

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE RNAS LARGOS NO CODIFICANTES
ASOCIADOS AL MIMETISMO VASCULOGÉNICO EN
BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
METASTÁSICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

DAVID NUÑEZ CORONA

DIRECTOR

DR. MARIO CESAR LÓPEZ CAMARILLO, UACM

CODIRECTOR

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, mayo ,2022

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Ángeles Carlos-Reyes

Secretario: Dr. Mario Cesar López Camarillo

Vocal: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

1er. Suplente: Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

2do. Suplente: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dr. Mario Cesar López Camarillo

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

A la Maestría en Ciencias Genómicas de la UACM por brindarme las facilidades y el apoyo en el programa de posgrado

A CONACYT por la beca recibida durante el periodo 01/feb/2020 - 31/ene/2022 para poder realizar mis estudios e investigación (Numero de beca 1035141)

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi madre, por brindarme siempre su amor y apoyo incondicional, por ser un ejemplo para seguir, por su compañía, sabios consejos e impulsarme a intentarlo todo. A mi padre, por darme su amor, apoyo incondicional, por ser maestro en mi vida y formación personal. A mis hermanos Alejandro, Juana, Silvia y Elizabeth, por acompañarme en esta travesía, con su amor, apoyo, por compartir tantos momentos de alegría y aprendizaje. A mis profesores, gracias por todo su tiempo y enseñanzas durante mi formación profesional. A mis amigos Jossimar, Rebeca, Samuel, Carlos, Misael y Bonachino, por haber tocado mi corazón, por ser personas increíbles sin importar la distancia y el tiempo. A mis compañeros posgrado, gracias a cada uno de ustedes por los momentos compartidos.

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Definición de cáncer.....	1
1.1.1	Características distintivas del cáncer	1
1.2	Metástasis.....	2
1.3	Epidemiología del cáncer a nivel mundial	5
1.4	Epidemiología del cáncer en México	6
1.5	Cáncer de mama	7
1.6	Factores de riesgo	8
1.7	Clasificación del cáncer de mama	9
1.8	Clasificación histológica de los carcinomas	9
1.9	Clasificación molecular	10
1.9.1	Clasificación de tumores triple negativos	11
1.9.2	Clasificación histológica del cáncer de mama	11
1.10	RNAs largos no codificantes	12
1.11	Clasificación de RNAs largos no codificantes	12
1.12	Función de los RNAs largos no codificantes en la célula.....	13
1.13	Mecanismos de vascularización en cáncer.....	17
1.14	Mecanismos en la formación de mimetismo vasculogénico en tumores...19	
1.14.1	Microambiente tumoral	20
1.15	Proteínas clave y vías de señalización relacionadas con mimetismo vasculogénico	21
2	ANTECEDENTES PARTICULARES	26
2.1	Metástasis y mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.....	26
2.2	LncRNAs asociados a metástasis en cáncer de mama	27
2.3	LncRNAs asociados con la transición epitelio mesenquimal e invasión ...27	
2.4	LncRNAs en la colonización metastásica de cáncer de mama.....	27
2.5	Papel de los lncRNAs en el mimetismo vasculogénico de cáncer de mama	28
3	HIPÓTESIS	29

4	JUSTIFICACIÓN	29
1.	OBJETIVOS	30
1.	Objetivo general.....	30
4.1	Objetivos particulares.....	30
5	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	31
6	MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1	Estrategia de búsqueda pubMed	32
6.2	Análisis de enriquecimiento GO	32
6.3	Conjunto de datos y construcción de mapas de calor.....	33
6.4	Material biológico.	33
6.5	Cortes histológicos.....	33
6.6	Extracción de RNA total de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE)	34
6.7	Síntesis de cDNA.....	34
6.8	Análisis de la expresión de lncRNAs.....	35
6.9	Inmunohistoquímica	36
6.10	Conteo de Microvasculatura	37
6.11	Análisis estadísticos.....	38
7	RESULTADOS	38
8	Modelo.....	72
9	DISCUSIÓN.....	74
10	CONCLUSIONES.....	83
11	BIBLIOGRAFÍA.....	84

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes utilizados en la reacción de qPCR	35
Tabla 2. Productos génicos involucrados en el desarrollo de la metástasis	40
Tabla 3. Productos génicos que participan en el desarrollo del mimetismo vasculogénico	42
Tabla 4. LncRNAs relacionados con la promoción y desarrollo de la metástasis en diferentes tipos de cáncer	49
Tabla 5. Los 10 principales lncRNAs desregulados en M0 y M1 en la cohorte de pacientes de TCGA.....	50
Tabla 6. LncRNAs relacionados con el desarrollo del mimetismo vasculogénico en diferentes tipos de cáncer	51
Tabla 7. Características clínico-patológicas de las muestras de cáncer de mama incluidas en este estudio	56
Tabla 8. Cuantificación del RNA total obtenido a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina	62
Tabla 9. Función de las lncRNAs asociados a metástasis y mimetismo vasculogénico	68
Tabla 10. Características de los primers para lncRNAs	97

Índice de figuras.

<i>Figura 1. Sellos del cáncer.....</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. Pasos clave en la progresión de la metástasis en tumores sólidos.</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3. Datos epidemiológicos del cáncer en el mundo.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4. Epidemiología del cáncer en México.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 5. Anatomía de la mama. A. Carcinoma ductal in situ B. Carcinoma lobulillar in situ.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 6. Características histológicas y moleculares del cáncer de mama.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 7. Clasificación de RNAs largos no codificantes conforme a la posición genómica donde se transcriben.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 8. Función de los RNAs largos no codificantes en la célula.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 9. Tipos de vasculatura tumoral.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 10. Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del mimetismo vasculogénico..</i>	<i>25</i>
<i>Figura 11. Condiciones y componentes para la síntesis de cDNA.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 12. Condiciones de la reacción de qPCR para medir la expresión relativa de lncRNAs y GAPDH.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 13. Método de conteo de microvasculatura positiva y negativa para mimetismo vasculogénico.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 14. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) del conjunto de genes relacionados con la metástasis.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) del conjunto de genes relacionados con mimetismo vasculogénico.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 16. Los 20 principales términos GO relacionados con los procesos biológicos en genes relacionados con metástasis y mimetismo vasculogénico....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17. Estadificación American Joint Committee on Cancer Metastasis y clasificación intrínseca del conjunto de datos provenientes de TCGA.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 18. Agrupación jerárquica de un grupo de RNAm relacionados con la metástasis.....</i>	<i>47</i>

<i>Figura 19. Agrupamiento jerárquico de la expresión diferencial de 132 genes relacionados con el mimetismo vasculogénico.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 20. Agrupamiento jerárquico de la expresión diferencial de lncRNAs relacionados con la metástasis..</i>	<i>50</i>
<i>Figura 21. Agrupamiento jerárquico de la expresión diferencial de lncRNAs relacionados con el mimetismo vasculogénico</i>	<i>52</i>
<i>Figura 22. Red de interacción de lncRNAs-miRNAs-RNAm relacionados con la metástasis.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 23. Red de interacción de lncRNAs-miRNAs-RNAm relacionados con el mimetismo vasculogénico..</i>	<i>55</i>
<i>Figura 24. Doble tinción CD31/PAS en cáncer de mama no metastásico.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 25. A. Conteo de las estructuras tipo canal en muestras de cáncer de mama no metastásico..</i>	<i>59</i>
<i>Figura 26. Doble tinción CD31/PAS en muestras de cáncer de mama metastásico.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 27. A. Conteo de canales en muestras metastásicas. B. Índice de tinción para CD31 en muestras de cáncer de mama metastásico.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. 1-5. RNA total obtenido a partir de muestras incluidas en parafina.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 29. Nivel de expresión de RNAs largos no codificantes en cohortes diferentes de cáncer de mama.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 30. Análisis de ontología genética GO de proteínas de unión a RNA.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 31. Enriquecimiento funcional en términos GO de la categoría “funciones moleculares” de genes con características ceRNA.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 32. Las 20 vías Kegg más significativas del conjunto de genes relacionados con los lncRNAs más expresados en metástasis y mimetismo vasculogénico.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 33. Modelo de las funciones por las cuales los lncRNA más expresados podrían estar regulando la metástasis y mimetismo vasculogénico.....</i>	<i>73</i>

Abreviaturas.

°C	Grados centígrados	PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
μL	Microlitro	PR	Receptor de progesterona
μm	Micras	PTMs	Modificaciones postraduccionales
μm ²	Micras cuadradas	RNA	Ácido ribonucleico
AR	Receptor de andrógenos	RNA ^m	RNA mensajero
CD31	Molécula de adhesión de células endoteliales	RT	Retro transcripción
cDNA	DNA complementario	TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β
ceRNAs	RNA endógenos competitivos	TN	Triple negativo
CLIS	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>	TNBC	Cáncer de mama triple negativo
CM	Cáncer de mama	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
cm	Centímetros	Twist	Factor de transcripción 1
cM0(i+)	Sin evidencia de metástasis, células tumorales en sangre	VE-cadherina	Cadherina endotelial vascular
COX-2	Ciclooxigenasa 2	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
EMT	Transición epitelio mesenquimal	Wnt	familia de proteínas Wingless
ER	Receptor de estrógenos	μM	Micromolar
FAK	Cinasa de adhesión focal		
FAK	Cinasa de adhesión focal		
FFPE	Fijado en formalina e incluido en parafina		
GO	Ontología génica		
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano		
ILC	Carcinoma lobulillar		
KEGG	Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas		
lncRNAs	RNAs largos no codificantes		
M	Mesenquimatoso		
M0	No metástasis		
M1	Metástasis		
M2	Macrófagos tipo 2		
MEC	Matriz extracelular		
min	Min		
miRNA	microRNA		
mL	Mililitros		
MMP	Metaloproteinasa		
MV	Mimetismo Vasculogénico		
ng	Nanogramos		
PAS	Ácido peryódico de schiff		
PBS	Buffer fosfato salino		

Resumen

El mimetismo vasculogénico es la formación de estructuras tipo canal mediante células tumorales, esto les permite generar una red de canales capaces de transportar sangre, nutrientes y células tumorales lo que puede favorecer en gran medida al proceso de metástasis. Se identificaron 192 genes y 106 lncRNAs relacionados con la metástasis, 132 genes y 20 lncRNAs relacionados con mimetismo vasculogénico (MV) en diferentes tipos de cáncer, los principales términos de ontología génica (GO) que están significativamente enriquecidos son los relacionados con la locomoción, migración celular, motilidad celular, adhesión focal, desarrollo de pseudópodos, sistema circulatorio, desarrollo de tubos y desarrollo vascular. Se analizó la expresión de estos conjuntos de genes en una cohorte de 916 muestras filtradas de cáncer de mama 895 no metastásico (M0) y 21 con metástasis (M1) y se identificaron los 30 genes más expresados. El análisis de enriquecimiento funcional en términos de GO muestra que ambos conjuntos presentan procesos biológicos en común: locomoción, migración celular, motilidad y diferenciación celular. Las redes de interacción mostraron que 44 miRNAs podrían unirse a los RNAm y lncRNAs relacionados con la metástasis, por otro lado, 43 miRNAs pueden interactuar con RNAm y lncRNAs relacionados con MV. Se encontró que todas las muestras M0 y M1 analizadas en este trabajo presentaban mimetismo vasculogénico y eran funcionales ya que se identificaron eritrocitos dentro de estas estructuras tipo canal. Los lncRNAs AFAP1-AS1, CASC15, LUCAT1, TINCR y LINC00662 están más expresados en tejidos de cáncer de mama M1 en comparación con muestras de mama M0. Se sugiere que estos lncRNAs podrían estar regulando la metástasis y MV a través de los cuerpos nucleares mediante en el procesamiento de pri-RNAm, pre-RNAm y formando cuerpos nucleares, también estos lncRNA podrían estar compitiendo por la unión de miRNA con otros lncRNAs o RNAm (ceRNA), a nivel de cromatina con HOTAIR, en el alargamiento de telómeros con AFAP1-AS1 el cual podría estabilizar el complejo de la telomerasa. Los resultados de este estudio pueden contribuir a la identificación de marcadores relacionados con la metástasis y mimetismo vasculogénico en

cáncer de mama en estudios futuros, además, estos resultados pueden ayudar a identificar potenciales objetivos experimentales.

Abstract.

Vasculogenic mimicry is the formation of channel-like structures by tumor cells, this allows them to generate a network of channels capable of transporting blood, nutrients, and tumor cells, which can greatly favor the process of metastasis. 192 genes and 106 lncRNAs related to metastasis were identified, 132 genes and 20 lncRNAs related to vasculogenic mimicry (MV) in distinct types of cancer, the main GO terms that are significantly enriched are those related to locomotion, cell migration, motility cell, focal adhesion, development of pseudopodia, circulatory system, development of tubes and vascular development. The expression of these gene sets in a cohort of 916 filtered breast cancer samples 895 non-metastatic M0 and 21 metastatic (M1) were analyzed and the 30 most expressed genes were identified. Functional enrichment analysis in terms of gene ontology (GO) shows that both sets have biological possessors in common: locomotion, cell migration, motility, and cell differentiation. Interaction networks showed 44 miRNAs could bind to metastasis-related mRNAs and lncRNAs, on the other hand, 43 miRNAs can interact with MV-related mRNAs and lncRNAs. All M0 and M1 samples analyzed in this work were found to exhibit vasculogenic mimicry and were functional as erythrocytes were identified within these channel-like structures. The lncRNAs AFAP1-AS1, CASC15, LUCAT1, TINCR and LINC00662 are more expressed in M1 breast cancer tissues compared to M0 breast samples. It is suggested that these lncRNAs could be regulating metastasis and MV through nuclear bodies by processing pri-mRNAs, pre-mRNAs and forming nuclear bodies, also these lncRNAs could be competing for miRNA binding with other lncRNAs or mRNA (ceRNA), at the chromatin level with HOTAIR, in the lengthening of telomeres with AFAP1-AS1 which could stabilize the telomerase complex. The results of this study may contribute to the identification of markers related to metastasis and vasculogenic mimicry in breast cancer in future studies, in addition, these results may help identify potential experimental targets.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Definición de cáncer*

El cáncer se considera como un conjunto de enfermedades donde las células normales del cuerpo comienzan a dividirse descontroladamente y pueden diseminarse a tejidos adyacentes y propagarse a otros órganos (Cáncer, 2015).

1.1.1 *Características distintivas del cáncer*

El cáncer es una enfermedad compleja, heterogénea y altamente dinámica en la cual múltiples componentes de células normales cambian progresivamente a un estado neoplásico adquiriendo una serie de características distintivas que las convierte en células malignas. En el 2000 Hanahan y Weinberg, propusieron un marco lógico integral para el estudio funcional del cáncer, describiendo seis Hallmarks o sellos distintivos que adquiere una célula durante el desarrollo tumoral: mantenimiento de la señal proliferativa, eludir supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis. Los avances significativos en la comprensión de las características del cáncer llevaron a estos mismos autores a identificar cuatro características nuevas: evasión del sistema inmune, inflamación, desregulación metabólica e inestabilidad genómica y mutacional (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).

Sellos del cáncer

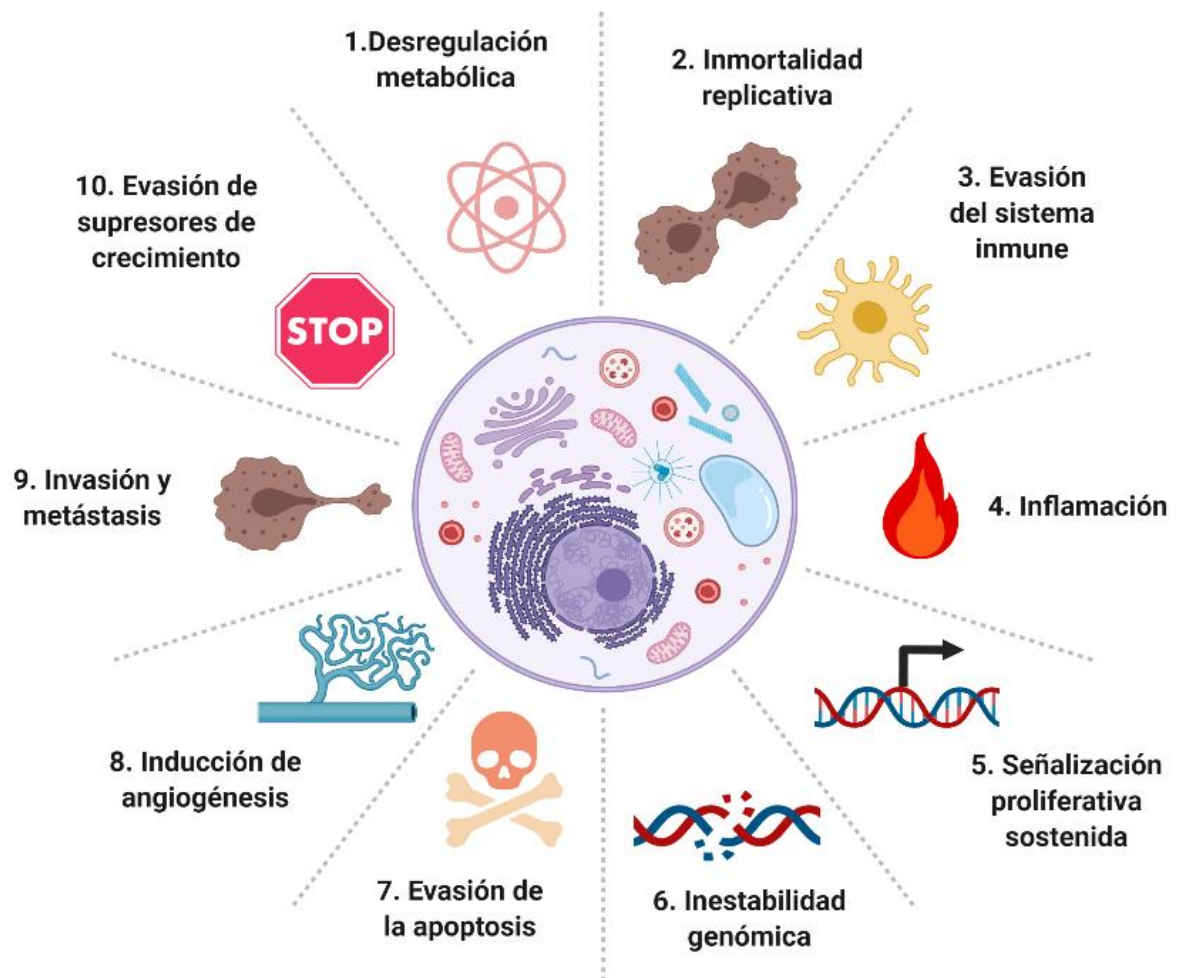


Figura 1. Sellos del cáncer. Las células tumorales adquieren una serie de características necesarias para el inicio, promoción y progresión del cáncer. Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011 en BioRender.com.

1.2 Metástasis

A la formación de tumores secundarios en alguna parte del cuerpo lejos del tumor primario original se le llama metástasis. Para que se lleve a cabo la metástasis las células cancerosas deben abandonar su sitio de origen, circular por el torrente sanguíneo, aclimatarse a un nuevo entorno celular en un sitio secundario, escapar del sistema inmune y progresar a un estado metastásico que a su vez se divide en cinco etapas fundamentales (Fares *et al.*, 2020) (Figura 2).

Invasión. La metástasis inicia cuando las células tumorales invaden la membrana basal, las células degradan la matriz extracelular mientras van migrando con la ayuda de las metaloproteinasas (MMP) MMP-1, -2, -13 y -14 (Kessenbrock et al., 2010).

Intravasación. Es el proceso mediante el cual las células tumorales entran a la luz de la vasculatura, en este proceso intervienen factores intrínsecos y extrínsecos, como factor intrínseco se incluye a la transición epitelio mesenquimal (EMT) y la producción de proteasas, por otro lado los factores extrínsecos comprenden la actividad de neutrófilos protumorales tipo 2 (N2), fibroblastos (CAFs), macrófagos tipo 2 (M2) y las células endoteliales que conforman a los vasos sanguíneos; estas últimas también juegan un papel importante en la intravasación ya que secretan el ligando CXCL12 que atrae a las células tumorales que expresan en receptor CXCR4 lo que facilita aún más la intravasación (Majidpoor y Mortezaee, 2021).

Circulación. Después de que las células tumorales entran a la luz de los vasos sanguíneos pueden viajar por el torrente sanguíneo de manera individual o en agregados celulares, este grupo heterogéneo puede estar formado por células del estroma y neutrófilos que aumentan las probabilidades supervivencia celular en la circulación sanguínea, por otra parte, las plaquetas forman un revestimiento que rodea a las células tumorales evitando que sean detectadas por las células del sistema inmune (Kessenbrock et al., 2010; Placke et al., 2012).

Extravasación. Cuando las células tumorales en circulación pasan a través de pequeños capilares o microvasculaturas, quedan atrapadas y pueden formar pequeñas colonias que romperán las paredes de los vasos. Para superar las barreras físicas de la extravasación en tejidos de baja permeabilidad, los tumores primarios son capaces de liberar exosomas que transfieren factores que pueden modificar el microambiente distante e inducir la permeabilidad vascular, por ejemplo, la angiopoyetina 4 (ANGPTL4), EREG, COX-2, MMP-1 y MMP-2 que interfieren en las uniones de células endoteliales lo que promueve la extravasación de células tumorales (Valastyan y Weinberg, 2011).

Colonización. Los nichos metastásicos poseen células y matriz extracelular compatible para la supervivencia y crecimiento de las células tumorales, por ejemplo, las integrinas regulan el proceso de colonización ya que facilitan la supervivencia independiente del anclaje de las células tumorales en circulación. Los exosomas secretados por el tumor primario pueden inducir la remodelación de la matriz extracelular al interactuar con fibroblastos, células del estroma y células endoteliales para degradar colágeno, laminina y fibronectina. La matriz extracelular alterada por exosomas denota un incremento en la proliferación, migración y supervivencia de las células tumorales, otro factor clave en el éxito de la colonización y crecimiento tumoral es la formación de una red vascular que lleve oxígeno y nutrientes hacia el nuevo tumor (Figura 2) (Hamidi y Ivaska, 2018; Fares *et al.*, 2020).

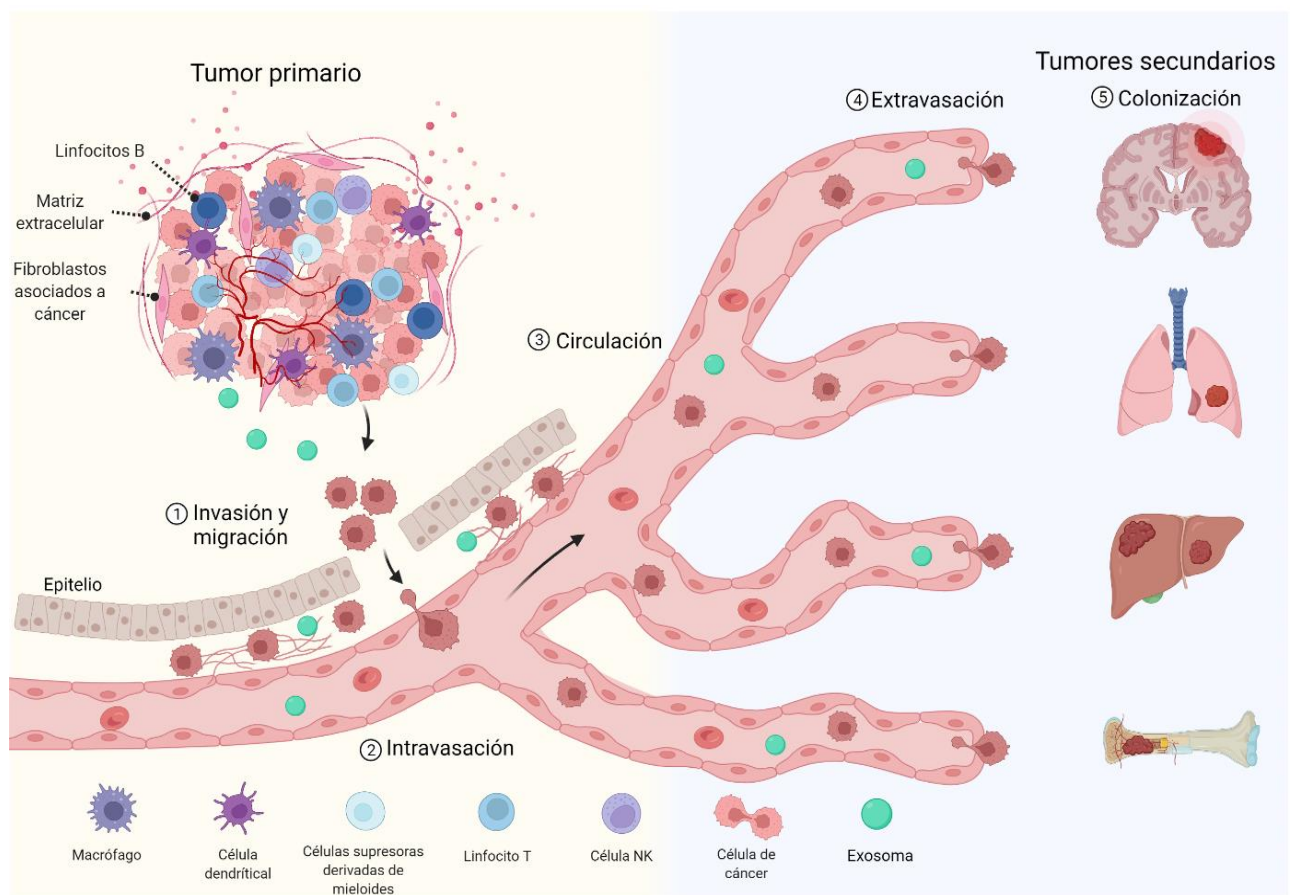


Figura 2. Pasos clave en la progresión de la metástasis en tumores sólidos. 1. Invasión y migración, 2. Intravasación, 3. Circulación, 4. Extravasación, 5. Colonización. Modificada de Fares et al., 2020

1.3 Epidemiología del cáncer a nivel mundial

En la actualidad las enfermedades no transmisibles son responsables de siete de cada diez muertes en todo el mundo y se estima que el cáncer se posicionara como la principal causa de muerte por estas enfermedades en el siglo XXI. Estudios realizados por la Organización Mundial de Salud (OMS) en el 2019 estiman que el cáncer fue la primera y segunda causa de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países (World Health Organization, 2020)

El cáncer constituye un enorme problema social y económico en países desarrollados y en vías de desarrollo; para muchos tipos de cáncer la tasa de incidencia es dos a tres veces mayor en países desarrollados en comparación con economías emergentes, sin embargo, la diferencia en mortalidad entre estas dos regiones es mucho más pequeña debido a una mayor fatalidad en los casos de cáncer de los países menos desarrollados. Estudios liderados por científicos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) estimaron que en 2020 se presentaron 19.3 millones nuevos casos y 10 millones de muertes por cáncer en todo el mundo. De los diez principales tipos de cáncer en ambos sexos, el cáncer de mama es el más diagnosticado (11.7 %) seguido por el cáncer de pulmón (11.4 %), colorrectal (10 %), próstata (7.3 %) y estómago (5.6 %). Por otro lado, los tipos de cáncer que causan un mayor número muertes son: de pulmón (18 %), colorrectal (9.4 %), hígado (8.3 %), estómago (7.7 %) y mama (6.9 %) (Figura 3) (Sung *et al.*, 2021)

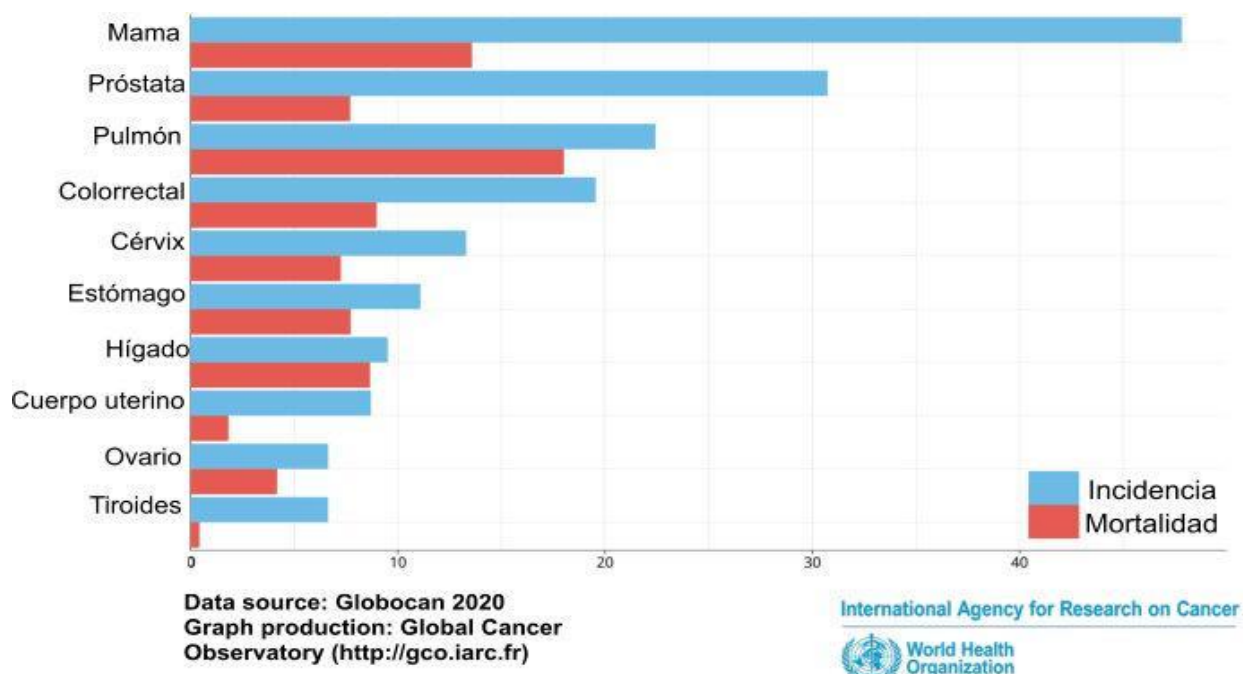


Figura 3. Datos epidemiológicos del cáncer en el mundo. Incidencia y mortalidad de los diez principales tipos de cáncer en el mundo en ambos sexos, todas las edades (Tomado de Globocan, 2020).

1.4 Epidemiología del cáncer en México

En lo que respecta al territorio mexicano en el 2020, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y la IARC reportaron 195 499 nuevos de casos de cáncer y una mortalidad de 90 222, los tipos de cáncer más diagnosticados en ambos sexos y en todas las edades fueron de mama (29 929, 15.3 % del total), próstata (26 472, 13.7 %), colorrectal (14 901, 7.6 %), tiroides (11 227, 5.7 %) y cérvix (9 439, 7.8 %), por otro lado, los tipos de cáncer que causaron un mayor número de muertes fueron debidas a neoplasias de mama (7 931, 8.8 % del total), colorrectal (7 755, 8.6 %), próstata (7 457, 8.3 %), hígado (7 175, 8 %) y leucemia (4 786, 5.3 %) (Figura 4) (INEGI, 2020; Globocan, 2020).

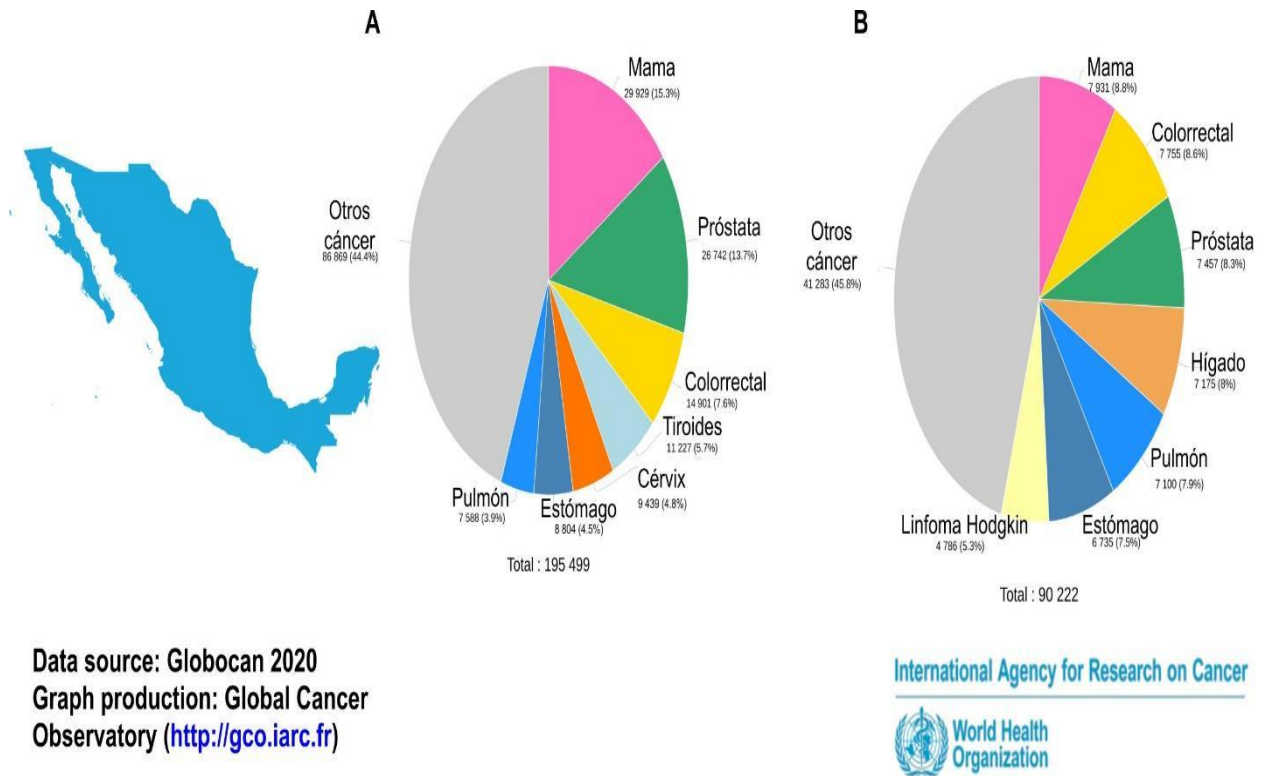


Figura 4. Epidemiología del cáncer en México. A. Incidencia de nuevos casos reportados en el 2020 en ambos sexos, todas las edades. B. Muertes reportadas por cáncer durante el 2020 en ambos sexos, todas las edades. Modificado de Globocan, 2020.

1.5 Cáncer de mama

El cáncer de seno se origina cuando las células de la mama comienzan a multiplicarse sin control. El cáncer de mama puede desarrollarse en diferentes partes del seno, el cual consta de tres partes fundamentales: lobulillos; son las glándulas encargadas de producir la leche, conductos; transportan la leche hacia el pezón y tejido conectivo; formado por tejido fibroso y adiposo que sirve como soporte para todas las partes de la mama. La gran mayoría de los cánceres de seno comienzan en los conductos y se les nombra cánceres ductales, algunos se originan en las glándulas que producen la leche y reciben el nombre de cánceres lobulillares y existen otros muy raros como los tumores filodes y angiosarcoma (Figura 5)(Chou *et al.*, 2013).

