

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Identificación de microRNAs modulados
durante la metástasis de tumores de cáncer de
mama que desarrollaron mimetismo
vasculogénico**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

ESTEFANIA CONTRERAS SANZÓN

DIRECTOR:

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

CODIRECTORA:

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

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. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Secretario: Dr. Mario César López Camarillo
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Vocal: Dra. María de los Ángeles Carlos Reyes
Instituto de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Lugar donde se realizó el posgrado:
Plantel del Valle, Universidad Autónoma de la Ciudad de México

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario Cesar López Camarillo
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR:

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA:

María Elizbeth Álvarez Sánchez
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES:

Dra. Mónica Sierra Martínez
Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca

Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. Yarely Marlene Salinas Vera
CINVESTAV-IPN

Dra. María de los Ángeles Carlos Reyes
Instituto de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

LECTORES:

Dra. María de los Ángeles Carlos Reyes
Instituto de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México, fondo SALUD-2018-01, proyecto A3-S-33674 “Estudio clínico y molecular de RNAs largos no codificantes en el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.” Convenio I1200/162 /2021.

Agradecemos a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo y ayuda económica brindada para la impresión y empastado de tesis. Yo, Estefanía Contreras Sanzón fui receptor de una beca de Maestría de CONACYT (No. 1035298) a quien agradezco el apoyo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias (INER) por haber hecho posible la realización experimental este trabajo.

Al Dr. César López Camarillo por nuevamente darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por volver creer en mí y todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo. ¡Gracias Dr.!

A la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez, a la Dra. Olga Noehemi Hernández de la Cruz, a la M.C Yarely Marlene Salinas Vera y a la Dra. Mónica Sierra Martínez por sus asesorías, paciencia y apoyo.

A la Dra. Ángeles Carlos Reyes por toda la ayuda brindada para la realización de este proyecto, por las enseñanzas, paciencia y apoyo. De igual forma agradecer al Dr. Víctor del INER por permitirme realizar la parte experimental en su laboratorio.

A Marthita, Iraíz, Fernando, Darío, Jaqueline Castañeda, Laura y Ali por todo su apoyo brindado.

También quiero agradecer de manera muy sincera todos los doctores del posgrado que me enseñaron y guiaron en mi proceso de formación.

A mis amigos y compañeros de generación David, Yussel, Yoali y Abril.

Y a mi familia.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

1. Introducción.....	15
1.1 Anatomía y función de la mama	15
1.2. Clasificación del cáncer de mama	16
1.2.1 Subtipo histológico pre-invasivo o invasivo.....	16
1.2.2 Clasificación TNM	18
1.2.3 Subtipos moleculares del cáncer de mama	20
1.3. Tratamiento del CMTN.	23
1.4. Herramientas moleculares.....	25
1.5. Neovascularización tumoral.....	27
Antecedentes particulares	28
2. Mimetismo Vasculogénico	28
2.1. Factores que impulsan el desarrollo del MV	29
2.3. Vía de señalización del MV	32
3. Proceso de metástasis	36
4. Metástasis en cáncer de mama.....	39
5. Mimetismo vasculogénico como impulsor de la metástasis	42
6. Biogénesis de miRNAs.....	43
6. Regulación del MV y la metástasis por miRNAs.	45
8. Regulación del MV por miRNAs como impulsor de la metástasis en cáncer de mama.....	45
9. Justificación.....	48
10. Hipótesis	48
11. Objetivo general	49
12. Objetivos particulares	49
13. Estrategia experimental	50
14. Métodos	51
14.1 Obtención de biopsias de cáncer de mama tiple negativo.....	51
14.2 Identificación de MV por doble tinción de CD31/PAS en CMTN mediante inmunohistoquímica.....	51
14.3 Extracción de RNA total a partir de muestras embebidas en parafina.....	52
14.4 Determinación de la expresión de miRNAs.	53
14.5 Análisis bioinformáticos de los datos públicos de cáncer de mama	55
14.6 Análisis estadísticos.....	55
15. Resultados	56
15.1 Identificación <i>in silico</i> de miRNAs asociados con metástasis en pacientes con cáncer de mama.	56
15.2. Redes de interacción de los metastamiRs con genes blancos que promueven la metástasis en cáncer de mama.	59
15.3. Predicción de metastamiRs que regulan mRNAs involucrados en el mimetismo	

