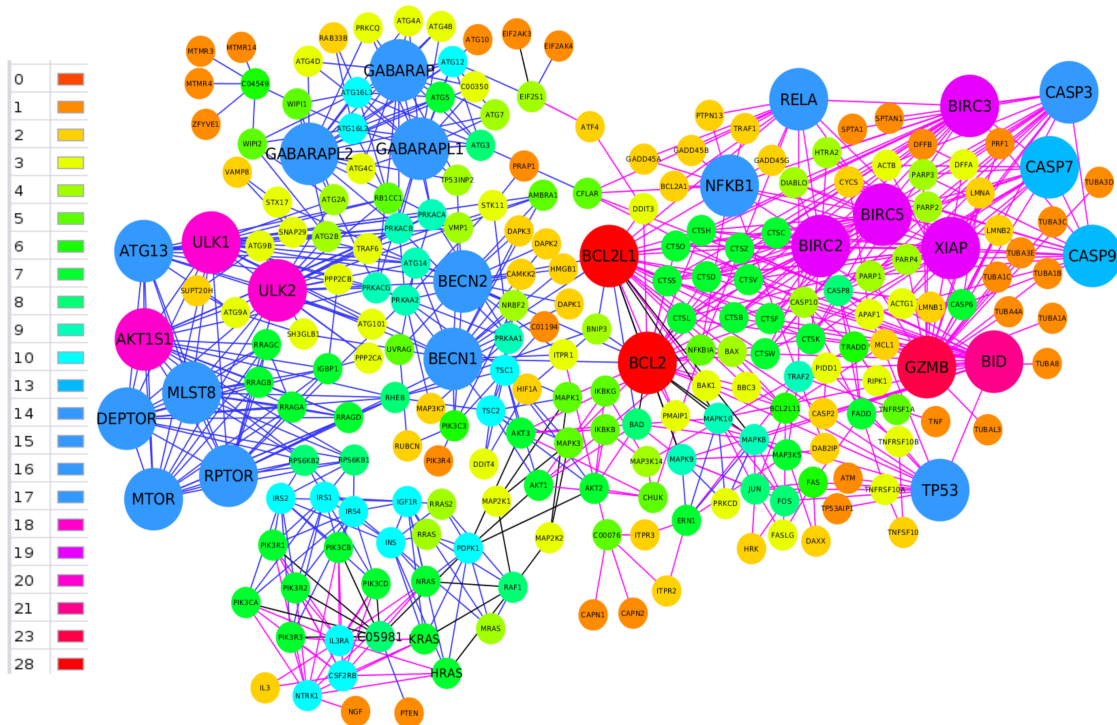


FIGURA 6.1: Red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia. Las interacciones en color rosa representan a la vía de apoptosis, las azules a la vía de autofagia y las negras se encuentran en ambas, el color de nodos representa el grado de conectividad y aquellos de mayor tamaño son los nodos de entrecruzamiento.

Como ya se menciona al inicio de este capítulo la apoptosis esta íntimamente relacionada con diversos procesos de la vida. Lo anterior pone en evidencia que existan múltiples moléculas de activación y que de cierta manera su activación sea "redundante". Sin embargo, la inhibición se delimita a un pequeño grupo de moléculas, probablemente la inhibición debe ser directa y específica ya que, se sabe que cualquier alteración desencadena procesos que llevan a las células a un estado comprometido que puede terminar en la muerte o a una proliferación desmedida.

Amplia es la literatura respecto a algunas moléculas que median el entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia, particularmente de las antiapoptóticas como BCL2, BCL2L1, CFLAR, además de las cinasas que pertenecen a las vías MAPK, PI3K-Akt y JNK. No obstante los reportes de otras moléculas de entrecruzamiento son limitados.

En todos los subtipos tumorales, existe un desequilibrio entre las moléculas proapoptóticas y las antiapoptóticas, inclinándose hacia el lado de supervivencia, lo cuál es observable en todas las redes de entrecruzamiento (ver Figura 5.7, 5.8, 5.9, 5.10). Está sobreexpresado CFLAR en todos los subtipos mientras que BCL2 solo en Her2 y Basal. Están subexpresados BAX, BAK1, BID y BAD principalmente en Basal. Sin embargo, es controversial el desequilibrio entre estas moléculas en la progresión del cáncer de mama [75]. Posiblemente, aunque existe un desequilibrio en los subtipos luminales, éstos tienen un mejor pronóstico y por lo tanto se supera la evasión de muerte celular.

En un trabajo que utiliza un análisis basado en *machine learning* para identificar predictores de respuesta o resistencia a los medicamentos contra el cáncer [67], se asoció a CFLAR subexpresado con el grupo de pacientes con una remisión patológica completa, osea, falta de todos los signos de cáncer en las muestras de tejido extraídas después del tratamiento con radiación o quimioterapia. Lo que significaría que la sobreexpresión estaría asociada con la evasión de la muerte celular.

Ya que CFLAR se sobreexpresa en varios cánceres humanos y se ha señalado que confiere resistencia a los tratamientos citotóxicos, se considera como un blanco terapéutico prometedor, sin embargo, CFLAR es una proteína que alberga una vida media corta y tiene una alta tasa de renovación por lo que formular una terapia que afecta al blanco de forma que interfiera con su actividad representa un gran reto. En cáncer de páncreas se ha demostrado que los inhibidores farmacológicos que interfieren con la transcripción o traducción disminuyen rápidamente sus niveles de expresión [51]. Esta noción está respaldada por la amplia implicación de CFLAR en la regulación de diversas vías de señalización, incluidas diferentes formas de muerte celular como la apoptosis, la necroptosis y la autofagia (bajo ciertas circunstancias), así como la vía de señalización de NF- κ B [38]. Esta molécula tiene una baja conectividad, lo que nos llevaría a considerar a CFLAR como un blanco terapéutico dado sus bajos efectos colaterales.

En cuanto a BCL2, investigaciones recientes se dirigen hacia la búsqueda de antagonistas que bloqueen directamente su acción. Por ejemplo, Hong [64] y colaboradores descubrieron que una mayor expresión del miR-7 predice una mejor respuesta patológica completa (pCR:

se refiere a la falta de todos los signos de cáncer en las muestras de tejido extraídas durante la cirugía o la biopsia después del tratamiento con radiación o quimioterapia.) de pacientes con cáncer de mama que reciben quimioterapia con paclitaxel/carboplatino ya que MRP1 así como BCL2 son blancos del miR-7 en las células de cáncer de mama. En cáncer de páncreas, se descubrió que el fármaco BaohuosideI inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis a través de las vías de señalización mTOR/S6K1/BCL2/Bax. Sin embargo se debe pensar en fármacos mas selectivos para favorecer la destrucción de las células malignas. Ya que, como se puede observar en la figura 6.1 BCL2 tiene un gran grado de conectividad y por lo tanto las consecuencias por perturbaciones pueden ser diversas.

Por otro lado, BCL2 también tiene relación directa con autofagia inhibiendo a BECN1. Es de relevancia en este trabajo ya que, es de los genes antiapoptóticos que se encuentran sobreexpresados en los subtipo HER2 y Basal (Figuras 5.9, 5.10). BECN1 (codifica para la proteína Beclin-1) está asociada con la formación de los autofagosomas y se considera que es una proteína indispensable para la autofagia. Tiene un dominio BH3 que media la interacción con BCL2 y sus homólogos. Por lo tanto la sobreexpresión de BCL2 inhibe la autofagia secuestrando a BECN1 impidiendo su unión con el complejo hVps34 [155]. Por el contrario, Shimizu y colaboradores [125] descubrieron que en células MEFs (fibroblastos embrionarios transformados Bax-/-/bak-/-) con BCL2/BCL-X sobreexpresado, no solo inhibe a la apoptosis, además sensibiliza a las células a la muerte no apoptótica dependiente de genes de autofagia. Probablemente incrementando la eficiencia en la formación de autofagosomas.

El papel de BECN1 en cáncer es controversial, se reconoce que es una proteína involucrada en la carcinogénesis. En los tumores de hígado y pulmón, la expresión de BECN1 se encuentra a la baja, mientras que en tumores gastrointestinales en etapas tempranas se encuentra la alta y en tumores de alto grado se encuentra a la baja, por lo que ha sido asociada con mejor prognosis [9]. En este trabajo solo se encuentra sobreexpresada en el subtipo Basal (Figura 5.10), es notable la falta de reportes relacionados con su papel en este subtipo de cáncer de mama y si promueve algún tipo de mecanismo relacionado con autofagia.

En cáncer de mama, ha sido reportada la baja expresión de BECN1 asociado a los subtipos moleculares HER2 y Basal [132], pero su expresión puede estar sujeta a otras moléculas como p53 o MYC. En este trabajo se encuentra sobreexpresada en el subtipo Basal, mientras que en los demás subtipos no existe algún cambio significativo de expresión. Además, la interacción de BECN1 con diversas vías podría llevar a diferentes resultados. Cabe señalar que hasta ahora, la información disponible sobre la relación de BECN1 con subtipos específicos de cáncer de mama es limitada. Los trabajos anteriores demuestran que el papel de BECN1 y BCL2 es contexto dependiente y que son moduladores relevantes en la muerte celular.

Con relación a la desregulación de las vías de interés, apoptosis se encuentra bastante desregulada en todos los subtipos, de menor a mayor respecto al grado de agresividad (es decir, la desregulación es baja en los subtipos luminales, aumenta en el subtipos Her2 y es la de mayor desregulación en Basal), posiblemente debido al aumento de cambios que deben ocurrir en la vía para que esta se mantenga inhibida, sin embargo la heterogeneidad biológica

de muchos de sus intermediarios podría ser la razón de tal comportamiento. Por otro lado, autofagia se mantiene escasamente desregulada en los diferentes subtipos aunque aparece en el top 10 en los subtipos luminales, tal vez este proceso tenga un impacto menor en la evasión de la muerte celular. Ha sido reportado que la inactivación de autofagia está asociada con una disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de mama [50].

6.2. Red de entrecruzamiento del subtipo LuminalA

De las vías más desreguladas en este subtipo fueron, $\text{NF}\kappa\text{B}$, esfingolípidos y ciclo celular, en la Figura 6.2 se observan a los primeros vecinos de las interacciones con IM pertenecientes a estas vías.

La vía $\text{NF}\kappa\text{B}$, es una vía que conlleva a la activación de una familia de factores de transcripción que regulan genes implicados en la inmunidad, inflamación y la supervivencia celular. Se activa a través de la unión del TNF (Factor de Necrosis Tumoral), IL1 (Interleucina 1) o por subproductos moleculares infecciosos [141]. Cabe resaltar que TNF es una molécula pleiotrópica, y podría activar la apoptosis extrínseca.