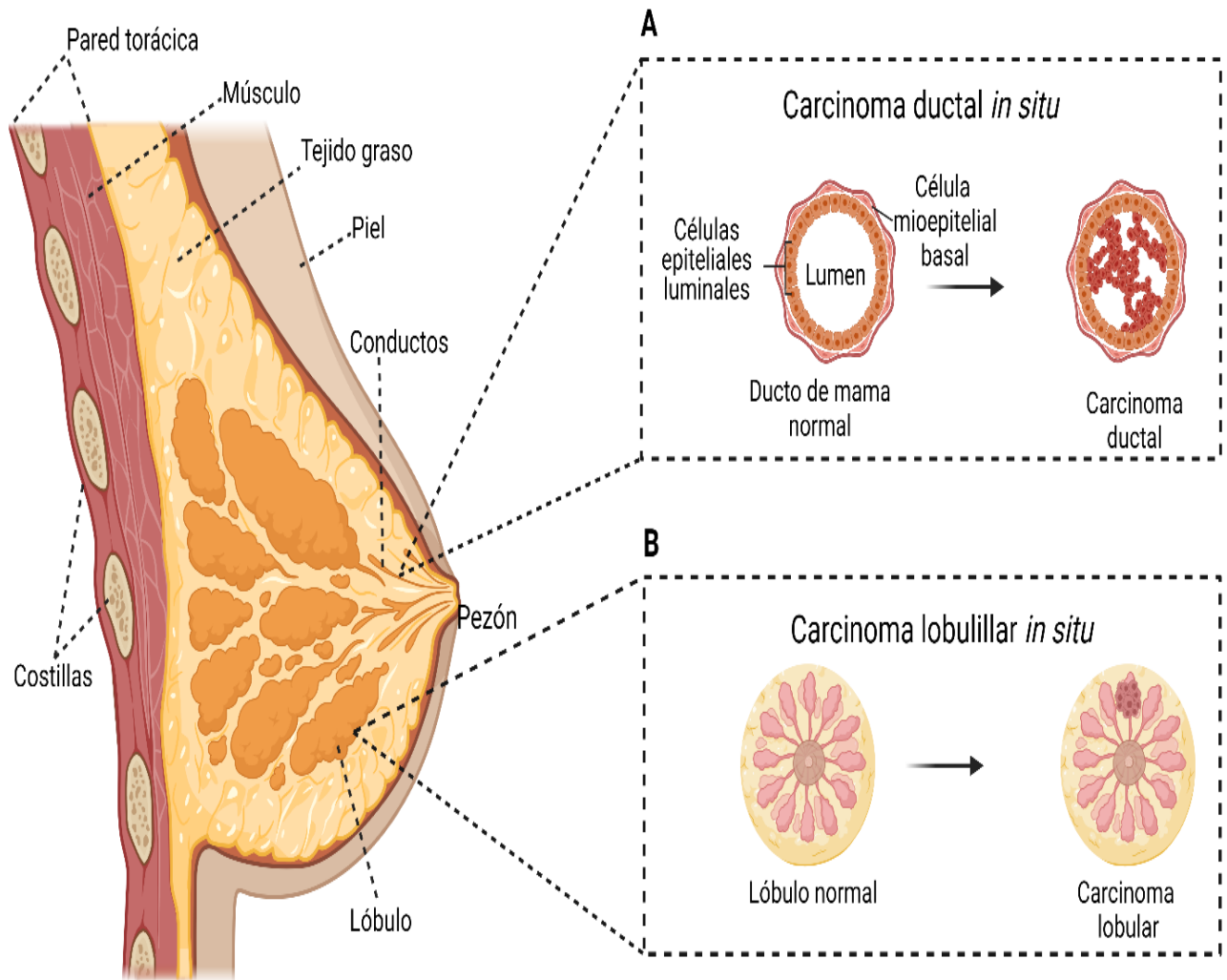


Figura 5. Anatomía de la mama. A. Carcinoma ductal *in situ* B. Carcinoma lobulillar *in situ*.
 Modificada de Harbeck et al., 2019 en BioRender.com.

1.6 Factores de riesgo

Existen dos grupos de factores de riesgo que influyen en el desarrollo del cáncer de mama. Uno de ellos es el factor genético, como mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés), raza y origen étnico, todos estos factores tienen la característica de no ser modificables (Coughlin, 2019).

El segundo grupo de factores de riesgo lo componen los no genéticos: edad avanzada, antecedentes personales de patologías en la mama como la hiperplasia atípica y el carcinoma lobulillar *in situ*, mamas densas, índice de masa corporal elevado, el tratamiento con hormonas femeninas como la terapia hormonal menopáusica y el uso de anticonceptivos hormonales, consumo de alcohol, baja actividad física, factores reproductivos como la menarquia prematura, edad avanzada en el primer embarazo, cortos periodos de lactancia y menopausia tardía, exposición a radiación ionizante (Britt, Cuzick y Phillips, 2020).

1.7 Clasificación del cáncer de mama

En cáncer de mama es altamente heterogéneo, como lo informa el último reporte de la Organización Mundial de la Salud los carcinomas de mama se dividen en 19 subtipos diferentes en los que se incluyen el carcinoma mamario invasivo de ningún tipo especial (70-75 %; antes conocido como carcinoma ductal), carcinoma lobulillar (10-14 %) y los carcinomas de tipo especial que incluyen 17 diferentes histotipos raros con subclasificaciones (Figura 6A) (Sinn y Kreipe, 2013).

1.8 Clasificación histológica de los carcinomas

Esta clasificación se divide en dos subgrupos, el carcinoma ductal preinvasivo (DCIS) que se caracteriza por propagarse a través de los conductos, distorsionar su arquitectura y puede progresar a invasivo; por otro lado el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) no distorsiona la arquitectura de los conductos y puede ser bilateral (Harbeck *et al.*, 2019). El segundo subgrupo corresponde a el carcinoma ductal invasivo sin tipo especial (NST), se caracteriza por desarrollarse a partir del DCIS, origina una masa tumoral de tipo fibrosa, se multiplica en el tejido circundante de la mama, desarrolla metástasis hacia los vasos linfáticos y se disemina por los vasos sanguíneos, y el carcinoma lobulillar (ILC) presentan una respuesta fibrosa mínima y hace metástasis a través de las vísceras (Figura 6A) (Harbeck *et al.*, 2019).

1.9 Clasificación molecular

Existe un número muy grande de alteraciones moleculares que impulsan el desarrollo del cáncer de mama, es por lo que se han desarrollado varias clasificaciones para agrupar este tipo de tumores. En 2000 Perou y Sorlie elaboraron la clasificación intrínseca que se basa en la expresión de un conjunto de 50 genes (PAM50), en ella se describen cuatro subtipos de cáncer de mama: Luminal A se caracterizan por presentar altos niveles de del receptor de estrógenos (ER; codificado por *ESR1*, se localiza en el núcleo, factor de transcripción activado por ligando) y receptor de progesterona (PR; codificado por el gen *PGR*, activador o represor transcripcional dependiente de isoforma, se localiza en el núcleo), bajos niveles de proliferación; El grupo Luminal B, expresa el RE pero no el PR (o en bajo grado), altos niveles de proliferación; Los tipos basales o triple negativos son muy agresivos presentan niveles altos de proliferación y no expresan ER, PR ni el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2; codificado por el gen *ERBB2*, posee tres dominios: unión a ligando extracelular, un dominio transmembranal y uno catalítico tirosina cinasa intracelular); el subtipo HER2 enriquecido no expresa ER, PR y son muy agresivos (Figura 6B).

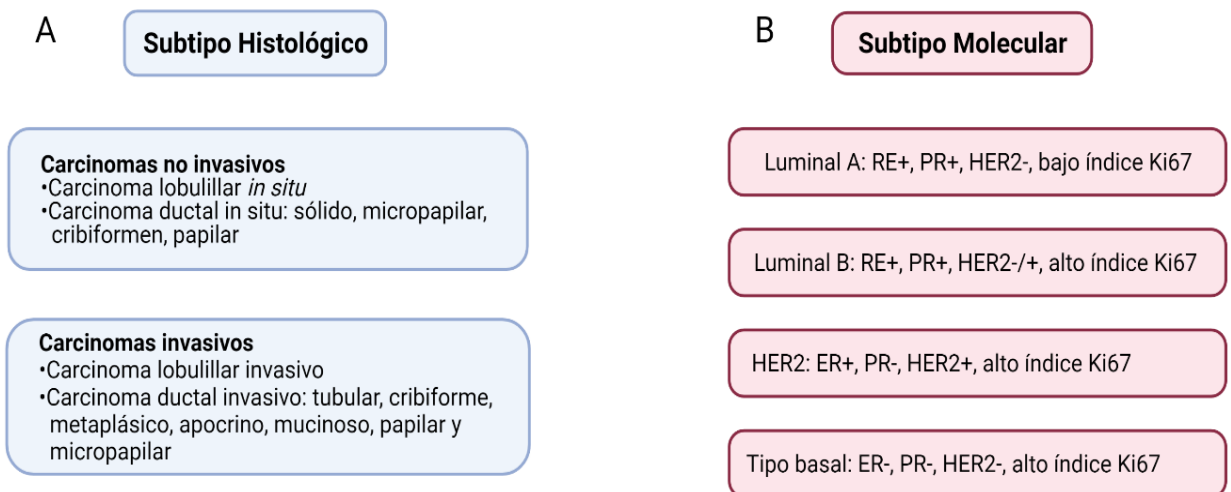


Figura 6. Características histológicas y moleculares del cáncer de mama. A. Clasificación histológica del cáncer de mama. B. Clasificación intrínseca (PAM50) de cáncer de mama, Ki67; marcador de proliferación. Modificada de Harbeck et al., 2019.

1.9.1 Clasificación de tumores triple negativos

Los tumores triple negativo o tipo basal comparten muy pocas similitudes con otros grupos, pero tienen una mayor diversidad intrínseca, al analizar los patrones de expresión génica Lehmann y colaboradores en 2016, refinaron su anterior clasificación de seis subtipos y los agruparon en solo cuatro:

- Basal 1 (BL1). Se caracteriza por presentar altos niveles de expresión en genes que participan en la regulación del ciclo celular como *PIK3CA*, *CDK6*, *AKT2*, *KRAS*, *FGFR1*, *IGF1R*, *CCNE1*, y *CDKN2A/B*, también presentan una alta tasa en deleciones homocigotas y heterocigotas en genes relacionados con la reparación del DNA como *BRCA*, *PTEN*, *MDM2*, *RB1* y *TP53* (Yin *et al.*, 2020).
- Basal 2 (BL2). Desregulación en las vías de señalización EGFR, MET, NGF, Wnt/ β -catenina e IGF-1R y activación de las vías de la glucólisis y gluconeogénesis (Gerratana *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2020).
- Mesenquimatoso (M). Tiene características de tejido similares al sarcoma o células epiteliales escamosas, con alta expresión de vías relacionados con la migración celular, interacción del receptor-matriz extracelular y diferenciación (Wnt, TGF- β) (Yin *et al.*, 2020).
- Receptor de andrógenos luminal (LAR). Este subtipo no expresa ER, tiene activadas vías de señalización relacionadas con las hormonas (metabolismo de andrógenos/estrógenos y porfirinas, síntesis de esteroides), expresión alta en el receptor de andrógenos (AR) (Yin *et al.*, 2020).

1.9.2 Clasificación histológica del cáncer de mama

La agresividad del cáncer se puede evaluar analizando la histología del tumor descrita por Scarff-Bloom-Richardson. La técnica hace una evaluación semicuantitativa de tres características morfológicas: el porcentaje de formación de túbulos, anisocariosis (la variación del tamaño y la forma del núcleo entre las células) y un recuento mitótico (divisiones celulares) preciso utilizando un área de campo definida, para cuantificar, este método se utiliza un sistema de puntuación

numérico en donde la calificación final se determina sumando las puntuaciones individuales de las tres variables para obtener el grado (G1,G2 o G3), el cual refleja el potencial de agresividad del cáncer de mama (Elston y Ellis, 1991).

1.10 RNAs largos no codificantes

Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) son transcritos en su mayoría por la RNA polimerasa tipo II (RNA Pol II), tienen un tamaño mayor a 200 nucleótidos y hasta la fecha no hay evidencia de que se traduzcan a proteínas, ya que no cuentan con marco abierto de lectura, algunos de estos poseen un cap de 7-metilguanosina (m7G) en el extremo 5' y una cola poliadenilada (poli A) en el extremo 3', pueden estabilizarse mediante el procesamiento de los extremos 3' por una endoribonucleasa como la RNasa P o mediante la formación de un cap en el extremos 5' por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snoRNP) (Yin *et al.*, 2012; Wu, Yang y Chen, 2017; Statello *et al.*, 2020).

1.11 Clasificación de RNAs largos no codificantes

Basándose en su posición genómica, los RNAs largos no codificantes pueden clasificarse en: 1) Sentido; se transcriben de la misma cadena y en la misma dirección que los genes que codifican para proteínas y pueden tener varios exones e intrones, 2) Antisentido; se transcriben de la cadena opuesta y pueden presentar numerosos intrones y exones, 3) Intrónico; se transcriben exclusivamente de intrones de genes que codifican proteínas y se caracterizan porque no tener secuencias exónicas, 4) Intergénicos; se transcriben entre dos genes que codifican para proteínas, 5) Bidireccionales; pueden estar asociados a los promotores o a potenciadores (enhancer) y ambos se transcriben dentro de 1 kb de esta región (Figura 7) (Hermans-Beijnsberger *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020).

Clasificación de lncRNAs

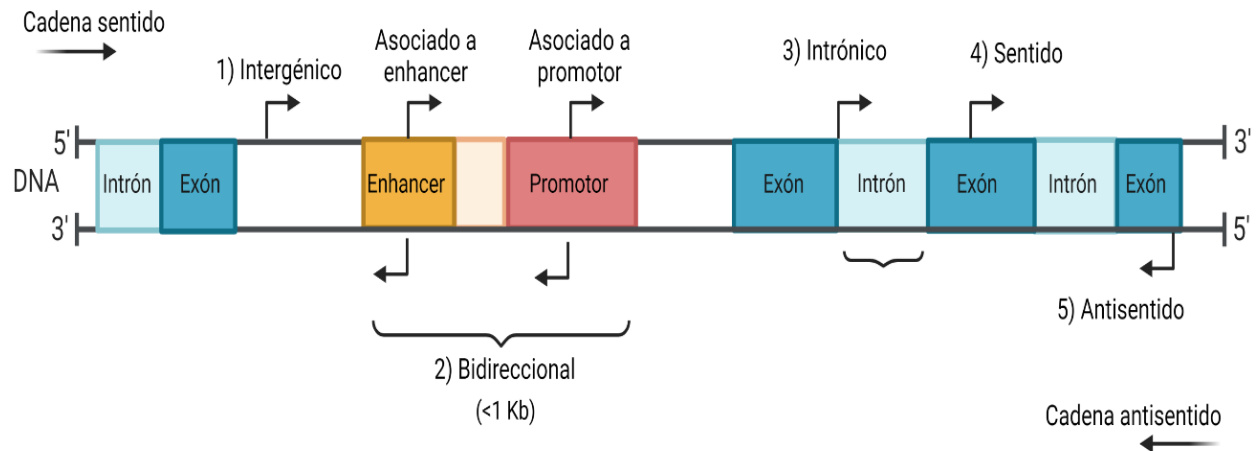


Figura 7. Clasificación de RNAs largos no codificantes conforme a la posición genómica donde se transcriben. 1) lncRNAs intergénicos, 2) lncRNAs Bidireccionales; pueden estar asociados a enhancer o promotores, 3) lncRNAs intrónicos, 4) lncRNAs sentido, 5) lncRNAs antisentido. Modificada en BioRender de Yang et al., 2020.

1.12 Función de los RNAs largos no codificantes en la célula

Los lncRNAs son importantes reguladores en la función celular, se sabe que varios lncRNAs desempeñan funciones centrales en procesos biológicos fundamentales ya que cuentan con dominios que son capaces de interaccionar con proteínas, RNA y DNA, lo que los convierte en reguladores muy versátiles dentro de la célula, por lo tanto, pueden regular procesos celulares a diferentes niveles (Figura 8).

Arquitectura cromosómica. El lncRNA Xist puede unirse al cromosoma X inactivo (Xi) para su posterior reclutamiento hacia la periferia del núcleo donde Xist puede asociarse con el receptor de laminina B para silenciar la transcripción (Chen et al., 2016).

Interacciones inter e intracromosómicas. El lncRNA Firre se transcribe del cromosoma X y posee motivos repetidos para la unión a proteínas hnRNP (pueden unirse a RNA y DNA) que están unidas a otros cromosomas permitiendo las interacciones entre cromosomas diferentes (Hacisuleyman et al., 2014). Por otro lado, existen lncRNAs que intervienen la formación de loops de cromatina dentro de

un cromosoma para acercar a un enhancer y promotor, un ejemplo de esto es CCAT1-L el cual puede interactuar con CTCF para formar loops enhancer-promotor en el locus de MYC (Xiang *et al.*, 2014).

Reclutamiento y secuestro de modificadores de la cromatina. Se ha visto que Xist puede reclutar a componentes del complejo represor Polycomb 2 (PRC2) para la trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3) en todo el cromosoma y dar lugar a cromatina reprimida; otro ejemplo es el lncRNA HOTAIR, el cual puede reclutar a PRC2 al locus de HOXD para inhibir su transcripción, por otro lado, el lncRNA Mhrt secuestra a Brg1 que forma parte del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF (Zhao *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2014).

A nivel transcripcional. Algunos lncRNAs antisentido pueden formar una estructura R-loop de tres cadenas compuesta por un híbrido DNA-RNA y DNA monocatenario, un ejemplo de esto es el lncRNA KHPS1 que al transcribirse de la cadena antisentido forma un R-loop que interactúa con la acetiltransferasa de histona p300/CBP mejorando la accesibilidad a la cromatina y facilita la unión de E2F2 para mejorar la expresión de SPHK1 (Postepska-Igielska *et al.*, 2015).

Cuerpos nucleares o paraspeckles. Son estructuras formadas por RNA y proteínas, no poseen membrana, pueden moverse en el núcleo y se ha visto que los lncRNAs son esenciales para su ensamblaje y función. Un ejemplo de esto es el lncRNA NEAT1 el cual forma cuerpos nucleares esféricos reclutando proteínas como NONO, SFPQ, FUS y RBM14, generalmente la región media de este lncRNA se localiza hacia el centro del paraspeckle y la región 5' y 3' se disponen hacia la periferia; se ha visto que en condiciones de estrés esta estructura esférica puede reprimir la transcripción secuestrando a SFPQ e impidiendo su unión a promotores de genes relacionados con la inmunidad. Este cuerpo nuclear formado por NEAT1 puede interactuar con el heterodímero NONO–PSF para optimizar el procesamiento de los pri-miRNAs por el complejo Drosha–DGCR8 (Hirose *et al.*, 2014; West *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017).

Regulación en citoplasma. Los lncRNAs exportados al citoplasma pueden regular la estabilidad de los RNAm, traducción e interferir con las modificaciones

postraduccionales (PTMs). Los lncRNAs poseen sitios complementarios para la unión de microRNAs y pueden regular la expresión como RNA endógenos competitivos o esponjas de miRNAs, esto disminuye la disponibilidad de los miRNAs para que se unan a sus RNAs blanco, por ejemplo, el lncRNA Cyrano secuestra a miR-7 para evitar su unión al RNA circular Cdr1as, esto conduce a una degradación más efectiva de miR-7 lo que da como resultado un bajo nivel de este miRNA y una acumulación de Cdr1as, conocido por ser un importante regulador neuronal (Kleaveland *et al.*, 2018); otro ejemplo, es el lncRNA PNUTS que secuestra a miR-205 evitando que se una a sus RNAm blancos ZEB1 y ZEB2, esto causa un aumento en el nivel de estas proteínas, fomenta la transición epitelio mesenquimal y promueve la migración e invasión de células de cáncer de mama (Grelet *et al.*, 2017). Los lncRNAs también pueden secuestrar proteínas de unión a RNA que están implicadas en la degradación del RNAm, por ejemplo, el lncRNA NORAD que secuestra a PUMILIO 1 y 2 (PUM1/2) lo que evita que estos se unan a las 3'UTRs de los RNAm para su posterior degradación (Lee *et al.*, 2016). Los lncRNAs pueden inhibir traducción de un RNAm, por ejemplo, lincRNA-p21 puede inhibir la traducción del RNAm de JUNB y CTNNB1 mediante el emparejamiento de bases y reclutando al represor transcripcional RCK (Lee *et al.*, 2016). También existen lncRNAs que pueden regular las PTMs, por ejemplo, el lnc-DC puede unirse al activador transcripcional STAT3 y promover su fosforilación, un ejemplo contrario es el lncRNA NKILA que interactúa con IKB interfiriendo su fosforilación lo que ocasiona activación de NF- κ B y la supresión de la metástasis del cáncer de mama (Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015).

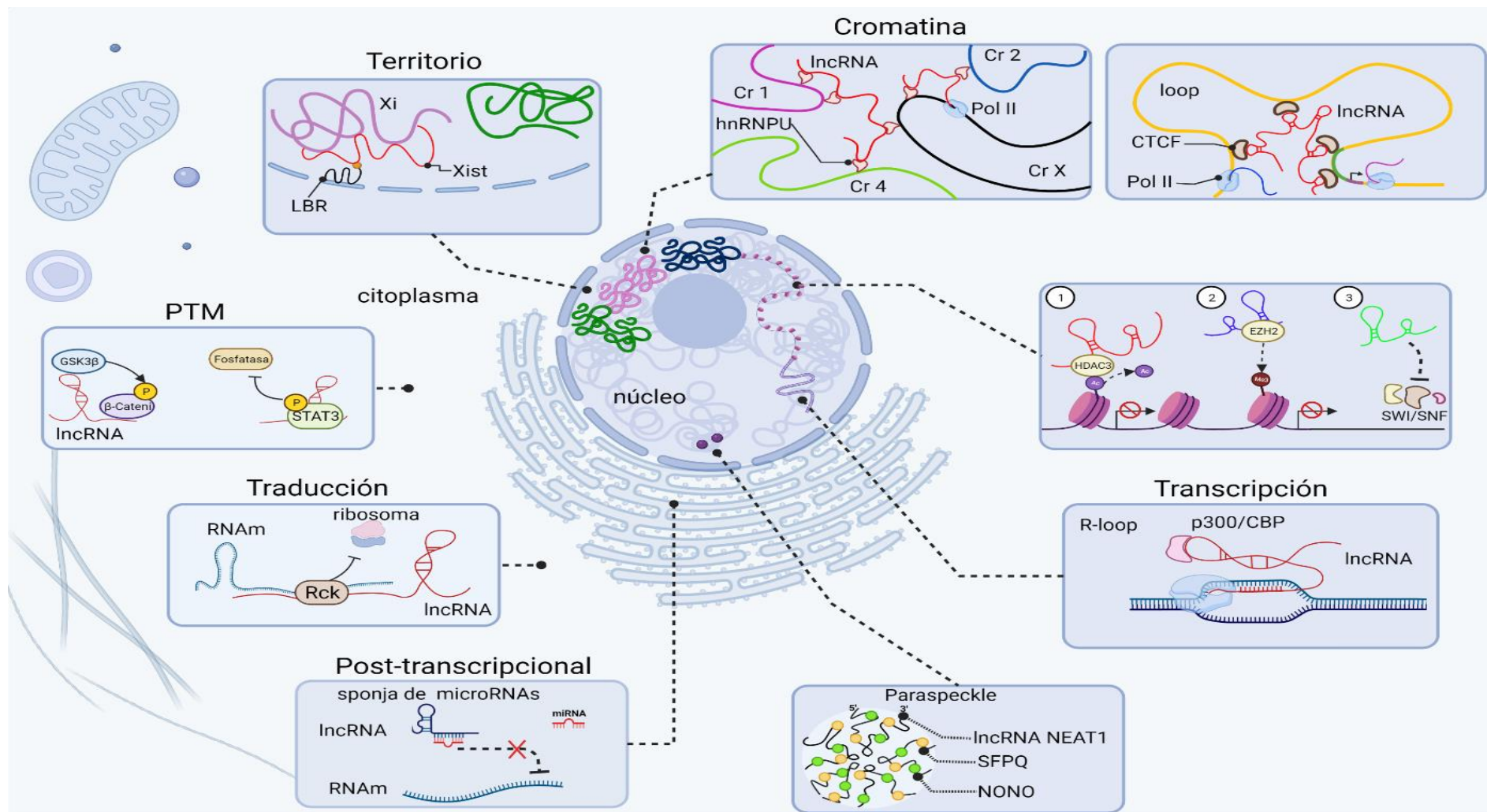


Figura 8. Función de los RNAs largos no codificantes en la célula. Ejemplos de cómo los lncRNA regulan la organización y la transcripción de la cromatina en el núcleo, modulan la estabilidad, la traducción y la modificación postraduccional en el citoplasma. Imagen creada con BioRender.

1.13 Mecanismos de vascularización en cáncer

El sistema circulatorio es fundamental para un suministro constante de nutrientes, oxígeno, eliminación de desechos y mantenimiento de la homeostasis en tejidos, en cáncer, la formación de vasos sanguíneos hacia los tumores puede inducirse a través de diferentes procesos celulares (Figura 9).

Angiogénesis intususceptiva. Es un proceso de angiogénesis *de novo* poco estudiado que consiste en formación de pilares de tejido en el lumen de un vaso existente, a este pilar se le unen pericitos para dar lugar a dos nuevos vasos, este mecanismo es inducido por VEGF, PDGF y eritropoyetina (Lugano, Ramachandran y Dimberg, 2020) (Figura 9a).

Angiogénesis. En este proceso las células endoteliales y los pericitos comienzan a proliferar y migrar para dar lugar a la formación de un vaso inmaduro que se origina a partir de uno preexistente. Este mecanismo es inducido por factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Hanahan y Folkman, 1996; Stanca Melincovici *et al.*, 2018) (Figura 9b).

Vasculogénesis. Este mecanismo de vascularización se caracteriza por que los tumores secretan citocinas CCL2, CCL5 y CXCL12 para reclutar células madre provenientes de la médula ósea o también llamadas células progenitoras endoteliales (EPC), posteriormente estas células diferencian en células endoteliales para participar en la formación y reparación de vasos para contribuir al crecimiento del tumoral (Spring *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2010) (Figura 9c).

Cooptación de vasos. En este mecanismo no se generan nuevos vasos sanguíneos ya que las células tumorales migran y se asocian a lo largo de los vasos preexistentes secuestrándolos para alimentar al tumor, este mecanismo se suele presentar en órganos altamente vascularizados como cerebro, pulmón e hígado (Donnem *et al.*, 2013) (Figura 9d).

Transdiferenciación de células tumorales o mimetismo vasculogénico tubular. El término mimetismo vascular fue propuesto por primera vez en 1999 por Maniotis y colaboradores en melanoma uveal, a la fecha se han descrito dos tipos de mimetismo vasculogénico (MV), el tubular y el tipo matriz, en el caso del mimetismo vascular tubular las células madre cancerosas entran en un proceso de transdiferenciación para dar origen a células tumorales con características endoteliales o que imitan al endotelio y pericitos, se puede saber que un tipo celular es de origen neoplásico gracias a que albergan mutaciones somáticas similares a las de las células malignas (Wang *et al.*, 2010) (Figura 9e).

Mimetismo vasculogénico. En este modelo las células tumorales pueden crear estructuras similares a vasos sanguíneos que pueden transportar fluidos, se caracteriza por no depender de células endoteliales para su formación, poseen una matriz rica en glicoproteínas, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparina, colágeno IV y VI y estas estructuras tipo canal están formadas por células tumorales, el MV puede ser diagnosticado mediante inmunohistoquímica por una doble tinción, positiva para PAS y negativa para CD31 (Zhang *et al.*, 2019) (Figura 9f).

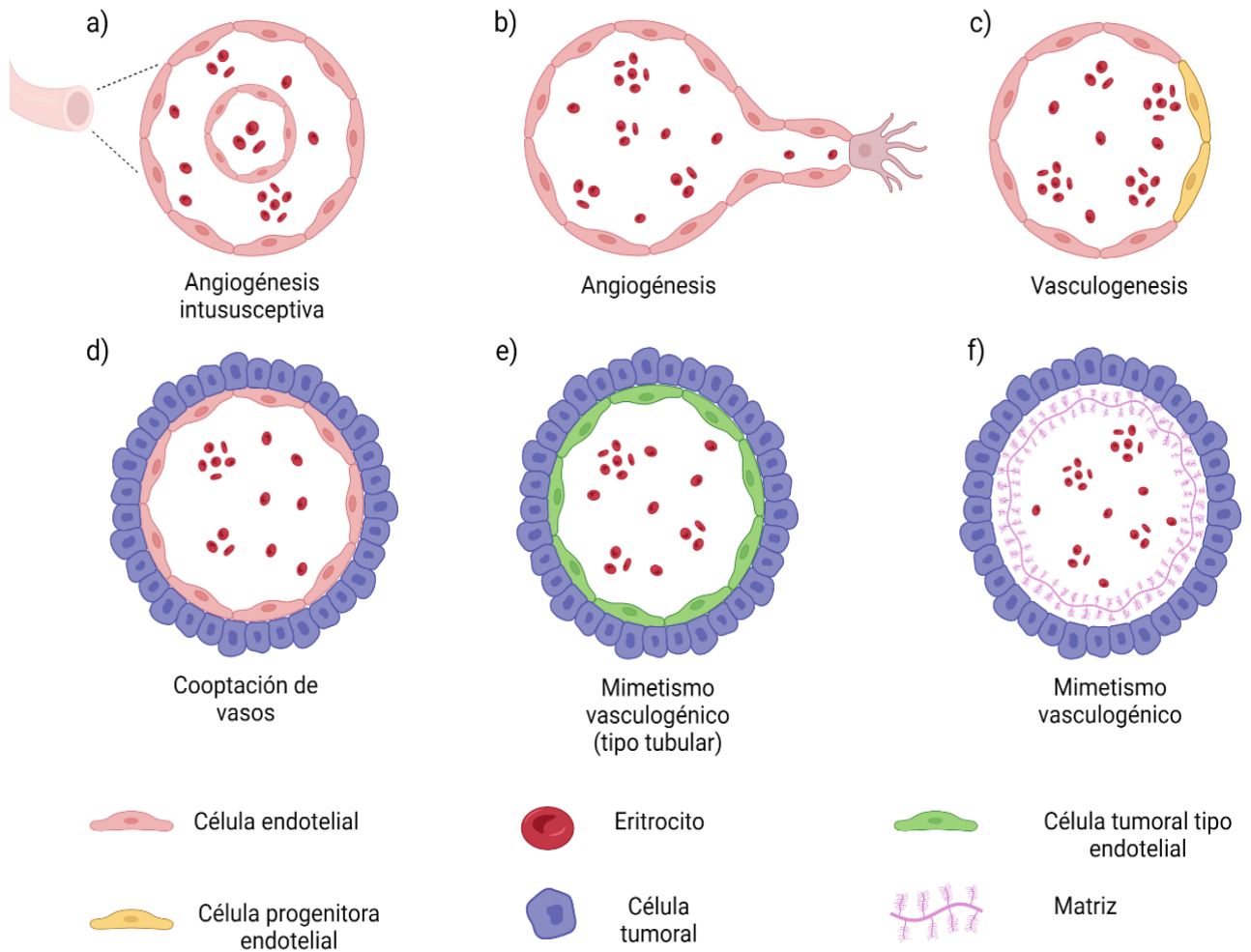


Figura 9. Tipos de vasculatura tumoral. a) Angiogénesis intususceptiva, formación de un vaso en el lumen de uno preexistente. b) Angiogénesis, formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. c) Vasculogénesis, células endoteliales progenitoras (EPC) participan en la formación de vasos sanguíneos hacia el tumor. d) Cooptación de vasos, las células tumorales secuestran la vasculatura existente. e-f) Mimetismo vasculogénico tipo tubular formado por células tumorales con características endoteliales y matriz extracelular cubierta por células tumorales. Modificada de Luo et al., 2020 en BioRender.com.

1.14 Mecanismos en la formación de mimetismo vasculogénico en tumores

Los modos alternativos de microcirculación tumoral poseen mecanismos y condiciones complejas para su formación, por ejemplo:

Transición epitelio mesenquimal. Es un proceso mediante el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimatoso, esta transición involucra una

disminución en la expresión de moléculas de adhesión celular como E-cadherina, también se caracteriza por el recambio de citoesqueleto de citoqueratina por uno a base de vimentina, entre los factores de transcripción asociados a este proceso destacan ZEB1, ZEB2, Twist, Snail, por otro lado, entre las vías de señalización relacionadas con este proceso destacan la vía Wnt, factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y Notch (Luo *et al.*, 2020).

1.14.1 Microambiente tumoral

Las células madre cancerosas tienen propiedades de autorrenovación y capacidad de diferenciarse en una variedad heterogénea de células tumorales, por ejemplo, células tumorales con características similares a las endoteliales para promover la microcirculación aberrante, este tipo de células expresan marcadores como CD133, aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), USP44, IL6 e IL8, también se ha visto que algunas de estas células pueden secretar factores IGFBP 1/2/3, MCP1, IL8, EGF y VEGF, para estimular crecimiento y renovación de células madre cancerosas a su alrededor y promover el proceso de mimetismo vasculogénico (Yao, Ping y Bian, 2011; Sun *et al.*, 2017; Biondani *et al.*, 2018).

Macrófagos asociados a tumores. Los macrófagos son células especializadas en eliminar microbios y desechos naturales, presentan antígenos al sistema inmunitario adaptativo y libera citocinas inmunomoduladoras, por un lado, están los macrófagos M1 que poseen un fenotipo proinflamatorio y se asocian con la destrucción de microorganismos, por otro lado, se encuentran los macrófagos M2 que se asocian a la supresión inmunitaria, la remodelación de tejidos y angiogénesis. Los macrófagos pueden promover la formación de tumores, crecimiento, invasión, migración y la formación de mimetismo vasculogénico a través de las vías PGE2/EP1/PKC y secreción de factores como VEGFA, VEGFC, VEGFD, EGF, FGF2, quimiocinas (CXCL8, CXCL12, TNF α y MCP-1), semaforina 4D, adrenomedulina y timidina fosforilasa y pueden secretar metaloproteinasas (MMP-1, 2, 3, 9 y 12) para degradar la matriz extracelular (Giraudó *et al.*, 2004; Mantovani y Sica, 2010; Špirić *et al.*, 2015; Rong *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2017).

Fibroblastos asociados a tumores. Se caracterizan por la expresión de proteínas activadas por fibroblastos (FAP), α -SMA, pueden promover la formación de MV al secretar TGF- β , SDF1 y mediante la expresión de VE-cadherina, MMP-2 y laminina 5 γ 2 y puede regular este tipo de vascularización mediante la señalización de EphA2-PI3K (Hutchenreuther *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

Hipoxia. El microambiente hipóxico es muy común en tumores gracias a que consumen una gran cantidad de nutrientes y oxígeno para su crecimiento y proliferación descontrolada. Se considera que la hipoxia es uno de los factores más importantes en el desarrollo del mimetismo vasculogénico ya que los factores de transcripción estables en condiciones hipóxicas (HIFs) como HIF-1 pueden regular la expresión de genes que poseen elementos sensibles a hipoxia (HREs) como VEGF-A, VEGFR-1, EphA2, Twist, Nodal, COX-2 e indirectamente el cambio de expresión de VE-cadherina por vimentina para la remodelación del citoesqueleto (Gustafsson *et al.*, 2005; Quail *et al.*, 2011; Seftor *et al.*, 2012; Rong *et al.*, 2016).

1.15 Proteínas clave y vías de señalización relacionadas con mimetismo vasculogénico

EphA2. Es un receptor de tirosina cinasa transmembranal miembro de la superfamilia de receptores de tirosina cinasa que se expresan en tumores altamente agresivos, su inhibición se asocia a la disminución del número de estructuras tipo canal y la alta expresión contribuye al crecimiento tumoral y la formación del mimetismo vasculogénico. Por otro lado, la vía EphA2/VE-cadherina/AKT aumenta los niveles de expresión de VE-cadherina, metaloproteinasa 2 (MMP-2) y laminina subunidad 5 y 2 (LAMC2) e induce la invasión tumoral y la formación de MV (Maniotis *et al.*, 1999a; R. Liu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016).

FAK. Es una tirosina cinasa citoplasmática que participa en la vía AKT e interacciona con PI3K, cuando es fosforilada por CEACAM6 puede promover la angiogénesis y el desarrollo de mimetismo vasculogénico, puede ser desfosforilada por EphA2 y contribuir a la remodelación de la matriz en MV. La eliminación de FAK puede tener

como consecuencia el daño al citoesqueleto y la formación de microfilamentos necesarios para la formación de MV asimismo a través del eje EphA2/FAK/Paxillin puede promover la formación de MV (Seftor *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2013; Delgado-Bellido *et al.*, 2017).

VE-cadherina. Es una proteína transmembranal dependiente de calcio que regula la adhesión célula-célula en células endoteliales, comúnmente se encuentra con altos niveles de expresión en células tumorales altamente agresivas, aun no se conoce del todo el motivo de expresión de VE-cadherina en células no endoteliales, pero hay evidencia que sugiere que el factor de transcripción Twist1 puede unirse a su promotor y promover su expresión. Por otro lado, la expresión de VE-cadherina se ha relacionado con la activación de la vía Nodal/Notch y de factores inducibles por hipoxia, además, se ha demostrado que puede participar en la formación de MV y su eliminación inhibe la formación de estas estructuras tipo canal (Topczewska *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012; Breier *et al.*, 2014; Delgado-Bellido *et al.*, 2017).

TGF- β . Participa en el crecimiento celular, apoptosis, motilidad e invasión celular, puede mejorar la transdiferenciación células madre de cáncer e inducir la polarización de células natural killer (NK) y puede hacer que estas secreten VEGF y PlGF, además, la relación entre Endoglin (ENG) y TGF- β puede promover la neoangiogénesis y el MV (Keskin *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013)

Twist1/2. Son factores transcripcionales que promueven la transición epitelio mesenquima, angiogénesis y la formación de MV, promoviendo la transcripción de VE-cadherina y MMPs, por ejemplo, la vía Twist-1/VE-cadherina regulada por HMGA2 promueve la expresión de MMP-2 e induce el MV (Sun *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2019).