vasculogénico en cáncer de mama.....	61
15.4. Redes de interacción de los metastamiRs con genes blancos que promueven el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.....	63
15.5. Genes relacionados en la metástasis y MV.....	65
15.6. El nivel de expresión de las proteínas TGFB1, AKT1, MMP14 promueven la metástasis en cáncer de mama.	67
15.7. Analisis de enriquecimiento funcional y vías de señalizacion de los metastamiRs en cáncer de mama.	69
15.8. Características clínicas de las pacientes con cáncer de mama.....	71
15.9 Identificación del MV mediante tinciones dobles de CD31/PAS en tejido tumoral de CMTN.	73
15.10. Identificación de la presencia de MV en biopsias de tumores mamarios triple negativo metastásicos y no metastásicos de pacientes mexicanas	75
15.11. Análisis de expresión de miRNAs que regulan el MV y metástasis en CMTN.	80
15.12. Expresión relativa de miRNAs que regulan la metástasis y el MV en CMTN.....	82
15.13. Vías de señalización que promueven el MV y la metástasis regulada por miRNAs en CMTN en población mexicana.	86
16. Discusión.....	89
17. Conclusión	97
18. Perspectivas a futuro para este proyecto.....	98
20. Cronograma de actividades.....	99
21. Referencias	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial.....	16
Figura 2. Clasificación histológica y molecular del cáncer de mama.	18
Figura 3. Clasificación del cáncer de mama triple negativo.	22
Figura 4. Hallmarks del cáncer.	26
Figura 5. Tipos de vascularización presentes en los tumores.....	27
Figura 6. Marcadores moleculares y factores biológicos involucrados en el desarrollo del MV.	30
Figura 7. Regulación de las vías de señalización que promueven el MV en cáncer de mama.	35
Figura 8. Proceso de metástasis.	38
Figura 9. MV favorece la metástasis	42
Figura 10. Biosíntesis de miRNA canónicos y no canónicos.	44
Figura 11. Perfil de expresión de miRNA en tumores de mama metastásico y no metastásico.	57
Figura 12. Red de interacción de metastamiRs y mRNA pro-metastaticos en tejido de cáncer de mama.	60
Figura 13. Red de interacción de metastamiRs que participan en el MV en tejido de cáncer de mama.	64
Figura 14. Diagrama de Venn de genes que participan en el mimetismo vasculogénico y en la metástasis en cáncer de mama.	66
Figura 15. La expresión de las proteínas que promueven la metástasis en pacientes con cáncer de mama.	68
Figura 16. Análisis de enriquecimiento funcional de las vías de señalización que participan en el MV y metástasis regulada por los metastamiRs.	70
Figura 17. Controles para las tinciones dobles CD31/PAS en amígdala y cáncer de mama.	74
Figura 18. Identificación de estructuras vasculares y tipo capilar en muestras de tejidos de cáncer de mama triple negativo con y sin metástasis.	77
Figura 19. Cuantificación de estructuras vasculares y tubulares en tejidos de CMTN.	79
Figura 20. Análisis de expresión relativa de miRNAs en CMTN metastásico y no metastásico.	85
Figura 21. Modelo de regulación del mimetismo vasculogénico y metástasis mediada por metastamiRs.	88

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama.....	9
Tabla 2. Tratamientos para el CMTN.....	24
Tabla 3. Genes implicados en metástasis de cáncer de mama triple negativo.	41
Tabla 4. Predicción de metastamiRs que regulan mRNAs pro-metastásicos.....	58
Tabla 5. MetastamiRs predichos que regulan mRNAs involucrados en el mimetismo vasculogénico	62
Tabla 6. Características clínicas y patológicas de las pacientes con cáncer de mama.	72
Tabla 7. Cuantificación de vasos sanguíneos y MV	78
Tabla 8. miRNAs que modulan potenciales genes blancos que participan en la formación del MV y metástasis en cáncer de mama.....	8;Error! Marcador no definido.
Tabla 9. Comparación de los perfiles de expresión de miRNAs desregulados en CMTN contra TCGA	86

ABREVIATURAS

ANGPT	Angiopietina
BL1	Basal-like 1
BL2	Basal-like 2
cADN A	DN complementario
CM	Cáncer de mama
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleósido trifosfatos
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
Eph2A	Receptor de ephrina tipo 2A
ERK	Cinasa de regulación extracelular
FAK	Cinasa de adhesión focal
HER2	Factor de crecimiento epidermal 2
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
KEGG	Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes
Ki67	Factor de proliferación celular 67
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
min	Minutos
miRNA	MicroRNA
ml	Mililitros
μl	Microlitros
MMP	Metaloproteasas
MSC	Células madre mesenquimales
MV	Mimetismo vasculogénico
ng	Nanogramos
pmol	Picomoles
PAS	Ácido peryodico de Schiff
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PR	Receptor de progesterona

pre-miRNA	MicroRNA precursor
pri-miRNA	MicroRNA primario
rpm	Revoluciones por minuto
RE	Receptor de estrógeno
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retro-transcripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de retro-transcripción
TA	Temperatura ambiente
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
UTR	Región no traducida
VE-cadherina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Factor de crecimiento epidermal vascular
VEGFR2	Receptor del factor de crecimiento epidermal vascular 2
°C	Grados centígrados

Resumen

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el subtipo más agresivo y de peor pronóstico. Se ha descrito que los pacientes con tumores con CMTN presentan una mayor probabilidad de desarrollar metástasis y mimetismo vasculogénico (MV). Diversos estudios sobre los OMICS han revelado la importancia de los microRNAs (miRNAs) en diferentes procesos biológicos de la célula, incluido el cáncer, un ejemplo de ello es el supresor de tumores miR-204 que en CMTN se reportó que inhibe el MV a través de la inhibición de la expresión y fosforilación de proteínas implicadas en las vías de señalización de PI3K/AKT, RAF1/MAPK, VEGF y FAK/SRC. El desarrollo de este trabajo de investigación se realizó en dos etapas. A través de un análisis bioinformático de un perfil de expresión de miRNAs obtenido de datos públicos se seleccionaron un set de miRNAs en pacientes de CMTN. De este análisis se identificaron 26 miRNAs sobreexpresados en tumores con metástasis con respecto con los que no desarrollaron metástasis. Mediante análisis de predicción se identificaron que estos miRNAs tienen diferentes RNAm blancos que participan en el MV y la tales como VEGF, HIF, MMP, SMAD2, ZEB1/2 entre otros, los cuales se han descrito que promueven el desarrollo del MV o se encuentran asociados a la angiogénesis, el MV y la metástasis. Posteriormente, se corroboró la posible interacción de estos 26 miRNAs con sus blancos mediante un análisis de interacción de redes usando la herramienta miRNET. Las redes de interacción respaldan que posiblemente estos miRNAs pudieran estar participando en el desarrollo de la metástasis y el MV a través de la modulación de la expresión de sus transcritos blancos. En la segunda etapa del desarrollo de este trabajo, se estudió un grupo de 10 miRNAs totalmente diferente al análisis bioinformático para determinar si estos tenían un papel en el MV y metástasis en pacientes mexicanas con CMTN. Se investigó la participación de los miRNAs en pacientes mexicanas con CNTN: 4 pacientes con metástasis y 6 pacientes sin metástasis. Posteriormente, para identificar la presencia de MV en los tejidos tumorales se realizaron tinciones dobles de CD31/PAS por inmunohistoquímica. Se obtuvieron los siguientes resultados: se detectaron estructuras vasculares formadas por las células tumorales con CD31-/PAS+ lo que incide que son MV+ y con presencia de eritrocitos en su interior, lo que sugiere el transporte de sangre hacia las células tumorales. Se identificaron también