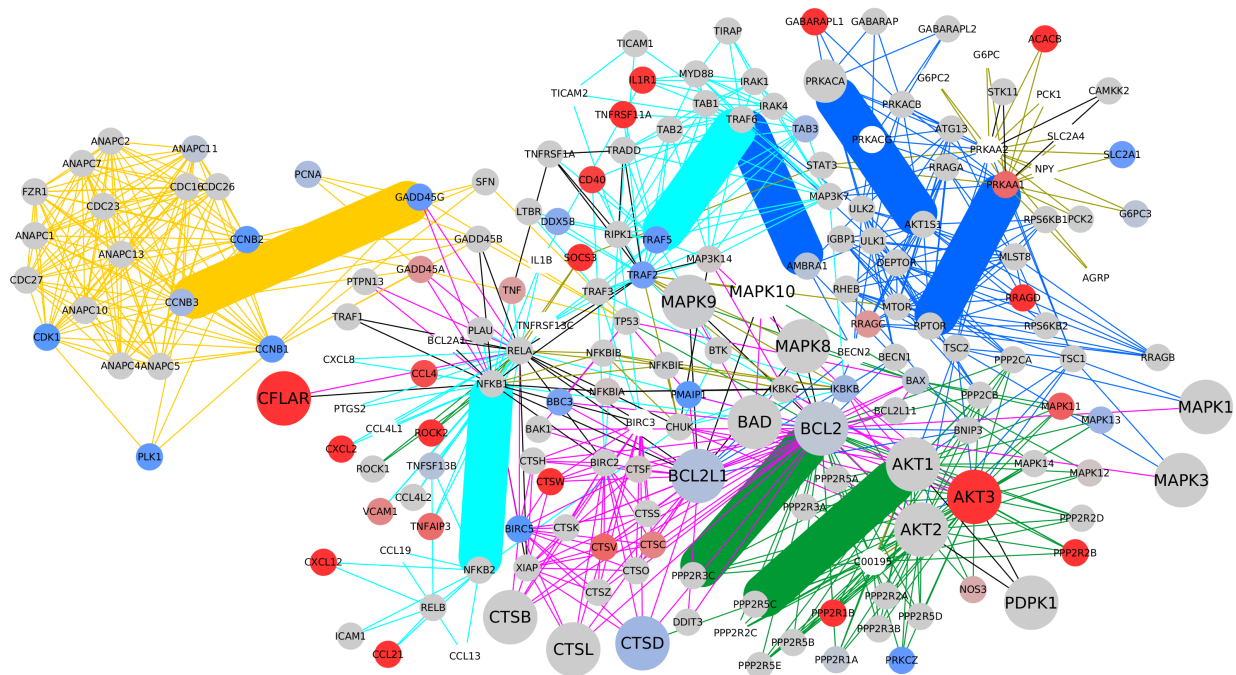


FIGURA 6.2: Primeros vecinos de las interacciones con IM que pertenece a las vías con mayor desregulación en la red de entrecruzamiento del subtipo luminal A. Las aristas en color azul celeste pertenecen a la vía $\text{NF}\kappa\text{B}$, las de color verde a la vía de esfingolípidos, las amarillas a ciclo celular, en rosa a apoptosis y las azules a autofagia.

En esta vía encontramos sobreexpresados a genes que codifican a receptores de membrana como ILR1, CD40, TNFRS11A. Y a blancos transcripcionales relacionados con el sistema inmune como CXCL12, CCL21, VCAM1, CXCL2, CCL4, TNF (feedback positivo) y a TNFAIP3 (feedback negativo), lo cuál evidencia un microambiente inflamatorio.

En este subtipo de cáncer de mama que es ER(+) y para el cual existe terapia dirigida, se ha planteado que la inhibición de los estrógenos prodría conducir a la progresión tumoral mediada por NF κ B al desacoplar al dímero NF κ B del control inhibitorio de ER. Ya que el tratamiento con estrógenos de células MCF7 restaura la sensibilidad de estas células malignas a apoptosis y reduce sus características invasivas [141].

Por otro lado, es interesante que en nuestros análisis se encuentre sobreexpresada una molécula que tiene un efecto de feedback negativo, TNFAIP3 es una enzima *ubiquitin-editing* que inhibe la activación de esta vía así como a apoptosis. Lee [77] y colaboradores descubrieron que los efectos pleiotropicos de TNF son regulados por TNFAIP3, por lo que su sobreexpresión en el subtipo luminal induce propiedades metastasicas agresivas en xenoinjertos de ratón generando un microambiente inflamatorio permisivo constituido por células MDSC (células supresoras del linaje mieloide) y su inhibición induce muerte celular citotóxica. Por lo que concluyen que TNFAIP3 puede ser un objetivo molecular importante para mujeres con el subtipo luminal A.

La vía de señalización de esfingolípidos que también encontramos desregulada, regula la producción y actividad de la ceramida (Cer) y la esfingosina-1-fosfato (S1P), los cuales han emergido como una clase de moléculas bioactivas potentes, ambas presentan respuestas al estrés y tienen efectos opuestos. La S1P funciona como un factor de supervivencia y la Cer activa las vías apoptóticas [43].

En nuestros análisis se encuentra sobreexpresados los receptores de membrana de la S1P (4 de 5) que promueven la activación de las vías PI3K-Akt y MAPK, lo cuál nos llevaría a la evasión de la apoptosis. Y por otro lado, solo se encuentran sobreexpresadas 2 fosfatasas PP2A (2 de 16) las cuáles son activadas por la Cer (Figura 6.2). Estas fosfatasas se consideran como *breaks* ya que inhiben a las moléculas AKT y a BCL2 [118] y por lo tanto promueven la apoptosis. Che [14] y colaboradores, descubrieron que después del tratamiento con tamoxifen en pacientes con cáncer de mama en etapa IV, éstas tienen concentraciones de Cer bajas y si éstas se elevan, entonces se inhibe la proliferación e induce apoptosis. Por otro lado, en otro trabajo al inhibir la producción de S1P se obtienen resultados parecidos, se incrementa la expresión de genes proapoptóticos y a la baja genes antiapoptóticos [136]. Sin embargo, considerar a las fosfatasas como blancos farmacológicos conlleva varias problemáticas. Son enzimas heterotriméricas con estructuras complejas, por lo que la focalización farmacéutica es muy complicada. Existe una gran cantidad de isoformas con diversas funciones en las células cancerosas, pueden actuar como oncogenes o supresores tumorales dependiendo del contexto celular. Por lo que se recomienda, una mejor comprensión de su regulación y papel en la tumorigénesis y la resistencia farmacológica. Cabe resaltar que se están desarrollando estrategias terapéuticas para suprimir a la S1P y reactivar a las fosfatasas para terapias contra el cáncer [118].

6.3. Red de entrecruzamiento del subtipo Luminal B

De las vías más desreguladas en este subtipo fueron, apoptosis, estrógenos, glucagón y autofagia. La principal interacción perteneciente a las 2 vías de mayor desregulación (estrógeno y glucagón) es PRKACA - CREB5. De alta relevancia es la vía de estrógeno en este subtipo, ya que la expresión del receptor forma parte de su etiología. Una vez activado por el estrógeno, se puede activar la vía nuclear para la transcripción de genes dependientes de ERE (como TFF1, OXT, FOS, MYC, TGFA, LTF, PRL, PR y CTSD) junto a otras moléculas como FOS, JUN y CoA. O se puede activar la vía “membranal” y la posterior activación por segundos mensajeros pertenecientes a varias vías de señalización, por ejemplo, cascadas de cinasas, de cAMP o Ca^{2+} , las cuales concluirán con la activación de factores de transcripción como CREB5 [99] el cuál se encuentra sobreexpresado en este subtipo .

En la red de este subtipo (Figura 5.8) podemos observar cambios en la expresión de genes en todas las vías, en la red de estrógeno llama la atención que se encuentra subexpresada la cinasa PKA el principal activador de CREB5.

Sin embargo la activación de CREB5 se puede llevar a cabo a través de la cooperación (entrecruzamiento) entre varias vías (Figura 6.3). En la vía de estrógenos parece que la activación de la vía “membranal” con la activación de las cinasas PI3K-Akt parece ser relevante acompañadas con los efectores *downstream* eNOS (NOS3, sintasa de óxido nítrico endotelial, la cual se encuentra sobreexpesada en este subtipo) y NO (óxido nítrico) (Figura 6.3). Se ha asociado que la eNOS modula diversos eventos relacionados al cáncer, como angiogénesis, apoptosis (pro- y anti-), ciclo celular, proliferación, daño al ADN y metastasis [96]. Además se ha sugerido que el resultado de la acción del NO depende de su localización, concentración, presencia de reactivos clave y blancos, tipo celular, microambiente, en general presenta heterogeneidad biológica y química [76]. En cáncer de mama, se han reportado asociaciones significativas de polimorfismos en eNOS con mayor riesgo de padecer cáncer de mama [40].

Otra manera en la que se puede activar a las cinasas PI3K-Akt es a través de moléculas que participan en apoptosis como los siguientes factores de supervivencia y sus receptores: NGF, NTRK1, IL3 e IL3RA (Figura 6.3). Ha sido reportado que el gen NGFR esta amplificado en cáncer de mama sin mutaciones en p53. Además se encuentra altamente expresado en varios tipos de cáncer incluido el cáncer de mama [156]. Por otro lado, su expresión podría ser un potencial marcador adjunto del subtipo luminal B [133].

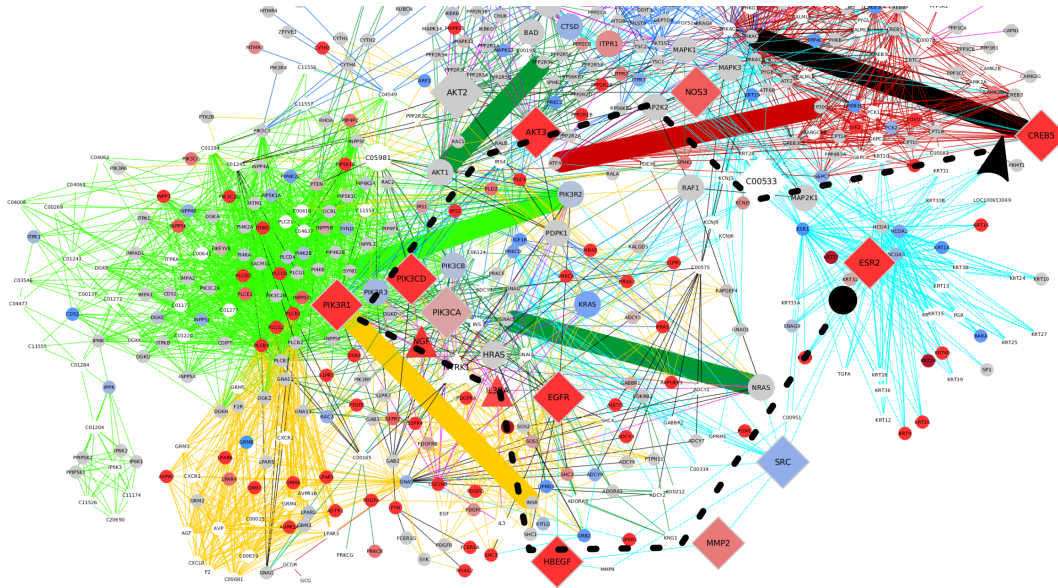


FIGURA 6.3: Red de entrecruzamiento en el subtipo luminal B, con una posible vía alternativa para activar al factor de transcripción CREB5. En rojo está la vía de señalización de glucagon, en amarillo la vía de señalización de fosfolipasa D, en verde la vía de señalización de esfingolípidos, en verde lima la vía del sistema de señalización de fosfatidilinositol, en azul celeste la vía de señalización de estrógenos, en azul marino autofagia y en rosa apoptosis.