COX-2. La ciclooxigenasa-2 cataliza la reacción que convierte el ácido araquidónico en prostaglandina E2 (PGE2). Esta molécula se une a los receptores de prostanoideos (EP1-4) que activan las vías de señalización de la proteína cinasa C (PKC) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Ambas vías conducen a una disminución de la apoptosis y a un aumento de la proliferación,

invasión, angiogénesis tumoral, y MV. Además, el eje COX-2/PEG2/EP3 regula la expresión de MMP-2 para formar estructuras vasculares (Maniotis *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2006; Kirschmann *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2015).

Metaloproteinasas de la matriz (MMPs). La expresión metaloproteasas de matriz puede darse por células tumorales o por las células estromales circundantes, las cuales contribuyen a la remodelación de la matriz extracelular, transición epitelio mesénquima y participan en la liberación de factores de crecimiento unidos a la membrana y matriz que promueven la progresión tumoral, la metástasis y la angiogénesis asociada al tumor, las metaloproteasas que intervienen en el desarrollo del MV son MMP-1, 2, 9 y 13 (Lin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

PI3K. Participa en transmisión de señales desde la superficie celular hacia el citoplasma, participa en el desarrollo del mimetismo vasculogénico al regular la actividad de MMP-14 y MMP-2, lo que a su vez promueve el corte de la cadena de laminina 5 γ 2 en los fragmentos γ 2' e γ 2, participa en la vía AKT regulando los niveles y la actividad de MMP-9 y contribuyendo a la remodelación de la matriz extracelular (Maniotis *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2003; Chiablaem *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

Notch. Es un receptor transmembranal que consta de cuatro isoformas diferentes (Notch1-4) y cinco posibles ligandos unidos a la membrana, Delta 1,3,4 y Jagged 1,2, son esenciales durante el desarrollo embrionario, el dominio intracelular Notch se libera en el citoplasma y se importa al núcleo donde regula la expresión génica de Nodal, además, esta vía de señalización está involucrada en desarrollo de redes vasculares en etapas embrionarias, MV en cáncer y transición epitelio mesénquima (Vartanian *et al.*, 2012; Jue *et al.*, 2017).

Nodal. Es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), participa en el desarrollo embrionario, regula la plasticidad de las células tumorales, el fenotipo transendotelial y la formación de MV al unirse a las proteínas Cripto-1, ALK 4/5/7 y ACTR-IIB para fosforilar SMAD 2/3 y que este puede translocarse al núcleo donde regula expresión génica (Strizzi *et al.*, 2009; Khalkhali-Ellis *et al.*, 2015).

Wnt. La familia de proteínas Wingless (Wnt) están involucradas en el desarrollo embrionario, migración, proliferación y diferenciación celular, también participan en la diferenciación de células endoteliales, en el desarrollo vascular y angiogénesis. Además, la vía Wnt induce transición epitelio mesénquima al inhibir la actividad de fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β) lo que impide la posterior fosforilación y degradación de la β -catenina, lo que ocasiona que ésta se acumule en el citoplasma y posteriormente sea translocada al núcleo para la activación de factores de transcripción como TCF/LEF. También se ha reportado que esta vía puede regular el mimetismo vasculogénico *in vitro* en líneas celulares de cáncer a través de eje Wnt5a/ PKC α / PI3K. Por otro lado, el ligando Wnt3 puede promover la formación de estructuras similares a tubos y aumentar los niveles de las proteínas VEGFR-2 y VE-cadherina involucradas en el proceso de MV (Reis y Liebner, 2013; Qi *et al.*, 2014; Delgado-Bellido *et al.*, 2017).

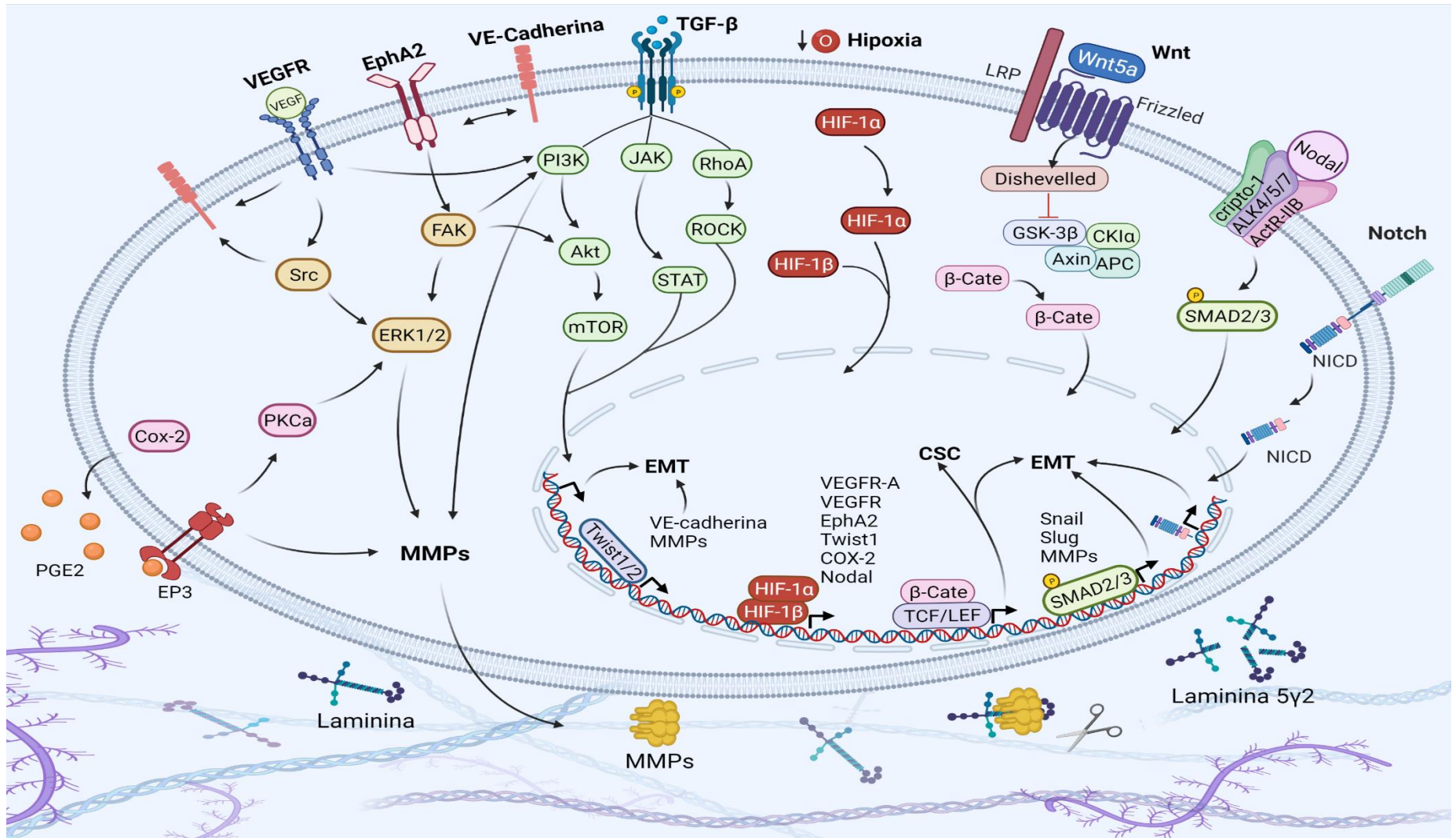


Figura 10. Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del mimetismo vasculogénico. MMPs; metaloproteinasas, EMT; transición epitelio mesenquimal. Modifica de Zhang et al., 2019 en BioRender.com.

2 ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 *Metástasis y mimetismo vasculogénico en cáncer de mama*

El mimetismo vasculogénico se ha descrito en varios tipos de tumores agresivos, en mama, la primera vez que se describió un proceso de vascularización que formaba estructuras tipo tubulares que no dependía de la angiogénesis fue en un modelo de xenoinjerto utilizando células procedentes de cáncer de mama inflamatorio. Dichos tumores se caracterizaron por hacer metástasis hacia el pulmón, y el estudio histológico del tumor original y xenoinjerto revelaron regiones con estructuras muy vascularizadas con ausencia de células endoteliales y una marcada permeación linfática en la dermis suprayacente (Shirakawa *et al.*, 2001).

Existe evidencia que indica que el mimetismo vasculogénico puede favorecer la metástasis, por ejemplo, en un estudio de 1238 pacientes de cáncer de mama se detectó que el 24 % era positivo para MV, esto se asoció con un mayor tamaño del tumor (>2 cm), metástasis a ganglios linfáticos, grado 2-3 y una supervivencia menor que aquellos pacientes sin MV. En otro estudio de 120 muestras con carcinoma ductal invasivo, se detectó MV el 13.3 % de los tumores, esto se asoció con metástasis hacia los ganglios linfáticos de la axila, un tamaño del tumor ≥ 3 cm, un estadio tres en grado histológico y un mal pronóstico. Estos estudios corroboran que el mimetismo vasculogénico se asocia con los tumores de mama más agresivos (Shen *et al.*, 2017a; Jafarian *et al.*, 2019).

Otro estudio indica que la heterogeneidad en los tumores de cáncer de mama está asociada con la activación del mimetismo vasculogénico y la metástasis a través de la expresión de los factores anticoagulantes Serpine2 y Slpi, ya que estos podrían promover el paso de eritrocitos al tumor y la salida de las células tumorales al torrente sanguíneo. Además, los tumores de mama altamente invasivos presentan una alta expresión de las metaloproteinasas MMP2 y MMP9 las cuales son piezas clave en la remodelación de la matriz extracelular y la formación de MV (T. J. Liu *et al.*, 2012; Wagenblast *et al.*, 2015).

2.2 *LncRNAs asociados a metástasis en cáncer de mama*

Los RNAs largos no codificantes están estrechamente relacionados con la aparición y el desarrollo de varios tipos de cáncer, entre ellos el de mama, su expresión aberrante puede activar o inhibir vías de señalización específicas para promover los procesos celulares que intervienen en la invasión y metástasis, por ejemplo:

2.3 *LncRNAs asociados con la transición epitelio mesenquimal e invasión*

La invasión y la EMT son los primeros pasos para que se lleve a cabo la metástasis ya que se activan reguladores maestros como SNAI1, TWIST1 y ZEB1 que confieren rasgos mesenquimales que permiten la invasión, intravasación y diseminación a sitios distantes de las células tumorales (Liu *et al.*, 2021). Existen lncRNAs con funciones en la invasión y EMT que están respaldados por experimentos *in vivo*, por ejemplo, H19 actúa como esponja para miR-200b a/c y let-7b regulando los niveles de GIT2, CYTH3 y los cambios reversibles entre los estados epitelial y mesenquimatoso, esto favorece la invasión y metástasis del tumor primario de mama hacia el pulmón, riñón e hígado, lo que sugiere que H19 es importante para el éxito de la metástasis (Zhou *et al.*, 2017). Otro ejemplo, es el lncRNA-PNUTS que puede inducir la EMT aumentando la expresión de ZEB1/ZEB2 y vimentina (Grelet *et al.*, 2017).

2.4 *LncRNAs en la colonización metastásica de cáncer de mama*

Las células malignas que se desprenden del tumor primario a través de transformaciones mesenquimales entran al torrente sanguíneo (intravasación), superan la anoikis durante su circulación, se extravasan en un sitio distal y colonizan. Se sabe muy poco sobre el papel de los lncRNA en los primeros tres procesos celulares *in vivo*, se han descrito algunos lncRNA que promueven ciertas características en células metastásicas para colonizar y adaptarse en sitios distantes. MALAT1 juega un papel en colonización metastásica ya que puede regular el crecimiento tumoral acompañado de una diferenciación significativa a tumores quísticos y una reducción en la metástasis E-cadherina (apoyando un fenotipo epitelial), además, la ambición de MALAT modifica la expresión génica y

cambios en los patrones de corte y empalme de los genes implicados en la diferenciación y las vías de señalización protumorigénicas, con esto se favorece la adhesión celular y pérdida de migración (Arun *et al.*, 2016). Otro ejemplo, es el lncRNA HOTAIR que presenta altos niveles de expresión en células MDA-MB-231, estas células inyectadas en la vena de la cola de ratones dan como resultado una colonización pulmonar, además, se observó que este tipo celular *in vivo* exhibe una colonización y expansión metastásica persistente (Gupta *et al.*, 2010).

2.5 Papel de los lncRNAs en el mimetismo vasculogénico de cáncer de mama

El lncRNA TP73-AS1 induce la invasión y migración de células de cáncer de mama y se ha visto que también participa en el desarrollo del mimetismo vasculogénico actuando como esponja para miR-490-3p, esto ocasiona una disminución de la unión de este miRNA a su blanco TWIST1, que participa en la EMT y la formación de MV (Tao *et al.*, 2018). Otro ejemplo, es el lncRNA HOTAIR que puede regular la migración y el mimetismo vasculogénico inducido por hipoxia células de cáncer de mama triple negativo mediante el eje miR-204/FAK (Lozano-Romero *et al.*, 2020).

3 HIPÓTESIS

Los lncRNAs promueven el mimetismo vasculogénico e inducen la metástasis, por lo tanto, se presentará una expresión diferencial entre biopsias de cáncer de mama metastásicas y no metastásicas, el número de estructuras tipo canal en muestras metastásicas será mayor en comparación con las no metastásicas.

4 JUSTIFICACIÓN

- Existe poca información sobre las funciones biológicas de los lncRNAs expresados diferencialmente en la metástasis y mimetismo vasculogénico en cáncer de mama de la población mexicana.
- El estudio permitirá contribuir al entendimiento del papel que juegan los lncRNAs en el desarrollo del MV y con ello poder proponer posibles blancos terapéuticos y potenciales biomarcadores en cáncer de mama.

1. OBJETIVOS

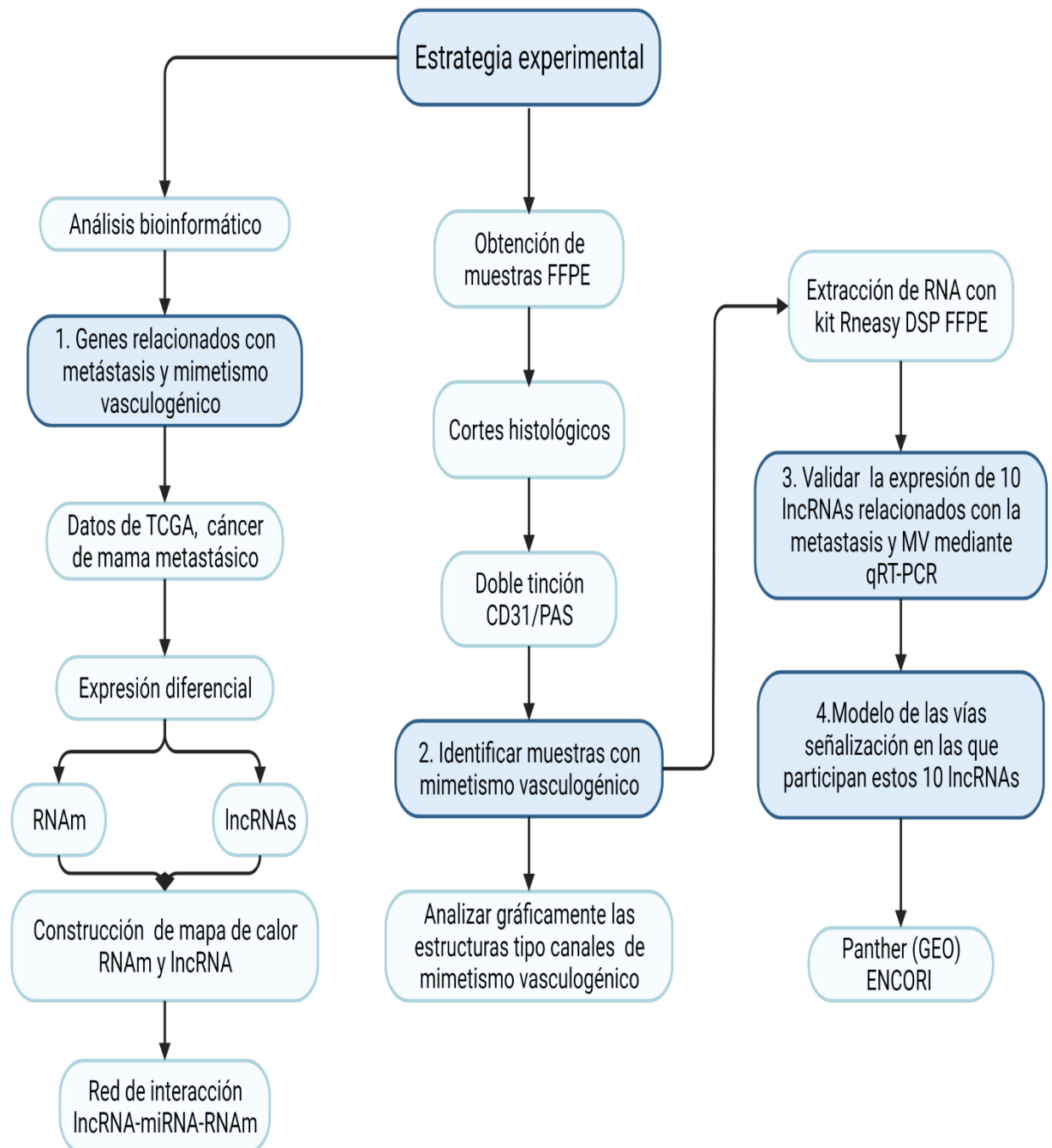
1. *Objetivo general*

Identificar RNAs largos no codificantes expresados diferencialmente en biopsias de tumores mamarios metastásicos y no metastásicos que presenten mimetismo vasculogénico.

4.1 *Objetivos particulares*

1. Analizar *in silico* redes de correlación de lncRNAs y RNAm en datos públicos de pacientes de cáncer de mama metastásico y no metastásico que potencialmente regulen el mimetismo vasculogénico y metástasis.
2. Identificar el mimetismo vasculogénico en biopsias de cáncer de mama metastásicas y no metastásicas de pacientes mexicanas.
3. Validar la expresión de 10 lncRNAs modulados en las muestras tumorales que presentan mimetismo vasculogénico con metástasis y sin metástasis.
4. Identificar las rutas de señalización potencialmente moduladas por el conjunto de lncRNAs desregulados asociadas a metástasis y mimetismo vasculogénico.

5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia de búsqueda pubMed

Para la búsqueda de genes relacionados con la metástasis y mimetismo vasculogénico se utilizaron las palabras clave: breast cancer, metástasis, vasculogenic mimicry, lncRNAs, xenografts, mouse, tumor, tissue, y se utilizaron los operadores de búsqueda “AND” “OR” para combinar los términos de búsqueda, también se utilizó el *(asterisco) para que en la búsqueda se incluyeran todas las posibles variaciones de las palabras clave, incluyendo el plural, se consideraron solamente artículos experimentales, posteriormente se revisó cada uno de los artículos para corroborar que haya sido validada la expresión del gen o lncRNA en tumores o en un modelo de xenoinjerto.

6.2 Análisis de enriquecimiento GO

Para la clasificación y asignación de las funciones génicas de los conjuntos de genes que se recopilaron de la literatura se usó ShinyGO v0.75: Gene Ontology Enrichment Analysis, esta herramienta se alimenta de 72 394 conjuntos de genes para humanos, incluye conjunto GO, coexpresión, genes específicos de tejido, factores de transcripción (TF), genes blanco de microRNAs y bases de datos de vías. Esta herramienta se basa en términos, donde a cada término GO se le asigna un identificador único numérico (GO:xxx), y un nombre asociado, posteriormente cada término es incluido dentro de una de las tres ontologías: funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos. Se recopilaron aquellos términos biológicos que estén relacionados con nuestro grupo de genes y se estableció un filtrado con p-value <0.05, ya que el término biológico se pone en valor a partir de una medida estadística, el p-value indica la importancia de un término biológico con respecto al conjunto de genes analizado, si el resultado es positivo (próximo a 0), o se trata de un resultado más relacionado con el azar (valor más alejado de 0). Hay que señalar que FDR se calcula en base al valor nominal de P de la prueba hipergeométrica, y nos indica qué tan probable es el enriquecimiento por casualidad. El Fold Enrichment se define como el porcentaje de genes en lista

que se ingresa que pertenecen a una vía, dividido por el porcentaje correspondiente en el ruido de fondo. Dicho de otro modo, Fold Enrichment indica cuán drásticamente los genes de una determinada vía están sobrerrepresentados (Ge et al., 2020).

6.3 Conjunto de datos y construcción de mapas de calor

Para el análisis de expresión génica se utilizó el conjunto de datos de 1084 muestras de carcinoma invasivo TCGA, PanCancer Atlas disponible en la base de datos cBioportal. Para tener un panorama general de cómo se expresan y se agrupan estos genes, se utilizó el algoritmo Hierarchical Clustering junto con la medida de distancia euclidiana y el método general de variación mínima Ward. Para la construcción del mapa de calor se utilizó la herramienta Interactive CHM Builder.

6.4 Material biológico.

Un total de 10 muestras de tumores fijadas en paraformaldehído (PFA) y embebidas en parafina con diagnóstico de cáncer de mama, de las cuales tres de ellas eran metastásicas y siete no metastásicas, fueron proporcionadas por el hospital regional de alta especialidad de Ixtapaluca previo consentimiento firmado por las pacientes y cada muestra cuenta con historial clínico completo, como control de vasculatura endotelial se utilizó tejido de amígdala. Este proyecto fue aprobado por el comité de ética e investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad Ixtapaluca (NR-16-2020).

6.5 Cortes histológicos

Con un microtomo spencer de rotación manual se obtuvieron tres cortes de cada una de las muestras con un grosor de 4 micras y se montaron en laminillas cargadas con poli-L-lisina, para su posterior tinción inmunohistoquímica, para la extracción de RNA se realizaron 4 cortes de 5 micras hasta obtener un total de 20, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -20 °C.

6.6 Extracción de RNA total de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE)

La extracción se realizó con el kit RNeasy FFPE de QIAGEN siguiendo las recomendaciones del fabricante, se cuantificó la cantidad y calidad de RNA con un Bioanalizador Agilent, posteriormente se hizo una electroforesis para verificar la integridad del RNA obtenido, se cargaron 500 ng de cada muestra en un gel de agarosa al 1.5 % y se utilizaron tres muestras de RNA provenientes de líneas celulares para comparar, se dejó correr durante 30 min en buffer TBE. Posteriormente el gel se observó con un transiluminador.

6.7 Síntesis de cDNA

Se obtuvo cDNA mediante RT-PCR a partir del 500 ng RNA siguiendo las recomendaciones del protocolo SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™), se combinaron los reactivos conforme la figura 11 en microtubos de PCR, el cDNA obtenido de la reacción de síntesis se diluyó con agua libre de nucleasas hasta una concentración de 5 ng/μL y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

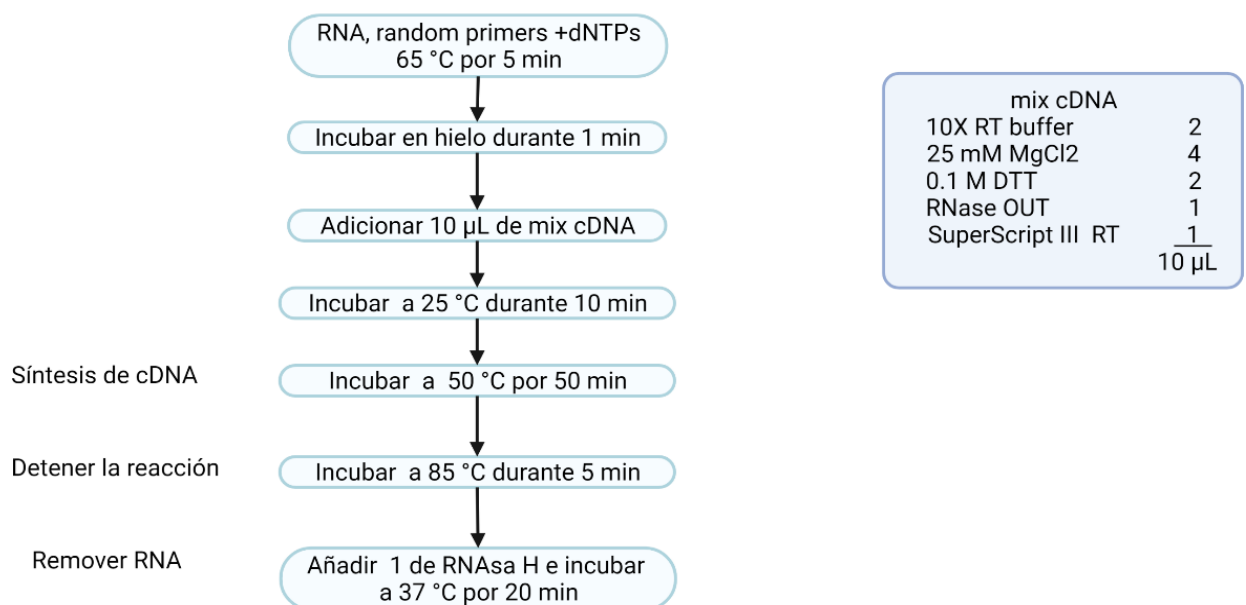


Figura 11. Condiciones y componentes para la síntesis de cDNA

6.8 Análisis de la expresión de lncRNAs

Los niveles de expresión de lncRNAs fueron determinados por PCR cuantitativa con iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), todas las reacciones se realizaron por triplicado utilizando los reactivos y cantidades mostradas en la tabla 1, se utilizó como control endógeno a GAPDH, todas las reacciones se cargaron en una placa de 384 pozos y se colocaron en un termociclador QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 1. Componentes utilizados en la reacción de qPCR

Componentes para cada reacción (rxn)	una rxn
2X iQ SYBR Green Supermix	5 µl
Forward primer, 10 µM	0.3 µl
Reverse primer, 10 µM	0.3 µl
Templado (10 ng en 2 µl)	2 µl
H2O	2.4 µl
Volumen final	10 µl

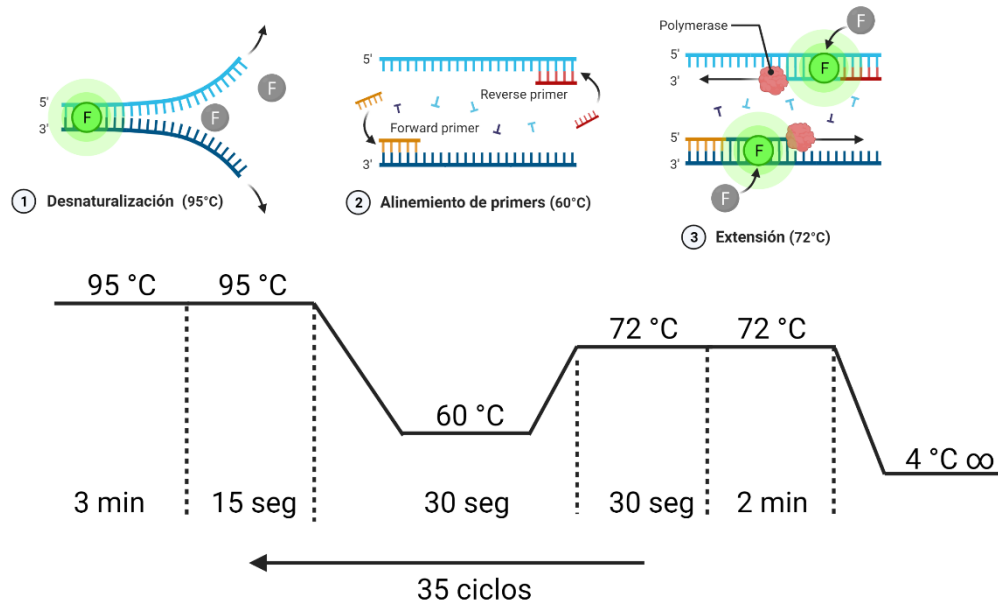


Figura 12. Condiciones de la reacción de qPCR para medir la expresión relativa de lncRNAs y GAPDH.

6.9 Inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica se realizó con algunas modificaciones de acuerdo con el protocolo de (Crosby et al., 2014), para eliminar la parafina de las laminillas se hicieron dos lavados con Xilol al 100 % durante 10 min. El tejido se rehidrató a concentraciones decrecientes de etanol y en agua, estos pasos tuvieron una duración de 10 min cada uno. Para la recuperación de antígeno las laminillas se colocaron en una jarra coplin la cual contenía buffer de citratos 0.01 M a pH 6.0. El desenmascaramiento de antígeno se realizó incubando a ebullición constante las laminillas en buffer citrato durante 20 min en un horno de microondas. Después de la incubación se dejó enfriar durante 20-30 min o hasta alcanzar la temperatura ambiente (TA). Con el fin de eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos fueron incubados a temperatura ambiente durante 30 min con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3 % (v/v) diluido en metanol al 50 %. Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario se preparó una solución bloqueadora que contenía PBS 1x pH 7.2, suero de cerdo al 2 % y tritón x-100 al 0.5 % (v/v) y se adicionó a cada laminilla 150 μ L de esta solución y se incubó durante 30 min a (TA). Se empleó el anticuerpo CD31 (Sigma-Aldrich, HPA004690) en una dilución 1:200, se adicionó 100 μ L de anticuerpo por laminilla y se incubó a 32 °C durante una hora, posteriormente se agregaron los últimos 100 μ L y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente para eliminar el excedente de anticuerpo se realizaron dos lavados con PBS-Tween al 0.1 % y dos con PBS 1x de tres min cada uno. El anticuerpo secundario biotinilado (Genetex) se empleó en una dilución 1:300 y se incubó a 32 °C durante una hora. Cumplido el tiempo se realizaron tres lavados con PBS de tres min cada uno, las laminillas se incubaron con un sistema avidina-biotina-peroxidasa (kit Vecta Stain ABC), en una dilución 1:150, se adicionó 150 μ L del complejo ABC a cada laminilla y se incubaron a 32 °C durante 30 min. Se preparó una solución al 0.04 % de diaminobencidina DAB (SIGMA) en PBS 1x como cromógeno y peróxido de hidrógeno al 3 % como sustrato para la enzima peroxidasa. La reacción cromogénica se incubó durante 10 min y se detuvo con agua corriente. Posteriormente las laminillas se incubaron en ácido peryódico al 1 % durante 10 min, se enjuagaron con agua destilada y se incubaron en reactivo de

Schiff durante 10 min, se lavaron las laminillas con agua corriente y se incubaron con hematoxilina de Harris durante un minuto, Por último, los tejidos se deshidrataron con pases sucesivos a concentraciones crecientes de etanol terminando en xilol al 100 % y se montaron con resina como medio de montaje no acuoso para microscopía (Entellan).

6.10 *Conteo de Microvasculatura*

Utilizando un escáner Leica CS2 se digitalizaron todas las laminillas a un aumento de 20 x y 40 x, de estas imágenes panorámicas tomaron 10 campos representativos al azar de cada muestra, cada una de las imágenes calibraron en micras y se dividió en cuadrantes de $13031.93 \mu\text{m}^2$, se seleccionaron 10 cuadrantes al azar y se contaron todas las estructuras tubulares tipo canal (rosas) y endoteliales (café) que estuvieran dentro de cada cuadrante y aquellas que estuvieran tocando los lados superior e izquierdo (aunque estén parcialmente fuera), no se contaron las estructuras tubulares que tocaran el lado derecho e inferior de ningún cuadrante (Figura 13).

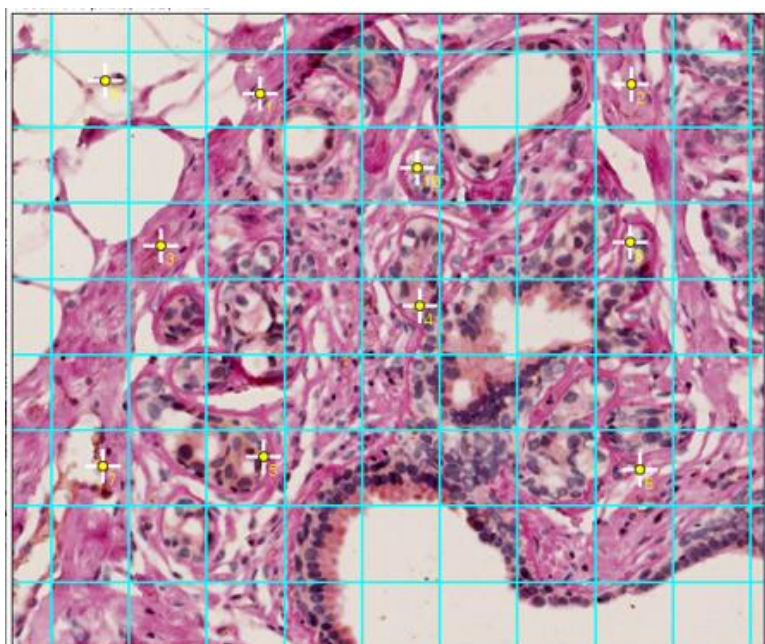


Figura 13. Método de conteo de microvasculatura positiva y negativa para mimetismo vasculogénico, cuadrantes de $13031.93 \mu\text{m}^2$, la tinción café indica la presencia de células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, los puntos amarillos son los cuadrantes de conteo asignados de manera aleatoria.

6.11 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism 9, se realizó una prueba t para comparar la microvasculatura e índice de tinción considerando una distribución no normal. Para medir la expresión relativa de cada lncRNAs se empleó el método doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Las muestras fueron normalizadas usando el gen GAPDH. Con los datos obtenidos se usó una prueba de t para comparar cada una de las muestras no metastásicas con cada una de las metastásicas y se consideraron como estadísticamente significativos todos los valores que presentaron un valor de $P < 0.05$.

7 RESULTADOS

La identificación de genes que participan en los procesos de metástasis y mimetismo vasculogénico que están validados experimentalmente se llevó a cabo usando la base de datos de acceso libre PubMed. Como resultado se identificaron 192 genes reportados que participaban en el proceso de metástasis (Tabla 2) y 132 genes en el desarrollo del mimetismo vasculogénico (Tabla 3).

La ontología génica (GO) se utilizó para identificar y visualizar las vías y procesos biológicos asociados con los conjuntos de genes. El análisis del conjunto de 192 genes relacionados con la metástasis reveló un papel predominante de los siguientes procesos biológicos: locomoción, migración celular, motilidad celular, localización celular, procesos de desarrollo celular, diferenciación celular, desarrollo de órganos, regulación de la muerte celular, movimiento de la célula o componente subcelular, y regulación de la apoptosis. Con respecto a los términos de componentes celulares, los productos génicos que están enriquecidos principalmente son los del espacio extracelular, región extracelular, uniones de anclaje, adhesión focal, unión célula-sustrato, matriz extracelular, matriz extracelular que contiene colágeno, unión celular. El análisis de funciones moleculares reveló aquellos genes que codifican para proteínas involucrados en señales de unión a receptores, unión a enzimas, unión a factores de transcripción,

actividad tirosina cinasa del receptor transmembranal, regulación de funciones moleculares (incluyen subunidades reguladoras de enzimas), proteínas con actividad tirosina cinasa, actividad cinasa de receptores transmembranales, Unión a complejos que contienen proteínas, actividad ligando-receptor y activadores del receptor de señalización. Además, el análisis de enriquecimiento de la vía mediante la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto KEGG confirmó vías relacionadas con la metástasis como los proteoglicanos en cáncer (componentes de la ECM), vías en cáncer (invasión de tejido y metástasis, angiogénesis, evasión de la apoptosis, proliferación), lípidos y aterosclerosis, vía de señalización TNF (p-value <0.05) (Figura 14).