estructuras típicas del MV en mayor proporción en tejidos tumorales de mama de pacientes que desarrollaron metástasis en comparación con las pacientes que no desarrollaron metástasis. Se analizó la expresión de 10 miRNAs en las poblaciones antes mencionadas. En los tumores que desarrollan metástasis se observó un bajo nivel de expresión de 5 miRNAs: miR-142-3p, miR-31, miR-148a, miR-200b, miR-145 con respecto a los no metastásico. Mientras que el miR-125b y miR-9* se detectaron con una sobreexpresión en tejidos metastásicos. Sin embargo, el miR-526b, miR-126 y miR-29b no mostraron cambios significativos en sus niveles de expresión en ambos grupos de estudio. La desregulación de estos miRNAs (miR-142-3p, miR-31, miR-148a, miR-200b, miR-145 miR-125b y miR-9*) podría indicar que están participando en promover el desarrollo del MV en las pacientes que presentaron metástasis, mediante la modulación de la expresión de sus transcritos blancos, impactando en diversas vías de señalización que dan origen al MV y metástasis. En conclusión, del análisis *in silico* se identificaron 26 miRNAs sobreexpresados en pacientes con CMTN. En el análisis *in vitro* se identificaron a 5 miRNAs con bajos niveles de expresión que promueven el MV a través de la desregulación de los blancos en pacientes con metástasis. Mientras que dos miRNAs se encontraron sobreexpresados en este mismo grupo en comparación en tejidos no metastásicos. Por lo tanto, nuestros resultados indican que este conjunto de miRNAs potencialmente están siendo modulados en la metástasis en tumores de CMTN que desarrollaron mimetismo vasculogénico.

Abstract

Triple negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive subtype with the worst prognosis. It has been described that patient with tumors with TNBC have a higher probability of developing metastases and vasculogenic mimicry (VM). Various studies on OMICS have revealed the importance of microRNAs (miRNAs) in different biological processes of the cell, including cancer, one example of this is miR-204, which in CMTN was reported to inhibit MV through the inhibition of the expression and phosphorylation of proteins involved in the PI3K/AKT, RAF1/MAPK, VEGF and FAK/SRC signaling pathways. The development of this research work was carried out in two stages. Through a bioinformatic analysis of a miRNAs expression profile obtained from public data, a set of miRNAs in CMTN patients are selected. From this analysis, 26 miRNAs were identified that are overexpressed in tumors with metastases relative to those that do not develop metastases. Through prediction analysis, it was identified that these miRNAs have different target mRNAs such as VEGF, HIF, MMP, SMAD2, ZEB1/2, among others, which have been described as promoting MV development or associated with metastasis. Subsequently, the possible interaction of these 26 miRNAs with their targets was confirmed by network interaction analysis using the miRNET tool. The interaction networks support that these miRNAs could possibly be participating in the development of metastasis and MV through the modulation of the expression of their targets. In the second stage of the development of this work, a group of 10 totally different miRNAs was proposed for bioinformatic analysis to determine if they have a role in MV and metastasis in Mexican patients with CMTN. The participation of miRNAs in Mexican patients with CNTN was investigated: 4 patients with metastasis and 6 without metastasis. Subsequently, to identify the presence of MV in tumor tissues, double CD31/PAS staining was performed by immunohistochemistry. The following results were obtained: vascular structures formed by tumor cells with CD31-/PAS+ were detected, which indicates that they are MV+ and with the presence of erythrocytes inside, which suggests the transport of blood towards the tumor cells. MV structures were identified in a higher proportion in tissues from patients who developed metastases compared to patients who did not develop metastases. The expression of 10 miRNAs in the aforementioned populations was analyzed. In tumors that develop metastasis, a low level of expression of 5 miRNAs was demonstrated: miR-142-3p,

miR-31, miR-148a, miR-200b, miR-145 with respect to non-metastatic tumors. While the miRNAs: miR-125b and miR-9* are detected with overexpression in metastatic tissues. However, the miRNAs: miR-526b, miR-126 and miR-29b did not show significant changes in their expression levels in both study groups. The deregulation of these miRNAs (miR-142-3p, miR-31, miR-148a, miR-200b, miR-145, miR-125b and miR-9*) could indicate that they are participating in promoting the development of MV in patients that metastasis appeared, by modulating the expression of its white transcripts, impacting on various signaling pathways that give rise to MV and metastasis. In conclusion, 26 overexpressed miRNAs in TNBC patients were identified from in silico analysis. In vitro analysis identified 5 miRNAs with low expression levels that promote MV through target deregulation in patients with metastasis. While two are found to be overexpressed in this same group compared to non-metastatic tissues. Therefore, our results indicate that this set of studied miRNAs are potentially being modulated in metastasis in TNBC tumors that develop vasculogenic mimicry.