Además de la señalización antiapoptótica de las vías previamente discutidas, en la vía de apoptosis (Figura 6.4) se encuentran sobreexpresadas mayor número de moléculas proapoptóticas, las antiapoptóticas son CFLAR, algunas catepsinas, GADD45G, BIRC2 y MCL1. Entre las proapoptóticas se encuentra GZMB la cual es una molécula efectora de apoptosis relacionada con el sistema inmune. Un reporte reciente reporta una correlación entre GZMB y la activación de células T pero no en fenotipos invasivos de cáncer de mama. Lo anterior implica que la disminución del sistema inmune podría ser necesaria para la progresión invasiva del cáncer en este contexto [27].

Por otro lado, la molécula de entrecruzamiento ITPR1 se encuentra sobreexpresada, en apoptosis promueve la liberación de calcio para la activación de caspasas efectoras y es inactiva a Beclin1 que participa en distintos complejos PI3K de clase III que tienen funciones distintas en los eventos de tráfico de membranas en la autofagia [55]. Escasa es la información sobre esta molécula, sin embargo, se considera como una molécula eficiente para crear una firma relacionada con la autofagia y la supervivencia en cáncer de tiroides [66]. En cáncer de mama, se asocia significativamente con la supervivencia general [50].

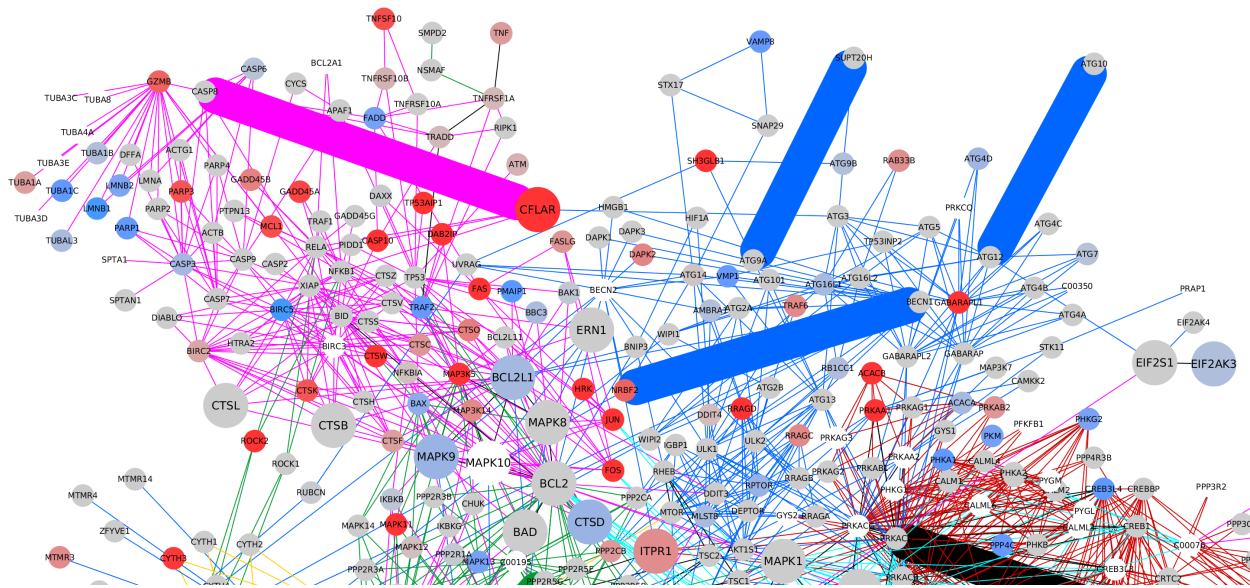


FIGURA 6.4: Red de entrecruzamiento en el subtipo luminal B, específicamente apoptosis y autofagia. En azul marino autofagia y en rosa apoptosis.

Por último, la ausencia de expresión de la molécula BCL2 en los subtipos luminales es relevante. ¿Será posible, que esta ausencia juegue algún papel en la inducción de muerte celular en los subtipos luminales?.

6.4. Red de entrecruzamiento del subtipo HER2

De las vías más desreguladas en este subtipo fueron, $\text{NF}\kappa\text{B}$, Hippo y Apoptosis. De entre las interacciones de interés y su relación con apoptosis resaltan, YAP1 - BIRC2 - NFKB1 (Figura 6.5). La vía Hippo regula la proliferación y la apoptosis para controlar el tamaño de los órganos durante el desarrollo. Cuando existe baja densidad celular el regulador transcripcional YAP-TAZ (YAP1/WWTR1) se transloca al núcleo y promueve la transcripción de genes de proliferación o aquellos que inhiben a apoptosis. Entre los genes antiapoptóticos que se regulan está BIRC2. Éste no solo inhibe a las caspasas 3, 7 y 9, además modula la señalización inflamatoria, la inmunidad, la señalización de las MAPK, la proliferación celular, la invasión celular y la metástasis.

En la Figura 6.5, se puede observar que sino se cuenta con la transcripción de los inhibidores de apoptosis a través de la vía $\text{NF}\kappa\text{B}$, la señal se obtendrá a través de otra vía, en este caso sería a través de la vía Hippo y las moléculas antes mencionadas.

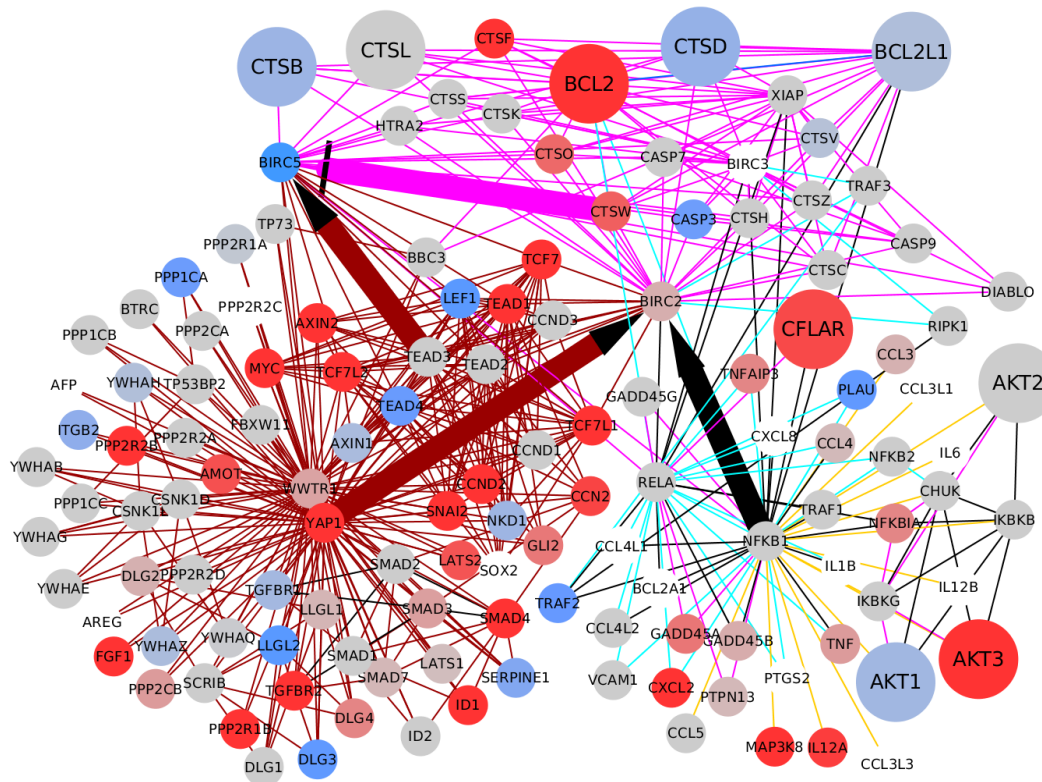


FIGURA 6.5: Primeros vecinos de la interacción con IM que pertenece a la vía con mayor desregulación en la red de entrecruzamiento del subtipo HER2. Las aristas en color rojo pertenecen a la vía Hippo, las rosas a apoptosis, las azul celeste $\text{NF}\kappa\text{B}$ y las amarillas a receptores tipo Toll.

En cáncer, TAZ es considerado como un co-activador transcripcional oncogénico, se ha encontrado asociación de la expresión nuclear de TAZ con el fenotipo TN y en los carcinomas de mama metaplásicos con características morfológicas de transición epitelio-mesénquima. Además, la expresión alta de YAP1 se asoció con la resistencia de los inhibidores de la familia BCL2, pero con sensibilidad a los inhibidores de MEK/MAPK en células de cáncer de mama HER2/ER positivo [29, 15]. Las evidencias sugieren que YAP1 puede funcionar como un modulador farmacológico en la resistencia a la terapia en cáncer de mama.

6.5. Red de entrecruzamiento del subtipo Basal

La vía de mayor desregulación en subtipo Basal fue la vía de regulación de la longevidad, está vía esta relacionada con la regulación del envejecimiento de acuerdo a diversas condiciones. Como se sabe el envejecimiento está relacionado con la disminución inevitable y dependiente del tiempo de funciones y es un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer [7]. Por lo que, no es sorprendente que en las células tumorales se modifique esta vía para promover la supervivencia, a pesar de desarrollarse en condiciones adversas.

En la vía de la longevidad si existe una restricción dietética se activa a la vía AMPK o mTOR. El primer caso deriva en la activación de SIRT1 lo que causaría la reducción de los eventos pro-apoptóticos a través de la inhibición de BAX, a la reducción de los efectos pro-inflamatorios inhibiendo a NF-kB lo que llevaría de manera general a la longevidad, en segundo lugar se activa a autofagia, se reduce la síntesis de proteínas y a la activación del FT FOXO lo que conduciría a la longevidad. Por otro lado, si no existe restricción dietética se sobreactiva la vía de la insulina los que llevaría a la activación de la vía PI3k y se inhibiría al FT FOXO reduciendo sus efectos relacionados a la longevidad [HTTPS://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa04213](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa04213).

En el cáncer resalta la desregulación en la detección de nutrientes, en este caso la vía de Insulina y del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1), una vez activados estos receptores activan una cascada de señalización que conduce a la activación de la vía de las cinasas activada por mitógenos, la vía PI3K y otras posibles vías que promueven la mitosis celular, la proliferación y la inhibición de apoptosis <https://www.creative-diagnostics.com/insulin-signaling-pathway.htm>.

En un modelo de ratón se conoce que la disminución de actividad de la vía de insulina debido a cambios en la expresión de sus integrantes (PTEN y PI3K) presentan un aumento de la esperanza de vida [80].

De esta vía, la interacción que aparece en la RRG es FOXO3 - ATG5 (Figura 6.6), que esta interacción tenga un valor alto de IM nos da evidencia de que probablemente estas dos moléculas tengan una expresión coordinada; y de esta manera dirigir la atención hacia esa parte del entrecruzamiento entre las vías seleccionadas.

Bajo el contexto anterior, en la figura 6.6 se pueden apreciar los primeros vecinos del par de moléculas con IM, están sobreexpresados el factor de transcripción FOXO1, la deacetilasa SIRT1 y la catalasa CAT. En la red de señalización, una vez activado SIRT1 este activará a los factores de transcripción FOXO, los cuáles promoverán la transcripción de genes asociados a la sobrevivencia como CAT y ATG5 (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04213).