Tabla 2. Productos génicos involucrados en el desarrollo de la metástasis

Genes	Función	Genes	Función	Genes	Función	Genes	Función
ADAM9	Interacciones célula-célula, célula-matriz	GDF15	Inhibe la hormona del crecimiento	POSTN	Unión y propagación celular	AKAP12	Proteína de anclaje
ADORA2B	Receptor de adenosina.	GHRL	Regulador del crecimiento	PPIA	Plegamiento de proteínas	AKT1	Metabolismo, proliferación, crecimiento
AGR2	Migración y diferenciación celular	GLI2	Desarrollo embrionario	PRRX1	Regulador transcripcional	ARHGD1B	Reorganización del citoesqueleto de actina
AKT1	Proliferación celular	GOLM1	Respuesta celular a la infección	PRSS50	Actividad treonina endopeptidasa	BMP4	Desarrollo embrionario, folículo piloso
ANXA1	Inflamación	GRK3	Fosforila receptores betaadrenérgicos	PTGS2	Respuesta inflamatoria	BRMS1	Represor transcripcional
APOBEC3G	Desaminasa	HMGB1	Replicación, transcripción, r. de la cromatina	PTTG1	Estabilidad cromosómica	CASP8	Cascada de activación de caspasas
ATF4	Factor de transcripción	HMMR	Receptor de ácido hialurónico	PXN	Proteína citoesqueleto	CCN2	Proliferación y diferenciación
AXL	Receptor de tirosina Cinasa	HOXB13	Factor de transcripción	RAB22A	Endocitosis y el transporte de proteínas	CD44	Interacción. cél-cél, adhesión y migración
BACH1	Regulador transcripcional	HOXB7	Factor de transcripción	RAC1	GTPasa asociada a la membrana	CD82	Se asocia con CD4 o CD8
BCL2L1	Regulador transcripcional	HOXB9	Factor de transcripción	RAF1	Proliferación, diferenciación, apoptosis	CDH1	Adhesión celular dependientes del calcio
BCL3	Activador transcripcional	ID1	Crecimiento, apoptosis y diferenciación	RHOC	Adherencias focales y fibras de actina	CDH11	Adhesión celular dependientes del calcio
BIRC5	Proliferación celular y apoptosis	IDO1	Homeostasis	ROR2	Osteogénesis y formación de hueso	CDH2	Adhesión célula-célula
BSG	Progresión del tumoral	IGFBP2	Promueve el crecimiento celular	RRAS	Organización del citoesqueleto de actina	CERS2	Cataliza la formación de ceramida
C5AR1	Receptor inflamatorio	IL32	Respuestas inmunitarias	RUNX3	Proliferación y/o diferenciación celular.	CLDN1	Permeabilidad de los epitelios
CAV1	Proteína de andamiaje	IL5	Diferenciación de las células B	S100A4	Progresión del ciclo celular	CLDN4	Adhesión celular independiente del calcio.
CCL2	Receptor de quimiocinas	IL6	Diferenciación de linfocitos y monocitos.	S100P	Proliferación celular	CRMP1	Reordenación del citoesqueleto de actina
CCR7	Receptor de quimiocina MIP-3-beta	IP6K2	Convierte hexakisfosfato	SEMA3E	Reorganización del citoesqueleto de actina	DCC	Remodelación del citoesqueleto
CD24	Diferenciación celular	Adhesión, invado podios y degra de la matriz	ITGA3	SFRP2	Señalización de Wnt	DLC1	Activadora de GTPasa
CD44	Interacción cél-cél, adhesión y migración	ITGA5	Receptor de fibrilina-1 y adhesión cel.	SIX2	Renovación en la proliferación de células	DRG1	Polimerización, microtúbulos
CDCP1	Adhesión celular	ITGBL1	Integrina beta-tipo 1	SNAI1	Transición epitelial a mesenquimal	GAS1	Supresión del crecimiento
CEACAM6	Adhesión celular y la progresión tumoral	KISS1R	Receptor de metastina	SNAI2	Represor transcripcional	GPC3	Proteoglicano de la superficie celular
CEBPD	Activador transcripcional	KLF8	Represor y activador transcripcional	SOX12	Activador transcripcional	GPR68	Sensor de pH osteoblástico
CENPF	Cinetocoro y la segregación cromosómica	L1CAM	Molécula de adhesión celular	SOX4	Activador transcripcional	GSN	Moduladora de actina regulada por calcio
CHD1L	Remodelación de la cromatina	LAMB3	Desarrollo embrionario	SPINK1	Inhibidor de serina proteasa	HUNK	Actividad transferasa
CHI3L1	Respuesta inflamatoria	LEF1	Factor de transcripción	SPON2	Proteína de adhesión celular	ITIH5	Supresor de tumores
CLDN9	Adhesión celular	LGALS1	Regulación de la apoptosis y proliferación	SPP1	Interacción célula-matriz.	KDM1A	Histona desmetaliza
COL6A1	Proteína de unión celular	LGALS3	Migración de células endoteliales.	SRC	Respuesta inmune, la adhesión celular	KISS1	Adhes cél-matriz, reorga. Citoesqueleto
COMP	Integridad estructural	LOX	Desaminación oxidativa postraducciona	SRGN	Procesamiento de MMP2	KISS1R	Suprime las metástasis
CSNK2A2	Ciclo celular, la apoptosis y transcripción	LOXL2	Correpresor de la transcripción	SRPK1	Reguladora del splicing	KLF17	Represor de la transcripción, TEM
CTSB	Tiol proteasa	MBD4	Reparación del ADN	TACSTD2	Receptor de factor de crecimiento	MAP2K4	Cinasa activada por estrés
CTSZ	Carboxi-monopeptidasa	MCAM	Adhesión cel. y en la cohesión del endotelio	TDO2	Dioxigenasa	MAP2K6	Proteína cinasa
CXCL1	Actividad quimiotáctica	MET	Receptor de tirosina cinasa	TF	Proteínas de unión a hierro	MAP2K7	Cinasa activada por estrés
CXCL10	Citocina proinflamatoria	MMP1	Metaloproteína 1 de la matriz	TGFB1	Se asocia con TGF-beta-1	MAPK14	Cinasa Serina/treonina

CXCL8	Factor quimiotáctico	MMP16	Endopeptidasa, degrada matriz extracelular	TGM2	Cataliza la reticulación de proteínas	MED23	Activación transcripcional
CXCR4	Migración celular	MMP9	Proteólisis local de la matriz extracelular	TNC	Proteína de la matriz extracelular	MYC	Factor de transcripción
E2F1	Activador transcripcional	MTA1	Corregulador transcripcional	TNFSF10	Induce apoptosis	NDRG1	Factor de transcripción
EIF5A	Dinámica de la actina y ciclo celular	MTA2	Represor y activador de la expresión génica	TNK2	Migración, supervivencia celular	NME1	Síntesis de nucleósidos
ELF5	Activador transcripcional	MYB	Activador transcripcional	TP73	Respuesta apoptótica al daño del ADN	PEBP1	Inhibe la actividad cinasa de RAF1
ENAH	Proteína asociada a actina	NFATC2	Promueve la migración	TPO	Producir las hormonas tiroideas	PTEN	Supresor de T. actividad de la fosfatasa
ENPP2	Migración de células	NRP2	Superficie celular	TRIM28	Complejo de remodelación del nucleosoma	RECK	Angiogénesis, activador de wnt7
ETV4	Activador transcripcional	NTRK3	Receptor de tirosina quinasa	TWIST1	Regulador transcripcional	RRM1	Biosíntesis desoxirribonucleótidas
EZH2	Proteína del grupo Polycomb	PARP1	Reparación del DNA	UBE2N	Ciclo celular y la diferenciación	SERPINB5	Crecimiento, la invasión
FGFR1	Receptor de superficie celular	PCDH7	Adhesión célula-célula	VAV1	Diferenciación y / o proliferación celular	SMAD7	Antagonista de TGF-beta
FLOT2	Proteína de andamiaje	PDGFRB	Receptor de superficie celular	VEGFB	F. de crecimiento de células endoteliales	SRC	Respuesta inmune, la adhesión celular
FOSL1	Acción de los retinoides	PDPN	Migración y adhesión celular	VIM	Filamentos intermedios cels mesenquimal	TIMP1	Inhibidor de metaloproteinasas
FOXC1	Factor transcripcional	PELP1	Progresión del ciclo celular	WASF3	Morfología cel y la organiz. citoesqueleto	TXNIP	Represor transcripcional
FOXM1	Proliferación celular	PHGDH	Oxidación reversible de 3-fosfo-D-glicerato	WNT5A	Receptores transmembrana		
FOXQ1	Diferenciación del folículo piloso.	PHIP	Proliferación celular	WSB1	Reconocimiento de sustrato para E3		
FZD2	Receptor de proteínas Wnt.	PLAUR	Activador del plasminógeno urocinasa	YBX1	Represión de la traducción, splicing		
GABRA3	Inhibidor neuronal	PLOD2	Enlaces de colágeno intermolecular	ZEB2	Inhibidor transcripcional		

Tabla 3. Productos génicos que participan en el desarrollo del mimetismo vasculogénico

Gen	Función	Gen	Función	Gen	Función	Gen	Función
TFPI	Coagulación sanguínea	FOXP2	Represor transcripcional	LGALS1	Apoptosis, proliferación y diferenciación	COL4A1	Componente estructural de la membrana
TFPI2	Remodelación de la matriz	SNAI1	Transición epitelial a mesenquimal	MTDH	Promueve el crecimiento	JAG1	Destino celular durante la hematopoyesis
PDGFB	Proliferación y migración	SNAI2	Migración de células	SELP	Receptor dependiente de Ca (2 +)	THBS1	Interacciones de cél- cél, de célula a matriz
TGFB1	Proliferación, diferenciación y crecimiento	STAT3	Regulador de la respuesta inflamatoria	VCAM1	Molécula de adhesión celular, vascular 1	EGFR	Receptor tirosina Kinasa
ALDH1A1	Metabolismo del retinol	TCF4	Factor de transcripción	PECAM1	Migración transendotelial	MAPK3	Crecimiento, adhesión, supervivencia celular
NODAL	Desarrollo embrionario	RUNX2	Diferenciación osteoblastos y morfogénesis	TIE1	Regulación de la angiogénesis	MAPK1	Crecimiento, adhesión, supervivencia celular
NOTCH1	Receptor de ligandos unidos a la membrana	PLAUR	Receptor del activador del plasminógeno	TEK	Angiogénesis, proliferación, migración, adhesión	MAP2K1	Crecimiento, adhesión, diferenciación
YAP1	Regulador transcripcional	CDK5	Detención y diferenciación del ciclo celular	VEGFC	Angiogénesis y el crecimiento de células endoteliales,	PRKCA	Crecimiento celular
HIF1A	Regulador transcripcional maestro	FZD2	Receptor de proteínas Wnt	NRP1	Regula la angiogénesis inducida por VEGF.	SERPINF1	Inhibidor de la angiogénesis
EPAS1	Factor de transcripción	NOTCH2	Receptor de ligandos unidos a la membrana	ENG	Migración de células endoteliales	TDGF1	Proteína de membrana celular
ZEB1	Represor transcripcional	DKK1	Antagoniza la vía Wnt	CLDN4	Formadora de canales	ACVR1B	Matriz extracelular
ZEB2	Inhibidor transcripcional	NTN1	Polimerizado en microtúbulos	WT1	Desarrollo y la supervivencia celular	TGFB1	Proliferación, diferenciación de céls mesénquima
CXCL8	Factor quimiotáctico	EPHA2	Receptor tirosina cinasa	USP44	Regulador negativo de la ubiquitinación	ACVR1C	Dif. Celular, crecimiento y la apoptosis
CXCR1	Activación de neutrófilos	LRIG1	Receptores tirosina cinasas	SNAI2	Represor transcripcional	ACVR2B	Cinasa transmembrana
CXCR2	Receptor de interleucina-8	MIF	Citocina proinflamatoria	VIM	Proteína de filamento intermedio	SMAD2	Activador la transcripción
LGALS3	Respuestas inflamatorias	MACC1	Promueve la motilidad celular	S1PR1	Migración celular,	SMAD3	Crecimiento, migración
PRKAR1A	Subunidad reguladora cinasas	WNT5A	Ligando en vía Wnt	RHOA	Organización del citoesqueleto	NOTCH4	Diferenciación, proliferación y apoptosis
DDAH1	Hidroliza N (G) dimetil-L-arginina	HMG2A	Regulación del ciclo celular	UBE2C	Ubiquitina	NOTCH3	Diferenciación, proliferación y apoptosis
MT-CO2	componente citocromo c oxidasa	ROCK1	Citoesqueleto de actina y polaridad celular	LGR5	Activa la vía de señalización Wnt	CXCR4	Migración celular
BCL2	Suprime la apoptosis	SEMA4D	Receptor de superficie celular	WVVOX	Supresor de tumores	PTGS2	Células endoteliales vasculares
PTGER3	Receptor de prostaglandina E2	LOXL2	Correpresor de la transcripción	PIK3CA	Crecimiento, proliferación, motilidad y morfología	PTGER1	Respuesta contráctil del músculo liso
CLDN15	Unión estrecha, permeabilidad del epitelio.	CDH5	Adhesión celular	POU5F1	Pluripotencia de las células madre embrionarias	ROCK2	Adhesión y motilidad celular
TWIST1	Regulador transcripcional.	LAMA2	Unión, migración y organización de las células	LAMC2	Desarrollo embrionario	RHOC	Adherencia focal y fibras de tensión de actina
TWIST2	Reprime citocinas proinflamatorias	FLT1	Receptor de superficie celular para VEGFA	XAF1	Participa en la apoptosis	AGGF1	Angiogénesis, proliferación de céls endoteliales
ALDH1A3	Formación de ácido retinoico	KDR	Angiogénesis, permeabilidad vascular	VEGFA	Angiogénesis, Vasculogenesis y crecimiento cels endot	MYH9	Reorganización del citoesqueleto
CD24	Diferenciación celular	FLT4	Desarrollo de la red vascular	YBX1	Proteína de unión a ADN y RNA	BECN1	Maduración de autofagosomas y endocitosis.
CD44	Receptor de superficie celular	MMP1	Remodelación de la matriz	IL6	Diferenciación final de las células B	CDKN2A	Ciclo celular, apoptosis
ITGA6	Receptor de laminina	MMP2	Vasculatura, angiogénesis, reparación tisular	HSP90AB1	Maduración, mantenimiento estructural, ATPasa	BMP4	Desarrollo embrionario
PROM1	Diferenciación celular	MMP9	Matriz extracelular y en la migración	PTK2	Migración, adhesión, reorgani. del citoesque de actina	CD82	Se asocia con CD4 o CD8
POU5F1	Factor de transcripción	MMP14	Reorganización del citoesqueleto	IGFBP1	Migración celular	NDRG1	Crecimiento celular y diferenciación.
SOX2	Factor de transcripción	NOX4	Inhibición de las fosfatasa	IGFBP2	Inhibe las tasas de crecimiento y desarrollo	FOXM1	Proliferación celular
NANOG	Regula EMT, proliferación	CD276	Inhibe la lisis celular	IGFBP3	Crecimiento, proliferación celular	CTNNB1	Coactivador de factores de transcripción
MYC	Transcripción, crecimiento	AURKA	Progresión del ciclo celular	CCL2	Movilización de iones de calcio		
KLF5	Factor de transcripción	SGCB	Componente del complejo sarcoglicano,	EGF	Estimula el crecimiento		

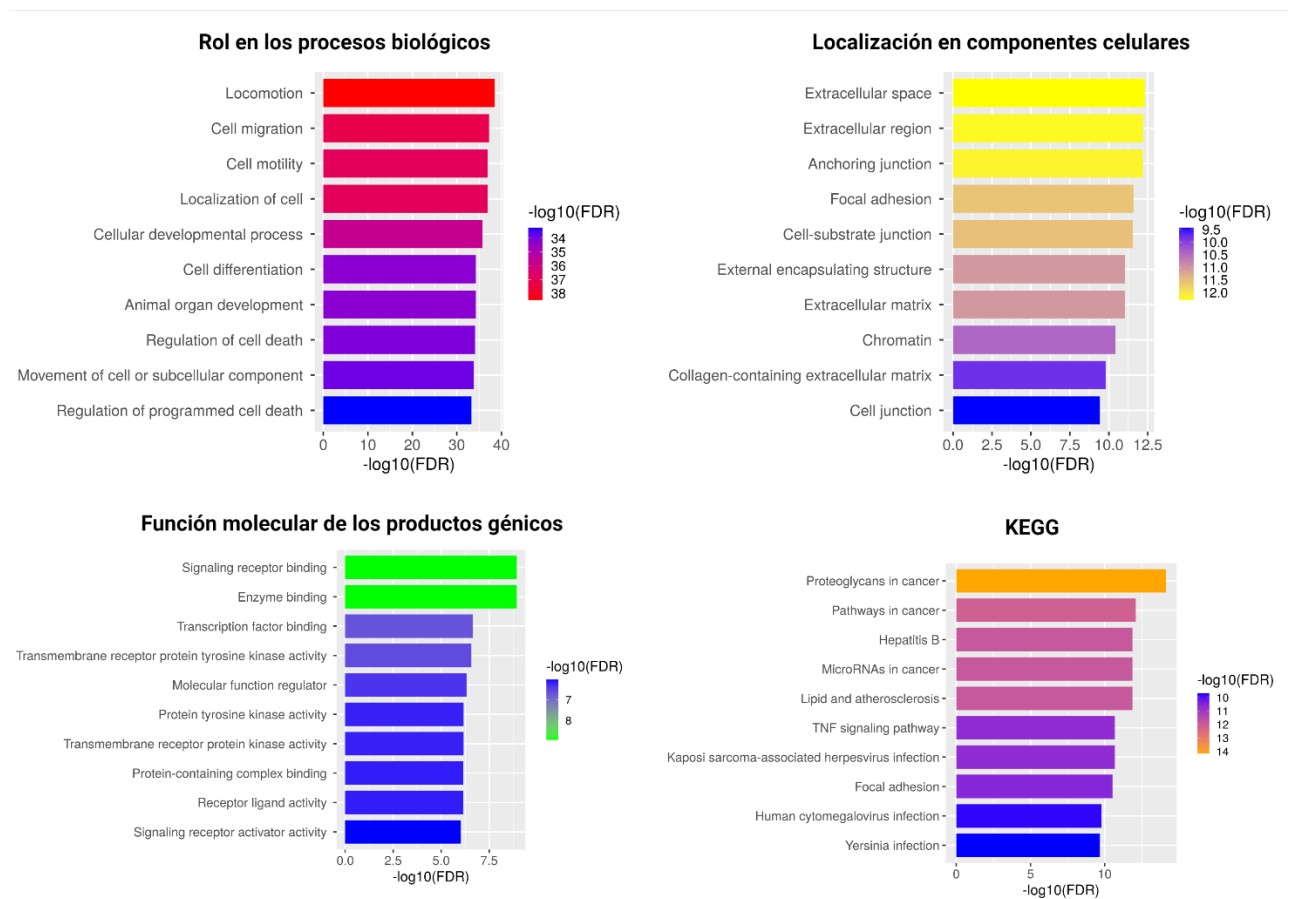


Figura 14. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) del conjunto de genes relacionados con la metástasis. Se presenta los 10 principales términos de GO que están significativamente enriquecidos en: procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y KEGG (-log p-value).

En lo que respecta al análisis de ontología génica (GO) de los 132 genes relacionados con el desarrollo del mimetismo vasculogénico se muestra que en los procesos biológicos predominan los que participan en la formación de estructuras implicadas en la morfogénesis (como pseudópodos), desarrollo del sistema circulatorio, desarrollo de tubos, regulación en el desarrollo, desarrollo vascular, desarrollo de vasos sanguíneos y desarrollo de la migración y motilidad celular. En componentes celulares predominan los que participan en la superficie celular, unión-anclaje, región extracelular, complejos receptores, adhesión focal, interacción célula-sustrato, espacio extracelular, unión celular y componentes de la membrana plasmática. De las funciones moleculares predominantes en este conjunto de genes

resaltan las relacionadas con la unión al factor de crecimiento, molécula-receptor, receptor transmembranal con actividad cinasa, proteínas con actividad cinasa, unión a enzimas, actividad fosfotransferasa, actividad del factor de crecimiento y unión a factores de transcripción. El análisis en KEGG mostró que las principales en las que participan estos genes fueron las relacionadas con cáncer, proteoglicanos, microRNAs, adhesión focal, vía de señalización AGE-RAGE, pluripotencia de células madre, PI3K-Akt (p-value <0.05) (Figura 15).

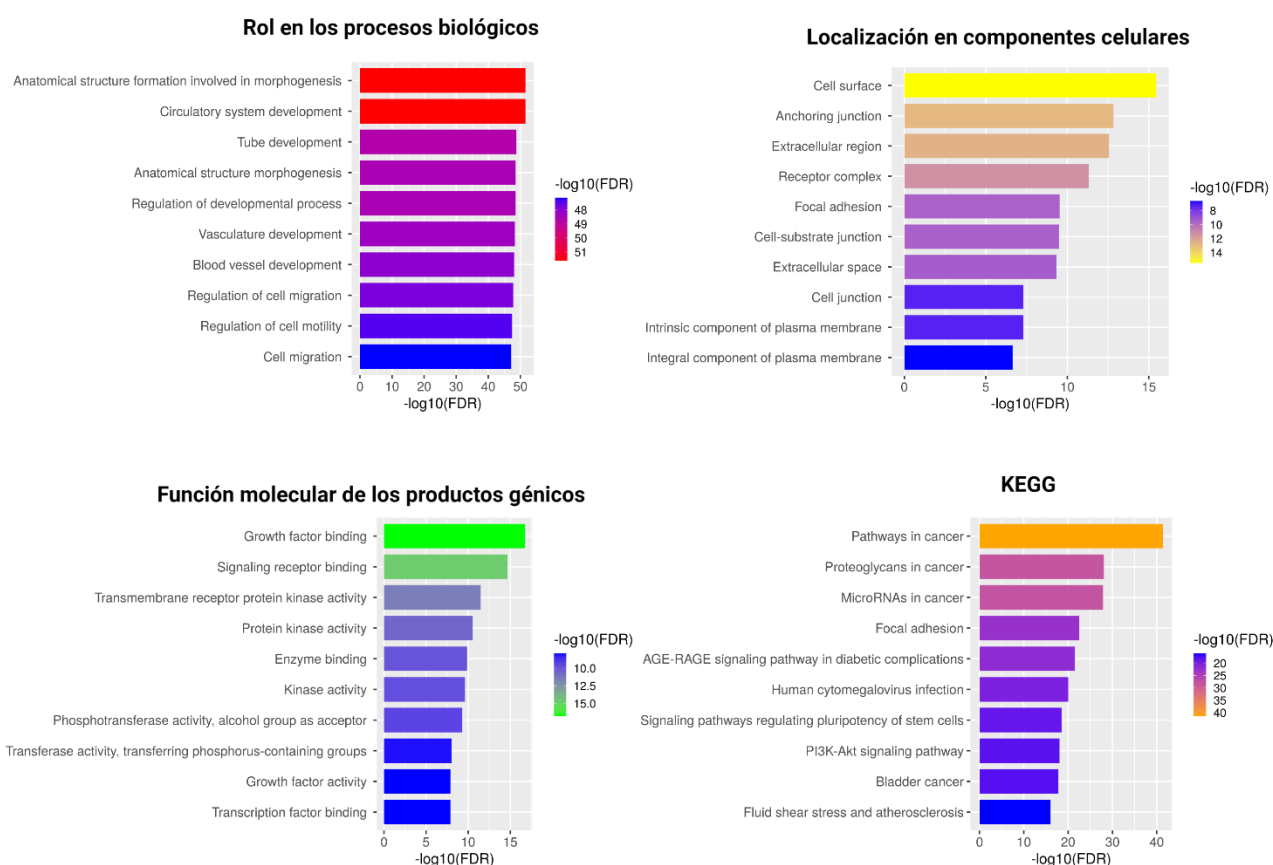


Figura 15. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) del conjunto de genes relacionados con mimetismo vasculogénico. Se presenta los 10 principales términos de GO que están significativamente enriquecidos en los, procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y KEGG (-log p-value)

Después clasificar los conjuntos de genes por vías de señalización se analizó en número de genes que codifican para proteínas que se comparten en ambos

procesos, de esta manera se identificaron 162 que participan en metástasis, 102 que participan en el desarrollo del mimetismo y 30 se comparten en ambos procesos. Luego se hizo un análisis GO para detectar el número y los principales procesos biológicos en los que intervienen estos productos génicos en común siendo los más destacados: migración celular, locomoción, motilidad celular, movimiento de componentes celulares, desarrollo y respuesta a estímulo ($p\text{-value} < 0.05$) (Figura 16).

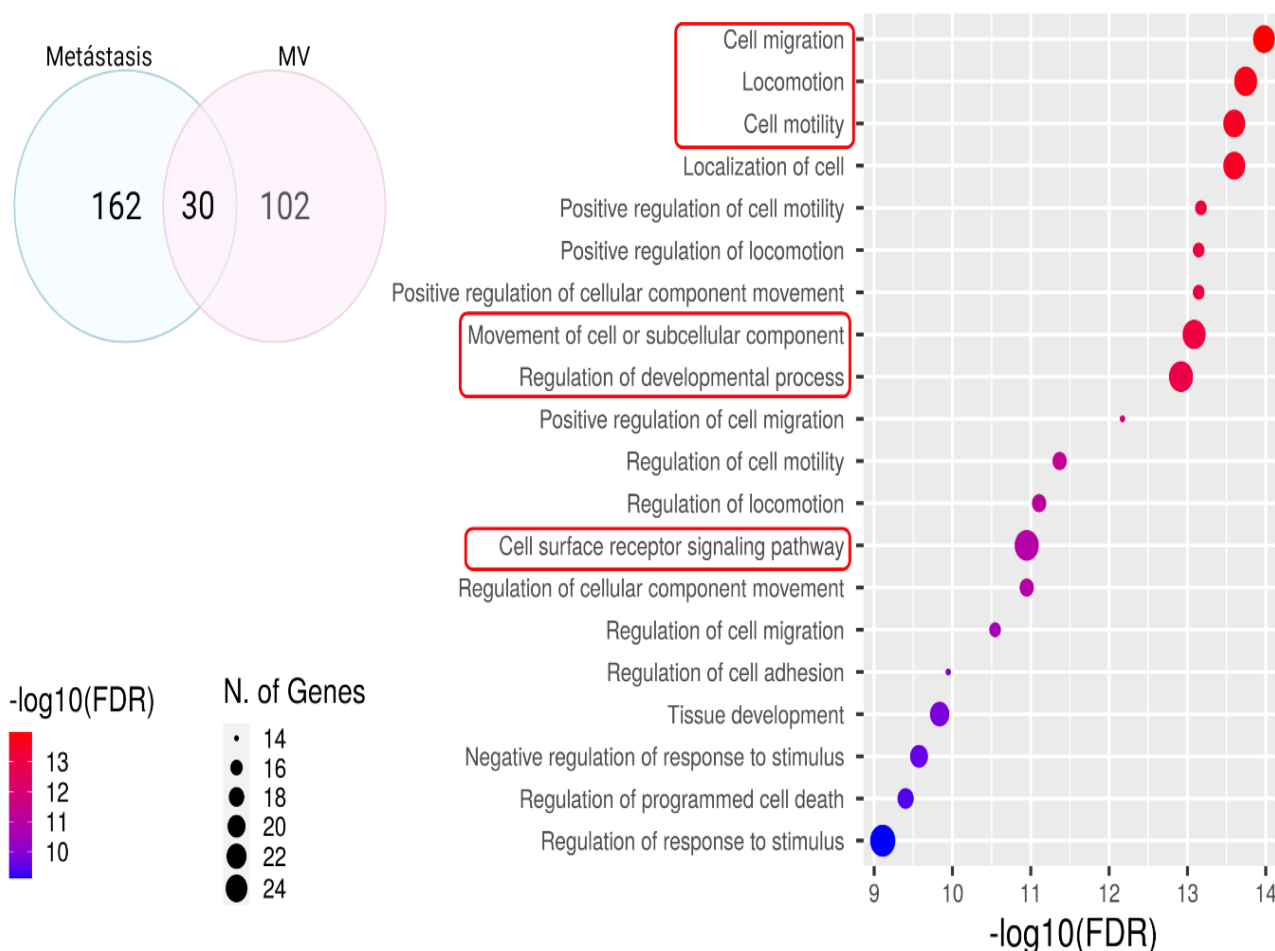


Figura 16. Los 20 principales términos GO relacionados con los procesos biológicos en genes relacionados con metástasis y mimetismo vasculogénico

El conjunto de datos incluye 1087 muestras de carcinoma invasivo, de las cuales 1072 son de mujeres, 12 de hombres (se descartaron), todos los casos fueron diagnosticados entre los 26 y 90 años, el conjunto de datos se compone de

muestras de diferentes grupos étnicos siendo el más predominante el blanco con 751 y el menos predominante el asiático con 60. La clasificación se hizo conforme al sistema de estadificación del American Joint Committee on Cancer Metastasis, de acuerdo con éste 895 muestras pertenecían a M0 (no han hecho metástasis), 162 a MX (no se puede evaluar la diseminación a distancia), 21 a M1 (se detectaron metástasis distantes) y 6 a cM0 (i+) (células tumorales en la sangre). Estas muestras incluyen una clasificación intrínseca (PAM50) en cuatro subtipos: 499 Luminal A, 197 Luminal B, 78 HER2, 171 Basal y 139 que no pudieron clasificarse en ninguno de estos subtipos (Figura 17).

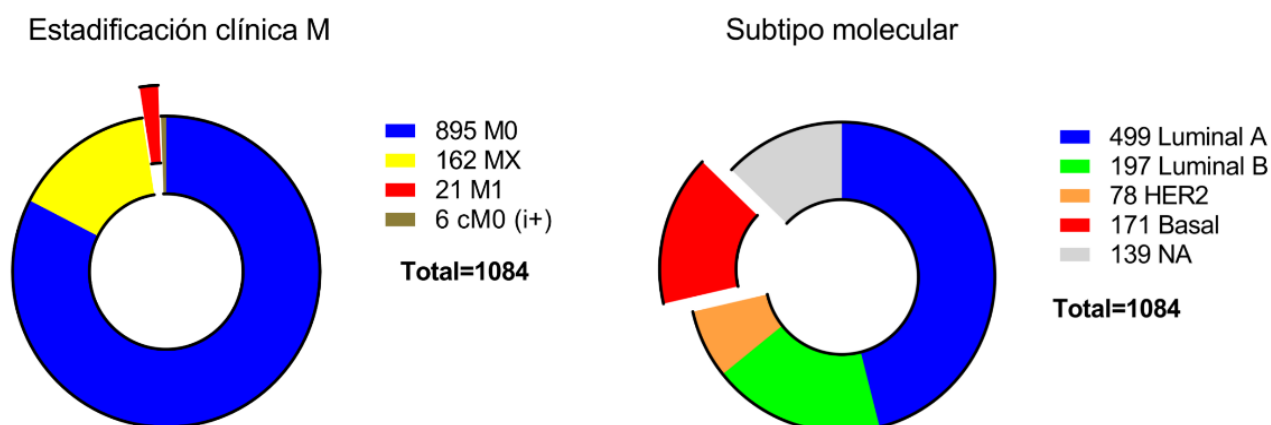


Figura 17. Estadificación American Joint Committee on Cancer Metastasis y clasificación intrínseca del conjunto de datos provenientes de TCGA PanCancer Atlas 2018.

Expresión relativa de genes relacionados con la metástasis

El mapa de calor elaborado con los 192 genes relacionados metástasis muestra una región con conjunto de 15 genes que se expresan más en muestras M0 que en muestras M1, de este grupo de genes destacan: PHIP, CENPF, HMMR, RRM1, MED23, UBE2N, SRPK1, CDH1, BACH1, ENAH, PLOD2, FOXM1, MAPK14, MMP1, SOX4 (Figura 18A). por otro lado, se identificó un grupo de 15 genes que se transcriben más en muestras M1, entre estos destacan: E2F1, FOXM1, BIRC5, PTTG1, EZH2, CENPF, ATF4, DRG1, PHGDH, YBX1, KDM1A, BMP4, EGF, BECN1, STAT3 (Figura 18B).

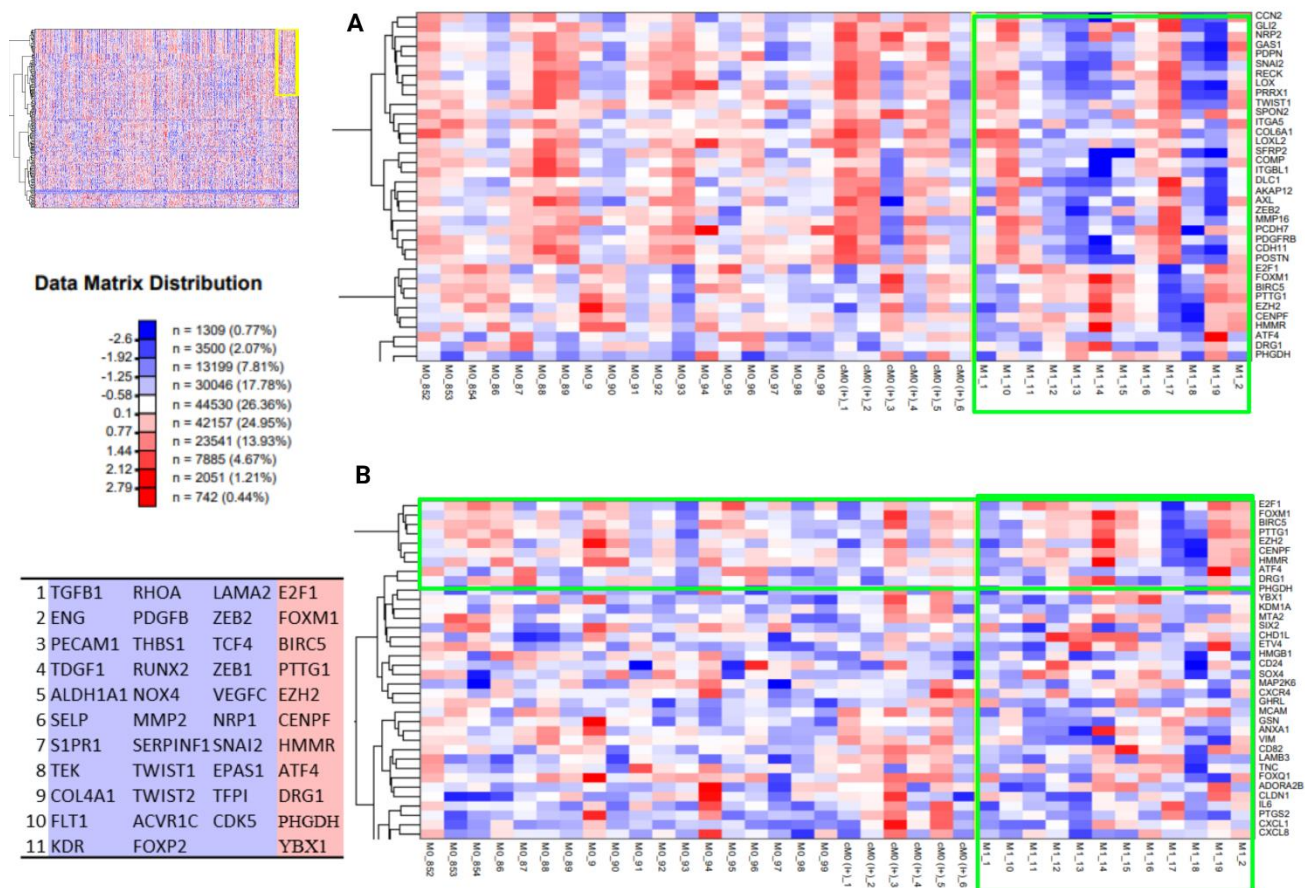


Figura 18. Mapa de calor generado a partir de datos provenientes de TCGA, PanCancer Atlas. Se muestra la agrupación jerárquica de un grupo de RNAm relacionados con la metástasis y muestras de cáncer de mama con y sin metástasis. Cada fila representa a un RNAm y cada columna una muestra de paciente. La escala de color ilustra el nivel relativo de expresión: azul; menos expresados, rojo; más expresados y blanco sin alteración. Creado en Interactive Clustered Heat Map Builder.

Una vez que se obtuvieron y se filtraron los datos de expresión de los 132 genes relacionados con el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama, se usaron para construir un agrupamiento jerárquico en donde se marcó con un recuadro verde la región del mapa que contenía muestras de pacientes con metástasis. En la Figura 19A se presenta el acercamiento de una zona que en su mayoría está conformada por genes alta expresión en muestras de cáncer M0 y que disminuye su expresión en muestras metastásicas M1, por ejemplo: LOXL2, MMP14, IGFBP3, SNAI1, VIM, LGALS1, PLAUR, IGFBP1, NANOG, NODAL; en la Figura 19B se observa un

acercamiento de una zona en donde se puede identificar un cuadrante de 20 genes expresados en M1 STAT3, PTGER3, BCL2, LRIG1, AGGF1, PRKAR1A, ACVR1B, SMAD3, MAPK1, PIK3CA, ROCK1, ROCK2, CTNNB1, NOTCH2.