1. Introducción

1.1 Anatomía y función de la mama

Anatómicamente las mamas están localizadas en la altura del tórax, está compuesta por tejido glandular, el cual, es el productor de leche, el tejido conectivo que conecta los lóbulos, y el tejido adiposo. Además, esta irrigada por una red de nervios, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ganglios linfáticos, tejido conjuntivo fibroso y ligamentos. Las glándulas mamarias femeninas contienen alrededor de 12 a 20 lóbulos que se conectan por los ductos que transportan la leche, los cuales llegan a la base del pezón (Akram et al., 2017). Los factores que influyen en el desarrollo del cáncer de mama pueden ser físicos, químicos o biológicos. Estos causan alteraciones en el genoma y epigenoma. En condiciones fisiológicas, diversas investigaciones han demostrado que el tejido mamario sufre alteraciones que pueden originar el desarrollo de cáncer.

El cáncer de mama es un grupo complejo de enfermedades que se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que regulan diversas funciones biológicas en las células del tejido mamario, conduciendo a desarrollo descontrolado de las células, dando origen a una masa o bulto tumoral. Epidemiológicamente, el cáncer de mama es el cáncer más común entre mujeres con una incidencia a nivel mundial de 2,261,419 casos nuevos por año (2020) y un índice de mortalidad del 6.9% donde el número de muertes reportado fue de 684 996 por año (Sung et al., 2021) (Fig. 1). Mientras que en México se reportan 29 929 (15.3%) nuevos casos por año (2020) con un índice de mortalidad del 8.8 % (7 931 muertes por año). (GLOBOCAN 2020).

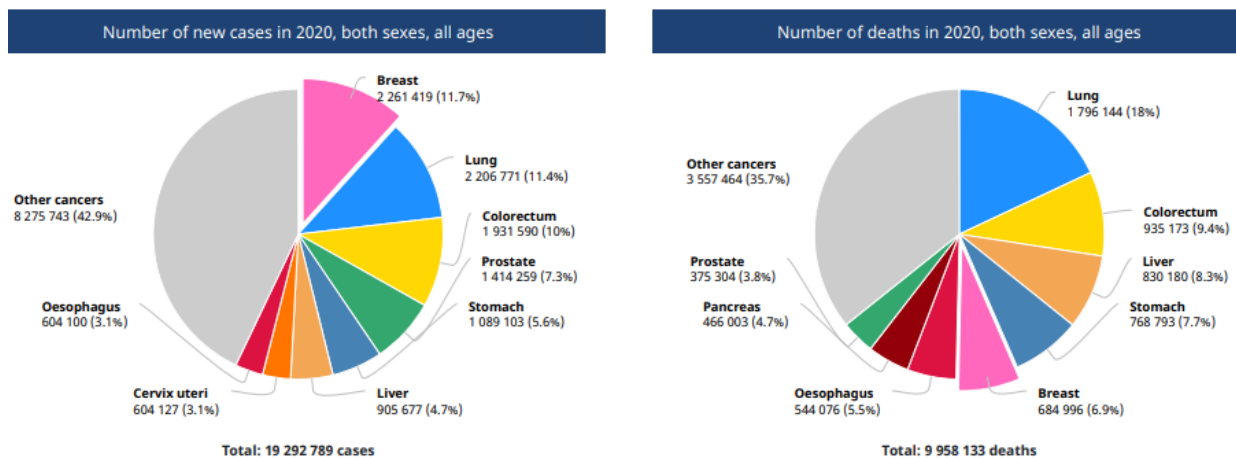


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. Estimaciones del 2020. A la izquierda se ilustra el número de nuevos casos de los diferentes cánceres más comunes en ambos sexos y todas las edades. A la derecha el número de muertes por cáncer en ambos sexos, en todas las edades. Tomada (Sung et al., 2021).

1.2. Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama se clasifica en base a las características histológicas (subtipo histológico pre-invasivo o invasivo) y subtipos moleculares intrínsecos (Luminal A, Luminal B, HER2 y cáncer de mama triple negativo (CMTN)). En base a esta clasificación se elige el tratamiento terapéutico más adecuado a cada paciente (Ver Fig. 2) (Harbeck et al., 2019).

1.2.1 Subtipo histológico pre-invasivo o invasivo.

El cáncer que no se ha extendido más allá del lóbulo o los conductos donde se encuentra se denomina *in situ*. El subtipo de cáncer pre-invasivo se caracteriza por que no se ha extendido más allá del lóbulo donde se encuentra el tumor, y se denomina *in situ*, estos pueden ser: Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS): Tumor benigno con un riesgo asociado a cáncer, las células del tumor no se han extendido fuera de los lóbulos del tejido mamario (Akram et al., 2017). Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): Cáncer no invasivo, limitado al conducto mamario. El cáncer

de mama invasivo ocurre cuando las células anormales del interior de los lóbulos o los conductos lácteos invaden regiones proximales del tejido mamario (Akram et al., 2017). Por otra parte, el carcinoma del subtipo histológico invasivo se caracteriza por que se ha extendido más allá del lóbulo o los conductos que se encuentran en el carcinoma inicial original, infiltrando el tejido, estos son: Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI): También llamado como carcinoma lobulillar invasivo. Se origina en los lóbulos mamarios y se extiende a otras áreas del cuerpo. Carcinoma ductal infiltrante (CDI): También llamado carcinoma ductal invasivo. Se desarrolla en los conductos lácteos e invade tejido graso de la mama u otras partes del cuerpo (Akram et al., 2017).