SIRT1, es un gen que codifica a la proteína desacetilasa dependiente de NAD que vincula la regulación transcripcional directamente a la energía intracelular y participa en la coordinación de varias funciones celulares, como el ciclo celular, la respuesta al daño del ADN, el metabolismo, la apoptosis y la autofagia (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIRT1#summaries>). Particularmente en cáncer existen las siguientes evidencias: en una suspensión de células tumorales circulantes de cáncer de mama, la sobreexpresión de SIRT1 protege a las células de apoptosis y la regulación a la baja de las especies reactivas de oxígeno [101], por ejemplo a través de algunas moléculas antioxidantes como CAT. CAT, es un gen que codifica a la catalasa, una enzima antioxidante clave en la defensa del cuerpo contra el estrés oxidativo. La catalasa es una enzima hemo que está presente en el peroxisoma. La catalasa convierte al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y por lo tanto, mitiga sus efectos oxidantes. En otros tipos de cáncer también tiene un papel relevante. La

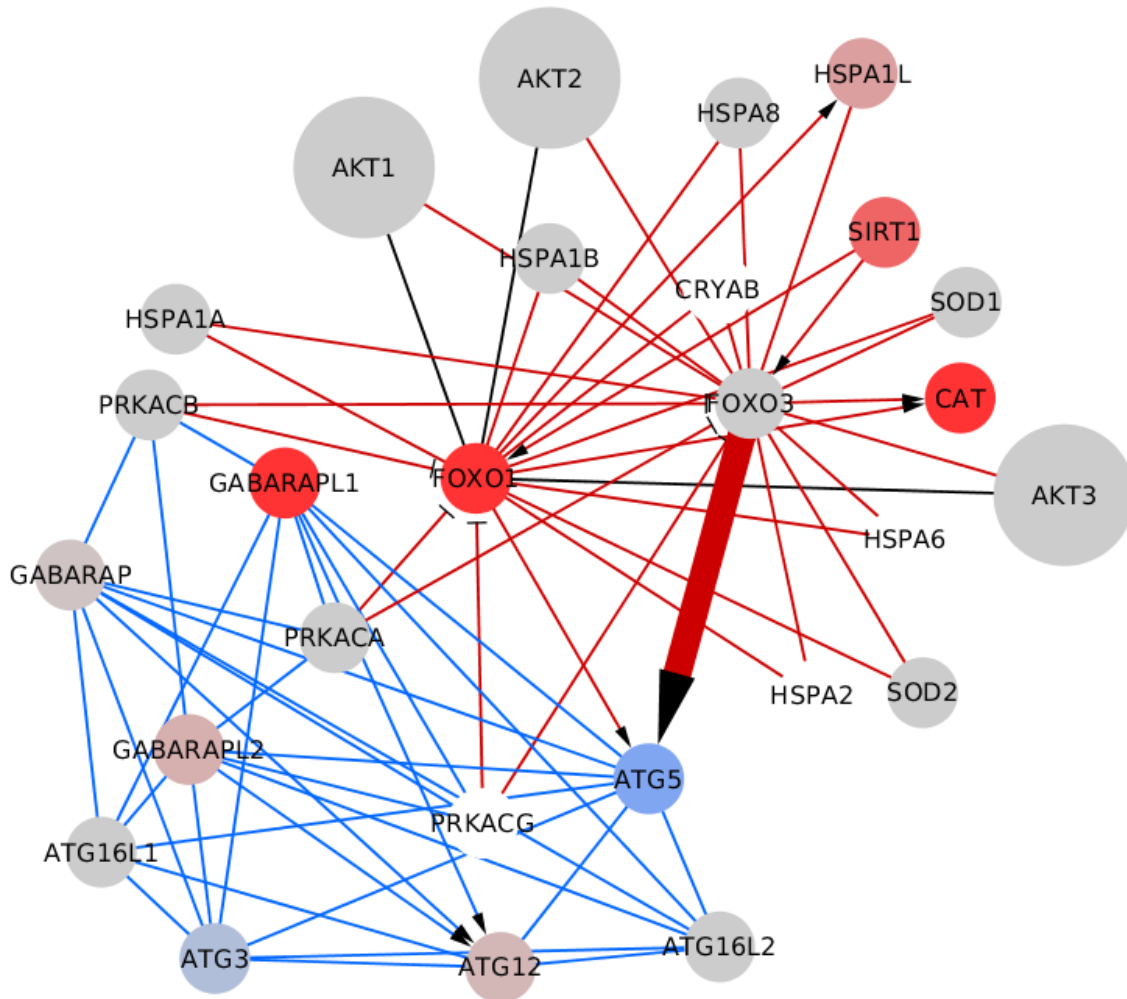


FIGURA 6.6: Primeros vecinos de la interacción con IM que pertenece a la vía con mayor desregulación en la red de entrecruzamiento del subtipo basal. Las aristas en color rojo pertenecen a la vía de cAMP y las azules a autofagia.

evaluación inmunohistoquímica de carcinoma urotelial de vejiga reveló que la sobreexpresión de SIRT1 se asocia con recurrencia local y escasa supervivencia [84]. En carcinoma de ovario el efecto de la sobreexpresión de SIRT1 depende de la localización subcelular, en este caso SIRT1 citoplasmático tiene un papel importante en la progresión tumoral [148]. El origen de las células troncales cancerígenas está regulado por SIRT1 [124]. En cáncer de pulmón, la inhibición de SIRT1 y SIRT2 induce la apoptosis en las células cancerosas pero solo en conjunto con el silenciamiento del gen autofágico ATG5. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento combinatorio de inhibidores de SIRT1/2 y ATG5 de autofagia son una estrategia terapéutica efectiva para la terapia contra el cáncer [93].

El propósito de este trabajo fue comprender mejor las vías de señalización asociados a la apoptosis y la autofagia, ya que estos procesos complejos e intrincados presentan asociaciones a diversas vías y con desregulación cambiante según el subtipo en el cáncer de mama, evitar o modificar la evasión de la muerte celular por apoptosis en cáncer de mama

representa un reto. El conocimiento sobre el entrecruzamiento entre vías y las moléculas de señalización involucradas es de vital importancia porque representan objetivos para el diseño de nuevos medicamentos y así combatir las patologías donde la apoptosis no está regulada adecuadamente.

Capítulo 7

CONCLUSIONES

En este trabajo se expuso un enfoque teórico bajo un contexto de biología de sistemas para explorar el entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia y las diversas vías con las que se relacionan en los subtipos moleculares de cáncer de mama. A continuación se presentan las principales conclusiones que se derivaron de esta investigación.

- Existe una gran heterogeneidad en las vías que entrecruzan con apoptosis y autofagia en los subtipos moleculares de cáncer de mama.
- El estudio logró identificar grupos de vías que podrían impactar en la regulación en apoptosis y autofagia.
- Autofagia es una vía que presenta una alta desregulación en los subtipos luminales por lo que se puede decir que es subtipo específica. Mientras que apoptosis siempre se encuentra en el top 10 de las vías más desreguladas en 3 subtipos luminal B, HER2 y Basal.
- El número de entrecruzamientos en las redes construidas es "enorme" por lo que la identificación de blancos terapéuticos así como combinaciones requiere del desarrollo de enfoques que evalúen los posibles efectos secundarios de las estrategias de direccionamiento. Así que, la visión "simple" de que la apoptosis es un mecanismo clave de defensa contra el cáncer resulta de una simplificación excesiva [132, 38].
- En la red de entrecruzamiento entre apoptosis y autofagia, algunas de las moléculas de entrecruzamiento no cuentan con una anotación funcional completa, tampoco se sabe si son oncogenes o genes supresores de tumores en cáncer de mama, por lo que estos suponen una oportunidad de investigación.
- Se requiere un mayor nivel de profundización mayor en el análisis de los de los resultados obtenidos, ya que los mejores candidatos para romper una red biológica o desconectar vías específicas podría ser a través de las moléculas más conectadas por lo que un análisis de perturbaciones podría elucidar mejor el fenómeno de entrecruzamiento. Además de que existen otros enfoques para el estudio de las vías, por ejemplo a través de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias o redes booleanas.

Respecto a los métodos:

- La herramienta utilizada para encontrar los genes de intersección mas relevantes que impactan en la evasión de apoptosis debe ser re-evaluada; se podrían utilizar otras bases de datos, criterios cuantitativos, de aprendizaje de máquina o utilizar conjuntos de moléculas de interés en experimentos funcionales.
- La reconstrucción de las redes de entrecruzamiento puede ser la base para implementar algunos algoritmos que permitan el modelado de la dinámica de las redes y así correlacionar estados particulares hacia el desarrollo de un fenotipo.
- Finalmente, una validación con otros conjuntos de datos, evidencian la importancia de obtener resultados reproducibles en los subtipos moleculares de cáncer de mama.

Si bien se han logrado grandes avances en la exploración del entrecruzamiento entre diversas vías y la regulación de apoptosis y autofagia, muchos problemas aún deben aclararse por lo que se requieren una mayor investigación.

Los resultados aquí reportados tienen la intención de ser generadores de hipótesis que guíen futuras líneas de investigación experimental y teórica.

Bibliografía

- [1] Réka Albert, Hawoong Jeong y Albert-László Barabási. “Error and attack tolerance of complex networks”. En: *nature* 406.6794 (2000), págs. 378-382.
- [2] Bogdanov Alexey, Moiseenko Fedor y Michael Dubina. “Abnormal expression of ATP1A1 and ATP1A2 in breast cancer”. En: *F1000Research* 6 (2017).
- [3] M Cristina de Almagro y D Vucic. “Inhibitor of Apoptosis Proteins, the Sentinels of Cell Death and Signaling”. En: (2016).
- [4] Md Altaf-Ul-Amin, Farit Mochamad Afendi, Samuel Kuria Kiboi y Shigehiko Kanaya. “Systems biology in the context of big data and networks”. En: *BioMed research international* 2014 (2014).
- [5] Guillermo de Anda-Jáuregui, Raúl A Mejía-Pedroza, Jesús Espinal-Enríquez y Enrique Hernández-Lemus. “Crosstalk events in the estrogen signaling pathway may affect tamoxifen efficacy in breast cancer molecular subtypes”. En: *Computational biology and chemistry* 59 (2015), págs. 42-54.
- [6] Camille Stephan-Otto Attolini, Yu-Kang Cheng, Rameen Beroukhim, Gad Getz, Omar Abdel-Wahab, Ross L Levine, Ingo K Mellingerhoff y Franziska Michor. “A mathematical framework to determine the temporal sequence of somatic genetic events in cancer”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.41 (2010), págs. 17604-17609.
- [7] Jan R Aunan, William C Cho y Kjetil Søreide. “The biology of aging and cancer: a brief overview of shared and divergent molecular hallmarks”. En: *Aging and disease* 8.5 (2017), pág. 628.
- [8] Albert-Laszlo Barabasi y Zoltan N Oltvai. “Network biology: understanding the cell’s functional organization”. En: *Nature reviews genetics* 5.2 (2004), pág. 101.
- [9] Martyna Bednarczyk, Nikola Zmarzły, Beniamin Grabarek, Urszula Mazurek y Małgorzata Muc-Wierzoń. “Genes involved in the regulation of different types of autophagy and their participation in cancer pathogenesis”. En: *Oncotarget* 9.76 (2018), pág. 34413.
- [10] C Bincoletto, A Bechara, GJS Pereira, CP Santos, F Antunes, J Peixoto da-Silva, M Muler, RD Gigli, PT Monteforte, H Hirata y col. “Interplay between apoptosis and autophagy, a challenging puzzle: new perspectives on antitumor chemotherapies”. En: *Chemico-biological interactions* 206.2 (2013), págs. 279-288.
- [11] Rebecca A Burrell, Nicholas McGranahan, Jiri Bartek y Charles Swanton. “The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution”. En: *Nature* 501.7467 (2013), pág. 338.