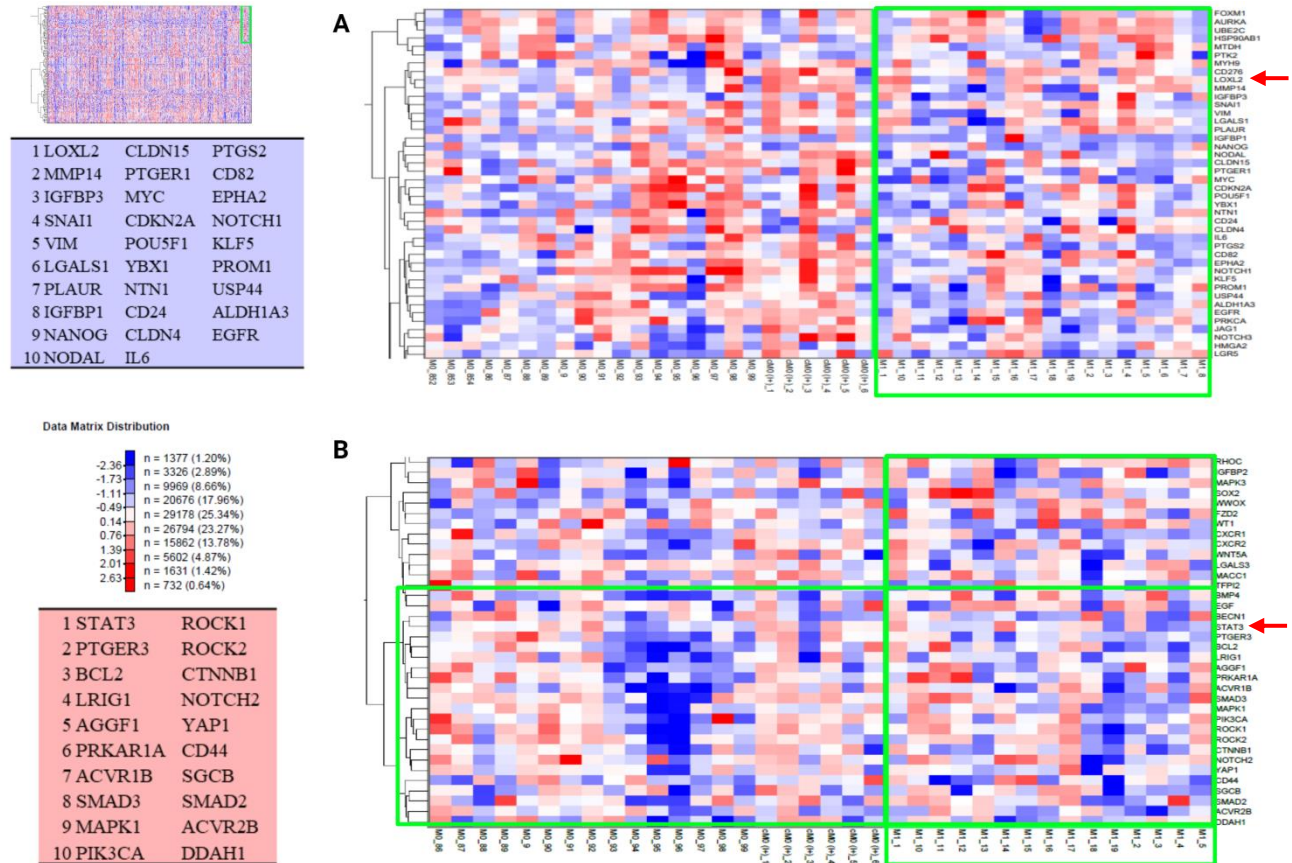


Figura 19. Agrupamiento jerárquico de la expresión diferencial de 132 genes relacionados con el mimetismo vasculogénico en una cohorte de pacientes de cáncer de mama provenientes de TCGA (n=1087). Cada fila representa un gen, mientras que cada columna representa una muestra de paciente. El cuadro de color verde representa muestras metastásicas. La abundancia relativa de la expresión se correlaciona con la intensidad del color; azul baja expresión, rojo alta expresión, blanco sin alteración. Creado en Interactive Clustered Heat Map Builder.

De los 106 lncRNAs identificados en la literatura (Tabla 4) por su participación en el desarrollo de la metástasis en diferentes tipos de cáncer, sólo se obtuvieron datos de expresión de 56 de ellos en cáncer de mama, con estos datos se elaboró un mapa de calor en donde se identificó a un grupo de lncRNAs que se expresan más en la mayoría de muestras M0: TUG1, XIST, NORAD, MRPL39, TINCR, AFAP1-

AS1, CASC2, CASC15, LINC00662, SUMO1P3. Por otro lado, los lncRNAs que se expresan en mayor medida en M1 son: AFAP1-AS1, CDKN2B-AS1, MIR4435-2HG, CASC15, HOTAIR, SLC26A4-AS1, LINC00472, LINC00589, CASC2, SNHG6 (Tabla 5) (Figura 20).

Tabla 4. LncRNAs relacionados con la promoción y desarrollo de la metástasis en diferentes tipos de cáncer.

1	RPL34-DT	HNF4A-AS1	LINC02273	PHACTR2-AS1
2	AFAP1-AS1	HOTAIR	LINC02323	RP1
3	AOC4P	HOTTIP	LINC-ROR	SATB2-AS1
4	ARHGAP27P1	HOXA11-AS	LINP1	SCHLAP1
5	ARNILA	HOXC-AS3	LNCNEF	SLC26A4-AS1
6	B3GALT5-AS1	HULC	LNCRNA-ATB	SNHG15
7	BCAR4	ID2-AS1	LOXL1-AS1	SNHG29
8	BDNF-AS	KRT19P3	LUCAT1	SNHG6
9	BLACAT1	LINC00115	MAGI2-AS3	SNHG7
10	CASC15	LINC00261	MALAT1	SPAAR
11	CASC2	LINC00472	MEG3	SPINT1-AS1
12	CCAT2	LINC00511	MIR210HG	SUMO1P3
13	CDC42EP2	LINC00514	MIR31HG	THORLNC
14	CDKN2B-AS1	LINC00518	MIR4435-2HG	TINCR
15	CERNA2	LINC00589	MIR503HG	TMEM238L
16	CPS1-IT1	LINC00628	MNX1-AS1	TTN-AS1
17	DANCR	LINC00662	MRPL39	TTY15
18	DCST1-AS1	LINC00672	MT1JP	TUG1
19	DUXAP8	LINC00673	NBAT1	TUSC7
20	DUXAP9	LINC00857	NEAT1	UC.134
21	FAM222A-AS1	LINC01087	NKILA	UCA1
22	FER1L4	LINC01089	NORAD	VIM-AS1
23	GAS5	LINC01133	NRON	XIST
24	GATA6-AS1	LINC01186	PCAT18	ZNF649-AS1
25	H19	LINC01419	PCAT6	ZNF667-AS1
26	HAGLR	LINC01819	PCNAP1	
27	HAND2-AS1	LINC01939	PDCD4-AS1	

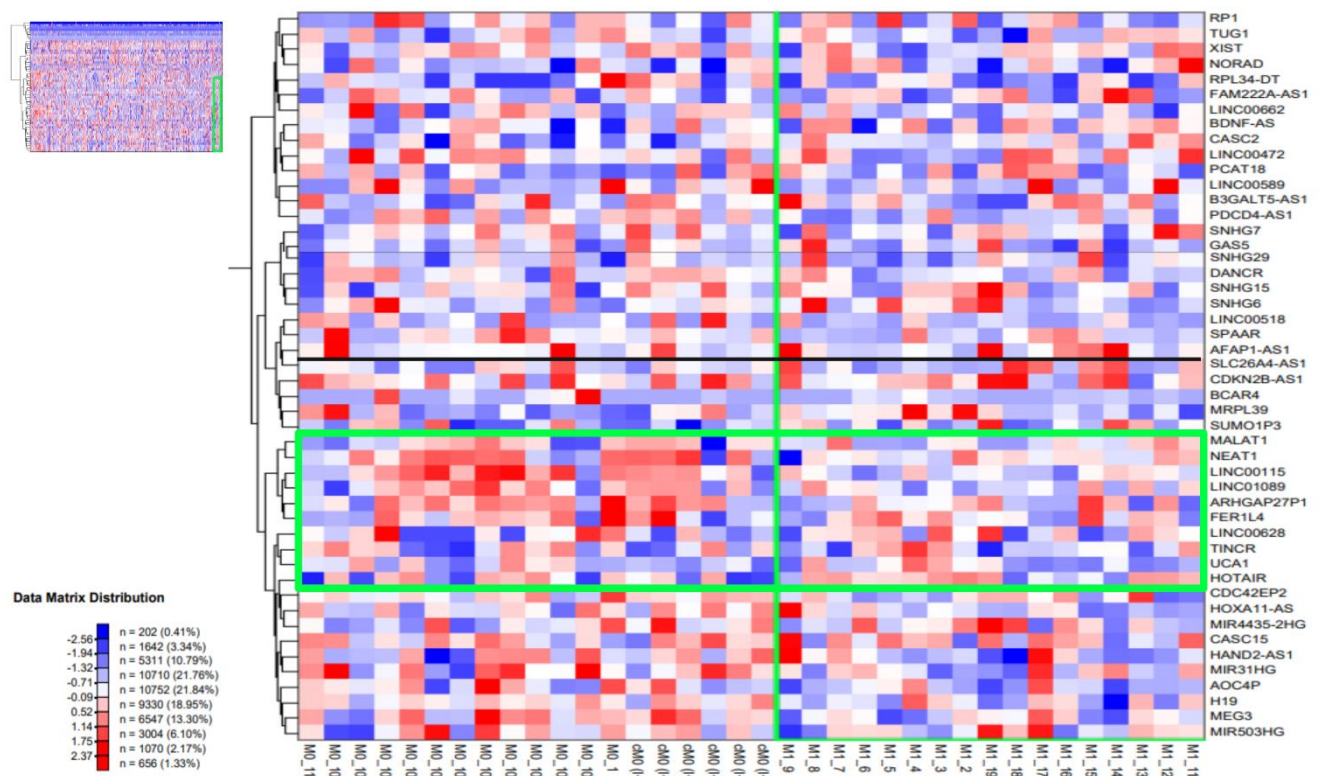


Figura 20. Agrupamiento jerárquico de la expresión diferencial de lncRNAs relacionados con la metástasis. Cada fila es un lncRNA, mientras que cada columna representa una muestra de paciente. M0; muestras no metastásicas, M1; muestras metastásicas. La abundancia relativa de la expresión se correlaciona con la intensidad del color; azul baja expresión, rojo alta expresión, blanco sin alteración. Creado en Interactive Clustered Heat Map Builder.

Tabla 5. Los 10 principales lncRNAs desregulados en M0 y M1 en la cohorte de pacientes de TCGA.

Alta expresión			Baja expresión			Alta expresión			Baja expresión		
lncRNA	M0		lncRNA	M0		lncRNA	M1		lncRNA	M1	
1 TUG1	0.0930		TUSC7	-2.4296		AFAP1-AS1	0.4080		TUSC7	-2.2188	
2 XIST	0.0829		PCNAP1	-1.5173		CDKN2B-AS1	0.3568		PCNAP1	-1.4712	
3 NORAD	0.0611		CPS1-IT1	-1.3006		MIR4435-2HG	0.2495		CPS1-IT1	-1.3291	
4 MRPL39	0.0400		PHACTR2-AS1	-1.0339		CASC15	0.2438		PHACTR2-AS1	-1.1547	
5 TINCR	0.0297		SATB2-AS1	-0.9384		HOTAIR	0.2185		SATB2-AS1	-0.9757	
6 AFAP1-AS1	0.0231		HULC	-0.8213		SLC26A4-AS1	0.1644		TTTY15	-0.8217	
7 CASC2	0.0219		TTTY15	-0.8058		LINC00472	0.0729		HULC	-0.8125	
8 CASC15	0.0061		LINC00261	-0.7033		LINC00589	0.0701		RPL34-DT	-0.7840	
9 LINC00662	0.0046		BCAR4	-0.4181		CASC2	0.0566		LINC00261	-0.7283	
10 SUMO1P3	-0.0003		LINC00518	-0.3403		SNHG6	0.0410		BCAR4	-0.6545	

Con ayuda del motor de búsqueda de libre acceso de PubMed se realizó una búsqueda exhaustiva los RNAs largos no codificantes que participan en la formación del mimetismo vasculogénico en los diferentes tipos de cáncer, se encontraron solamente 20 lncRNAs que participaban en este proceso, la mayoría de ellos han sido reportados en glioma y solamente TP73-AS1 y HOTAIR estaban relacionados con el cáncer de mama (Tabla 6).

Tabla 6. LncRNAs relacionados con el desarrollo del mimetismo vasculogénico en diferentes tipos de cáncer.

LncRNA	Tipo de cáncer	Referencia
1 AFAP1-AS1	Osteosarcoma	(Shi et al., 2019)
2 HCG15	Glioma	(Jing et al., 2020)
3 HOTAIR	Cáncer de mama TN	(Lozano-Romero et al., 2020)
4 HOXA-AS2	Glioma	(Gao et al., 2018)
5 HULC	Glioma	(Yin et al., 2021)
6 LINC00312	Pulmón	(Peng et al., 2018)
7 LINC00339	Glioma	(Guo et al., 2018)
8 LINC00667	Glioma	(Wang et al., 2019)
9 LINC00707	Glioma	(Yu et al., 2021)
10 LOXL1-AS1	Glioma	(Yi et al., 2022)
11 MALAT1	Pulmón, estómago	(Li et al., 2017; Yu et al., 2019)
12 NEAT1	SNSCC	Lu y Kang, 2020)
13 NORAD	Colorrectal	(Zhang et al., 2022)
14 PVT1	Cáncer de estómago	(Zhao et al., 2020)
15 RSU1P2	Cérvix	(Hernández de la Cruz et al., 2020; Liu et al., 2017)
16 SNHG16	Glioma	(Hernández de la Cruz et al., 2020; Hirschler, 2019)
17 SNHG20	Glioma	(X. Li et al., 2019)
18 SNHG5	Glioma	(Jing et al., 2020)
19 SNHG7	Cáncer colorrectal	(Yang Li et al., 2018)
20 TP73-AS1	Cáncer de mama TN	(Tao et al., 2018)

SNSCC; Carcinoma de Células Escamosas Nasal, TN: Triple Negativo.

Se obtuvieron los datos de expresión de los 20 lncRNAs relacionados con la formación de mimetismo vasculogénico, de estos solamente 15 presentaban datos numéricos de expresión completos y cinco de ellos (HCG15, HOXA-AS2,

LINC00707, LOXL1-AS1 y SNHG16) no presentaban ningún dato de expresión en ninguna muestra de cáncer de mama. Los cinco lncRNAs faltantes tienen en común que están reportados en glioma como se puede observar en la tabla 5. Enseguida se construyó un mapa de calor para esquematizar la variación en la expresión de los 15 lncRNAs restantes entre muestras M0 y M1. En este agrupamiento se identificó un conjunto de cinco lncRNAs que presentan alta expresión en la mayoría de las muestras M0, que incluyen: AFAP1-AS1, MALAT1, NORAD, SNHG7, PVT1. Por otro lado, se identificó que LINC00667 y NEAT1 se transcriben más en cM0 (+) en comparación con M0 y M1. Además, se observó que un grupo de tres lncRNAs al parecer mantienen una expresión constante en la mayoría de las muestras independientemente si es M0, cM0 (+) o M1, estos son: AFAP1-AS1 y HOTAIR (Figura 21).

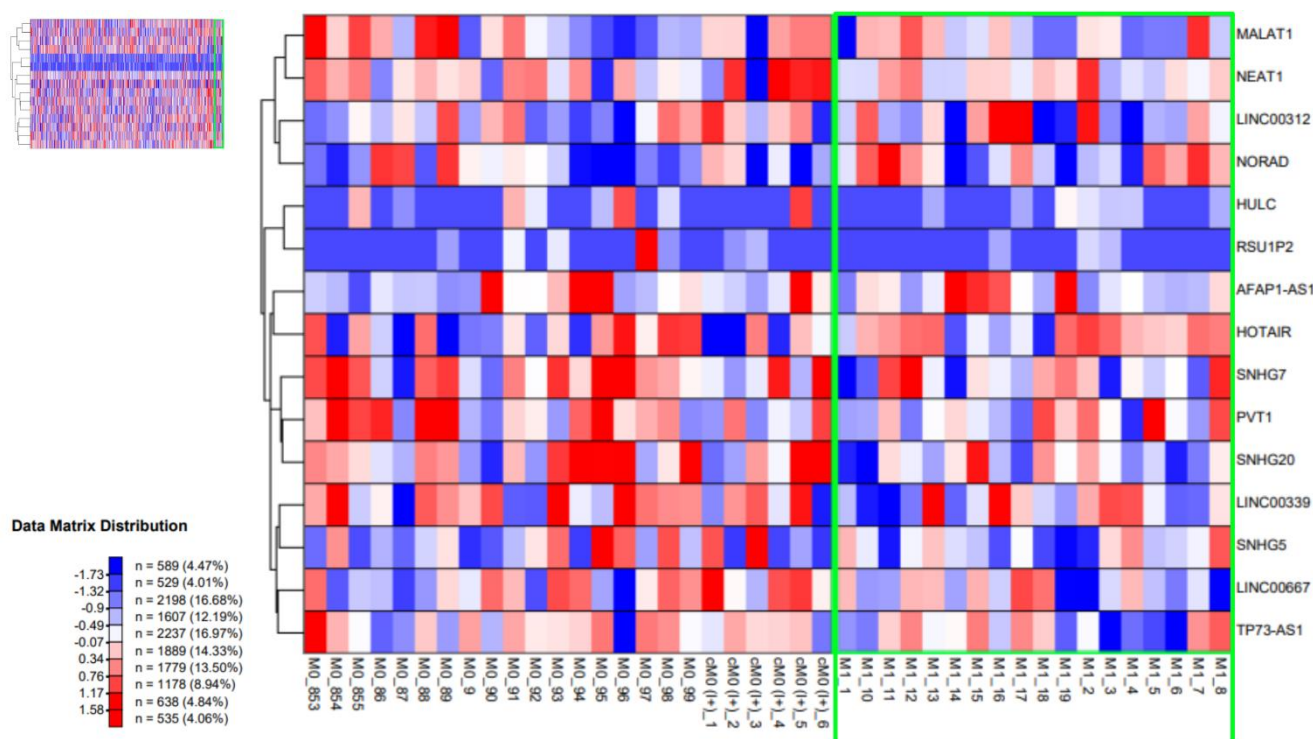
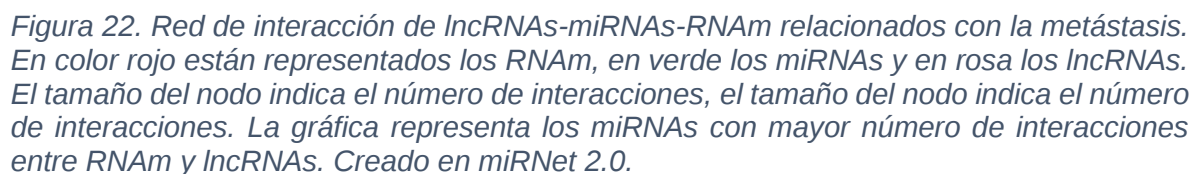


Figura 21. Agrupamiento jerárquico de la expresión diferencial de lncRNAs relacionados con el mimetismo vasculogénico en una cohorte de pacientes de cáncer de mama provenientes de TCGA (n=1087). El cuadro de color verde representa pacientes M1. La abundancia relativa del lncRNA en el tejido se correlaciona con la intensidad del color: azul; baja expresión, rojo; alta expresión, blanco sin alteración. Creado en Interactive Clustered Heat Map Builder.

Para tratar de comprender las funciones y los mecanismos por los cuales estos lncRNAs intervienen en el desarrollo de la metástasis y mimetismo vasculogénico se elaboró una red de interacción lncRNAs-miRNAs-RNAm en tejido de cáncer de mama a partir de datos validados provenientes de interacciones miRNAs-RNAm y miRNAs-lncRNAs anotados en la herramienta miRNet. Utilizando los genes más expresados en M0, M1 y lncRNAs relacionados con la metástasis, se obtuvo una red que estaba compuesta de 39 lncRNA, 40 miRNA y 68 RNAm, en donde 40 miRNAs interactuaban con 19 RNAm, 44 miRNAs interactuaron tanto con RNAm y lncRNAs y ningún miRNA interactuó de forma exclusiva con un lncRNA. Entre los RNAm que presentan un mayor número de interacciones se encuentran: PTEN (44), ADAM9 (39), EZH2 (26), NDRG1 (25), SOX4 (24), PARP1 (21), BACH1 (20), CERS2 (20), CENPF (19) y BIRC5 (17). Los miRNAs tienen más interacciones con este grupo de RNAm son: hsa-mir-16-5p (62), hsa-mir-1-3p (58), hsa-mir-34a-5p (54), hsa-mir-155-5p (48), hsa-let-7b-5p (42), hsa-mir-20a-5p (37), hsa-mir-27a-3p (36), hsa-mir-15a-5p (35), hsa-mir-17-5p (34), hsa-mir-29b-3p (34). Por otro lado los lncRNA que tienen más interacciones son: NEAT1 (106), XIST (99), TUG1 (23), MALAT1 (22), GAS5 (19), HOTAIR (13), NORAD (13), H19 (12), TTN-AS1 (11), LINC00662 (11) (Figura 22).



54

hsa-mir-20a-5p (38), hsa-let-7b-5p (35), hsa-mir-27a-3p (35), hsa-mir-17-5p (32), hsa-mir-7-5p (32), hsa-mir-106b-5p (31). Los lncRNAs que tiene un mayor número de interacciones son: NEAT1 (41), MALAT1 (18), PVT1 (17), SNHG16 (14), HOTAIR (13), SNHG20 (11), LINC00667 (10) (Figura 23).

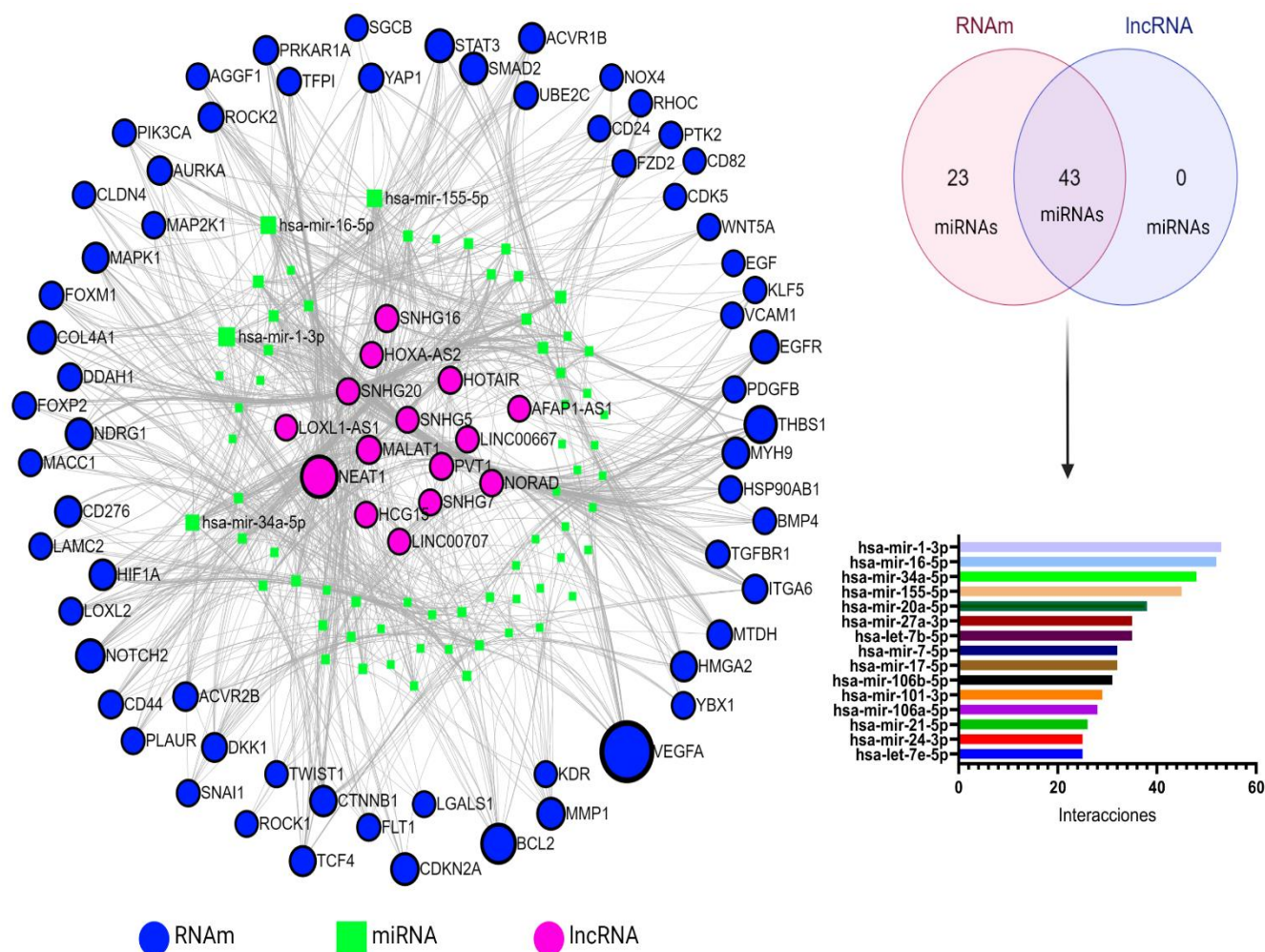


Figura 23. Red de interacción de lncRNAs-miRNAs-RNAm relacionados con el mimetismo vasculogénico. En color azul se representan a los RNAm, en color verde los miRNAs y en color rosa los lncRNAs, el tamaño del nodo indica el número de interacciones. La gráfica representa los miRNAs con mayor número de interacciones entre RNAm y lncRNAs. Creado en miRNet 2.0.

Características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca

Cuatro de las muestras no metastásicas pertenecían a mujeres < 50 años y tres de ellas a >50 años, asimismo, tres muestras metastásicas eran de pacientes <50 y una >50 años. Todas las muestras eran negativas para la detección del receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y HER2, por lo que todas son subtipo basal. En el grupo no metastásico cuatro muestras pertenecían a un estadio clínico dos y tres a un estadio tres, en el grupo metastásico una muestra se clasificó en el estadio uno y las tres restantes en estadio clínico tres. Seis de los tumores no metastásicos se encuentran en grado de tres y uno en grado dos, del grupo metastásico dos muestras pertenecían al grado dos y dos al grado tres (Tabla 7).

Tabla 7. Características clínico-patológicas de las muestras de cáncer de mama incluidas en este estudio

Características clínicas	Muestras de tejido	
	No metástasis	Metástasis
	n=7	n=4
Edad (años)		
<50	4	3
>50	3	1
Receptores hormonales (IHC)		
RE		
Positivo	0	0
Negativo	0	0
RP		
Positivo	0	0
Negativo	0	0
HER		
Positivo	0	0
Negativo	0	0
Tipo basal	7	4
Estadio clínico		
I	0	0
II	4	1
III	3	0
IV	0	3
Grado tumoral		
G1	0	0
G2	1	2
G3	6	2
G4	0	0

Para examinar presencia de estructuras tipo canal que son características del mimetismo vasculogénico, se realizó una doble tinción CD31/PAS, los vasos sanguíneos presentaron un marcaje positivo para CD31 debido a presencia de las células endoteliales (color café), por otro lado, se presentó una reacción PAS positiva en las paredes que rodean las células endoteliales y las estructuras tipo canal (rosa), como control de tinción se utilizó en tejido altamente vascularizado de amígdala. Como se puede ver en la columna uno y dos, el anticuerpo para CD31 es altamente específico para la detección de células endoteliales que recubren a los vasos sanguíneos (flechas azules). Las columnas tres y cuatro son imágenes representativas de las muestras de tejido de mama no metastásico H-1456-20, H-2261, H-2334-20, H-1997-20, H-1575-20 y H-2133-20; en la columna tres se puede observar la presencia de estructuras tipo canal negativas para CD31 y positivas para PAS, además, en su interior se puede ver la presencia de eritrocitos (asterisco rojo) dispuestos en la luz de la estructura, esto indica que estos canales son funcionales y pueden transportar sangre, por lo tanto existen estructuras tipo canal características del MV (flechas amarillas) en todas las muestras no metastásicas. Por otra parte, en ciertas regiones de las muestras se encontraron vasos endoteliales (flechas azules), como se pueden ver en la columna cuatro, los cuales se caracterizan por ser positivos para CD31(café) y positivos para la tinción con PAS (rosa) (Figura 24).

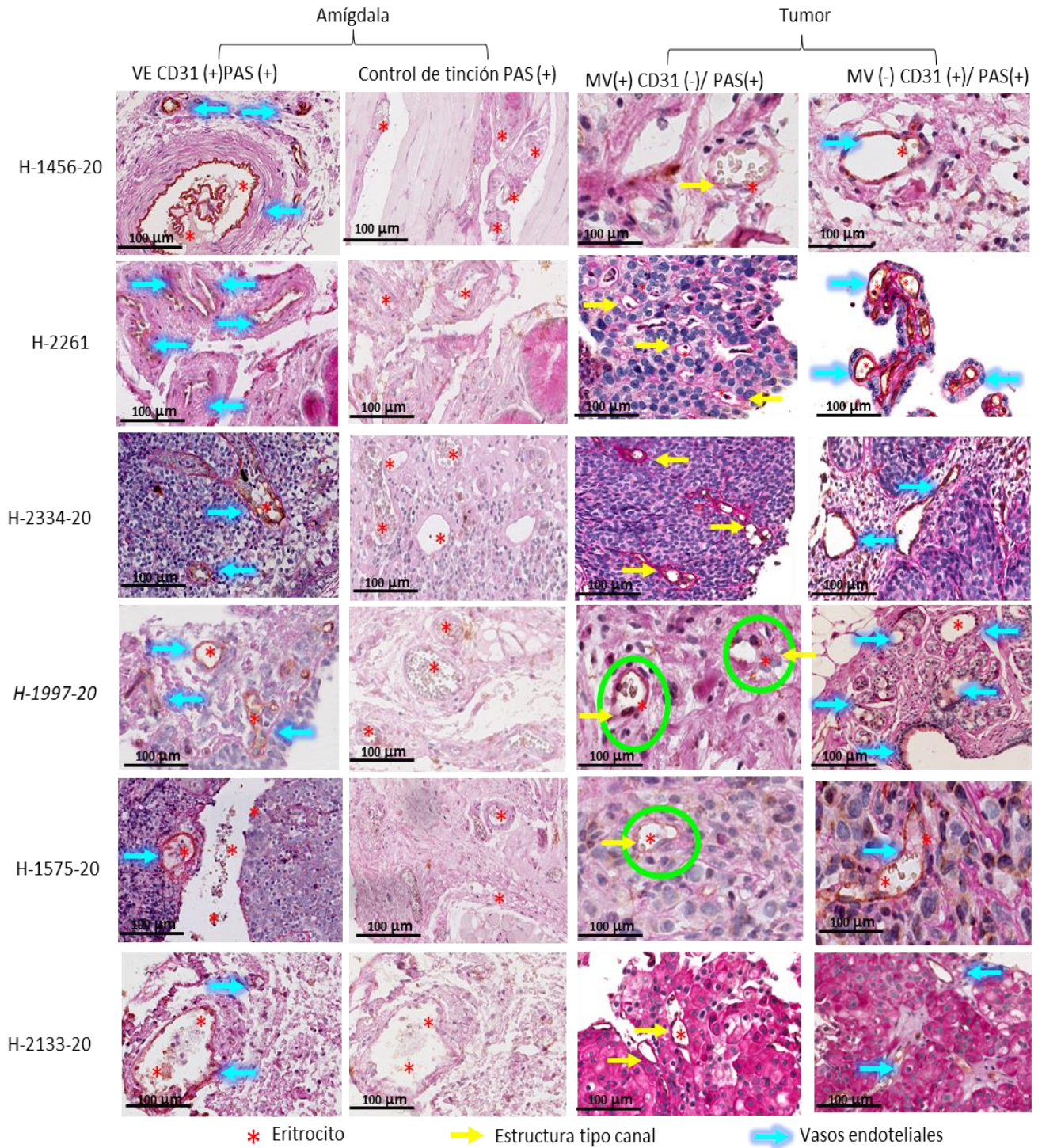


Figura 24. Doble tinción CD31/PAS en cáncer de mama no metastásico. La primera y segunda columna son imágenes representativas del control de tinción en tejido de amígdala altamente vascularizados, control (+) CD31/PAS, control (-) sin CD31, la tercera columna corresponde tejido de mama MV (+) con estructuras tubulares con borde rosados (flechas amarillas) y eritrocitos en su interior (asterisco rojo). La cuarta columna corresponde a tejidos MV (-) mostrando en color café la tinción de células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos (flechas azules).

Para determinar si existen diferencias significativas entre el número de estructuras tipo canal en muestras de cáncer de mama no metastásico, se contó el número de estructuras y se comparó en cada muestra. En general, las muestras presentan un número constante de canales y no hubo diferencias significativas entre muestras, con excepción de la muestra H-2133-20 que presentó número menor en el conteo de canales (Figura 25A).

Con la finalidad de determinar si existen o no diferencias estadísticas en la tinción con CD31 entre los campos de las muestras no metastásicas analizadas, se midió intensidad de tinción del anticuerpo CD31, se utilizaron como control negativo tejido de amígdala (sin anticuerpo) y como control positivo tejido de amígdala con anticuerpo CD31, se observó poca o nula intensidad de CD31 en los campos donde se presentaban las estructuras tipo canal, por otro lado, en los campos con poca presencia canales se presentó un mayor índice de tinción para CD31, lo que indica una mayor número de vasos sanguíneos (Figura 25B).

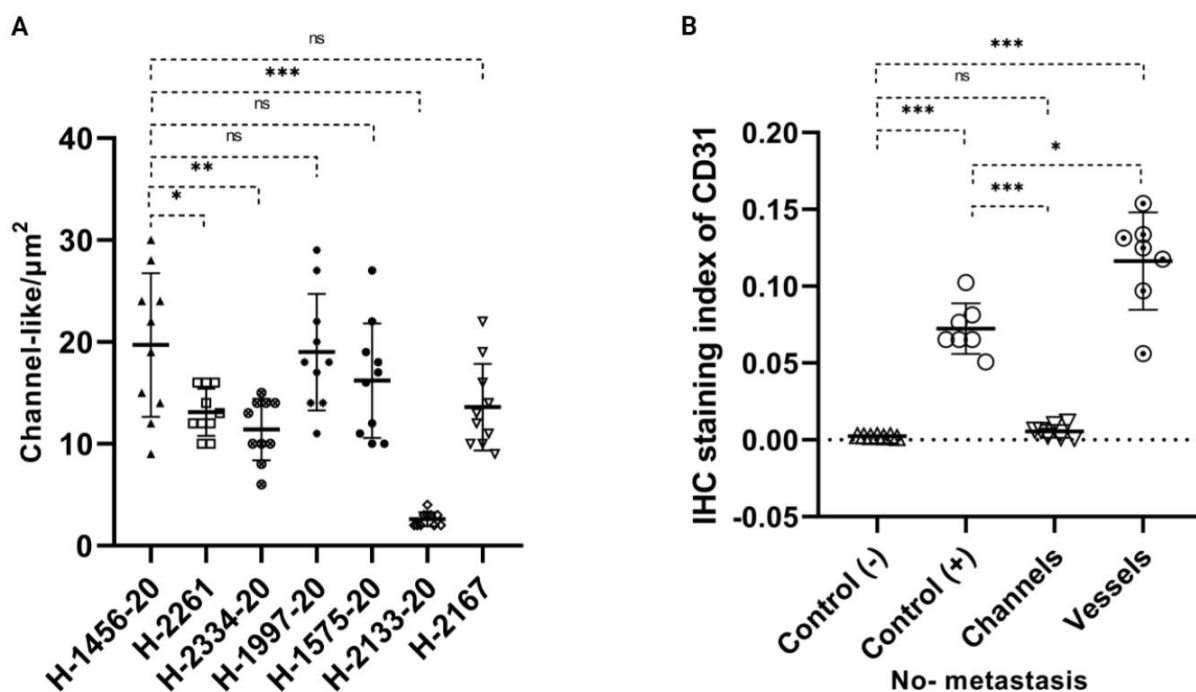


Figura 25. A. Conteo de las estructuras tipo canal en muestras de cáncer de mama no metastásico. B. índice de tinción para CD31 en muestras de cáncer de mama no metastásico * $p < 0.05$, ** $p < 0.0003$, *** $p < 0.0001$, ns; no significativo.

Metástasis

Las estructuras tipos canal características del mimetismo vasculogénico fueron examinada a partir de muestras metastásicas, como control de tinción se utilizaron las secciones de tejido de amígdala (Figura 26, columna uno y dos). Como se puede observar en la Figura 26 se encontraron estructuras tipo canal negativas para el marcaje con CD31 y positivas a la reacción de PAS (rosa) en las paredes que rodeaban estas estructuras, además se observaron grupos de eritrocitos en la luz de estos canales (flechas amarillas columna tres). Los vasos sanguíneos fueron positivos para CD31 (café) y positivos para la reacción PAS en las paredes que rodean las células endoteliales (flechas azules columna cuatro) (Figura 26).