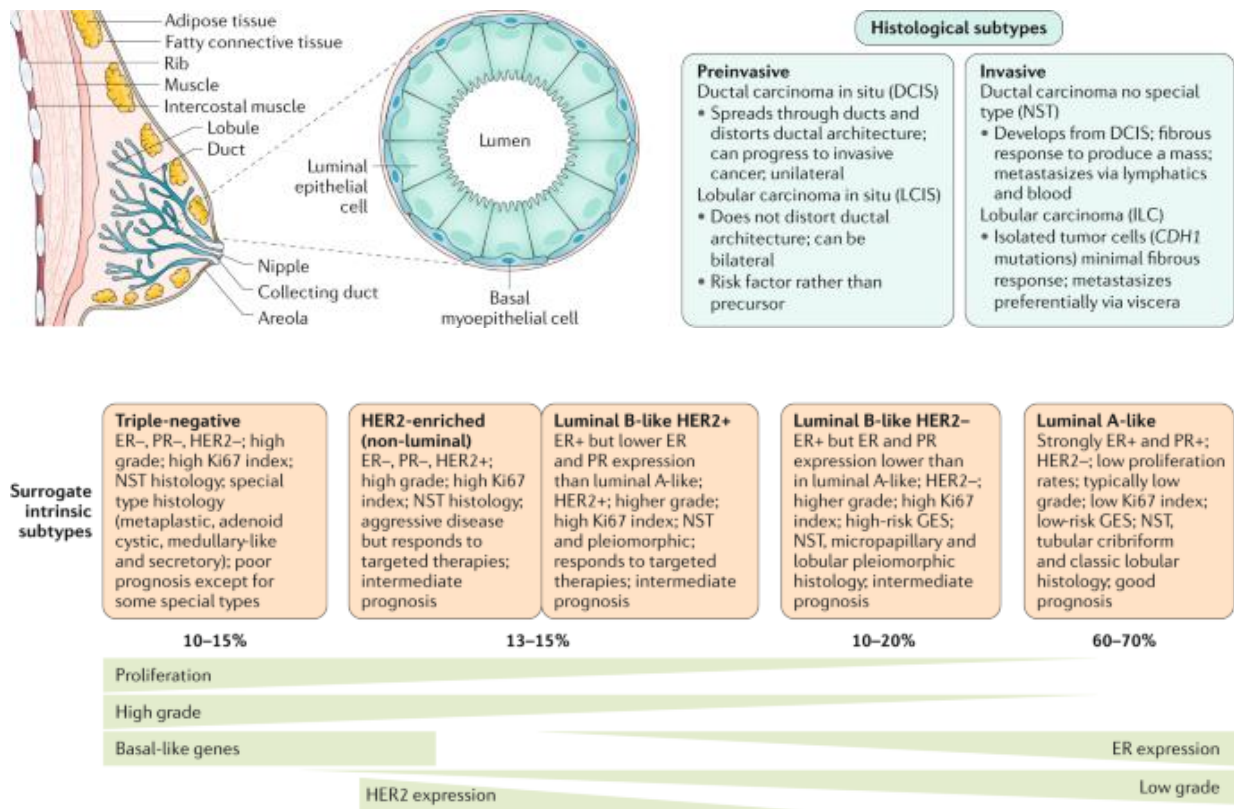


Figura 2. Clasificación histológica y molecular del cáncer de mama. La mama está conformada internamente por tejido adiposo, musculo, ductos y lobulillos. Según las características histológicas, los subtipos del cáncer de mama pueden ser pre-invasivos o invasivos. Mientras que en base a las características moleculares, el cáncer de mama puede ser de subtipo triple negativo, HER2, Luminal A o B. Tomada de (Harbeck et al., 2019).

1.2.2 Clasificación TNM

La clasificación de TNM es un sistema de estadificación del cáncer en donde se determina la ubicación del tumor en el cuerpo, el tamaño del tumor primario (T), la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos cercanos (N) y la metástasis a diferentes partes del cuerpo (M) (Cserni et al., 2018) (Sawaki et al., 2019). Las características que se toman en cuenta para esta clasificación se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama.

Clasificación TNM	Características	Estadio	Tumor primario (T)	Estatus de nodos linfáticos (N)	Metástasis a distancia (M)
T- Tumor					
T1	Tumor $\leq$ 2 cm	I	T1	N0	M0
T2	Tumor $\geq$ 2 cm, pero $\geq$ 5 cm		T0	N1	M0
T3	Tumor $\geq$ 5 cm	IIA	T1	N1	M0
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o la piel.		T2	N0	M0
N- Nodos linfáticos		IIB	T2	N1	M0
N0	Sin cáncer en el ganglio		T3	N0	M0
N1	1-3 Nódulos axilares afectados, metástasis móvil	IIIA	T0	N2	M0
N2	4-9 nodos linfáticos afectados. Metástasis regionales no móviles		T1	N2	M0
N3	Cáncer en los ganglios linfáticos mamaris internos en >10 nodos linfáticos		T2	N2	M0
M- Metástasis			T3	N1/N2	M0
M0	No evidencia de metástasis a distancia	IIIB	T4	Cualquier N	M0
M1	Metástasis a distancia	IIIC IV	Cualquier T Cualquier T	N3 Cualquier N	M1

Tomada y modificada de (Ljuslinder, 2009).

1.2.3 Subtipos moleculares del cáncer de mama

Los carcinomas de mama se clasifican molecularmente en 4 grupos: Luminal A, Luminal B, HER2 y triple negativo. Sin embargo, estos grupos son homogéneos y existen la necesidad de establecer subcategorías o subtipos que pueden ser identificadas mediante inmunohistoquímica (IHQ), para que de esta manera se determinar el pronóstico y establecer un tratamiento más eficaz. Esta clasificación se basa en la expresión de marcadores moleculares como: el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), así como la expresión de ki67 un marcador de proliferación celular, comúnmente empleado en la clasificación de los subtipos luminal A y B (ver Fig. 3) (Wawruszak et al., 2021).