- [12] Kai Cao y Stephen WG Tait. “Apoptosis and Cancer: Force Awakens, Phantom Menace, or Both?” En: *International review of cell and molecular biology*. Vol. 337. Elsevier, 2018, págs. 135-152.
- [13] Christine L Chaffer, Ines Brueckmann, Christina Scheel, Alicia J Kaestli, Paul A Wiggins, Leonardo O Rodrigues, Mary Brooks, Ferenc Reinhardt, Ying Su, Kornelia Polyak y col. “Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.19 (2011), págs. 7950-7955.
- [14] Jing Che, Yu Huang, Chuanrui Xu y Peng Zhang. “Increased ceramide production sensitizes breast cancer cell response to chemotherapy”. En: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 79.5 (2017), págs. 933-941.
- [15] Feixiong Cheng, Junfei Zhao, Ariella B Hanker, Monica Red Brewer, Carlos L Arteaga y Zhongming Zhao. “Transcriptome-and proteome-oriented identification of dysregulated eIF4G, STAT3, and Hippo pathways altered by PIK3CA H1047R in HER2/ER-positive breast cancer”. En: *Breast cancer research and treatment* 160.3 (2016), págs. 457-474.
- [16] David P. Clark y Nanette J. Pazdernik. “Chapter 19 - Cancer”. En: *Biotechnology (Second Edition)*. Ed. por David P. Clark y Nanette J. Pazdernik. Second Edition. Boston: Academic Cell, 2016, págs. 593-626. ISBN: 978-0-12-385015-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00019-3>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123850157000193>.
- [17] Robert Clarke, Ayesha N Shajahan, Rebecca B Riggins, Younsook Cho, Anatasha Crawford, Jianhua Xuan, Yue Wang, Alan Zwart, Ruchi Nehra y Minetta C Liu. “Gene network signaling in hormone responsiveness modifies apoptosis and autophagy in breast cancer cells”. En: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 114.1-2 (2009), págs. 8-20.
- [18] Marco Cordani, Giovanna Butera, Raffaella Pacchiana y Massimo Donadelli. “Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells”. En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1867.1 (2017), págs. 19-28.
- [19] Juliana Costa-Silva, Douglas Domingues y Fabricio Martins Lopes. “RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool”. En: *PloS one* 12.12 (2017), e0190152.
- [20] Pau Creixell, Jüri Reimand, Syed Haider, Guanming Wu, Tatsuhiro Shibata, Miguel Vazquez, Ville Mustonen, Abel Gonzalez-Perez, John Pearson, Chris Sander y col. “Pathway and network analysis of cancer genomes”. En: *Nature methods* 12.7 (2015), pág. 615.
- [21] Peter Csermely, Tamás Korcsmáros, Huba JM Kiss, Gabor London y Ruth Nussinov. “Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review”. En: *Pharmacology & therapeutics* 138.3 (2013), págs. 333-408.
- [22] Amy E Cyr y Julie A Margenthaler. “Molecular profiling of breast cancer”. En: *Surgical Oncology Clinics* 23.3 (2014), págs. 451-462.

- [23] Mark S D'Arcy. "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy". En: *Cell biology international* 43.6 (2019), págs. 582-592.
- [24] Xiaofeng Dai, Ting Li, Zhonghu Bai, Yankun Yang, Xiuxia Liu, Jinling Zhan y Bozhi Shi. "Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends". En: *American journal of cancer research* 5.10 (2015), pág. 2929.
- [25] Sipko van Dam, Urmo Vosa, Adriaan van der Graaf, Lude Franke y Joao Pedro de Magalhaes. "Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions". En: *Briefings in bioinformatics* 19.4 (2017), págs. 575-592.
- [26] Kurt Degenhardt, Robin Mathew, Brian Beaudoin, Kevin Bray, Diana Anderson, Guanghua Chen, Chandreyee Mukherjee, Yufang Shi, Céline Gélinas, Yongjun Fan y col. "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis". En: *Cancer cell* 10.1 (2006), págs. 51-64.
- [27] Carlos R Gil Del Alcazar, Sung Jin Huh, Muhammad B Ekram, Anne Trinh, Lin L Liu, Francisco Beca, Xiaoyuan Zi, Minsuk Kwak, Helga Bergholtz, Ying Su y col. "Immune escape in breast cancer during in situ to invasive carcinoma transition". En: *Cancer discovery* 7.10 (2017), págs. 1098-1115.
- [28] Carol E DeSantis, Freddie Bray, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent, Benjamin O Anderson y Ahmedin Jemal. "International variation in female breast cancer incidence and mortality rates". En: *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 24.10 (2015), págs. 1495-1506.
- [29] Juan Diaz-Martin, Maria Ángeles López-García, Laura Romero-Pérez, Maria Reina Atienza-Amores, Maria Luisa Pecero, Maria Ángeles Castilla, Michele Biscuola, Almudena Santón y José Palacios. "Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer". En: *Endocrine-related cancer* 22.3 (2015), págs. 443-454.
- [30] Xiaoxi Dong, Anatoly Yambartsev, Stephen A Ramsey, Lina D Thomas, Natalia Shulzhenko y Andrey Morgun. "Reverse enGENEering of regulatory networks from big data: a roadmap for biologists". En: *Bioinformatics and biology insights* 9 (2015), BBI-S12467.
- [31] Yotam Drier, Michal Sheffer y Eytan Domany. "Pathway-based personalized analysis of cancer". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.16 (2013), págs. 6388-6393.
- [32] W Du y O Elemento. "Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies". En: *Oncogene* 34.25 (2015), pág. 3215.
- [33] Lindsay M Edwards. "Metabolic systems biology: a brief primer". En: *The Journal of physiology* 595.9 (2017), págs. 2849-2855.
- [34] Susan Elmore. "Apoptosis: a review of programmed cell death". En: *Toxicologic pathology* 35.4 (2007), págs. 495-516.
- [35] Juan M Esteve y Erwin Knecht. "Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells". En: *World journal of biological chemistry* 2.10 (2011), pág. 232.

- [36] Ciaran Evans, Johanna Hardin y Daniel M Stoebel. “Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions”. En: *Briefings in bioinformatics* 19.5 (2017), págs. 776-792.
- [37] Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman y Freddie Bray. “Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012”. En: *International journal of cancer* 136.5 (2015).
- [38] Simone Fulda. “Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer”. En: *Expert opinion on therapeutic targets* 17.2 (2013), págs. 195-201.
- [39] Simone Fulda. “Tumor resistance to apoptosis”. En: *International journal of cancer* 124.3 (2009), págs. 511-515.
- [40] Xueren Gao, Jie Wang, Wenjun Wang, Mingxi Wang y Jianqiong Zhang. “eNOS genetic polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis and a case-control study of breast cancer”. En: *Medicine* 94.26 (2015).
- [41] D. Drago García. “Análisis de la estructura de la red de regulación por NCRNA en pacientes con cáncer de mama”. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, jun. de 2017.
- [42] Miguel A Garcia-Campos, Jesús Espinal-Enriquez y Enrique Hernández-Lemus. “Pathway analysis: state of the art”. En: *Frontiers in physiology* 6 (2015), pág. 383.
- [43] Victor Garcia-González, José Fernando Díaz-Villanueva, Octavio Galindo-Hernández, Israel Martínez-Navarro, Gustavo Hurtado-Ureta y Abril Alicia Pérez-Arias. “Ceramide metabolism balance, a multifaceted factor in critical steps of breast cancer development”. En: *International journal of molecular sciences* 19.9 (2018), pág. 2527.
- [44] Luciana R Gomes, Alexandre T Vessoni y Carlos FM Menck. “Microenvironment and autophagy cross-talk: Implications in cancer therapy”. En: *Pharmacological research* 107 (2016), págs. 300-307.
- [45] Laura Gómez-Romero, Karina López-Reyes y Enrique Hernández-Lemus. “The large scale structure of human metabolism reveals resilience via extensive signaling cross-talk”. En: *Frontiers in physiology* 11 (2020), pág. 1667.
- [46] Magdalena Gorska-Ponikowska, Ugo Perricone, Alicja Kuban-Jankowska, Giosue Lo Bosco y Giampaolo Barone. “2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor”. En: *Journal of cellular physiology* 232.11 (2017), págs. 3030-3049.
- [47] Evangelia Goulielmaki, Miriam Bermudez-Brito, Margarita Andreou, Niki Tzenaki, Maria Tzardi, Eelco de Bree, Eleftheria Tsentelierou, Antonis Makrigiannakis y Evangelia A Papakonstanti. “Pharmacological inactivation of the PI3K p110 δ prevents breast tumour progression by targeting cancer cells and macrophages”. En: *Cell death & disease* 9.6 (2018), págs. 1-15.
- [48] Douglas R Green, Lorenzo Galluzzi y Guido Kroemer. “Metabolic control of cell death”. En: *Science* 345.6203 (2014), pág. 1250256.

- [49] Robert L Grossman, Allison P Heath, Vincent Ferretti, Harold E Varmus, Douglas R Lowy, Warren A Kibbe y Louis M Staudt. “Toward a shared vision for cancer genomic data”. En: *New England Journal of Medicine* 375.12 (2016), págs. 1109-1112.
- [50] Yunyan Gu, Pengfei Li, Fudian Peng, Mengmeng Zhang, Yuanyuan Zhang, Haihai Liang, Wenyuan Zhao, Lishuang Qi, Hongwei Wang, Chenguang Wang y col. “Autophagy-related prognostic signature for breast cancer”. En: *Molecular carcinogenesis* 55.3 (2016), págs. 292-299.
- [51] Christian Haag, Dominic Stadel, Shaoxia Zhou, Max G Bachem, Peter Möller, Klaus-Michael Debatin y Simone Fulda. “Identification of c-FLIPL and c-FLIPS as critical regulators of death receptor-induced apoptosis in pancreatic cancer cells”. En: *Gut* 60.2 (2011), págs. 225-237.
- [52] Junwei Han, Chunquan Li, Haixiu Yang, Yanjun Xu, Chunlong Zhang, Jiquan Ma, Xinrui Shi, Wei Liu, Desi Shang, Qianlan Yao y col. “A novel dysregulated pathway-identification analysis based on global influence of within-pathway effects and cross-talk between pathways”. En: *Journal of The Royal Society Interface* 12.102 (2015), pág. 20140937.
- [53] Douglas Hanahan y Robert A Weinberg. “The hallmarks of cancer”. En: *cell* 100.1 (2000), págs. 57-70.
- [54] Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg. “Hallmarks of cancer The next generation”. En: *Cell* 144.5 (2011), págs. 646-674.
- [55] Congcong He y Beth Levine. “The beclin 1 interactome”. En: *Current opinion in cell biology* 22.2 (2010), págs. 140-149.
- [56] Ming-Xiao He y You-Wen He. “CFLAR/c-FLIPL: a star in the autophagy, apoptosis and necroptosis alliance”. En: *Autophagy* 9.5 (2013), págs. 791-793.
- [57] Michael O Hengartner. “The biochemistry of apoptosis”. En: *Nature* 407.6805 (2000), pág. 770.
- [58] E Hernández-Lemus y C Rangel-Escareño. *The role of information theory in gene regulatory network inference In Information Theory: New Research. Edited by Deloumeaux P, Gorzalka JD. Mathematics Research Developments Series.* 2011.
- [59] Enrique Hernández-Lemus. “Systems biology and integrative omics in breast cancer”. En: *Omics Approaches in Breast Cancer.* Springer, 2014, págs. 333-352.
- [60] Enrique Hernández-Lemus, Wentian Li y Pablo Meyer. “Advances in systems biology- New trends and perspectives”. En: *Computational biology and chemistry* 59.PB (2015), págs. 1-2.
- [61] Enrique Hernández-Lemus y J Mario Siqueiros-García. “Mechanistic-enriched models: integrating transcription factor networks and metabolic deregulation in cancer”. En: *Theoretical Biology and Medical Modelling* 12.1 (2015), pág. 16.
- [62] Ralf Höcker, Alisha Walker e Ingo Schmitz. “Inhibition of autophagy through MAPK14-mediated phosphorylation of ATG5”. En: *Autophagy* 9.3 (2013), págs. 426-428.