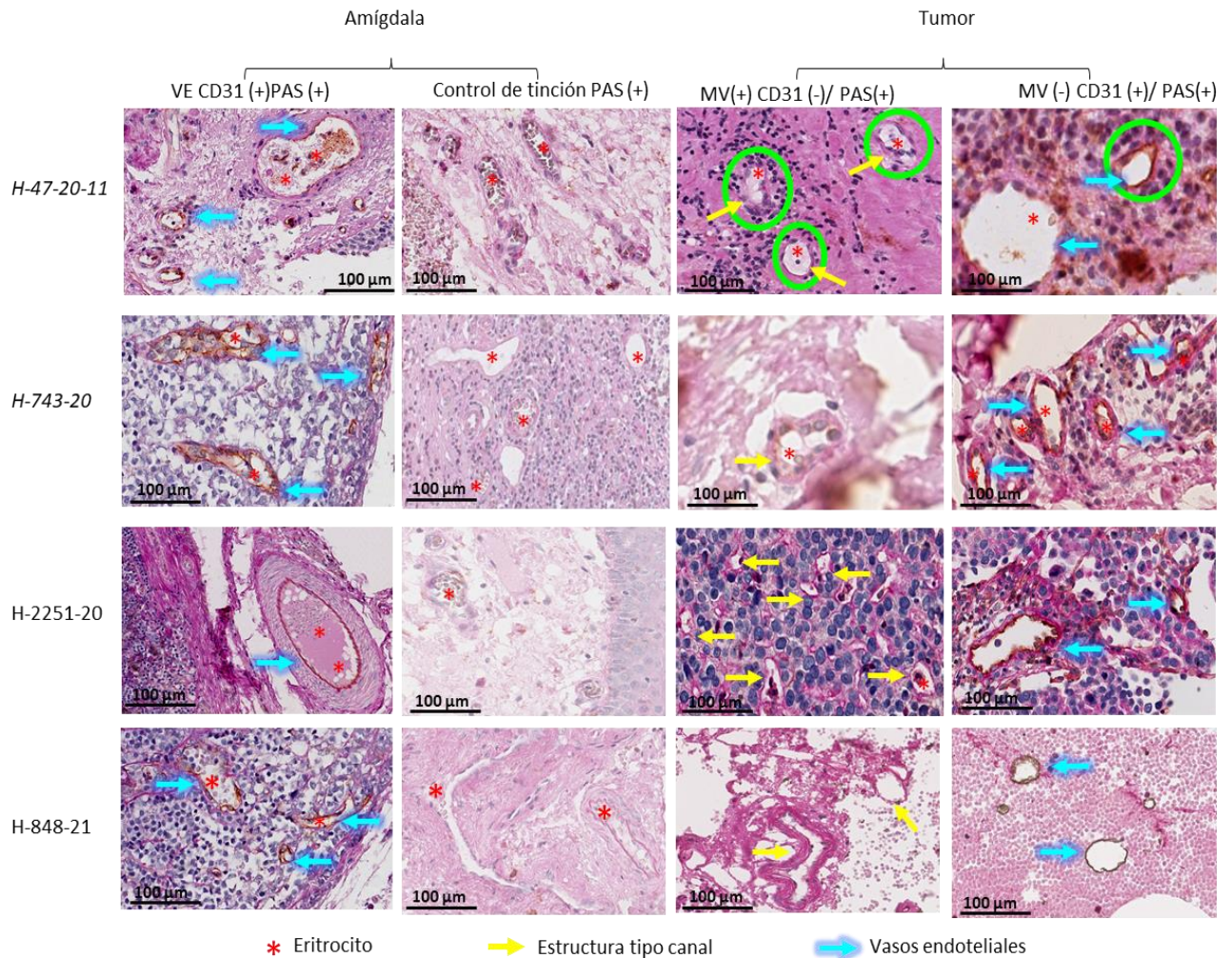


Figura 26. Doble tinción CD31/PAS en muestras de cáncer de mama metastásico. La primera y segunda columna son imágenes representativas de los controles en amígdala,

control (+) con tinción con CD31/PAS, control (-) tinción PAS, la tercera columna corresponde tejido MV (+) con estructuras tubulares, bordes rosados (flechas amarillas) y eritrocitos en su interior (asterisco rojo). La cuarta columna corresponde a tejidos MV (-) mostrando en color café la tinción de células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos (flechas azules).

Posteriormente, se contó el número de estructuras tipo canal en muestras metastásicas y se encontró que el número de canales varía significativamente entre las muestras H-47-20-11, H-2251 y H-848-21, por otro lado, entre las muestras H-47-20-11 vs H-743-20 y H-2251-20 Vs H-848-21 no se observan diferencias significativas en el número de estructuras tipos canales (Figura 27 A). Se cuantificó el índice de tinción de CD31 en campos que contenían estructuras tipo canal y vasos sanguíneos, se utilizó tejido de amígdala como control y como se puede ver en la Figura 27 B, en el control negativo y en los canales no se detectó a CD31 mientras que en el grupo control positivo y vasos sanguíneos fueron positivos a CD31.

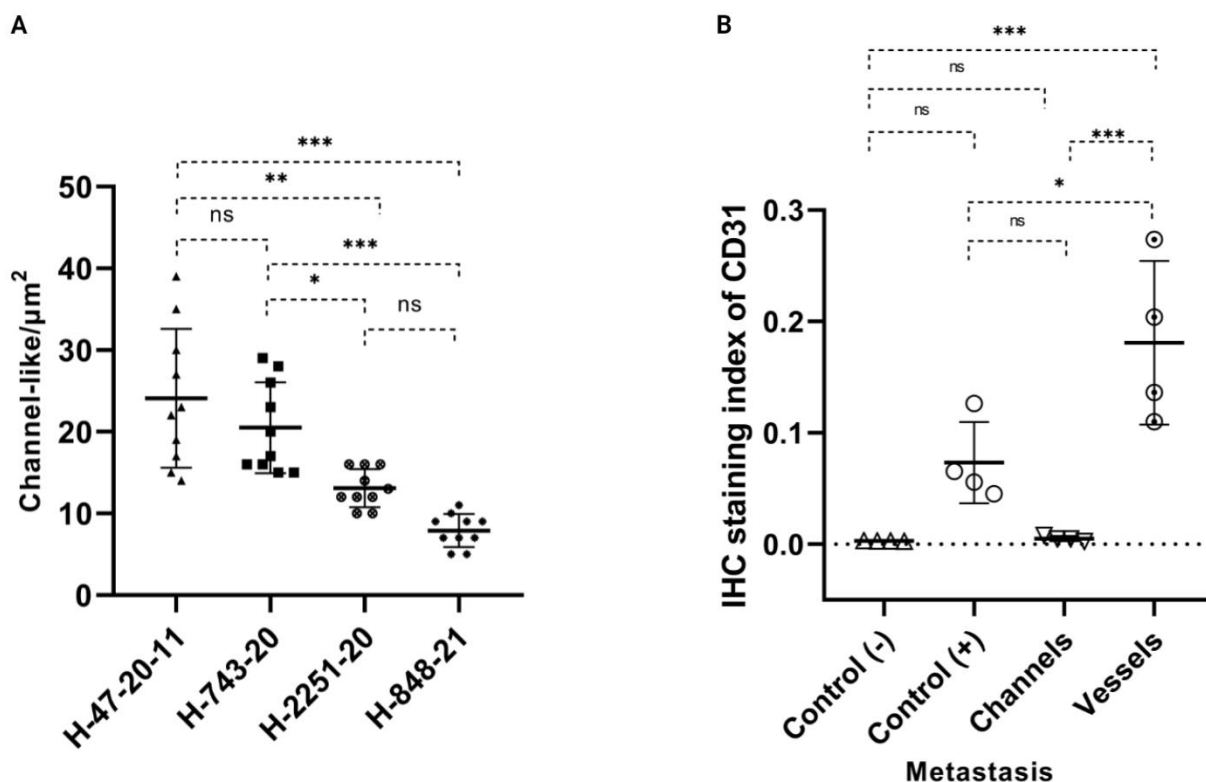


Figura 27. A. Conteo de las estructuras tipo canal en muestras de cáncer de mama metastásico. B. Índice de tinción para CD31 en muestras de cáncer de mama metastásico * $p < 0.05$, ** $p < 0.0003$, *** $p < 0.0001$, ns; no significativo.

Con la finalidad de determinar la abundancia de los lncRNAs en los tejidos de cáncer de mama se realizó primeramente la extracción del RNA Total de las muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina. Cabe mencionar que en algunas muestras se realizó dos veces el procedimiento de extracción para obtener aumentar el rendimiento de RNA. En general se obtuvieron concentración de que iban desde los 13 a 92 ng/ μ L de RNA, como se puede ver hay una cantidad muy baja en cuatro muestras y siete de estas tienen una cantidad aceptable, además la mayoría de ellas poseen proporciones de OD (densidad óptica) 260/280 que oscilaron entre 1.8 y 2.1 lo que indica una buena calidad en la pureza del RNA (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación del RNA total obtenido a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.

<i>Tubo</i>	<i>Metástasis</i>	<i>Subtipo</i>	<i>No. Registro</i>	<i>ng/μL</i>	<i>260/280</i>	<i>Volumen</i>	<i>Total (ng)</i>
1	Si	basal	H-743-20-1	92	1.95	36 μ L	3312
2	Si	basal	H-47-20-11	14.4	1.65	36 μ L	518.4
3	Si	basal	H-2251	43.4	2.25	20 μ L	868
4	Si	basal	H-848	69	1.81	17 μ L	1173
5	No	basal	H-1575-20	413.1	2.01	36 μ L	14871.6
6	No	basal	H-1997-20	47.4	1.93	56 μ L	2654.4
7	No	basal	H-1456-20-1	83.3	1.96	36 μ L	2998.8
8	No	basal	H-2167-19	73	2.11	20 μ L	1460
9	No	basal	H-2261-20	52.9	1.97	20 μ L	1058
10	No	basal	H-2334-20	33.3	2.3	20 μ L	666
11	No	basal	H-2133-20	13.4	1.81	40 μ L	536

Como era de esperarse, cuando los extractos se separaron en gel de agarosa se observó que todas las muestras provenientes de tejido embebido en parafina muestran unas bandas barridas, lo que indica que el RNA está fragmentado comparación con el RNA extraído de líneas celulares en donde se puede observar claramente las subunidades 28s, 18s y 5s (Figura 28).

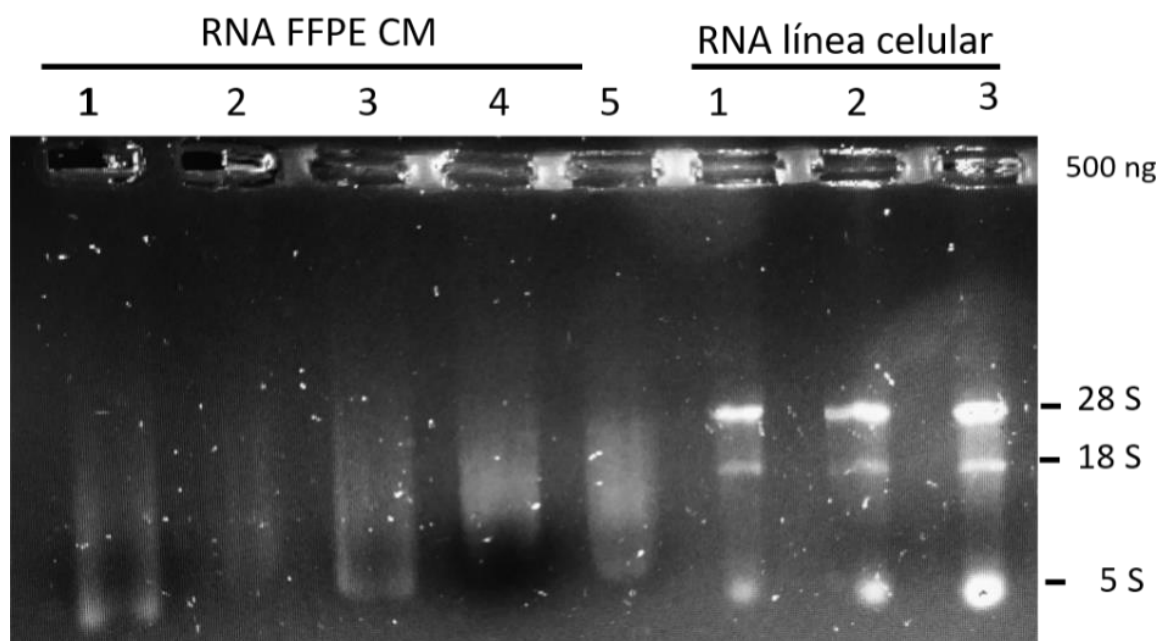


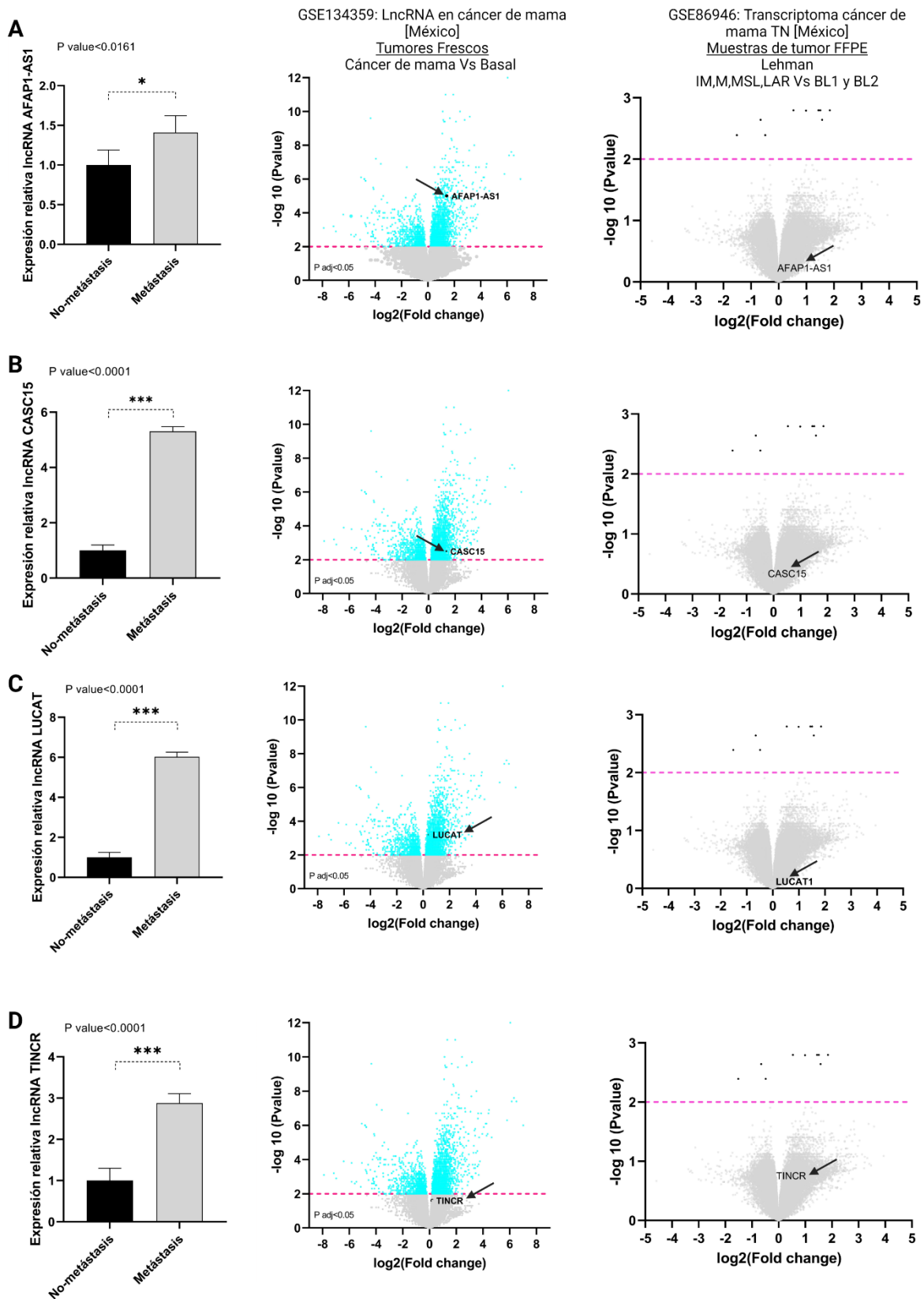
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. 1-5. RNA total obtenido a partir de muestras incluidas en parafina. Los carriles de la derecha 1-3 son de muestras de RNA provenientes de líneas celulares de pulmón que se utilizaron para comparar la integridad de RNA total.

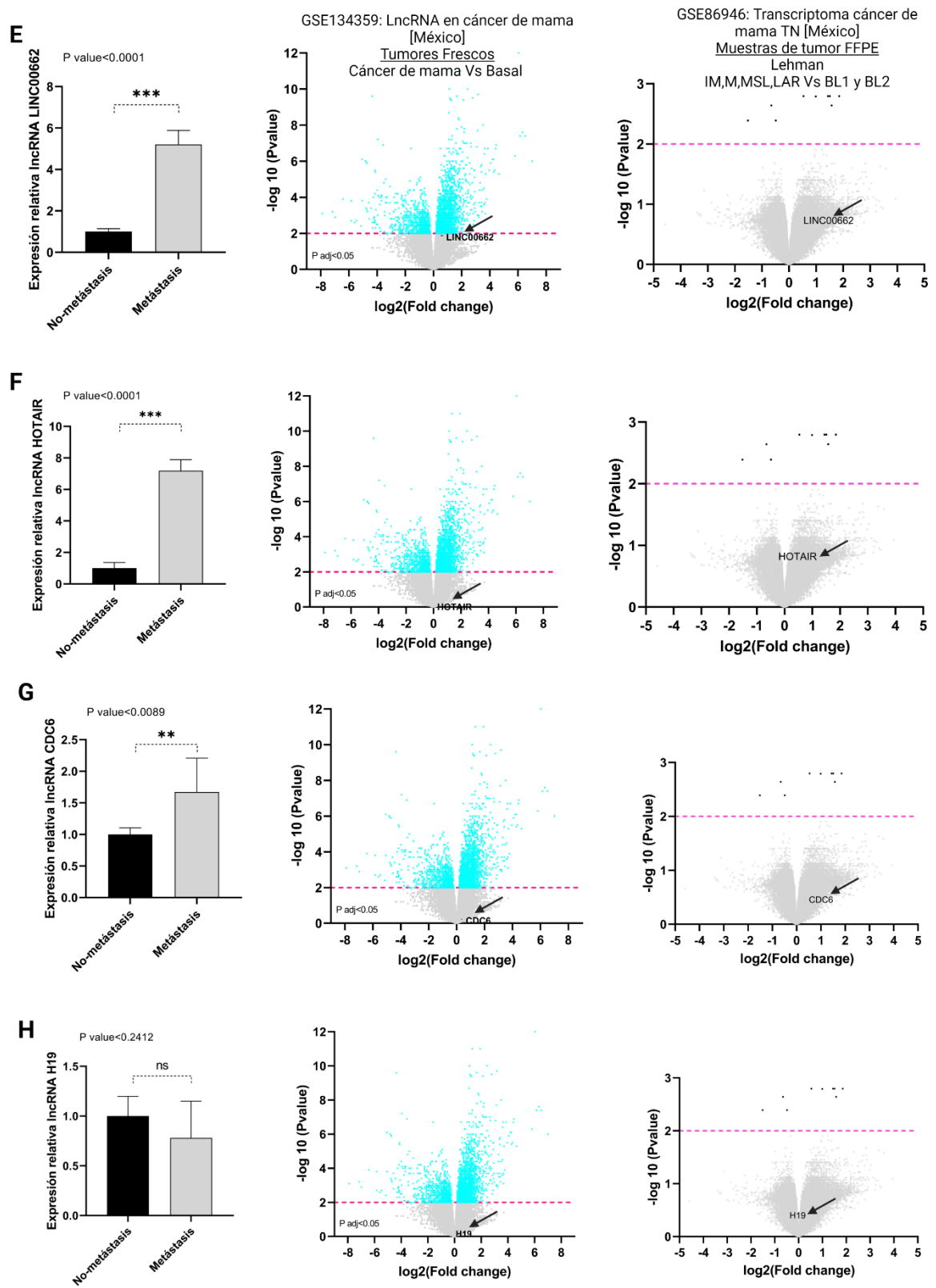
Análisis de expresión de un conjunto de lncRNAs a partir de muestras no metastásicas y metastásicas que presentan mimetismo vasculogénico

Para corroborar la expresión de lncRNAs en la cohorte de pacientes mexicanas de cáncer de mama no metastásica y metastásica provenientes de muestras FFPE, se validó la expresión de diez lncRNAs en dos cohortes independientes de tumores de mama provenientes de la base datos pública GEO, la primera cohorte con número de registro GSE134359 contenía un total de 75 muestras frescas colectadas por la Fundación de cáncer de mama (FUCAM) en México. Dichos tumores estaban clasificados en el subtipo molecular pam50, en donde 65 de ellas se clasificaban en

Luminal A, Luminal B y HER2 y 10 muestras pertenecían al tipo basal. La segunda cohorte de estudio con número de serie GSE134359 contiene el transcriptoma completo de 158 tumores de cáncer de mama triple negativos (TNBC), los tumores de mama prevenían de los archivos FFPE del FUCAM y estaban clasificados conforme al subtipo Lehmann.

Al comparar los datos de expresión se encontró que los lncRNAs AFAP1-AS1, CASC15, LUCAT1, TINCR y LINC00662 presentaban una alta expresión en las muestras metastásicas que se usaron en este estudio y en muestras de tumores frescos, sin embargo, la expresión de estos transcritos no fue significativa en muestras de tumores provenientes de FFPE (Figura 29 A-E). Por otro lado, HOTAIR y lncRNA-CDC6 son los genes más expresados en muestras metastásicas de este estudio, pero no presentaron cambios en su expresión estadísticamente significativos en la cohorte de muestras frescas ni en la cohorte de muestras FFPE (Figura 29 F,G). Asimismo se determinó que no había diferencias significativas en la expresión de H19 en muestras no metastásicas y metastásicas, en muestras frescas ni en muestras FFPE (Figura 29 H), por último no se encontraron diferencias significativas en la expresión de LINC01087 entre las muestras no metastásicas y metastásicas, pero curiosamente este transcrito tuvo una baja expresión en muestras frescas y no se encontraron datos de expresión en muestras FFPE (Figura 29 I). En ninguna de las cohortes de estudio se encontraron datos de expresión de LINC00511 (Figura 29). La lista de primers utilizada para la detección de los lncRNAs en este estudio se encuentra en el anexo 1.





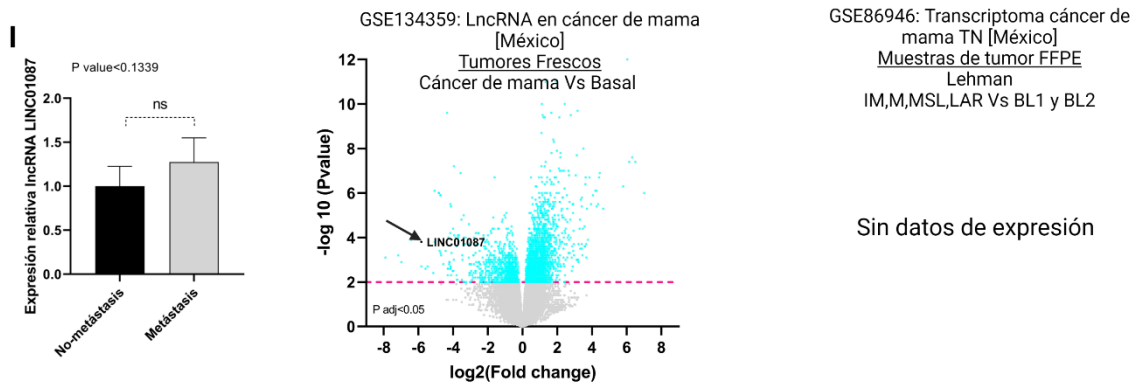


Figura 29. Nivel de expresión de RNAs largos no codificantes en cohortes diferentes de cáncer de mama, el gráfico de volcán azul de la columna dos fue construido a partir de datos de expresión provenientes de una cohorte mexicana donde se emplearon tumores frescos, el mapa de volcán de la columna tres está construido con datos de expresión de muestras de FFPE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.003$, *** $p < 0.0001$. ns; no significativo. Los puntos en gris indican a los transcritos sin significancia estadística, los puntos azules indican los transcritos con valor de p significativo, hacia la izquierda con un fold change negativo ($\log_2 FC < 0$) se encuentran los transcritos baja expresión, hacia la derecha con fold change positivo ($\log_2 FC > 0$) indica transcritos alta expresión.

Modelo de rutas de señalización potencialmente reguladas por el conjunto de lncRNAs asociados a metástasis y mimetismo vasculogénico

Para entender cómo este grupo de lncRNAs con alta expresión podrían estar regulando las vías relacionadas con la metástasis y mimetismo vasculogénico se utilizó la plataforma de código abierto ENCORI para estudiar las interacciones, RBP-lncRNA, lncRNA-ceRNA y lncRNA-RNA, cabe señalar que estas interacciones RBP-RNA respaldadas por datos derivados CLIP-seq. Se encontró que el lncRNA AFAP1-AS1 podía interactuar con 12 proteínas de unión con RNA (RBPs), podía competir con 8 RNA por la unión de 45 mi RNAs, y podía estabilizar el RNAm de USP36 y FAM239B. El lncRNA CASC15 podía interactuar con 17 proteínas, no se encontraron datos de ceRNA, también se encontró que podía participar en la estabilización de 10 RNAm y un RNAr. El lncRNA LUCAT1 puede unirse a 19 RBPs, compite con cinco RNAs por la unión de 28 miRNAs, y no hay datos que indiquen que participe como estabilizador de RNAs. Por otra parte, se encontró que el lncRNA LINC00662 puede unirse a 41 RBPs, éste puede estar compitiendo con 90 RNAm y con cuatro lncRNAs por la unión de 85 miRNAs, participa estabilizando tres RNAs: el RNAm de RPS9, dos RNAr el RNA28S5 y RNA18N5. Por último, el lncRNA

HOTAIR puede interactuar con 21 RBPs, compite con 74 RNAm, cuatro lncRNAs y con cuatro RNAs por la unión de 45 miRNAs (Tabla 9).

Tabla 9. Función de las lncRNAs asociados a metástasis y mimetismo vasculogénico

lncRNA	RBP	ceRNA		lncRNA-RNAm
AFAP1-AS1	ADAR, DGCR8, DKC1, ELAVL1, EWSR1, FBL, FUS, RBM47, TAF15, UPF1, WTAP, YTHDC1.	lncRNA	AC007823.1 (3), AC010530.1 (3), AL160290.2 (2), AP000894.2 (2), AL589740.1 (2).	USP36, FAM239B
		RNAm	ZFR (10), KIAA0895 (11), UBE2B (10).	
CASC15	RBP, ADAR, DDX54, DGCR8, DHX9, ELAVL1, FUS, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPM, IGF2BP2, MSI1, RBFOX2, TAF15, TARDBP, U2AF2, UPF1, YTHDC1.	lncRNA	Sin datos	GNAI3, CD46, XPO4, EDNRB, RCC1, SNHG3, TPT1, KRAS, ALDOA, CNOT10, RNA18N5
		RNAm		
LUCAT1	ADAR, BUD13, EIF4A3, ELAVL1, HNRNPA1, HNRNPC, HNRNPK, HNRNPU, SF3B4, SRSF1, SRSF3, SRSF7, SRSF9, TIA1, TRA2A, U2AF1, U2AF2, UPF1, YTHDC1.	lncRNA	AL136164.3 (4).	Sin datos
		RNAm	NCOA1 (8), DPPA3 (2), SOD2 (7), NLK (7).	
LINCO0662	CSTF2T, DDX54, DGCR8, DHX9, DICER1, ELAVL1, EWSR1, FAM120A, FMR1, FUS, FXR1, FXR2, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPK, HNRNPM, HNRNPU, HNRNPUL1, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, KHDRBS1, LIN28B, METTL3, MOV10, PRPF8, RBFOX2, SLTM, SND1, SRSF1, SRSF7, SRSF9, TAF15, TARDBP, TRA2A, TROVE2, U2AF1, U2AF2, UPF1.	lncRNA	HSPD1P18 (3), TOLLIP-AS1 (4), AC094019.1 (3), AP002387.1 (3).	RPS9, RNA28S5, RNA18N5,
		RNAm	HSPA1B (10), ZNF709 (16), AC008758.1 (15), ZBTB44 (31), ESYT1 (22), PHKA1 (20), DIAPH1 (30), WDHD1 (18), NPR3 (26), IL7R (17), SH3BP2 (26), TMEM39B (13), TAF7 (17), FCGRT (12), MYC (13), TCAIM (30), PAFAH1B2 (24), TSEN15 (21), FAM221A (11), DOT1L (16), ADCY6 (28), CLCN3 (24), EIF2AK3 (18), KIAA1324 (12), UBE2B (21), PLXNA3 (19), OOE (5), ETS1 (33), SOX9 (26), PRKD2 (8), DHX35 (17), COL4A4 (25), SDHAF2 (16), UBL3 (27), SRPX (12), MAMSTR (9), XPO5 (23), HIRA (17), PMPCB (14), TLL1 (25), TBC1D5 (29), FOXF1 (12), TUFT1 (24), MAPK9 (23), ATG13 (23), VCL (28), CDC25B (22), DUSP9 (14), RBM23 (20), SOX6 (27), LYPLA2 (16), CTDSP2 (30), FEZ2 (19), VEGFA (26), USP13 (22), SOD2 (24), TCF3 (24), INTS2 (24), RAB10 (29), THBS1 (29), SHROOM3 (23), SNAP25 (17), C11orf58 (17), WDR44 (13), SNX11 (22), SLC19A2 (22), AFF3 (28), PTPN12 (18), ACTR8 (20), SPCS3 (23), BIRC5 (24), RNF216 (22), GCLC (21), SMARCA5 (18), HLT (22), KCNK1 (16), TTPAL (31), ERI1 (21), ADGRL2 (23), RAD23B (28), M6PR (22), AHNK (21), CRBN (12), WDR37 (31), CLOCK (33), CD276 (23), MAPK1 (37), PIKFYVE (30), CDC14A (24), MEGF9 (32).	
HOTAIR	DDX54, DGCR8, EIF4A3, ELAVL1, FBL, FMR1, HNRNPA1, HNRNPC, HNRNPK, MOV10, NOP58, NUMA1, PTBP1, RANGAP1, RBM10, SRSF1, U2AF2, UPF1, YTHDC1, YTHDF1, ZNF184	lncRNA	AC010478.1 (6), AC007066.2 (6), PCAT5 (5), LINCO0839 (5), ELMO2P1 (4), ATP6V1B1-AS1 (4), DLG5-AS1 (5), AL139156.3 (4).	RN7SKP9, RN7SKP80
		RNAm	PURB (19), KMT2A (18), RICTOR (17), DCAF7 (17), CDC42BPA (16), PANK3 (16), CRCP (15), E2F2 (15), NAA30 (15), ABCA1 (15), CEMIP (15), BAH1D1 (14), (BRWD3 (14), MYO5C (14), FAM219B (6), TCN2 (6), CXCL6 (6), HS3ST5 (5), RIMBP2 (5), FIBIN (5), COX8C (4), CNTNAP3 (4), SYT16 (4), ARL16 (4), (13), USP14 (13), HDAC4 (13), PAFAH2 (12), TFDLP2 (12), TNFRSF1B (12), MED12L (12), ZNF695 (12), ZNF681 (12), ARL13B (12), FSD1L (12), SLC1A2 (12), SRPK2 (12), PPP6R2 (11), COQ10B (11), EIF2AK4 (11), TBX3 (11), LMAN2L (11), PDE3B (11), PTPRD (11), CHD5 (10), DNMT2 (10), RABL3 (10), IFT22 (10), RASD1 (10), MFSD9 (10), PPP6R1 (10), PHAX (10), SFMBT1 (10), E2F1 (10), PDE5A (10), HNRNPUL1 (10), DNAL1 (9), USF1 (9), MAPRE3 (9), NLE1 (9), SLC16A10 (9), HELZ2 (9), TBP (9), IMPDH1 (9), ENPP5 (9), PNPLA2 (8), LYSDM2 (8), MOCS1 (8), STX16-NPEPL1 (7), FAAP24 (7), LRRC32 (7), GPD1 (7), HSCB (7), FAM53A (6), NEK8.	

Para comprender mejor la relación que tiene el conjunto de genes RBPs y los lncRNAs con alta expresión que participan en el desarrollo de la metástasis y mimetismo vasculogénico se realizó una ontología génica GO. Como resultado de este análisis se encontró que las funciones moleculares en las que estaban enriquecidas estas RBPs pertenecían a: unión a RNA, unión a ácidos nucleicos, unión a al 3'UTR de los RNAm, unión a pre-RNAm, pero la que llama la atención es la unión a DNA telomérico en donde participan HNRNPA2B1 que puede interaccionar con el lncRNA CASC15 y LINC00662; HNRNPA1 con LUCAT1, LINC00662 y HOTAIR; HNRNPD con LINC00662; por último, UPF1 que interactúa con los cinco lncRNAs (Tabla 8) (Figura 30A). Por otra parte, el análisis de componentes celulares reveló que estas RBPs se encuentran en los complejos ribonucleoproteicos, nucleoplasma, en complejo del splicing, cuerpos nucleares que consta de 23 RBPs relacionadas con los cinco lncRNAs, otra que llama la atención son los cuerpos nucleares que consta de 14 RBPs (Figura 30B).

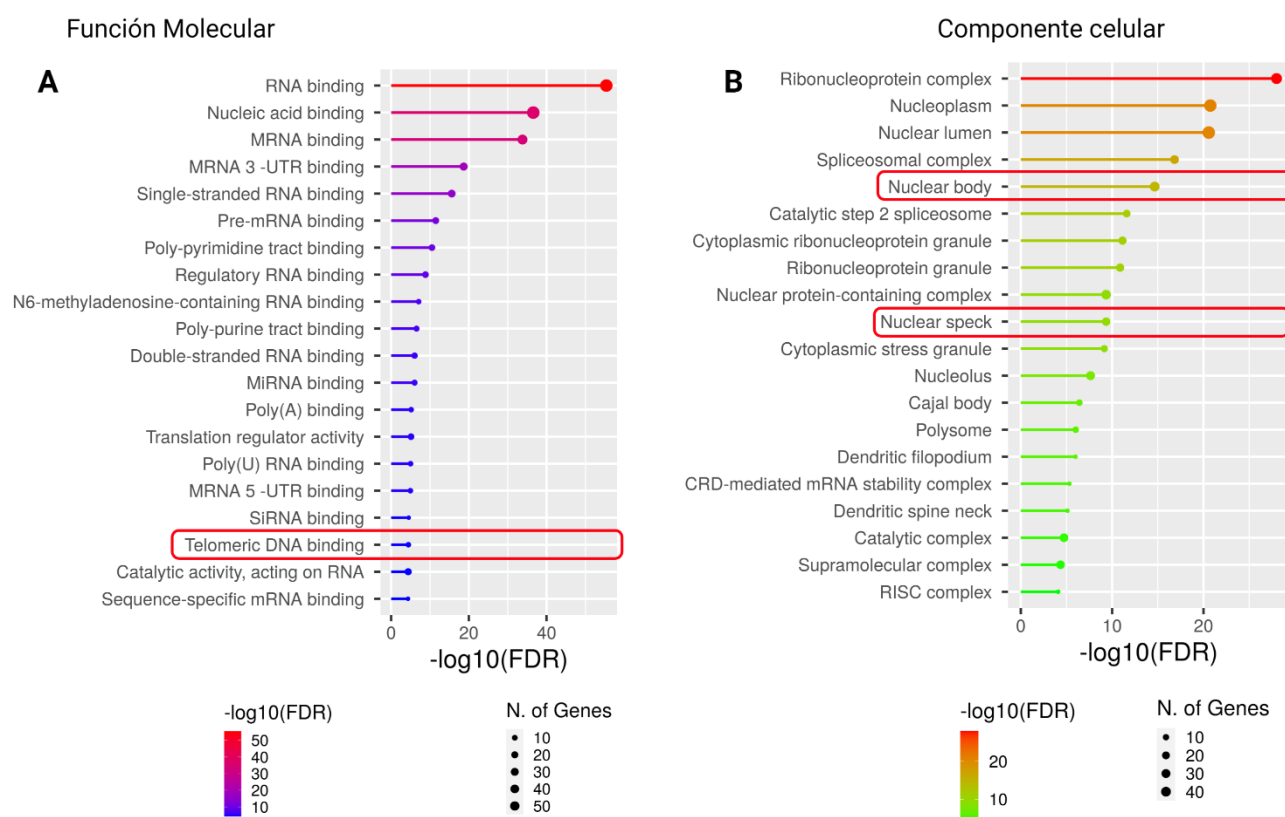


Figura 30. Análisis de ontología genética GO de proteínas de unión a RNA. Las gráficas muestran los 20 términos más significativos.