Los tumores con subtipo luminal A representan aproximadamente el 40% de los cánceres de mama, expresan los marcadores RE, pueden o no expresar el RP y no expresan HER2 y con un nivel de expresión menor o igual del 14% de ki67, presentan un mejor pronóstico y pueden ser de grado histológico I o II. Las pacientes que presentan este subtipo tienen bajo riesgo y una menor probabilidad de recurrencia del tumor (Gao & Swain, 2018; Malhotra et al., 2010). El subtipo luminal B expresan el RE, HER2, pueden o no expresar el RP y un 30% de expresión de ki67, pueden ser de grado II o III. Aproximadamente el 20% de los pacientes pertenecen a este subtipo y presenta una mayor expresión de genes implicados en la mitosis y la proliferación celular (Gao & Swain, 2018; Russnes et al., 2017). El subtipo HER2 expresan el marcador ER, puede o no expresar RP, altos niveles de HER2 y un Ki67 mayor al 14% y presentan un grado histológico de III. Adicionalmente este subtipo también expresan la proteína tirosina cinasa receptora HER2/erbB2/neu que regula el crecimiento celular (Russnes et al., 2017). El subtipo triple negativo (TN), carece de los marcadores moleculares RE, RP y HER2. También son denominados tipo basal-like debido a que expresan genes típicos de las células epiteliales mioepiteliales/basales, como las citoqueratinas basales. Este subtipo representa del 10-15% de todos los cánceres de mama y se caracteriza por ser muy agresivo (Russnes et al., 2017). El triple negativo

No basal-like y basal-like ambos son grado III. El no basal-like se caracteriza por presentar un alto nivel de expresión de ki67 y es negativo para los marcadores antes mencionados. El basal-like se identifica por su alto nivel de expresión de HER1 y Ki67, así como la alta expresión de citoqueratinas 5 y 6 (Russnes et al., 2017). Otro subtipo llamado baja en claudina representa ~6% de las muestras de cáncer de mama, carecen de proteínas de uniones estrechas (claudina 3 y E-cadherina), y se caracterizan por una baja expresión de marcadores luminales y una alta expresión de marcadores mesenquimales (Sabatier et al., 2014).

El CMTN tiene una naturaleza heterogénea por lo que este se sub-clasifica en otros 7 subtipos: Basal-like 1 (BL-1), Basal-like 2 (BL-2), Inmunomodulador (IM), Mesenquimal (M), Células madre mesenquimales (MSL) y receptor de andrógenos luminal (LAR). Esta clasificación se basa en los perfiles de expresión génica, por lo que el subtipo BL1 y BL2 tienen una mayor sensibilidad a agentes que dañan al DNA, con un elevado nivel de expresión de los genes involucrados al daño al DNA, así como una aumentada expresión del gen Ki67 y de genes relacionados al ciclo celular (Sporikova et al., 2018; Uscanga-Perales et al., 2016). El subtipo BL-2 expresa genes involucrados en las vías de señalización de diferentes factores de crecimiento: EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), IGF-IR (El receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina), y NGF (factor de crecimiento nervioso), así como alteraciones metabólicas en la ruta de glucólisis, gluconeogénesis, adicionalmente con alteraciones en marcadores mioepiteliales (Shekar et al., 2020).

Los subtipos M y MSL se caracterizan por promover los fenotipos de transición mesenquimatoso-epitelial (TME) en los que las células mesenquimatosas pierden sus propiedades móviles y migratorias y adquieren polaridad celular y adhesión al epitelio, permiten la remodelación de la matriz extracelular, diferenciación celular, angiogénesis y responden mejor a fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), rapamicina y desatinib (Uscanga-Perales et al., 2016). El subtipo LAR se identifica por una alta expresión de los receptores de andrógenos (RA), promueve la señalización

hormonal y la síntesis de esteroides (Sporikova et al., 2018; Uscanga-Perales et al., 2016). Las funciones primordiales y la proporción de los subtipos CMTN se resumen en la figura 3.