- [63] Sabine Hombach-Klonisch, Maryam Mehrpour, Shahla Shojaei, Craig Harlos, Marshall Pitz, Ahmed Hamai, Krzysztof Siemianowicz, Wirginia Likus, Emilia Wiechec, Brian D Toyota y col. “Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response”. En: *Pharmacology & therapeutics* (2017).
- [64] Tianzi Hong, Jian Ding y Wenlian Li. “miR-7 Reverses Breast Cancer Resistance To Chemotherapy By Targeting MRP1 And BCL2”. En: *OncoTargets and therapy* 12 (2019), pág. 11097.
- [65] I-Ling Hsu, Cheng-Yang Chou, Yi-Ying Wu, Jia-En Wu, Chen-Hsien Liang, Yao-Tsung Tsai, Jhen-Yu Ke, Yuh-Ling Chen, Keng-Fu Hsu y Tse-Ming Hong. “Targeting FXRD2 by cardiac glycosides potently blocks tumor growth in ovarian clear cell carcinoma”. En: *Oncotarget* 7.39 (2016), pág. 62925.
- [66] Gang Hu, Hong-fang Feng y Hui Zhan. “Identification of an Autophagy-Related Signature Predicting Overall Survival for Papillary Thyroid Carcinoma”. En: *Dose-Response* 18.1 (2020), pág. 1559325819899265.
- [67] Wei Hu. “Identifying predictive markers of chemosensitivity of breast cancer with random forests”. En: *Journal of Biomedical Science and Engineering* 3.01 (2010), pág. 59.
- [68] Katrin Hübner, Sven Sahle y Ursula Kummer. “Applications and trends in systems biology in biochemistry”. En: *The FEBS journal* 278.16 (2011), págs. 2767-2857.
- [69] Gabriel Ichim, Jonathan Lopez, Shafiq U Ahmed, Nathiya Muthalagu, Evangelos Giampazolias, M Eugenia Delgado, Martina Haller, Joel S Riley, Susan M Mason, Dimitris Athineos y col. “Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death”. En: *Molecular cell* 57.5 (2015), págs. 860-872.
- [70] Minoru Kanehisa, Miho Furumichi, Mao Tanabe, Yoko Sato y Kanae Morishima. “KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs”. En: *Nucleic acids research* 45.D1 (2016), págs. D353-D361.
- [71] Candia M Kenific y Jayanta Debnath. “Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells”. En: *Trends in cell biology* 25.1 (2015), págs. 37-45.
- [72] Maitham A Khajah, Princy M Mathew y Yunus A Luqmani. “Na⁺/K⁺ ATPase activity promotes invasion of endocrine resistant breast cancer cells”. En: *PloS one* 13.3 (2018).
- [73] Alec C Kimmelman y Eileen White. “Autophagy and tumor metabolism”. En: *Cell metabolism* 25.5 (2017), págs. 1037-1043.
- [74] Felicia Marie Knaul, Gustavo Nigenda, Rafael Lozano, Hector Arreola-Ornelas, Ana Langer y Julio Frenk. “Breast cancer in Mexico: an urgent priority”. En: *Salud publica de Mexico* 51 (2009), s335-s344.

- [75] Shunzo Kobayashi, Hirotaka Iwase, Yukashi Ito, Hiroko Yamashita, Hiroji Iwata, Toshinari Yamashita, Kazuko Ito, Tatsuya Toyama, Takaaki Nakamura y Akira Ma-saoka. “Clinical significance of bcl-2 gene expression in human breast cancer tissues”. En: *Breast cancer research and treatment* 42.2 (1997), págs. 173-181.
- [76] Jack R Lancaster y Keping Xie. “Tumors face NO problems?” En: *Cancer Research* 66.13 (2006), págs. 6459-6462.
- [77] Eunmi Lee, Maria Ouzounova, Raziye Piranlioglu, Minh Thu Ma, Mustafa Guzel, Daniela Marasco, Ahmed Chadli, Jason E Gestwicki, John K Cowell, Max S Wicha y col. “The pleiotropic effects of TNF α in breast cancer subtypes is regulated by TNFAIP3/A20”. En: *Oncogene* 38.4 (2019), págs. 469-482.
- [78] Beth Levine y Guido Kroemer. “Autophagy in the pathogenesis of disease”. En: *Cell* 132.1 (2008), págs. 27-42.
- [79] Li-Ling Lin, Hsuan-Cheng Huang, Hsueh-Fen Juan, 2013 Taida Cancer Systems Bio-logy Study Group y col. “Deciphering molecular determinants of chemotherapy in gastrointestinal malignancy using systems biology approaches”. En: *Drug discovery today* 19.9 (2014), págs. 1402-1409.
- [80] Carlos López-Otin, Maria A Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano y Guido Kroe-mer. “The hallmarks of aging”. En: *Cell* 153.6 (2013), págs. 1194-1217.
- [81] Maja Magdalena Lovric y CJ Hawkins. “TRAIL treatment provokes mutations in surviving cells”. En: *Oncogene* 29.36 (2010), pág. 5048.
- [82] Scott W Lowe, Enrique Cepero y Gerard Evan. “Intrinsic tumour suppression”. En: *Nature* 432.7015 (2004), pág. 307.
- [83] Robin L Macintosh y Kevin M Ryan. “Autophagy in tumour cell death”. En: *Seminars in cancer biology*. Vol. 23. 5. Elsevier. 2013, págs. 344-351.
- [84] Jaudah A Al-Maghrabi. “Overexpression of SIRT1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder is associated with local recurrence and poor survival.” En: *Saudi Medical Journal* 40.6 (2019), págs. 541-548.
- [85] Adam A Margolin, Ilya Nemenman, Katia Basso, Chris Wiggins, Gustavo Stolovitzky, Riccardo Dalla Favera y Andrea Califano. “ARACNE: an algorithm for the recons-truction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context”. En: *BMC bioinformatics*. Vol. 7. 1. BioMed Central. 2006, S7.
- [86] Guillermo Mariño, Mireia Niso-Santano, Eric H Baehrecke y Guido Kroemer. “Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis”. En: *Nature reviews Mole-cular cell biology* 15.2 (2014), pág. 81.
- [87] Robin Mathew, Cristina M Karp, Brian Beaudoin, Nhan Vuong, Guanghua Chen, Hsin-Yi Chen, Kevin Bray, Anupama Reddy, Gyan Bhanot, Celine Gelinás y col. “Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62”. En: *Cell* 137.6 (2009), págs. 1062-1075.

- [88] Robin Mathew, Sameera Kongara, Brian Beaudoin, Cristina M Karp, Kevin Bray, Kurt Degenhardt, Guanghua Chen, Shengkan Jin y Eileen White. “Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability”. En: *Genes & development* 21.11 (2007), págs. 1367-1381.
- [89] Kate McArthur y Benjamin T Kile. “Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?” En: *Trends in cell biology* (2018).
- [90] John Mendelsohn, Peter M Howley, Mark A Israel, Joe W Gray y Craig B Thompson. *The Molecular Basis of Cancer: Expert Consult-Online*. Elsevier Health Sciences, 2008.
- [91] Kimberly D Miller, Rebecca L Siegel, Chun Chieh Lin, Angela B Mariotto, Joan L Kramer, Julia H Rowland, Kevin D Stein, Rick Alteri y Ahmedin Jemal. “Cancer treatment and survivorship statistics, 2016”. En: *CA: a cancer journal for clinicians* 66.4 (2016), págs. 271-289.
- [92] Noboru Mizushima, Beth Levine, Ana Maria Cuervo y Daniel J Klionsky. “Autophagy fights disease through cellular self-digestion”. En: *nature* 451.7182 (2008), págs. 1069-1075.
- [93] Ning Mu, Yuanjiu Lei, Yu Wang, Yingying Wang, Qinghui Duan, Guilin Ma, Xiangguo Liu y Ling Su. “Inhibition of SIRT1/2 upregulates HSPA5 acetylation and induces pro-survival autophagy via ATF4-DDIT4-mTORC1 axis in human lung cancer cells”. En: *Apoptosis* 24.9-10 (2019), págs. 798-811.
- [94] Siddhartha Mukherjee. *El emperador de todos los males: Una biografía del cáncer*. Debate, 2014.
- [95] Subhadip Mukhopadhyay, Prashanta Kumar Panda, Niharika Sinha, Durgesh Nandini Das y Sujit Kumar Bhutia. “Autophagy and apoptosis: where do they meet?” En: *Apoptosis* 19.4 (2014), págs. 555-566.
- [96] Jordi Muntané y Manuel De la Mata. “Nitric oxide and cancer”. En: *World journal of hepatology* 2.9 (2010), pág. 337.
- [97] Anika Nagelkerke, Johan Bussink, Anneke Geurts-Moespot, Fred CGJ Sweep y Paul N Span. “Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: Pharmacological modulation of treatment-induced autophagy”. En: *Seminars in cancer biology*. Vol. 31. Elsevier. 2015, págs. 99-105.
- [98] Serena Nik-Zainal, Ludmil B Alexandrov, David C Wedge, Peter Van Loo, Christopher D Greenman, Keiran Raine, David Jones, Jonathan Hinton, John Marshall, Lucy A Stebbings y col. “Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers”. En: *Cell* 149.5 (2012), págs. 979-993.
- [99] Ma Yamilet Noriega-Reyes y L McCarron. “Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario”. En: *Cancerologia* 3 (2008), págs. 29-40.
- [100] William G. North, Guohong Gao, Vincent A. Memoli, Roy H. Pang y Launa Lynch. “Breast cancer expresses functional NMDA receptors”. En: *Breast Cancer Research and Treatment* 122.2 (jul. de 2010), págs. 307-314. ISSN: 1573-7217. DOI: [10.1007/s10549-009-0556-1](https://doi.org/10.1007/s10549-009-0556-1). URL: <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0556-1>.