Para analizar más a profundidad los procesos moleculares en donde se enriquecían los genes de ceRNAs que se encontraron relacionados con los cinco lncRNAs participan en el desarrollo de la metástasis y mimetismo vasculogénico, se realizó una ontología génica GO. Entre las funciones moleculares en las que participan estos genes ceRNA destacan: unión a factores de transcripción, actividad MAP cinasa, unión a modificadores de la histona H3K27me3 y actividad acetiltransferasa del factor activador de plaquetas (Figura 31).

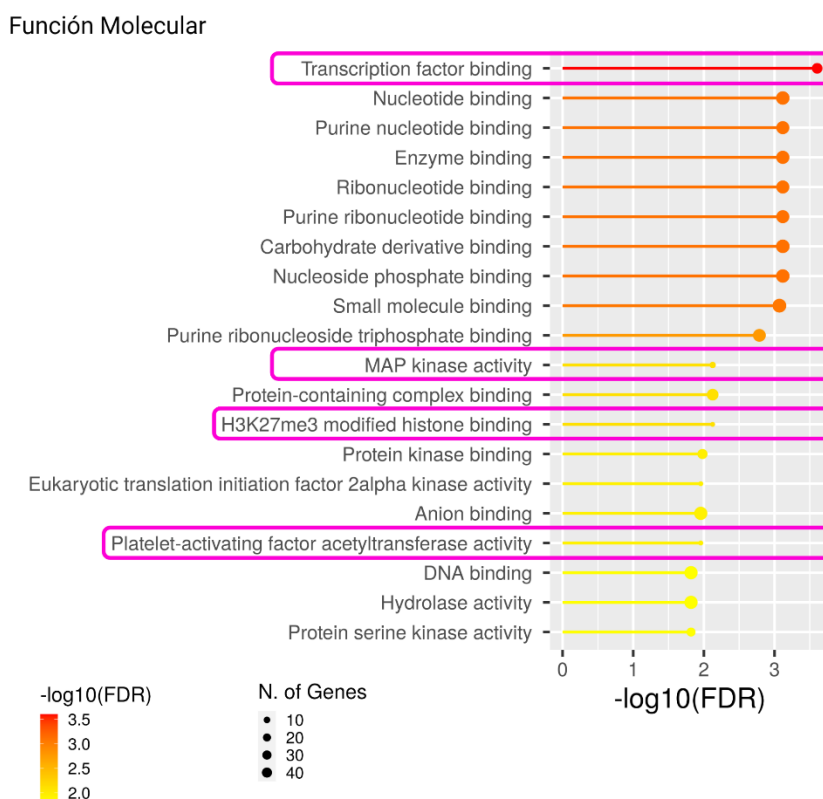


Figura 31. Enriquecimiento funcional en términos GO de la categoría “funciones moleculares” de genes con características ceRNA. La gráfica muestra los 20 términos más significativos y el número de genes.

Posteriormente, se utilizó la base de datos KEGG para hacer un enriquecimiento funcional por rutas e identificar las principales vías en donde participan este conjunto de genes que son regulados por los lncRNAs que se encontraron con alta expresión en este estudio. Entre las vías más enriquecidas para este conjunto de genes se encuentran las relacionadas con cáncer como era esperado, pero las que llaman la atención son las vías relacionadas con la adhesión focal, la vía de señalización MAPK, la vía de señalización de la relaxina y la de FOXO (Figura 32).

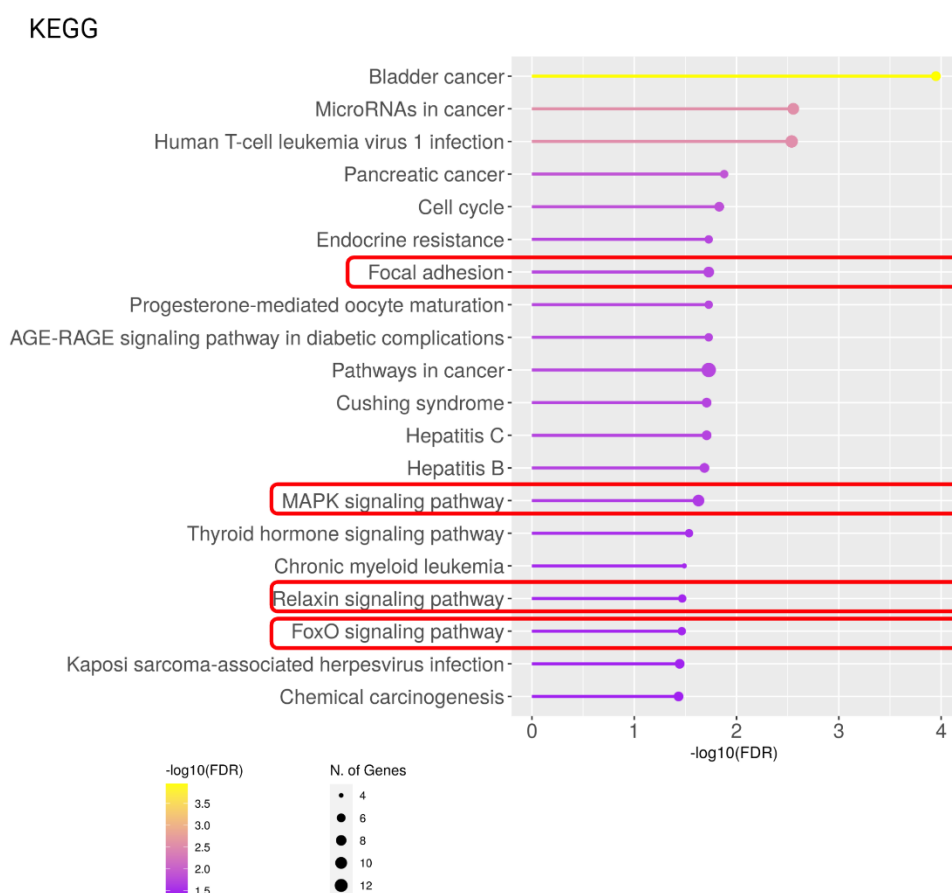


Figura 32. El gráfico muestra las 20 vías Kegg más significativas del conjunto de genes relacionados con los lncRNAs más expresados en metástasis y mimetismo vasculogénico, su p-value y el número de genes involucrados.

8 Modelo

Con la información obtenida de las funciones moleculares y los componentes celulares (donde se localiza) de las RBPs y las ceRNAs se planteó un modelo en donde se sugieren las rutas en donde podrían estar involucrados los lncRNAs con más expresión en este estudio, que promueven el desarrollo de la metástasis y mimetismo vasculogénico (Figura 33).

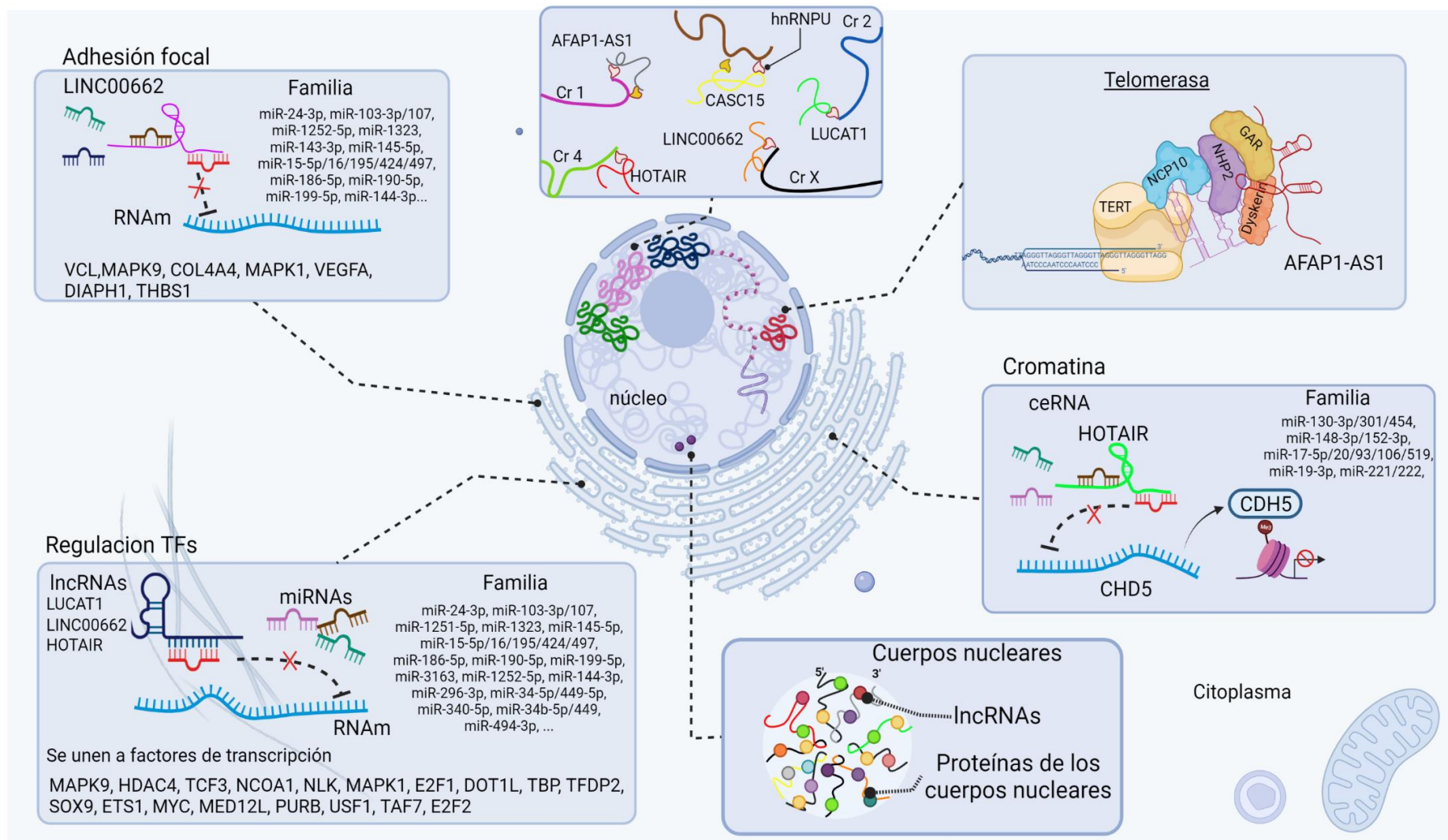


Figura 33. Modelo de las funciones por las cuales los lncRNA más expresados podrían estar regulando la metástasis y mimetismo vasculogénico. Creada en BioRender.com.

9 DISCUSIÓN

De los aproximados 22,000 genes que en la actualidad se cree que existen en el genoma humano, existen grupos de genes cuyos productos proteicos y no proteicos son importantes en el desarrollo de la progresión de la metástasis y el mimetismo vasculogénico, este trabajo pretende identificar algunos genes clave en estos dos procesos. Dada la basta cantidad de artículos que se relacionan con metástasis y en menor medida sobre el mimetismo vasculogénico, es por eso que en este estudio se trató de cortar esa brecha y enlistar sólo aquellos genes que hayan sido validados en modelos de xenoinjerto o que sean provenientes de trabajos experimentales en donde usaron muestras tumorales, también se es consciente que no es posible abarcar en su totalidad el número de genes y rutas relacionadas en estos dos grandes procesos por eso es comprensible que esto sea una pequeña aproximación a lo que realmente sucede en estos dos procesos. Esta búsqueda dio como resultado un total de 192 productos génicos validados que participan en la metástasis y 132 que promueven el mimetismo en diferentes tipos de cáncer, hay que señalar que no se sabe a ciencia cierta cuantos más participan indirectamente en el desarrollo de estos procesos así que este número puede ser mucho mayor en la realidad, sin embargo, en estos dos grupos se encontró que 30 de ellos se comparten entre ambos procesos.

Se encontró que con respecto a los procesos biológicos están enriquecidos los genes relacionados con la locomoción, migración celular, motilidad y diferenciación celular. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Stuelten y cols. en el, 2018 en donde mencionan que uno de los puntos clave para que se lleva a cabo la metástasis es la motilidad de las células tumorales, ya que contribuye en la ruptura de la membrana basal, el escape del tumor primario, la migración de vasos sanguíneos y linfáticos, la intravasación, la extravasación, y el movimiento hacia órganos distantes. El espacio celular en donde se localizan la mayoría de estos productos génicos son: las adhesiones focales, unión célula-sustrato, matriz extracelular y en las uniones celulares, lo cual concuerda con la descripción de la metástasis, ya que este proceso requiere cambios del citoesqueleto, interacciones

de la matriz extracelular, contracciones actina-miosina, desensamble y ensamblaje de las adhesiones focales (Stuelten, Parent y Montell, 2018). Con respecto a las funciones moleculares, los genes más enriquecidos fueron los relacionados con la unión a receptores, enzimas y factores de transcripción, esto es importante ya que la mayoría de los pasos biológicos moleculares comienzan en el núcleo, donde los factores de transcripción estimulan la expresión de múltiples genes implicados en los procesos de la metástasis, un ejemplo de esto es el factor de transcripción TWIST que está relacionado con la transición epitelio mesénquima y puede aumentar la migración intravascular y una extravasación de manera independiente de la integrina B1 (Stoletov *et al.*, 2010). Por otro lado, las vías KEGG más destacadas fueron las relacionadas con proteoglicanos en cáncer y la vía de necrosis tumoral TNF. Los proteoglicanos constan de dos unidades funcionales, un núcleo de proteínas y largas cadenas de glicosoaminoglicanos unidos covalentemente y son componentes importantes de la glucocálix, se sabe que la glucocálix desempeña un papel crucial en las interacciones receptor-ligando en las células cancerosas y su entorno, lo que permite la migración, la intravasación y la extravasación, además se ha visto que los proteoglicanos también contribuyen a promover el inserto y colonización de células cancerosas y parecen desempeñar un papel importante en varios aspectos de la progresión del cáncer. Un ejemplo de estos proteoglicanos es CD44, que está involucrado en la transición epitelio mesenquima , ayuda a prevenir el anoikis y participa en la extravasación, lo que permite que las células metastásicas lleguen a su sitio distante con éxito (Ahrens *et al.*, 2020). También se ha visto que las células del microambiente tumoral como las células inmunitarias inflamatorias y los monocitos pueden provocar que las células cancerosas adquieran un fenotipo migratorio a través de la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el factor de crecimiento tan transformante (TGF- β) (Ham *et al.*, 2016).

De los genes relacionados con el desarrollo del mimetismo vasculogénico, se encontró que estaban enriquecidos los relacionados con la formación de estructuras de la morfogénesis (seudópodos), desarrollo de tubos, desarrollo vascular, de vasos sanguíneos y migración y motilidad celular, la mayoría de los productos de estos

genes se lo localizaban en la superficie de la célula, complejos receptores, adhesiones focales y estaban relacionados con la unión de la célula-sustrato y uniones celulares. Además, las principales funciones moleculares asociadas a los genes relacionados con el mimetismo vasculogénico fueron las asociadas con la unión a factores de crecimiento, receptores transmembranales con actividad cinasa, unión a enzimas y proteínas con actividad cinasa, las vías más destacadas son las relacionadas con las adhesiones focales y la vía PI3K-AKT. Se reportado que las células tumorales que muestran mimetismo vasculogénico pueden proyectar pseudópodos agresivos en donde reclutan a MMP-2, MMP-9 y MMP-14 para degradar el colágeno y la matriz extracelular de la membrana basal promoviendo el MV, la invasión y metástasis. Por otra parte, el proceso de MV también requiere de la expresión de genes que le permitan reclutar células tumorales para la formación de estructuras tipo tubulares, además de que puede haber diferentes formas de angiogénesis en un mismo tumor por lo que crucial la expresión de genes relacionados con la formación de nuevos vasos sanguíneos (Wei *et al.*, 2021).

Los análisis de enriquecimiento mostraron que existen varias rutas y genes que se comparten en ambos procesos por lo que no era descabellado hacer un análisis de enriquecimiento utilizando los dos conjuntos de genes. Los principales procesos biológicos enriquecidos que se encontraron fueron los relacionados con la migración celular, locomoción y motilidad celular, que son fundamentales para los cinco pasos en la progresión de la metástasis y para la formación del MV (Fares *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2021).

El análisis expresión diferencial utilizando el conjunto de datos provenientes de muestras M0 y M1 dio como resultado una mayor expresión de muestras M1 de los genes: E2F1, FOXM1, BIRC5, PTTG1, EZH2, CENPF, ATF4, DRG1, PHGDH, YBX1, KDM1A, BMP4, EGF, BECN1, STAT3, PTGER3, BCL2, LRIG1, AGGF1, PRKAR1A, ACVR1B, SMAD3, MAPK1, PIK3CA, ROCK1, ROCK2, CTNNB1, NOTCH2. Dichos datos concuerdan con las revisiones publicadas a la fecha en donde se menciona que éstos forman parte de un gran grupo de genes que son

piezas clave para el inicio y progresión de la metástasis y mimetismo vasculogénico (Hapach *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Fares *et al.*, 2020).

En el conjunto de datos de cáncer de mama de TCGA se encontró que los lncRNAs relacionados con la metástasis más expresados fueron: AFAP1-AS1, CDKN2B-AS1, MIR4435-2HG, CASC15, HOTAIR, SLC26A4-AS1, LINC00472, LINC00589. Se ha reportado que la alta expresión del lncRNA AFAP1-AS1 pueden promover el crecimiento, invasión y metástasis en cáncer de pulmón y colorrectal (Han *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2016), además, estudios recientes han reportado que puede promover la proliferación e invasión en células triple negativas y su detección en cáncer de mama se asocia a un mal pronóstico (Ma *et al.*, 2019; X. Zhang *et al.*, 2020). En el caso de CDKN2B-AS1, su expresión está relacionada con el desarrollo de la metástasis en hígado, riñón y cáncer cervical; con respecto al cáncer de mama solo hay un estudio de asociación de dicho RNA en una población china, donde mencionan que un SNP de G>A puede aumentar el riesgo de cáncer de mama (Huang *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019; Dasgupta *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022). Se ha reportado que la inhibición del lncRNA MIR4435-2HG inactiva la vía de señalización Wnt/ β -catenina en cáncer de mama (Chen *et al.*, 2021). En lo que respecta al lncRNA CASC15, solo hay un reporte en donde se menciona que este RNA puede regular la troncalidad de células madre en cáncer de mama (Shen *et al.*, 2022). En el caso del lncRNA SLC26A4-AS1 se tiene sólo un estudio estadístico en donde se menciona que su expresión se relaciona con una baja supervivencia (Yi *et al.*, 2021). La expresión del lncRNA LINC00472 que encontramos en este trabajo no concuerda con lo reportado en la literatura, ya que se ha visto expresado a la baja en células y tejidos de cáncer de mama TN, y su expresión puede inhibir la proliferación, invasión y migración de células MDA-MB-231 (Shao *et al.*, 2021), esta variación en la expresión entre lo reportado y los resultados obtenidos puede deberse a los cambios en la metilación de la isla CpG del promotor de este lncRNA que podrían estar ocurriendo durante la metástasis (Shen *et al.*, 2015). El lncRNA LINC00589 también conocido como TSLNC8 se ha visto que puede inhibir la proliferación y la transición de fase G1/S en células de cáncer de mama mediante el eje TSLNC8/miR-214-3p/FOXP2 (Qin *et al.*, 2019).

Los lncRNAs relacionados con mimetismo vasculogénico más expresados en la cohorte de pacientes M1 del TCGA fueron AFAP1-AS1 y HOTAIR. A la fecha solo hay un estudio en osteosarcoma donde se relaciona al lncRNA AFAP1-AS1 con la formación de mimetismo vasculogénico (Shi *et al.*, 2019), por otro lado, el lncRNA HOTAIR ya ha sido bien caracterizado en el desarrollo de la metástasis y mimetismo vasculogénico (Ahn *et al.*, 2010; Lozano-Romero *et al.*, 2020).

El mimetismo vasculogénico se ha observado en diferentes tipos de cáncer, pero la relación que guarda con la metástasis aún no se conoce del todo. En este trabajo se observó la reacción que tiene la doble tinción de CD31/PAS en muestras tumorales de cáncer de mama no metastásico y metastásico que presentan estructuras tipo canal, las cuales son representativas del mimetismo vasculogénico. Las estructuras tipo canal formadas por células tumorales encontraron en todas las muestras de cáncer de mama de este trabajo fueron positivas para PAS, estos resultados proporcionan más evidencia de la importancia del mimetismo vasculogénico en cáncer de mama. Estos datos podrían respaldar la idea de que es necesaria la formación de canales de MV para promover la metástasis en tumores de mama. Además, los datos mostraron que hay un mayor número de estructuras tipo canal en muestras metastásicas que en las no metastásicas lo cual puede deberse a que la formación de estas estructuras tipos canal están formadas por células tumorales, lo que permite que estas puedan desprenderse más fácilmente e invadir otras partes distantes del cuerpo. Lo anterior, concuerda con un trabajo proveniente de datos clínicos con 1238 pacientes con cáncer de mama en el cual la tasa de casos de MV fue mayor, específicamente 24 %, y esto se asoció con mayor tamaño tumoral (> 2 cm), metástasis en ganglios linfáticos, peor grado de diferenciación (grados 2 y 3), y una supervivencia general más corta que aquellos sin MV, lo que corrobora que esta característica se asocia con tumores de cáncer de mama más agresivos y peor pronóstico (Shen *et al.*, 2017). De manera similar, otro estudio mostró que los pacientes con cáncer de mama con tumores MV-positivos se relacionaron con un estado ganglionar positivo y un estadio clínico avanzado, estando la mayoría de los casos de MV en estadios progresivos 2 y 3, por lo que, nuevamente, se asoció la MV a un peor resultado. Un estudio en donde

abordan el papel del MV en la progresión del cáncer y su valor pronóstico en diferentes tipos de tumores corrobora que la presencia de MV en las muestras predice peores resultados de supervivencia de pacientes con cáncer (Liu *et al.*, 2013).

Las muestras de tejido FFPE resultaron en extractos de RNA con concentraciones aceptables, solo una muestra metastásica fue descartada por que no fue suficiente para analizar la expresión de los 10 lncRNAs elegidos. Por otra parte, en el gel de agarosa se observaron bandas poco definidas, lo cual es común debido al origen de las muestras ya que se ha reportado que el RNA proveniente de muestras FFPE está altamente fragmentado, pero contiene fragmentos mayores o iguales a 200 pb lo cual es suficiente para hacer ensayos de RT-PCR cuantitativa (Zhang *et al.*, 2010).

Al analizar la expresión de los 10 lncRNAs en las muestras de pacientes M0 y M1 con MV se encontró que solamente los lncRNAs AFAP1-AS1, CASC15, LUCAT1, TINCR y LINC00662 se encontraban más expresados en la cohorte de pacientes M1 de este estudio y en una cohorte de pacientes de tejido fresco TN. Por otro lado, no se encontró expresión significativa en ninguna de las muestras de la cohorte FFPE. Con respecto al lncRNA AFAP1-AS1, se ha reportado que puede promover la metástasis en otros tipos de cáncer, pero aún no hay evidencia que confirme su papel en la metástasis del cáncer de mama ni en MV, solo hay estudio en osteosarcoma en donde mencionan que este lncRNA puede inducir la EMT lo que promueve fenotipos tumorales que conducen a la invasión y metástasis (Shi *et al.*, 2019). Para el lncRNA CASC15 a la fecha no hay reportes que indiquen su participación en metástasis de cáncer de mama ni en MV. Existe un estudio en donde reportan que el lncRNA LUCAT1 puede favorecer el desarrollo tumoral y la metástasis, pero el papel que juega en MV es aún desconocido (Mou y Wang, 2019). En el caso de TINCR hay un estudio reciente en donde se menciona que este RNA puede detectarse en suero de pacientes en donde funciona como esponja de miR-761 y promueve el potencial metastásico de células de cáncer de mama TN, pero su papel en el desarrollo del MV es desconocido (Zhang, Liu y Li, 2021). Del lncRNA

LINC00662 todavía no existen reportes de su participación en la metástasis de cáncer de mama, pero si en otros tipos de cáncer como: colorrectal, carcinoma de células escamosas de esófago y Carcinoma de Células Escamosas Orales (Cheng *et al.*, 2020; Z. Zhang *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2021); sin embargo, no hay evidencia en la literatura que sugiera su participación en MV.

Por otro lado, HOTAIR y lncRNA–CDC6 presentaron una alta expresión en muestras M1 de este estudio, pero no había cambios significativos en su expresión en la cohorte de muestras frescas TN, tampoco en la cohorte de pacientes FFPE. Se conoce que el lncRNA HOTAIR tiene una alta expresión en diferentes tipos de cáncer incluido el de mama TN, aunque solo hay un trabajo *in vitro* donde sugieren su participación en el desarrollo del MV (Collina *et al.*, 2019; Lozano-Romero *et al.*, 2020). En el caso del lncRNA–CDC6 no hay evidencia reportada de su participación en la metástasis ni en el MV.

Para tratar de comprender los mecanismos moleculares que regulan la metástasis y mimetismo vasculogénico se investigaron las interacciones RBP-lncRNA, lncRNA-ceRNA y lncRNA-RNAs. Con este propósito se determinó que los lncRNAs AFAP1-AS1, CASC15, LUCAT1, LINC00662 y HOTAIR pueden interactuar con las proteínas que conforman los cuerpos nucleares, por lo que no es descabellado sugerir que pueden estar cumpliendo un papel importante. A este respecto, se tienen reportes en los que algunos lncRNAs pueden funcionar como centros o andamios de cuerpos nucleares como es el caso del lncRNA NEAT1, que participan en la formación y mantenimiento de los paraspeckles y se ha visto que el número y morfología de estos cuerpos nucleares se relaciona con la expresión de NEAT1. Los paraspeckles están formados por más de 40 proteínas y participan en la regulación de múltiples genes, por ejemplo, el secuestro de la proteína SFPQ por NEAT1 en los cuerpos nucleares evita que se una a los promotores de genes (Hirose *et al.*, 2014), también se ha visto que este NEAT1 en los cuerpos nucleares puede mejorar el procesamiento de pri-miRNAs (Jiang *et al.*, 2017). Otro ejemplo, es el lncRNA MALAT1 que también se encuentra en la periferia de los cuerpos nucleares, este lncRNA puede regular el splicing de los pre-RNAm uniéndose a las

proteínas SR (Factores de splicing serina/arginina SR) (Tripathi *et al.*, 2010). Por todo lo anterior, se postula que este grupo de lncRNAs encontrados con alta expresión podrían estar participando en el procesamiento de pri-RNAs, pre-RNAm, en la formación de cuerpos nucleares o que podrían simplemente estar interactuando con estas proteínas porque están siendo procesados mediante splicing.

Los lncRNA abundantes presentan varios sitios complementarios para miRNAs y pueden regular la expresión génica como RNAs endógenos competitivos o "esponjas" de miRNA, lo que reduce la disponibilidad de los miRNAs para unirse a los ARNm. En este estudio se identificaron tres grupos de lncRNAs el primero conformado por HOTAIR que podría funcionar como esponja de miRNAs para contribuir con la expresión del regulador de la cromatina CHD5; el segundo grupo conformado por LUCAT1, LINC00662 y HOTAIR podrían competir por la unión de miRNAs con un grupo de RNAm que codifican para factores de transcripción y el tercero formado por LINC00662 que compite con los RNAm que codifican para genes relacionados con las adhesiones focales.

Asimismo, se determinó que el lncRNA AFAP1-AS1 puede interactuar con la proteína Dyskerin, la cual forma parte del complejo de la telomerasa necesario para el alargamiento de los telómeros, por lo que se sugiere que este lncRNA podría darle estabilidad a este complejo. A este respecto existe un precedente de un lncRNA que puede participar en el mantenimiento de los telómeros, su nombre es TERRA, éste se transcribe de regiones teloméricas y al interactuar con la proteína hnRNPA1 puede regular el cambio RPA por POT1 en el DNA de una cadena (ssDNA), la cual recluta al complejo de telomerasa para el alargamiento de los telómeros. Además TERRA puede funcionar como andamio y reclutar a factores de cromatina para formar heterocromatina en los telómeros (Deng *et al.*, 2009; Flynn *et al.*, 2011).

Se encontró que los lncRNAs LUCAT, LINC00662 y HOTAIR podrían estar actuando como esponjas para miRNAs cuyos blancos son RNAm que codifican para proteínas involucradas en la transcripción. Hay evidencia de que el lncRNAs LUCAT

puede estar actuando como un ceRNA que atrapa a miR-7-5p y evita que pueda regular negativamente al factor de transcripción SOX2, al mejorar los niveles de SOX2, también lo hacen la proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama (Li *et al.*, 2020). Existen precedentes de la actividad de LINC00662 como esponja para el miR-320d, esto reduce la disponibilidad de que este miRNA pueda unirse a uno de sus blancos, el factor de transcripción en E2F1 en cáncer de pulmón de células no pequeñas, esto es importante ya que es el único registro de la actividad de este lncRNA en cáncer de mama (Lv *et al.*, 2021).

10 CONCLUSIONES.

Los resultados del presente estudio permiten concluir lo siguiente

- Se identificaron los genes 192 genes y 106 lncRNAs relacionados con la metástasis, 132 genes y 20 lncRNAs relacionados con el mimetismo vasculogénico en todos los tipos de cáncer en la literatura. Además, se analizaron las funciones de estos genes en procesos biológicos, moleculares, localización y las vías de señalización en las que están involucrados, se analizó la expresión de estos genes y lncRNAs en una cohorte de pacientes con muestras no metastásica M0 y metastásica M1 de cáncer de mama y se construyó una red con los genes y lncRNAs más expresados.
- Se determinó que todas las muestras tumorales de cáncer de mama no metastásicas M0 y metastásicas M1 de este estudio, presentaban mimetismo vasculogénico y que las muestras metastásicas presentaban una mayor densidad de estructuras tipo canal.
- Se validó la expresión de 10 lncRNAs relacionados con la metástasis o mimetismo en las muestras de este estudio, y se comparó con los datos de dos cohortes independientes, una de tumores frescos y una de tumores FFPE, ambas de pacientes mexicanas. Se encontró que solo cinco de estos lncRNAs AFAP1-AS1, CASC15, LUCAT1, TINCR y LINC00662 presentaban altos niveles de expresión tanto en las muestras de este estudio y en la cohorte de tumores frescos.
- Mediante la plataforma ENCORI se analizaron las posibles funciones por las cuales estos lncRNAs podrían estar regulando las metástasis y el MV, se estudiaron las interacciones RBP-lncRNA, lncRNA-ceRNA y lncRNA-RNA para formular un modelo, se encontró estos lncRNAs podrían estar participando en la regulación del alargamiento de los telómeros, como RNAs endógenos competitivos con otros lncRNAs y RNAm relacionados con la transcripción y las adhesiones focales, además se postula que podrían estar regulando la metilación en la cromatina y a través de su asociación con hnRNPU podrían estar participando en la organización de la cromatina.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J. B., Rha, S. Y., Shin, S. J., Jeung, H. C., Kim, T. S., Zhang, X., Park, K. H., Noh, S. H., Roh, J. K. and Chung, H. C. (2010) 'Circulating endothelial progenitor cells (EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients', *Cancer Letters*. Elsevier, 288(1), pp. 124–132. doi: 10.1016/J.CANLET.2009.06.031.
- Ahrens, T. D., Bang-Christensen, S. R., Jørgensen, A. M., Løppke, C., Spliid, C. B., Sand, N. T., Clausen, T. M., Salanti, A. and Agerbæk, M. O. (2020) 'The Role of Proteoglycans in Cancer Metastasis and Circulating Tumor Cell Analysis', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., p. 749. doi: 10.3389/fcell.2020.00749.
- Arun, G., Diermeier, S., Akerman, M., Chang, K. C., Wilkinson, J. E., Hearn, S., Kim, Y., MacLeod, A. R., Krainer, A. R., Norton, L., Brogi, E., Egeblad, M. and Spector, D. L. (2016) 'Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 30(1), pp. 34–51. doi: 10.1101/gad.270959.115.
- Basu, G. D., Liang, W. S., Stephan, D. A., Wegener, L. T., Conley, C. R., Pockaj, B. A. and Mukherjee, P. (2006) 'A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells', *Breast Cancer Research*. BioMed Central, 8(6), p. R69. doi: 10.1186/BCR1626.
- Biondani, G., Zeeberg, K., Greco, M. R., Cannone, S., Dando, I., Dalla Pozza, E., Mastrodonato, M., Forciniti, S., Casavola, V., Palmieri, M., Reshkin, S. J. and Cardone, R. A. (2018) 'Extracellular matrix composition modulates PDAC parenchymal and stem cell plasticity and behavior through the secretome', *The FEBS Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 285(11), pp. 2104–2124. doi: 10.1111/FEBS.14471.
- Breier, G., Grosser, M. and Rezaei, M. (2014) 'Endothelial cadherins in cancer', *Cell and Tissue Research* 2014 355:3. Springer, 355(3), pp. 523–527. doi: 10.1007/S00441-014-1851-7.
- Britt, K. L., Cuzick, J. and Phillips, K. A. (2020) 'Key steps for effective breast cancer prevention', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 417–436. doi: 10.1038/s41568-020-0266-x.
- Bruno, A., Focaccetti, C., Pagani, A., Imperatori, A. S., Spagnoletti, M., Rotolo, N., Cantelmo, A. R., Franzi, F., Capella, C., Ferlazzo, G., Mortara, L., Albin, A. and Noonan, D. M. (2013) 'The Proangiogenic Phenotype of Natural Killer Cells in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer', *Neoplasia*. Elsevier, 15(2), pp. 133–IN7. doi: 10.1593/NEO.121758.
- Cáncer, I. N. del (2015) *¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer, 9 De Febrero*. Available at: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> (Accessed: 20 October 2021).
- Chen, C. K., Blanco, M., Jackson, C., Aznauryan, E., Ollikainen, N., Surka, C., Chow, A., Cerase, A., McDonel, P. and Guttman, M. (2016) 'Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 354(6311), pp. 468–472. doi: 10.1126/science.aae0047.
- Chen, D., Tang, P., Wang, Y., Wan, F., Long, J., Zhou, J., Zhuang, M. and Chen, X. (2021) 'Downregulation of long non-coding RNA MR4435-2HG suppresses breast cancer progression via the Wnt/ β -catenin signaling pathway', *Oncology Letters*. Oncol Lett, 21(5).

doi: 10.3892/ol.2021.12634.

Cheng, B., Rong, A., Zhou, Q. and Li, W. (2020) 'LncRNA LINC00662 promotes colon cancer tumor growth and metastasis by competitively binding with miR-340-5p to regulate CLDN8/IL22 co-expression and activating ERK signaling pathway', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. J Exp Clin Cancer Res, 39(1). doi: 10.1186/s13046-019-1510-7.

Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., Min, W., McLendon, R. E., Rich, J. N. and Bao, S. (2013) 'Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth', *Cell*. Cell Press, 153(1), pp. 139–152. doi: 10.1016/J.CELL.2013.02.021.

Chiablaem, K., Lirdprapamongkol, K., Keeratichamroen, S., Surarit, R. and Svasti, J. (2014) 'Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition', *Anticancer Research*, 34(4), pp. 1857–1864.

Chou, Y.-H., Li, S.-H., Liao, S.-F. and Tang, H.-W. (2013) '¿Qué es el cáncer de seno?', *The American Journal of Hospice & Palliative Care*, 30(5), pp. 503–506. Available at: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html%0Ahttps://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html%0Ahttps://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.h>

Collina, F., Aquino, G., Brogna, M., Cipolletta, S., Buonfanti, G., De Laurentiis, M., Bonito, M. Di, Cantile, M. and Botti, G. (2019) 'LncRNA HOTAIR up-regulation is strongly related with lymph nodes metastasis and LAR subtype of triple negative breast cancer', *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, 10(9), pp. 2018–2024. doi: 10.7150/jca.29670.

Coughlin, S. S. (2019) 'Epidemiology of Breast Cancer in Women', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham, pp. 9–29. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_2.

Crosby, Katie, Simendinger, J. and Grange, Christopher, Ferrante, Michelle, Bernier, Trisha, Standen, C. (2014) 'Immunohistochemistry Protocol for Paraffin-embedded Tissue Sections - ADVERTISEMENT', *JoVE*, (86), p. e5064. doi: 10.3791/5064.