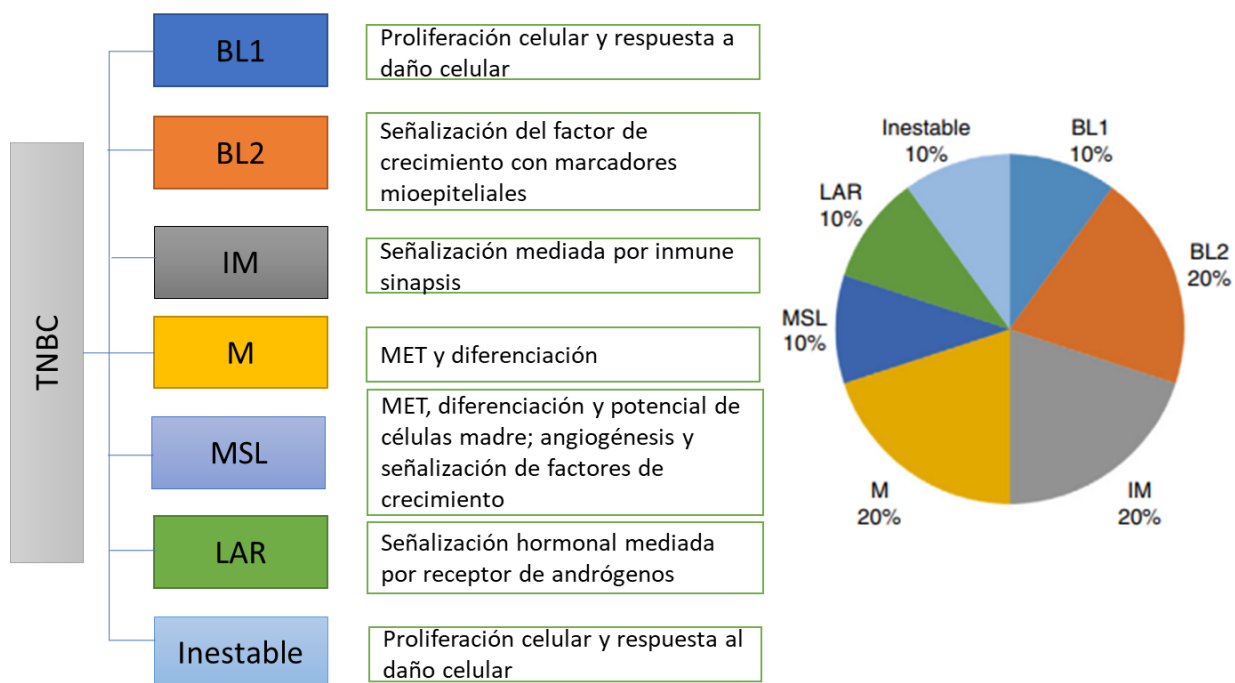


Figura 3. Clasificación del cáncer de mama triple negativo. La heterogeneidad de los tumores TNBC permite su sub-clasificación en base a los patrones de expresión en 7 subtipos: Basal-like 1(BL-1), Basal-like 2 (BL-2), Inmunomodulador (IM), Mesenquimal (M), Células madre mesenquimales (MSC) y receptor de andrógenos luminal (LAR), MET (transición mesenquimal-epitelial). Tomada de Uscanga-Perales et al., 2016.

1.3. Tratamiento del CMTN.

El CMTN se considera un cáncer altamente agresivo debido a su alto índice de proliferación y su capacidad de desarrollar metástasis (Chang-Qing et al., 2020). La falta de la expresión de los receptores RE, RP y HER2 hacen ineficientes a las terapias endocrinas (hormonales) dirigidas hacia estas moléculas. Sin embargo, hay diversos tratamientos para este subtipo de cáncer (Tabla. 2) (Yin et al., 2020).

La quimioterapia neoadyuvante es el principal tratamiento para el CMTN (Medina et al., 2020).

Taxanos. Detienen el ciclo celular al Inhibir la despolimerización de los microtúbulos impidiendo la formación de huso y fibras de huso en la mitosis. Además, induce la apoptosis (Medina et al., 2020; Yin et al., 2020).

Antraciclinas. Es un fármaco quimioterapéutico que se deriva de *Streptomyces peucetius* var. *cesio* que participa en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleico. Es usado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, debido a que la quimioterapia en conjunto con las antraciclinas disminuye la tasa de mortalidad en pacientes con cáncer (Yin et al., 2020).

Ciclofosfamida. Es un agente alquilante que actúa retardando el crecimiento de las células cancerosas a nivel del ciclo celular en la fase S.

Radioterapia. Promueve la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y la muerte de células cancerosas a través de rayos de alta energía que se limitan solo al área tumoral reduciendo el daño a células normales (Chang-Qing et al., 2020).

Generalmente la cirugía es el primer tratamiento elegido para erradicar el cáncer de mama. Se pueden realizar dos tipos de cirugía, Lumpectomía o mastectomía dependiendo de la localización y tamaño del tumor (estadio clínico).

Lumpectomía. Esta cirugía consiste en la conservación de la mama, en donde se realiza la extirpación de pequeños tumores y una pequeña cantidad de tejido circundante únicamente (Chang-Qing et al., 2020).

Mastectomía. Es la extirpación de la totalidad del tejido mamario y esta se basa si la biopsia detecta metástasis del cáncer de mama fuera del conducto lácteo (Chang-Qing et al., 2020). En la tabla 2 se representan estas y algunas otras terapias y su mecanismo de acción.

Tabla 2. Tratamientos para el CMTN. Tomada y modificada de (Medina et al., 2020).

Tratamiento convencional	Drogas	Mecanismo	Esquema/Dosis
Tratamiento neoadyuvante temprano para TNBC (estándar de oro) avanzado o metastásico	Antraciclinas + Taxanos o Capecitabina + taxanos Monoterapia con ixabepilona o Ixabepilona + capecitabina	Citotoxicidad** Estabilización Microtúbulos	Doxorrubicina 20mg/m ² más ciclofosfamida 600 mg/m ² 4 semanas seguido de paclitaxel 80 mg/m ² 12 semanas Capecitabina 1250 mg/m ² por 14 días + Docetaxel 75 mg/m ² Ixabepilona 40 mg/m ² por 3 semanas
Nuevos agentes neoadyuvantes (mutaciones BRCA)	Platinos (Carboplatino) Bevacizumab, Nab-paclitaxel	Citotoxicidad e inmunoterapia con VEGF	Sumando esquema estándar Abraxane 125 mg/m ² Carboplatino AUC, Bevacizumab 10 mg/kg
Agentes adyuvantes	Antraciclinas y taxanos	citotoxicidad	Ciclofosfamida 600 mg/m ² + Doxorrubicina 20m ² + Docetaxel 75 mg/m ² por 3 semanas 6 ciclos
Cirugía: TNBC, el tratamiento quirúrgico es la preservación de la mama			
Radioterapia: La radioterapia (RT) a menudo se administra combinada o después de la quimioterapia. La RT también podría ser útil después de la cirugía. Probablemente, se beneficie de las mutaciones BRCA.			