- [101] Ji Young Park, Sora Han, Hye In Ka, Hyun Jeong Joo, Su Jung Soh, Kyung Hyun Yoo y Young Yang. “Silent mating-type information regulation 2 homolog 1 overexpression is an important strategy for the survival of adapted suspension tumor cells”. En: *Cancer science* 110.9 (2019), pág. 2773.
- [102] Joel S Parker, Michael Mullins, Maggie CU Cheang, Samuel Leung, David Voduc, Tammi Vickery, Sherri Davies, Christiane Fauron, Xiaping He, Zhiyuan Hu y col. “Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes”. En: *Journal of clinical oncology* 27.8 (2009), pág. 1160.
- [103] Franck Pellestor. “Chromothripsis: how does such a catastrophic event impact human reproduction?” En: *Human Reproduction* 29.3 (2014), págs. 388-393.
- [104] Charles M Perou y Anne-Lise Børresen-Dale. “Systems biology and genomics of breast cancer”. En: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.2 (2011), a003293.
- [105] Charles M Perou, Therese Sørlie, Michael B Eisen, Matt Van De Rijn, Stefanie S Jeffrey, Christian A Rees, Jonathan R Pollack, Douglas T Ross, Hilde Johnsen, Lars A Akslen y col. “Molecular portraits of human breast tumours”. En: *Nature* 406.6797 (2000), pág. 747.
- [106] Kornelia Polyak. “Breast cancer: origins and evolution”. En: *The Journal of clinical investigation* 117.11 (2007), págs. 3155-3163.
- [107] Kornelia Polyak. “Heterogeneity in breast cancer”. En: *The Journal of clinical investigation* 121.10 (2011), págs. 3786-3788.
- [108] Aleix Prat y Charles M Perou. “Deconstructing the molecular portraits of breast cancer”. En: *Molecular oncology* 5.1 (2011), págs. 5-23.
- [109] Kevin J Pridham, Lamvy Le, Sujuan Guo, Robin T Varghese, Sarah Algino, Yanping Liang, Renee Fajardin, Cara M Rodgers, Gary R Simonds, Deborah F Kelly y col. “PIK3CB/p110 β is a selective survival factor for glioblastoma”. En: *Neuro-oncology* 20.4 (2018), págs. 494-505.
- [110] Gudapureddy Radha y Sathees C Raghavan. “BCL2: a promising cancer therapeutic target”. En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1868.1 (2017), págs. 309-314.
- [111] Flavia Radogna, Mario Dicato y Marc Diederich. “Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target”. En: *Biochemical pharmacology* 94.1 (2015), págs. 1-11.
- [112] Miguel Ángel Ramirez-García, Horacio Márquez-González, Gilberto Barranco-Lampón y Javier Enrique López-Aguilar. “Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer”. En: *El Residente* 9.3 (2014), págs. 84-94.
- [113] Palaniyandi Ramanan, Ida Florance Srikumar y Priti Talwar. “Autophagy: the spotlight for cellular stress responses”. En: *Life sciences* 188 (2017), págs. 53-67.
- [114] Matthew E Ritchie, Belinda Phipson, Di Wu, Yifang Hu, Charity W Law, Wei Shi y Gordon K Smyth. “limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies”. En: *Nucleic acids research* 43.7 (2015), e47-e47.

- [115] Ashley G Rivenbark, Siobhan M O'Connor y William B Coleman. "Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine". En: *The American journal of pathology* 183.4 (2013), págs. 1113-1124.
- [116] Alberto Roseto y CATHERINE Brenner. "Apoptosis o la muerte celular programada". En: *Arch Argent Pediatr* 97.4 (1999), págs. 253-64.
- [117] Maria Russo y Gian Luigi Russo. "Autophagy inducers in cancer". En: *Biochemical pharmacology* 153 (2018), págs. 51-61.
- [118] Peter P Ruvolo. "The broken "Off" switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance". En: *BBA clinical* 6 (2016), págs. 87-99.
- [119] Michael W Schmitt, Lawrence A Loeb y Jesse J Salk. "The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy". En: *Nature reviews Clinical oncology* 13.6 (2016), pág. 335.
- [120] Michael W Schmitt, Marc J Prindle y Lawrence A Loeb. "Implications of genetic heterogeneity in cancer". En: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1267.1 (2012), págs. 110-116.
- [121] Alvaro Sebastian, Alberto Pascual-Garcia, Federico Abascal, Jacobo Aguirre, Eduardo Andrés-León, Djordje Bajic, Davide Baú, Juan A Bueren-Calabuig, Álvaro Cortés-Cabrera, Iván Dotu y col. "'Bioinformática con Ñ v1. 0': a collaborative project of young Spanish scientists to write a complete book about Bioinformatics". En: *Book of Abstracts*. Vol. 1, pág. 22.
- [122] Richard Sever y Joan S Brugge. "Signal transduction in cancer". En: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5.4 (2015), a006098.
- [123] Fatemeh Seyednasrollah, Asta Laiho y Laura L Elo. "Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies". En: *Briefings in bioinformatics* 16.1 (2013), págs. 59-70.
- [124] Lei Shi, Xiaolong Tang, Minxian Qian, Zuojun Liu, Fanbiao Meng, Li Fu, Zimei Wang, Wei-Guo Zhu, Jian-Dong Huang, Zhongjun Zhou y col. "A SIRT1-centered circuitry regulates breast cancer stemness and metastasis". En: *Oncogene* 37.49 (2018), pág. 6299.
- [125] Shigeomi Shimizu, Toku Kanaseki, Noboru Mizushima, Takeshi Mizuta, Satoko Arakawa-Kobayashi, Craig B Thompson y Yoshihide Tsujimoto. "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes". En: *Nature cell biology* 6.12 (2004), pág. 1221.
- [126] Arun J Singh, Stephen A Ramsey, Theresa M Filtz y Chrissa Kioussi. "Differential gene regulatory networks in development and disease". En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 75.6 (2018), págs. 1013-1025.

- [127] Therese Sørli, Charles M Perou, Robert Tibshirani, Turid Aas, Stephanie Geisler, Hilde Johnsen, Trevor Hastie, Michael B Eisen, Matt Van De Rijn, Stefanie S Jeffrey y col. “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.19 (2001), págs. 10869-10874.
- [128] Zhenyi Su, Zuozhang Yang, Yongqing Xu, Yongbin Chen y Qiang Yu. “Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis”. En: *Molecular cancer* 14.1 (2015), pág. 48.
- [129] Xiao-xiao Sun y Qiang Yu. “Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment”. En: *Acta Pharmacologica Sinica* 36.10 (2015), pág. 1219.
- [130] Chrisna Swart, Andre Du Toit y Ben Loos. “Autophagy and the invisible line between life and death”. En: *European journal of cell biology* 95.12 (2016), págs. 598-610.
- [131] Lindsey A Torre, Freddie Bray, Rebecca L Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent y Ahmedin Jemal. “Global cancer statistics, 2012”. En: *CA: a cancer journal for clinicians* 65.2 (2015), págs. 87-108.
- [132] Julia YS Tsang y MK Gary. “Is BECN1 a target gene of chromosome 17q21 alteration in breast cancer?” En: *EBioMedicine* 2.3 (2015), págs. 190-191.
- [133] Julia YS Tsang, Ken HY Wong, Michael WH Lai, Maribel D Lacambra, Chun-Wai Ko, Siu Ki Chan, Christopher CF Lam, MC Alex, Puay-Hoon Tan y M Tse Gary. “Nerve growth factor receptor (NGFR): a potential marker for specific molecular subtypes of breast cancer”. En: *Journal of clinical pathology* 66.4 (2013), págs. 291-296.
- [134] Panagiotis Tsapras y Ioannis P Nezis. “Caspase involvement in autophagy”. En: *Cell death and differentiation* 24.8 (2017), pág. 1369.
- [135] Tom Vanden Berghe, William J Kaiser, Mathieu JM Bertrand y Peter Vandenabeele. “Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling”. En: *Molecular & cellular oncology* 2.4 (2015), e975093.
- [136] Helen Shiphrah Vethakanraj, Thabraz Ahmed Babu, Ganesh Babu Sudarsanan, Prabhu Kumar Duraisamy y Sekar Ashok Kumar. “Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines”. En: *Biochemical and biophysical research communications* 464.3 (2015), págs. 833-839.
- [137] Darina Vuong, Peter T Simpson, Benjamin Green, Margaret C Cummings y Sunil R Lakhani. “Molecular classification of breast cancer”. En: *Virchows Archiv* 465.1 (2014), págs. 1-14.
- [138] Edwin Wang, Jinfeng Zou, Naif Zaman, Lenore K Beitel, Mark Trifiro y Miltiadis Paliouras. “Cancer systems biology in the genome sequencing era: Part 1, dissecting and modeling of tumor clones and their networks”. En: *Seminars in cancer biology*. Vol. 23. 4. Elsevier. 2013, págs. 279-285.
- [139] Li Wang, Jing Li, Hongying Zhao, Jing Hu, Yanyan Ping, Feng Li, Yujia Lan, Chaohan Xu, Yun Xiao y Xia Li. “Identifying the crosstalk of dysfunctional pathways mediated by lncRNAs in breast cancer subtypes”. En: *Molecular BioSystems* 12.3 (2016), págs. 711-720.

- [140] Q Wang, C-J Shi y S-H Lv. “Benchmarking pathway interaction network for colorectal cancer to identify dysregulated pathways”. En: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 50.5 (2017).
- [141] Wei Wang, Subhasree A Nag y Ruiwen Zhang. “Targeting the NF κ B signaling pathways for breast cancer prevention and therapy”. En: *Current medicinal chemistry* 22.2 (2015), págs. 264-289.
- [142] Yong Wang, Jill Waters, Marco L Leung, Anna Unruh, Whijae Roh, Xiuqing Shi, Ken Chen, Paul Scheet, Selina Vattathil, Han Liang y col. “Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing”. En: *Nature* 512.7513 (2014), pág. 155.
- [143] Zhong Wang, Mark Gerstein y Michael Snyder. “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics”. En: *Nature reviews genetics* 10.1 (2009), pág. 57.
- [144] Joseph A Wayman y Jeffrey D Varner. “Biological systems modeling of metabolic and signaling networks”. En: *Current Opinion in Chemical Engineering* 2.4 (2013), págs. 365-372.
- [145] Robert A Weinberg. “Tumor suppressor genes”. En: *Science* 254.5035 (1991), págs. 1138-1146.
- [146] Rebecca SY Wong. “Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment”. En: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30.1 (2011), pág. 87.
- [147] Xiaojie Yan, Ruimin Zhou y Zhenyi Ma. “Autophagy—Cell Survival and Death”. En: *Autophagy: Biology and Diseases*. Springer, 2019, págs. 667-696.
- [148] Tong Yang, Ru Zhou, Shentong Yu, Shuhong Yu, Zhuqing Cui, Peizhen Hu, Jinsong Liu, Qing Qiao y Jing Zhang. “Cytoplasmic SIRT1 inhibits cell migration and invasion by impeding epithelial–mesenchymal transition in ovarian carcinoma”. En: *Molecular and cellular biochemistry* 459.1-2 (2019), págs. 157-169.
- [149] Yumei Yang, Mei Li y Yanshuang Li. “High expression of PIK3R1 (p85 α) correlates with poor survival in patients with metastatic breast cancer”. En: *Int J Clin Exp Pathol* 9.12 (2016), págs. 12797-12806.
- [150] Byong Chul Yoo, Kyung-Hee Kim, Sang Myung Woo y Jae Kyung Myung. “Clinical multi-omics strategies for the effective cancer management”. En: *Journal of proteomics* (2017).
- [151] Byong Chul Yoo, Kyung-Hee Kim, Sang Myung Woo y Jae Kyung Myung. “Clinical multi-omics strategies for the effective cancer management”. En: *Journal of proteomics* 188 (2018), págs. 97-106.
- [152] Andrew RJ Young, Masako Narita, Manuela Ferreira, Kristina Kirschner, Mahito Sadaie, Jeremy FJ Darot, Simon Tavaré, Satoko Arakawa, Shigeomi Shimizu, Fiona M Watt y col. “Autophagy mediates the mitotic senescence transition”. En: *Genes & development* 23.7 (2009), págs. 798-803.
- [153] Dimitrios Zardavas, Alexandre Irrthum, Charles Swanton y Martine Piccart. “Clinical management of breast cancer heterogeneity”. En: *Nature reviews Clinical oncology* 12.7 (2015), pág. 381.