Dasgupta, P., Kulkarni, P., Majid, S., Hashimoto, Y., Shiina, M., Shahryari, V., Bhat, N. S., Tabatabai, L., Yamamura, S., Saini, S., Tanaka, Y. and Dahiya, R. (2020) 'LncRNA CDKN2B-AS1/miR-141/cyclin D network regulates tumor progression and metastasis of renal cell carcinoma', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 11(8). doi: 10.1038/s41419-020-02877-0.

Delgado-Bellido, D., Serrano-Saenz, S., Fernández-Cortés, M. and Oliver, F. J. (2017) 'Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin', *Molecular Cancer*. BioMed Central, 16(1). doi: 10.1186/S12943-017-0631-X.

Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H. and Lieberman, P. M. (2009) 'TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres', *Molecular Cell*. NIH Public Access, 35(4), pp. 403–413. doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.025.

Donnem, T., Hu, J., Ferguson, M., Adighibe, O., Snell, C., Harris, A. L., Gatter, K. C. and Pezzella, F. (2013) 'Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment?', *Cancer Medicine*. Wiley-Blackwell, 2(4), p. 427. doi:

10.1002/CAM4.105.

ELSTON, C. W. and ELLIS, I. O. (1991) 'pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up', *Histopathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 19(5), pp. 403–410. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. and Fares, Y. (2020) 'Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited', *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 1–17. doi: 10.1038/s41392-020-0134-X.

Flynn, R. L., Centore, R. C., O'Sullivan, R. J., Rai, R., Tse, A., Songyang, Z., Chang, S., Karlseder, J. and Zou, L. (2011) 'TERRA and hnRNP A1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA', *Nature*. NIH Public Access, 471(7339), pp. 532–538. doi: 10.1038/nature09772.

Ge, S. X., Jung, D., Jung, D. and Yao, R. (2020) 'ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 36(8), p. 2628. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTZ931.

Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., Coinu, A., Martorana, F., De Santo, I., Del Mastro, L., De Laurentiis, M., Puglisi, F. and Arpino, G. (2018) 'Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype', *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier, pp. 102–110. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.06.005.

Giraud, E., Inoue, M. and Hanahan, D. (2004) 'An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis', *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 114(5), pp. 623–633. doi: 10.1172/JCI22087.

Grelet, S., Link, L. A., Howley, B., Obellianne, C., Palanisamy, V., Gangaraju, V. K., Diehl, J. A. and Howe, P. H. (2017) 'A regulated PNUTS mRNA to lncRNA splice switch mediates EMT and tumor progression', *Nature cell biology*. NIH Public Access, 19(9), p. 1105. doi: 10.1038/NCB3595.

Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., Van De Vijver, M. J., Sukumar, S. and Chang, H. Y. (2010) 'Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7291), pp. 1071–1076. doi: 10.1038/nature08975.

Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., Poellinger, L., Lendahl, U. and Bondesson, M. (2005) 'Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state', *Developmental Cell*. Elsevier, 9(5), pp. 617–628. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2005.09.010/ATTACHMENT/C3F31FF0-37F4-4EAC-B0BC-2EF1BFC9B624/MMC1.PDF.

Hacisuleyman, E., Goff, L. A., Trapnell, C., Williams, A., Henao-Mejia, J., Sun, L., McClanahan, P., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Kelley, D. R., Morse, M., Engreitz, J., Lander, E. S., Guttman, M., Lodish, H. F., Flavell, R., Raj, A. and Rinn, J. L. (2014) 'Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 21(2), pp. 198–206. doi: 10.1038/nsmb.2764.

- Ham, B., Fernandez, M. C., D'Costa, Z. and Brodt, P. (2016) 'The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis.', *Trends in cancer research*. PMC Canada manuscript submission, 11(1), pp. 1–27. Available at: /pmc/articles/PMC5138060/ (Accessed: 14 March 2022).
- Hamidi, H. and Ivaska, J. (2018) 'Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis', *Nature Reviews Cancer* 2018 18:9. Nature Publishing Group, 18(9), pp. 533–548. doi: 10.1038/s41568-018-0038-z.
- Han, P., Li, W., Lin, C. H., Yang, J., Shang, C., Nurnberg, S. T., Jin, K. K., Xu, W., Lin, C. Y., Lin, C. J., Xiong, Y., Chien, H. C., Zhou, B., Ashley, E., Bernstein, D., Chen, P. S., Chen, H. S. V., Quertermous, T. and Chang, C. P. (2014) 'A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy', *Nature*. Nature Publishing Group, 514(7520), pp. 102–106. doi: 10.1038/nature13596.
- Han, X., Wang, L., Ning, Y., Li, S. and Wang, Z. (2016) 'Long non-coding RNA AFAP1-AS1 facilitates tumor growth and promotes metastasis in colorectal cancer', *Biological Research*. BioMed Central, 49(1), p. 36. doi: 10.1186/s40659-016-0094-3.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) 'Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis', *Cell*. Elsevier, 86(3), pp. 353–364. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer', *Cell*. Elsevier, pp. 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*. Elsevier, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W. and Reinhart-King, C. A. (2019) 'Engineered models to parse apart the metastatic cascade', *npj Precision Oncology*. Nature Publishing Group, pp. 1–8. doi: 10.1038/s41698-019-0092-3.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. and Cardoso, F. (2019) 'Breast cancer', *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 1–31. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- Hermans-Beijnsberger, S., van Bilsen, M. and Schroen, B. (2018) 'Long non-coding RNAs in the failing heart and vasculature', *Non-coding RNA Research*. KeAi Publishing, 3(3), p. 118. doi: 10.1016/J.NCRNA.2018.04.002.
- Hess, A. R., Seftor, E. A., Seftor, R. E. B. and Hendrix, M. J. C. (2003) 'Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MMP-2 Activity during Melanoma Cell Vasculogenic Mimicry 1'.
- Hirose, T., Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., Yokoi, T., Nakagawa, S., Bénard, M., Fox, A. H. and Pierron, G. (2014) 'NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies', *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 25(1), pp. 169–183. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0558.
- Huang, Y., Xiang, B., Liu, Y., Wang, Y. and Kan, H. (2018) 'LncRNA CDKN2B-AS1 promotes tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting let-7c-5p/NAP1L1 axis', *Cancer Letters*. Elsevier, 437, pp. 56–66. doi: 10.1016/j.canlet.2018.08.024.

Hutchenreuther, J., Vincent, K., Norley, C., Racanelli, M., Gruber, S. B., Johnson, T. M., Fullen, D. R., Raskin, L., Perbal, B., Holdsworth, D. W., Postovit, L. M. and Leask, A. (2018) 'Activation of cancer-associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma', *Matrix Biology*. Elsevier, 74, pp. 52–61. doi: 10.1016/J.MATBIO.2018.06.003.

INEGI (2020) 'Características de las Defunciones Registradas en México Durante 2020, PRELIMINAR', *Comunicado de Prensa num. 402/21*, pp. 1–5. Available at: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pre_07.pdf.

Jafarian, A. H., Kooshkiforooshani, M., Rasoliostadi, A. and Roshan, N. M. (2019) 'Vascular Mimicry Expression in Invasive Ductal Carcinoma; A New Technique for Prospect of Aggressiveness', *Iranian Journal of Pathology*. Iranian Society of Pathology, 14(3), p. 232. doi: 10.30699/IJP.2019.94997.1939.

Jiang, L., Shao, C., Wu, Q. J., Chen, G., Zhou, J., Yang, B., Li, H., Gou, L. T., Zhang, Y., Wang, Y., Yeo, G. W., Zhou, Y. and Fu, X. D. (2017) 'NEAT1 scaffolds RNA-binding proteins and the Microprocessor to globally enhance pri-miRNA processing', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 24(10), pp. 816–824. doi: 10.1038/nsmb.3455.

Jue, C., Lin, C., Zhisheng, Z., Yayun, Q., Feng, J., Min, Z., Haibo, W., Youyang, S., Hisamitsu, T., Shintaro, I., Shiyu, G. and Yanqing, L. (2017) 'Notch1 promotes vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma by inducing EMT signaling', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(2), p. 2501. doi: 10.18632/ONCOTARGET.12388.

Keskin, D. B., Allan, D. S. J., Rybalov, B., Andzelm, M. M., Stern, J. N. H., Kopcow, H. D., Koopman, L. A. and Strominger, J. L. (2007) 'TGF β promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16– NK cells with similarities to decidual NK cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 104(9), pp. 3378–3383. doi: 10.1073/PNAS.0611098104.

Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. (2010) 'Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment', *Cell*. Elsevier, 141(1), pp. 52–67. doi: 10.1016/J.CELL.2010.03.015.

Khalkhali-Ellis, Z., Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Gilgur, A., Bodenshtine, T. M., Hinck, A. P. and Hendrix, M. J. C. (2015) 'Divergence(s) in Nodal Signaling Between Aggressive Melanoma and Embryonic Stem Cells', *International journal of cancer. Journal international du cancer*. NIH Public Access, 136(5), p. E242. doi: 10.1002/IJC.29198.

Kim, H. S., Won, Y. J., Shim, J. H., Kim, H. J., Kim, B. S. and Hong, H. N. (2019) 'Role of EphA2-PI3K signaling in vasculogenic mimicry induced by cancer-associated fibroblasts in gastric cancer cells', *Oncology Letters*. Spandidos Publications, 18(3), p. 3031. doi: 10.3892/OL.2019.10677.

Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Hardy, K. M., Seftor, R. E. B. and Hendrix, M. J. C. (2012) 'Molecular Pathways: Vasculogenic Mimicry in Tumor Cells: Diagnostic and Therapeutic Implications', *Clinical Cancer Research*. NIH Public Access, 18(10), p. 2726. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3237.

Kleaveland, B., Shi, C. Y., Stefano, J. and Bartel, D. P. (2018) 'A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain', *Cell*. NIH Public Access, 174(2), p. 350. doi: 10.1016/J.CELL.2018.05.022.

- Lee, S., Kopp, F., Chang, T. C., Sataluri, A., Chen, B., Sivakumar, S., Yu, H., Xie, Y. and Mendell, J. T. (2016) 'Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins', *Cell*. NIH Public Access, 164(0), p. 69. doi: 10.1016/J.CELL.2015.12.017.
- Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E. and Pietenpol, J. A. (2016) 'Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for neoadjuvant chemotherapy selection', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(6). doi: 10.1371/journal.pone.0157368.
- Li, Y. L., Wang, X. M., Qiao, G. D., Zhang, S., Wang, J., Cong, Y. Z. and Zhu, S. G. (2020) 'Up-regulated lnc-lung cancer associated transcript 1 enhances cell migration and invasion in breast cancer progression', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 521(2), pp. 271–278. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.040.
- Li, Y., Sun, B., Zhao, X., Wang, X., Zhang, D., Gu, Q. and Liu, T. (2017) 'MMP-2 and MMP-13 affect vasculogenic mimicry formation in large cell lung cancer', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Wiley-Blackwell, 21(12), p. 3741. doi: 10.1111/JCMM.13283.
- Lin, H., Pan, J. cheng, Zhang, F. ming, Huang, B., Chen, X., Zhuang, J. tao, Wang, H., Mo, C. qiang, Wang, D. hu and Qiu, S. peng (2015) 'Matrix metalloproteinase-9 is required for vasculogenic mimicry by clear cell renal carcinoma cells', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier, 33(4), pp. 168.e9-168.e16. doi: 10.1016/J.UROLONC.2014.12.007.
- Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., Lin, L., Yao, H., Su, F., Li, D., Zeng, M. and Song, E. (2015) 'A Cytoplasmic NF-κB Interacting Long Noncoding RNA Blocks IκB Phosphorylation and Suppresses Breast Cancer Metastasis', *Cancer Cell*. Cell Press, 27(3), pp. 370–381. doi: 10.1016/J.CCELL.2015.02.004/ATTACHMENT/2FD14EC2-75B3-455D-A90B-6D8864FD0C98/MMC4.XLS.
- Liu, R., Yang, K., Meng, C., Zhang, Z. and Xu, Y. (2012) 'Vasculogenic mimicry is a marker of poor prognosis in prostate cancer', <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.19602>. Taylor & Francis, 13(7), pp. 527–533. doi: 10.4161/CBT.19602.
- Liu, S. J., Dang, H. X., Lim, D. A., Feng, F. Y. and Maher, C. A. (2021) 'Long noncoding RNAs in cancer metastasis', *Nature reviews. Cancer*. NIH Public Access, 21(7), p. 446. doi: 10.1038/S41568-021-00353-1.
- Liu, T. J., Sun, B. C., Zhao, X. L., Zhao, X. M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X. Y., Zhao, N. and Liu, N. (2012) 'CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer', *Oncogene* 2013 32:5. Nature Publishing Group, 32(5), pp. 544–553. doi: 10.1038/onc.2012.85.
- Liu, T., Sun, B., Zhao, X., Gu, Q., Dong, X., Yao, Z., Zhao, N., Chi, J., Liu, N., Sun, R. and Ma, Y. (2013) 'HER2/neu expression correlates with vasculogenic mimicry in invasive breast carcinoma', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Wiley-Blackwell, 17(1), pp. 116–122. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01653.x.
- Lozano-Romero, A., Astudillo-de la Vega, H., del Rocío Terrones-Gurrola, M. C., Marchat, L. A., Hernández-Sotelo, D., Salinas-Vera, Y. M., Ramos-Payan, R., Silva-Cázares, M. B., Nuñez-Olvera, S. I., Hernández-de la Cruz, O. N. and López-Camarillo, C. (2020) 'HOX Transcript Antisense RNA HOTAIR Abrogates Vasculogenic Mimicry by Targeting the AngiomiR-204/FAK Axis in Triple Negative Breast Cancer Cells', *Non-Coding RNA*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 6(2). doi: 10.3390/NCRNA6020019.

- Lu, X. S., Sun, W., Ge, C. Y., Zhang, W. Z. and Fan, Y. Z. (2013) 'Contribution of the PI3K/MMPs/Ln-5γ2 and EphA2/FAK/Paxillin signaling pathways to tumor growth and vasculogenic mimicry of gallbladder carcinomas', *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications, 42(6), pp. 2103–2115. doi: 10.3892/IJO.2013.1897/HTML.
- Lugano, R., Ramachandran, M. and Dimberg, A. (2020) 'Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, pp. 1745–1770. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- Luo, Q., Wang, J., Zhao, W., Peng, Z., Liu, X., Li, B., Zhang, H., Shan, B., Zhang, C. and Duan, C. (2020) 'Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications'. *BioMed Central*, 13(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/S13045-020-00858-6.
- Lv, X., Lian, Y., Liu, Z., Jianguang, X., Zhang, D. and Yin, X. (2021) 'Exosomal long non-coding RNA LINC00662 promotes non-small cell lung cancer progression by miR-320d/E2F1 axis', *Aging. Impact Journals, LLC*, 13(4), pp. 6010–6024. doi: 10.18632/aging.202522.
- Ma, D., Chen, C., Wu, J., Wang, H. and Wu, D. (2019) 'Up-regulated lncRNA AFAP1-AS1 indicates a poor prognosis and promotes carcinogenesis of breast cancer', *Breast Cancer*. Springer Tokyo, 26(1), pp. 74–83. doi: 10.1007/s12282-018-0891-3.
- Majidpoor, J. and Mortezaee, K. (2021) 'Steps in metastasis: an updated review', *Medical Oncology*. Springer, 38(1), pp. 1–17. doi: 10.1007/S12032-020-01447-W/TABLES/3.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J. C. (1999a) 'Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 155(3), pp. 739–752. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J. C. (1999b) 'Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology Inc., 155(3), pp. 739–752. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5.
- Mantovani, A. and Sica, A. (2010) 'Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Current Trends, 22(2), pp. 231–237. doi: 10.1016/J.COI.2010.01.009.
- Mou, E. and Wang, H. (2019) 'LncRNA LUCAT1 facilitates tumorigenesis and metastasis of triple-negative breast cancer through modulating MIR-5702', *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd, 39(9), pp. 1–12. doi: 10.1042/BSR20190489.
- Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O. and Botstein, D. (2000) 'Molecular portraits of human breast tumours', *Nature*. Nature Publishing Group, 406(6797), pp. 747–752. doi: 10.1038/35021093.
- Placke, T., Örgel, M., Schaller, M., Jung, G., Rammensee, H. G., Kopp, H. G. and Salih, H. R. (2012) 'Platelet-Derived MHC Class I Confers a Pseudonormal Phenotype to Cancer Cells That Subverts the Antitumor Reactivity of Natural Killer Immune Cells', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 72(2), pp. 440–448. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-11-1872.

Postepska-Igielska, A., Giwojna, A., Gasri-Plotnitsky, L., Schmitt, N., Dold, A., Ginsberg, D. and Grummt, I. (2015) 'LncRNA Khps1 Regulates Expression of the Proto-oncogene SPHK1 via Triplex-Mediated Changes in Chromatin Structure', *Molecular Cell*. Cell Press, 60(4), pp. 626–636. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2015.10.001/ATTACHMENT/77662C6C-437D-4608-A54D-23EFBBFA32E1/MMC1.PDF.

Qi, H., Sun, B., Zhao, X., Du, J., Gu, Q., Liu, Y., Cheng, R. and Dong, X. (2014) 'Wnt5a promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition via protein kinase C α in epithelial ovarian cancer', *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 32(2), pp. 771–779. doi: 10.3892/OR.2014.3229/HTML.

Qiao, L., Liang, N., Zhang, J., Xie, J., Liu, F., Xu, D., Yu, X. and Tian, Y. (2015) 'Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Wiley-Blackwell, 19(2), p. 315. doi: 10.1111/JCMM.12496.

Qin, C. X., Yang, X. Q., Jin, G. C. and Zhan, Z. Y. (2019) 'LncRNA TSLNC8 inhibits proliferation of breast cancer cell through the MIR-214-3p/FOXP2 axis', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. Verduci Editore s.r.l, 23(19), pp. 8440–8448. doi: 10.26355/eurrev_201910_19156.

Quail, D. F., Taylor, M. J., Walsh, L. A., Dieters-Castator, D., Das, P., Jewer, M., Zhang, G. and Postovit, L. M. (2011) 'Low oxygen levels induce the expression of the embryonic morphogen Nodal', *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 22(24), p. 4809. doi: 10.1091/MBC.E11-03-0263.

Reis, M. and Liebner, S. (2013) 'Wnt signaling in the vasculature', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 319(9), pp. 1317–1323. doi: 10.1016/J.YEXCR.2012.12.023.

Rong, X., Huang, B., Qiu, S., Li, X., He, L. and Peng, Y. (2016) 'Tumor-associated macrophages induce vasculogenic mimicry of glioblastoma multiforme through cyclooxygenase-2 activation', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(51), p. 83976. doi: 10.18632/ONCOTARGET.6930.

Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Schatteman, G. C., Gruman, L. M., Hess, A. R., Kirschmann, D. A., Seftor, R. E. B. and Hendrix, M. J. C. (2002) 'Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry', *Critical reviews in oncology/hematology*. Crit Rev Oncol Hematol, 44(1), pp. 17–27. doi: 10.1016/S1040-8428(01)00199-8.

Seftor, R. E. B., Hess, A. R., Seftor, E. A., Kirschmann, D. A., Hardy, K. M., Margaryan, N. V. and Hendrix, M. J. C. (2012) 'Tumor cell vasculogenic mimicry: From controversy to therapeutic promise', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 181(4), pp. 1115–1125. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.013.

Shao, G., Fan, X., Zhang, P., Liu, X., Huang, L. and Ji, S. (2021) 'Methylation-dependent MCM6 repression induced by LINC00472 inhibits triple-negative breast cancer metastasis by disturbing the MEK/ERK signaling pathway', *Aging*. Impact Journals, LLC, 13(4), pp. 4962–4975. doi: 10.18632/aging.103568.

Shen, P., Yu, Y., Yan, Y., Yu, B. and You, W. (2022) 'LncRNA CASC15 regulates breast cancer cell stemness via the miR-654-5p/MEF2D axis', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd, p. e23023. doi: 10.1002/jbt.23023.

- Shen, Y., Quan, J., Wang, M., Li, S., Yang, Jiao, Lv, M., Chen, Z., Zhang, L., Zhao, X. and Yang, Jin (2017a) 'Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(34), p. 56408. doi: 10.18632/ONCOTARGET.16919.
- Shen, Y., Quan, J., Wang, M., Li, S., Yang, Jiao, Lv, M., Chen, Z., Zhang, L., Zhao, X. and Yang, Jin (2017b) 'Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(34), pp. 56408–56416. doi: 10.18632/oncotarget.16919.
- Shen, Y., Wang, Z., Loo, L. W. M., Ni, Y., Jia, W., Fei, P., Risch, H. A., Katsaros, D. and Yu, H. (2015) 'LINC00472 expression is regulated by promoter methylation and associated with disease-free survival in patients with grade 2 breast cancer', *Breast Cancer Research and Treatment*. Springer New York LLC, 154(3), pp. 473–482. doi: 10.1007/s10549-015-3632-8.
- Shi, D., Wu, F., Mu, S., Hu, B., Zhong, B., Gao, F., Qing, X., Liu, J., Zhang, Z. and Shao, Z. (2019) 'LncRNA AFAP1-AS1 promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma through RhoC/ROCK1/p38MAPK/Twist1 signaling pathway', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central, 38(1). doi: 10.1186/s13046-019-1363-0.
- Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M. and Wakasugi, H. (2001) 'Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer', *Cancer Research*, 61(2), pp. 445–451. Available at: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/2/445.long> (Accessed: 9 February 2022).
- Sinn, H. P. and Kreipe, H. (2013) 'A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition', *Breast Care*. Karger Publishers, pp. 149–154. doi: 10.1159/000350774.
- Špirić, Z., Eri, Ž. and Erić, M. (2015) 'Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in the progression of cutaneous melanoma', *International Journal of Surgical Pathology*. SAGE Publications Inc., 23(8), pp. 629–637. doi: 10.1177/1066896915583694.
- Spring, H., Schüler, T., Arnold, B., Hämmerling, G. J. and Ganss, R. (2005) 'Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 102(50), pp. 18111–18116. doi: 10.1073/PNAS.0507158102.
- Stanca Melincovici, C., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.-M., Roman, A. L. and Mişu, C. M. (2018) 'Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis', *Rom J Morphol Embryol*, 59(2). Available at: <http://www.rjme.ro/> (Accessed: 3 February 2022).
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L. and Huarte, M. (2020) 'Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:2. Nature Publishing Group, 22(2), pp. 96–118. doi: 10.1038/s41580-020-00315-9.
- Stoletov, K., Kato, H., Zardoujian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S. and Klemke, R. (2010) 'Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells', *Journal of Cell Science*. Company of Biologists, 123(13), pp. 2332–2341. doi: 10.1242/jcs.069443.

- Strizzi, L., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Lipavsky, A., Gadiot, J., Blank, C., Seftor, R. E. B., Seftor, E. A. and Hendrix, M. J. C. (2009) 'Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention', *Expert review of dermatology*. NIH Public Access, 4(1), p. 67. doi: 10.1586/17469872.4.1.67.
- Stuelten, C. H., Parent, C. A. and Montell, D. J. (2018) 'Cell motility in cancer invasion and metastasis: Insights from simple model organisms', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 296–312. doi: 10.1038/nrc.2018.15.
- Sun, B., Zhang, D., Zhao, N. and Zhao, X. (2017) 'Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors', *Oncotarget*, 8(18). doi: 10.18632/ONCOTARGET.8461.
- Sun, Q., Chong, F., Jiang, X., Wang, Y., Xu, K., Zou, Y. and Song, C. (2022) 'Association study of SNPs in LncRNA CDKN2B-AS1 with breast cancer susceptibility in Chinese Han population', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon, 143, p. 106139. doi: 10.1016/j.biocel.2021.106139.
- Sun, T., Zhao, N., Zhao, X. L., Gu, Q., Zhang, S. W., Che, N., Wang, X. H., Du, J., Liu, Y. X. and Sun, B. C. (2010) 'Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: Its role in vasculogenic mimicry', *Hepatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 51(2), pp. 545–556. doi: 10.1002/HEP.23311.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/CAAC.21660.
- Tao, W., Sun, W., Zhu, H. and Zhang, J. (2018) 'Knockdown of long non-coding RNA TP73-AS1 suppresses triple negative breast cancer cell vasculogenic mimicry by targeting miR-490-3p/TWIST1 axis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 504(4), pp. 629–634. doi: 10.1016/J.BBRC.2018.08.122.
- The Global Cancer Observatory (Globocan) (2020) 'Mexico Source: Globocan 2020', *International Agency for Research on Cancer WHO*, 929, pp. 1–2. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
- Topczewska, J. M., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Sam, A., Hess, A. R., Wheaton, W. W., Nickoloff, B. J., Topczewski, J. and Hendrix, M. J. C. (2006) 'Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness', *Nature Medicine* 2006 12:8. Nature Publishing Group, 12(8), pp. 925–932. doi: 10.1038/nm1448.
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, S. M., Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P. A., Blencowe, B. J., Prasanth, S. G. and Prasanth, K. V. (2010) 'The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation', *Molecular Cell*. NIH Public Access, 39(6), pp. 925–938. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- Valastyan, S. and Weinberg, R. A. (2011) 'Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms', *Cell*. Elsevier, pp. 275–292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024.
- Vartanian, A., Gatsina, G., Grigorieva, I., Solomko, E., Dombrovsky, V., Baryshnikov, A. and Stepanova, E. (2012) 'The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry', *Clinical and Experimental Medicine* 2012 13:3. Springer, 13(3), pp. 201–209. doi: 10.1007/S10238-012-0190-9.

- Wagenblast, E., Soto, M., Gutiérrez-Ángel, S., Hartl, C. A., Gable, A. L., Maceli, A. R., Erard, N., Williams, A. M., Kim, S. Y., Dickopf, S., Harrell, J. C., Smith, A. D., Perou, C. M., Wilkinson, J. E., Hannon, G. J. and Knott, S. R. V. (2015) 'A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis', *Nature*. NIH Public Access, 520(7547), p. 358. doi: 10.1038/NATURE14403.
- Wang, H., Lin, H., Pan, J., Mo, C., Zhang, F., Huang, B., Wang, Z., Chen, X., Zhuang, J., Wang, D. and Qiu, S. (2016) 'Vasculogenic Mimicry in Prostate Cancer: The Roles of EphA2 and PI3K', *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, 7(9), p. 1114. doi: 10.7150/JCA.14120.
- Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., Jiang, Z., Xu, J., Liu, Q. and Cao, X. (2014) 'The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 344(6181), pp. 310–313. doi: 10.1126/SCIENCE.1251456/SUPPL_FILE/WANG.SM.PDF.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C. and Tabar, V. (2010) 'Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium', *Nature* 2010 468:7325. Nature Publishing Group, 468(7325), pp. 829–833. doi: 10.1038/nature09624.
- Wei, X., Chen, Y., Jiang, X., Peng, M., Liu, Y., Mo, Y., Ren, D., Hua, Y., Yu, B., Zhou, Y., Liao, Q., Wang, H., Xiang, B., Zhou, M., Li, X., Li, G., Li, Y., Xiong, W. and Zeng, Z. (2021) 'Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments', *Molecular Cancer*. BioMed Central. doi: 10.1186/s12943-020-01288-1.
- West, J. A., Mito, M., Kurosaka, S., Takumi, T., Tanegashima, C., Chujo, T., Yanaka, K., Kingston, R. E., Hirose, T., Bond, C., Fox, A. and Nakagawa, S. (2016) 'Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization', *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 214(7), pp. 817–830. doi: 10.1083/JCB.201601071.
- World Health Organization (2020) *Global health estimates: Leading causes of death, The Global Health Observatory, Explore a world of health data*. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Available at: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> (Accessed: 9 November 2021).
- Wu, H., Yang, L. and Chen, L. L. (2017) 'The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation', *Trends in Genetics*. Elsevier Current Trends, 33(8), pp. 540–552. doi: 10.1016/J.TIG.2017.05.004.
- Xiang, J. F., Yin, Q. F., Chen, T., Zhang, Y., Zhang, X. O., Wu, Z., Zhang, S., Wang, H. Bin, Ge, J., Lu, X., Yang, L. and Chen, L. L. (2014) 'Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus', *Cell Research* 2014 24:5. Nature Publishing Group, 24(5), pp. 513–531. doi: 10.1038/cr.2014.35.
- Yang, J. P., Liao, Y. D., Mai, D. M., Xie, P., Qiang, Y. Y., Zheng, L. S., Wang, M. Y., Mei, Y., Meng, D. F., Xu, L., Cao, L., Yang, Q., Yang, X. X., Wang, W. B., Peng, L. X., Huang, B. J. and Qian, C. N. (2016) 'Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis', *Angiogenesis* 2016 19:2. Springer, 19(2), pp. 191–200. doi: 10.1007/S10456-016-9500-2.
- Yang, S., Lim, K. H., Kim, S. H. and Joo, J. Y. (2020) 'Molecular landscape of long noncoding RNAs in brain disorders', *Molecular Psychiatry* 2020 26:4. Nature Publishing Group, 26(4),

pp. 1060–1074. doi: 10.1038/S41380-020-00947-5.

Yao, X. hong, Ping, Y. fang and Bian, X. wu (2011) 'Contribution of cancer stem cells to tumor vasculogenic mimicry', *Protein & cell*. Protein Cell, 2(4), pp. 266–272. doi: 10.1007/S13238-011-1041-2.

Yao, Y., Liu, Y., Jin, F. and Meng, Z. (2021) 'LINC00662 promotes oral squamous cell carcinoma cell growth and metastasis through miR-144-3p/EZH2 axis', *Yonsei Medical Journal*. Yonsei Med J, 62(7), pp. 640–649. doi: 10.3349/ymj.2021.62.7.640.

Yi, W., Shen, H., Sun, D., Xu, Y., Feng, Y., Li, D. and Wang, C. (2021) 'Low expression of long noncoding RNA SLC26A4 antisense RNA 1 is an independent prognostic biomarker and correlate of immune infiltrates in breast cancer', *Medical Science Monitor*. International Scientific Information, Inc., 28, pp. e934522-1. doi: 10.12659/MSM.934522.

Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W. and Yu, S. C. (2020) 'Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress', *Breast Cancer Research*. BioMed Central Ltd, pp. 1–13. doi: 10.1186/s13058-020-01296-5.

Yin, Q. F., Yang, L., Zhang, Y., Xiang, J. F., Wu, Y. W., Carmichael, G. G. and Chen, L. L. (2012) 'Long Noncoding RNAs with snoRNA Ends', *Molecular Cell*. Cell Press, 48(2), pp. 219–230. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.07.033.

Zang, M., Hu, L., Zhang, B., Zhu, Zhenglun, Li, J., Zhu, Zhenggang, Yan, M. and Liu, B. (2017) 'Luteolin suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation through inhibiting Notch1-VEGF signaling in gastric cancer', *Biochemical and biophysical research communications*. Biochem Biophys Res Commun, 490(3), pp. 913–919. doi: 10.1016/J.BBRC.2017.06.140.

Zeng, Z., Bo, H., Gong, Z., Lian, Y., Li, Xiayu, Li, Xiaoling, Zhang, W., Deng, H., Zhou, M., Peng, S., Li, G. and Xiong, W. (2016) 'AFAP1-AS1, a long noncoding RNA upregulated in lung cancer and promotes invasion and metastasis', *Tumor Biology*. Springer, 37(1), pp. 729–737. doi: 10.1007/s13277-015-3860-x.

Zhang, F., Wang, Z. M., Liu, H. Y., Bai, Y., Wei, S., Li, Y., Wang, M., Chen, J. and Zhou, Q. H. (2010) 'Application of RT-PCR in formalin-fixed and paraffin-embedded lung cancer tissues', *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, 31(1), pp. 111–117. doi: 10.1038/aps.2009.178.

Zhang, M. L., Liu, W. W. and Li, W. D. (2021) 'Imbalance of molecular module of tincr-mir-761 promotes the metastatic potential of early triple negative breast cancer and partially offsets the anti-tumor activity of luteolin', *Cancer Management and Research*. Dove Press, 13, pp. 1877–1886. doi: 10.2147/CMAR.S288271.

Zhang, W., Zhou, P., Meng, A., Zhang, R. and Zhou, Y. (2018) 'Down-regulating Myoferlin inhibits the vasculogenic mimicry of melanoma via decreasing MMP-2 and inducing mesenchymal-to-epithelial transition', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Wiley-Blackwell, 22(3), p. 1743. doi: 10.1111/JCMM.13455.

Zhang, X., Zhang, J., Zhou, H., Fan, G. and Li, Q. (2019) 'Molecular Mechanisms and Anticancer Therapeutic Strategies in Vasculogenic Mimicry', *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, 10(25), p. 6327. doi: 10.7150/JCA.34171.

Zhang, X., Zhou, Y., Mao, F., Lin, Y., Shen, S. and Sun, Q. (2020) 'lncRNA AFAP1-AS1 promotes triple negative breast cancer cell proliferation and invasion via targeting miR-145

to regulate MTH1 expression', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-64713-x.

Zhang, Z., Liang, X., Ren, L., Zhang, S., Li, S., Wan, T., Xu, D. and Lv, S. (2020) 'LINC00662 promotes cell viability and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-340-5p and upregulating HOXB2', *Thoracic Cancer*. Thorac Cancer, 11(8), pp. 2306–2315. doi: 10.1111/1759-7714.13551.

Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J. J. and Lee, J. T. (2008) 'Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome', *Science*. NIH Public Access, 322(5902), pp. 750–756. doi: 10.1126/science.1163045.

Zhao, N., Sun, B. C., Sun, T., Ma, Y. M., Zhao, X. L., Liu, Z. Y., Dong, X. Y., Che, N., Mo, J. and Gu, Q. (2012) 'Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2', *Medical Oncology* 2012 29:5. Springer, 29(5), pp. 3599–3607. doi: 10.1007/S12032-012-0245-5.

Zhou, W., Ye, X. L., Xu, J., Cao, M. G., Fang, Z. Y., Li, L. Y., Guan, G. H., Liu, Q., Qian, Y. H. and Xie, D. (2017) 'The lncRNA H19 mediates breast cancer cell plasticity during EMT and MET plasticity by differentially sponging miR-200b/c and let-7b', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 10(483). doi: 10.1126/SCISIGNAL.AAK9557/SUPPL_FILE/AAK9557_SM.PDF.

Zhu, L., Zhang, Q., Li, S., Jiang, S., Cui, J. and Dang, G. (2019) 'Interference of the long noncoding RNA CDKN2B-AS1 upregulates miR-181a-5p/TGFβ1 axis to restrain the metastasis and promote apoptosis and senescence of cervical cancer cells', *Cancer Medicine*. Wiley-Blackwell, 8(4), pp. 1721–1730. doi: 10.1002/cam4.2040.

Anexo 1.

Tabla 10. Características de los primers para lncRNAs

#	Nombres	Proceso	Expresión	Tamaño	Secuencias	Amplicón	TM
1	AFAP1-AS1	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No Si	Alta	1008 bp	5'-AATGGTGGTAGGAGGGAGGA-3' 5'-CACACAGGGGAATGAAGAGG-3'	207 60.5 60.5
2	CASC15	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No No	Alta	1226 bp	5'-CACACGCATGGAAAACCCAG-3' 5'-GAGGACCTGAGCTGTAAGCC-3'	140 60.5 62.5
3	HOTAIR	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si Si Si	Alta	2421 bp	5'-CAGTGGGGAACCTGACTCG-3' 5'-GTGCCTGGTGCTCTCTTACC-3'	94 62.5 62.5
4	H19	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No Si	Alta	2767 bp	5'-TACAACCACTGCACTACCTG-3' 5'-TGGCCATGAAGATGGAGTCG-3'	142 58.5 60.5
5	LINC01087	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No No	Alta	3516 bp	5'- AATTTGCCCAACGTAGATGC-3' 5'- TTCTTGGAGTGCCATTTTCC-3'	218 64.1 60.1
6	LINC00662	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No No	Alta	1829 bp	5'-CACGCTTCTGAAACTGGTGT-3' 5'-TGTACAGCCTGGTGACAGAG-3'	179 58.4 60.5
7	lncRNA- CDC6	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No No	Alta	1453 bp	5'-CTCTGAAATGAACACTACCCAC-3' 5'-CCATCAGCCTTCGGACA-3'	214 60.1 58.4
8	LUCAT1	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No si	Alta	9585 bp	5'-ACCAGCTGTCCCTCAGTGTCT-3' 5'-AGGCCTTTATCCTCGGGTTGCCT-3'	76 66.6
9	TINCR	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No Si	Alta	3733 bp	5'- TGTGGCCCAAACCTCAGGGATACAT-3' 5'- AGATGACAGTGGCTGGAGTTGTCA-3'	213 65.2
10	LINC00511	Metástasis Mimetismo Angiogénesis	Si No No	Alta	1563 bp	5'-CAAGCATGAAAACCTCAGCA-3' 5'-GGTTTGCACAAGGAGAGAGC-3'	107 60.5 60.5
11	GAPDH					5'-TCAAGGCTGAGAACGGGAAG-3' 5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3'	117 60.5 60.5