- [154] Boris Zhivotovsky y Sten Orrenius. “Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease”. En: *Experimental cell research* 316.8 (2010), págs. 1374-1383.
- [155] Feifan Zhou, Ying Yang y Da Xing. “Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis”. En: *The FEBS journal* 278.3 (2011), págs. 403-413.
- [156] Xiang Zhou, Qian Hao, Peng Liao, Shiwen Luo, Minhong Zhang, Guohui Hu, Hongbing Liu, Yiwei Zhang, Bo Cao, Melody Baddoo y col. “Nerve growth factor receptor negates the tumor suppressor p53 as a feedback regulator”. En: *Elife* 5 (2016), e15099.
- [157] Hua Zou, Ruomei Yang, Junshan Hao, Jean Wang, Chaohong Sun, Stephen W Fesik, Joe C Wu, Kevin J Tomaselli y Robert C Armstrong. “Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP”. En: *Journal of Biological Chemistry* 278.10 (2003), págs. 8091-8098.

Apéndice A

RRG-Subtipos

Las redes de los subtipo Her2, LuminalA y LuminalB son las siguientes [A.1](#), [A.2](#), [A.3](#), como en la del subtipo Basal en estas RRG los enlaces representan los valores de información mutua, los nodos color rojo representan genes de apoptosis y autofagia, los nodos de color azul representan genes relacionados a los genes de apoptosis y autofagia con un valor de interacción de información mutua alto.

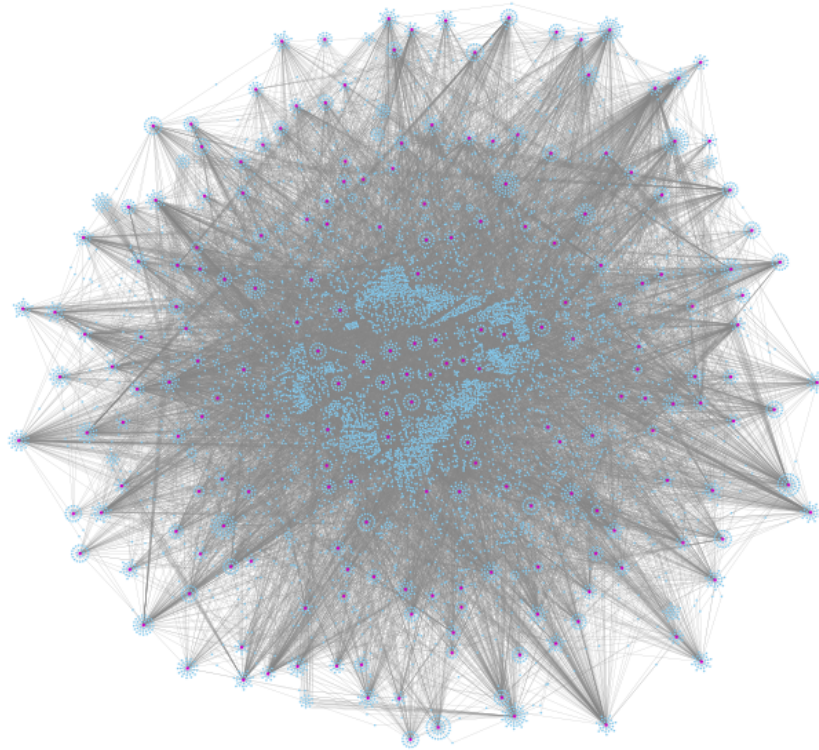


FIGURA A.1: Red de Regulación Genética del subtipo LuminalA.

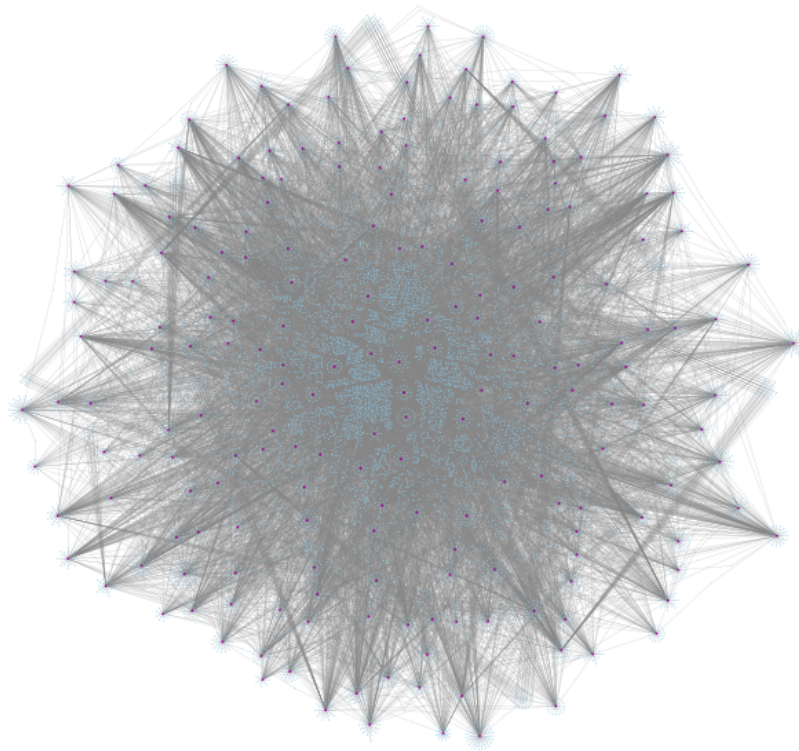


FIGURA A.2: Red de Regulación Genética del subtipo LuminalB.

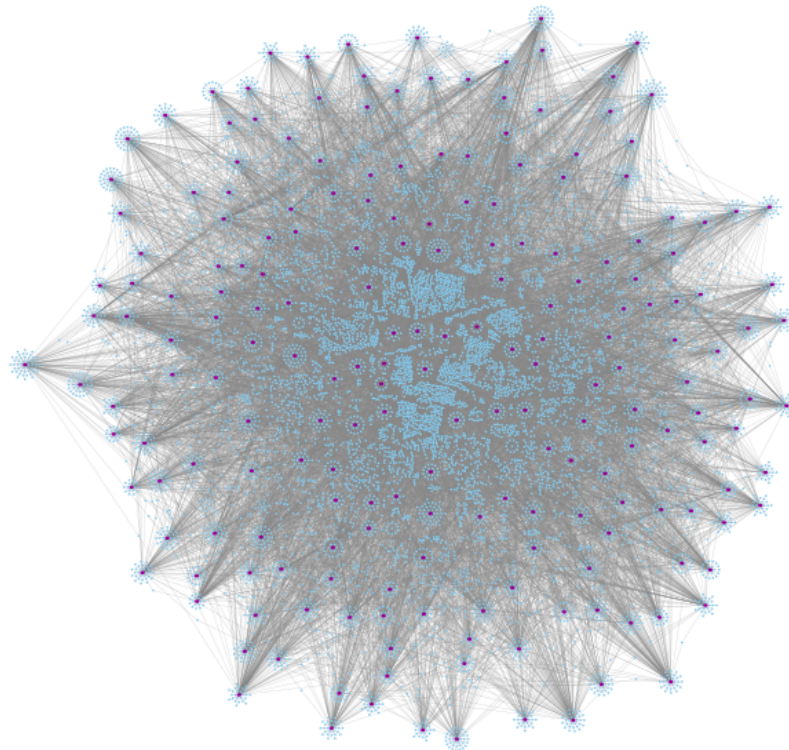


FIGURA A.3: Red de Regulación Genética del subtipo Her2.



The Large Scale Structure of Human Metabolism Reveals Resilience via Extensive Signaling Crosstalk

Laura Gómez-Romero^{1†}, Karina López-Reyes^{1†} and Enrique Hernández-Lemus^{1,2*}

¹ Computational Genomics Division, National Institute of Genomic Medicine, Mexico, Mexico, ² Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Matteo Barberis,
University of Surrey, United Kingdom

Reviewed by:

Kalyan C. Vinnakota,
CFD Research Corporation,
United States
Bhanwar Lal Puniya,
University of Nebraska-Lincoln,
United States

*Correspondence:

Enrique Hernández-Lemus
ehernandez@inmegen.gob.mx

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Systems Biology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 28 July 2020

Accepted: 26 November 2020

Published: 16 December 2020

Citation:

Gómez-Romero L, López-Reyes K
and Hernández-Lemus E (2020) The
Large Scale Structure of Human
Metabolism Reveals Resilience via
Extensive Signaling Crosstalk.
Front. Physiol. 11:588012.
doi: 10.3389/fphys.2020.588012

Metabolism is loosely defined as the set of physical and chemical interactions associated with the processes responsible for sustaining life. Two evident features arise whenever one looks at metabolism: first, metabolism is conformed as a very complex and intertwined construct of the many associated biomolecular processes. Second, metabolism is characterized by a high degree of stability reflected by the organisms resilience to either environmental changes or pathogenic conditions. Here we will investigate the relationship between these two features. By having access to the full set of human metabolic interactions as reported in the highly curated KEGG database, we built an integrated human metabolic network comprising metabolic, transcriptional regulation, and protein-protein interaction networks. We hypothesized that a metabolic process may exhibit resilience if it can recover from perturbations at the pathway level; in other words, metabolic resilience could be due to pathway crosstalk which may implicate that a metabolic process could proceed even when a perturbation has occurred. By analyzing the topological structure of the integrated network, as well as the hierarchical structure of its main modules or subnetworks, we observed that behind biological resilience lies an intricate communication structure at the topological and functional level with pathway crosstalk as the main component. The present findings, alongside the advent of large biomolecular databases, such as KEGG may allow the study of the consequences of this redundancy and resilience for the study of healthy and pathological phenotypes with many potential applications in biomedical science.

Keywords: metabolic networks, pathway crosstalk, functional redundancy, resilience, human metabolism

1. INTRODUCTION

Metabolism is defined as the sum of physical and biochemical processes in living organisms that either produce or consume energy. Metabolic alterations often lead to cellular dysfunction, which is usually translated into disease (DeBerardinis and Thompson, 2012). Metabolism and disease are so tightly linked that diseases associated with adjacent metabolic reactions present higher comorbidity than diseases that have no metabolic links between them (Lee et al., 2008). Also, driver reactions, defined as the smallest set of reactions that must be controlled to control the activity of all reactions of the metabolic network, have been proposed as potential therapeutic targets in cancer cells (Basler et al., 2016). Understanding how the metabolism works, is one of the foundations to understand human disease.