1.4. Herramientas moleculares

Con los recientes avances en el desarrollo tecnológico enfocados en las “OMICS” se ha logrado identificar nuevas vías biológicas o moléculas individuales que permitan la integración de datos para determinar los procesos biológicos en los cuales participan los perfiles de expresión génica, en diversas enfermedades incluyendo el cáncer de mama. Los conocimientos sobre la regulación genómica y epigenoma permiten entender como las alteraciones en estos procesos promueven el desarrollo de diversos fenotipos que se caracterizan por ser más agresivos e invasivos y que tengan una pobre respuesta a los tratamientos. Se ha descrito que las alteraciones epigenéticas que contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer de mama son a través de la desregulación de metilación de DNA, acetilación de histonas y miRNAs, los cuales impactan en la regulación de los hallmarks del cáncer: 1) Señalización proliferativa sostenida, 2) Evasión de supresores de crecimiento, 3) Resistencia a la muerte celular, 4) Inducción a la angiogénesis, 5) Activación de la invasión y metástasis, 6) Inmortalidad replicativa, 7) Inestabilidad genómica, 8) Inflamación, 9) Reprogramación del metabolismo energético y 10) Evasión del sistema inmune (Fig. 4) (Hanahan & Weinberg, 2011). En particular en este proyecto nos enfocamos en realizar el análisis bioinformático en dos de los hallmarks del cáncer, como los mecanismos de neovascularización de los tumores, específicamente el MV y la metástasis en los tumores de cáncer de CMTN.

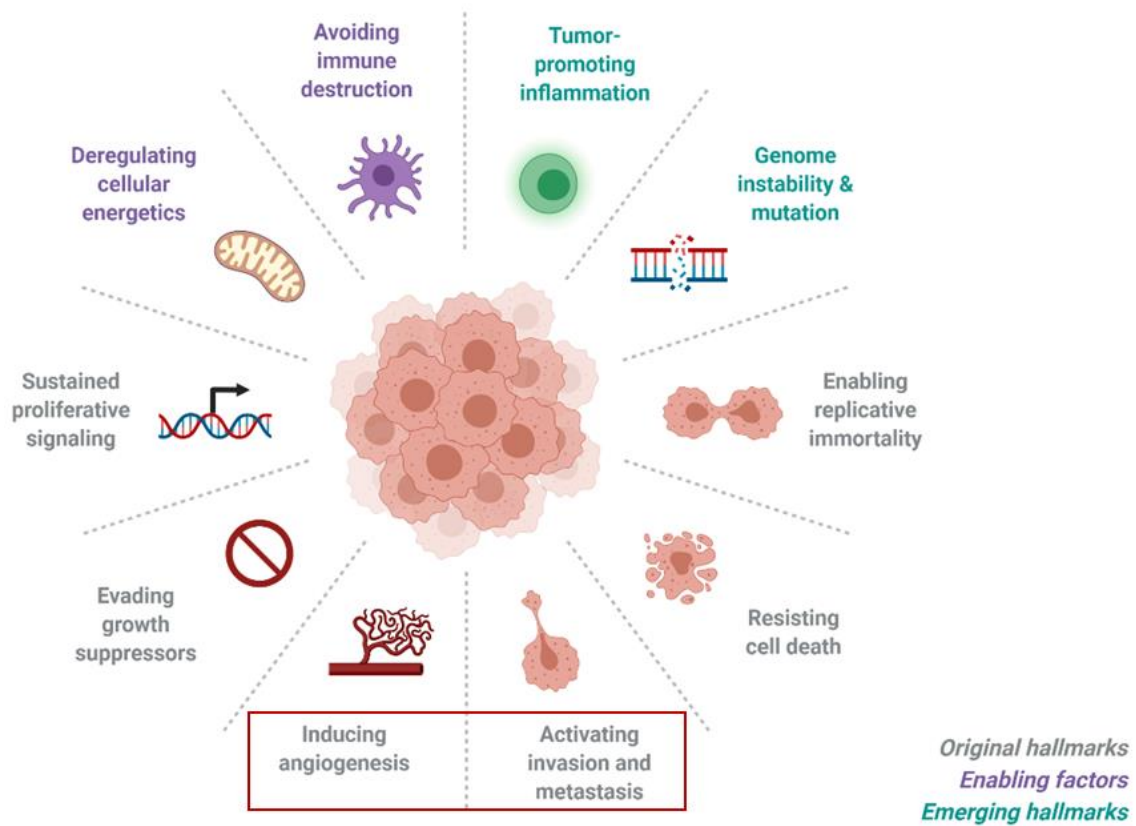


Figura 4. Hallmarks del cáncer. Procesos celulares que permiten y promueven la transformación de células tumorales. Diseñado con el software de Biorender. <http://app.biorender.com/biorender-templates>

1.5. Neovascularización tumoral

La neovascularización se refiere a los procesos mediante el cual, se forman vasos sanguíneos a partir de los existentes después de la proliferación y migración de las células endoteliales. Este proceso es esencial en la angiogénesis fisiológica, como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. La neovascularización tumoral tiene un papel fundamental en el desarrollo, progresión y metástasis de los tumores. Los tumores sólidos comúnmente establecen mecanismos de neovascularización a través de los cuales obtienen nutrientes y oxígeno necesarios para su crecimiento. Las formas de neovascularización tumoral son: cooptación de vasos, vasculogénesis, angiogénesis, angiogénesis intusúscitiva, y mimetismo vasculogénico (Fig. 5) (Q. Luo et al., 2020b).

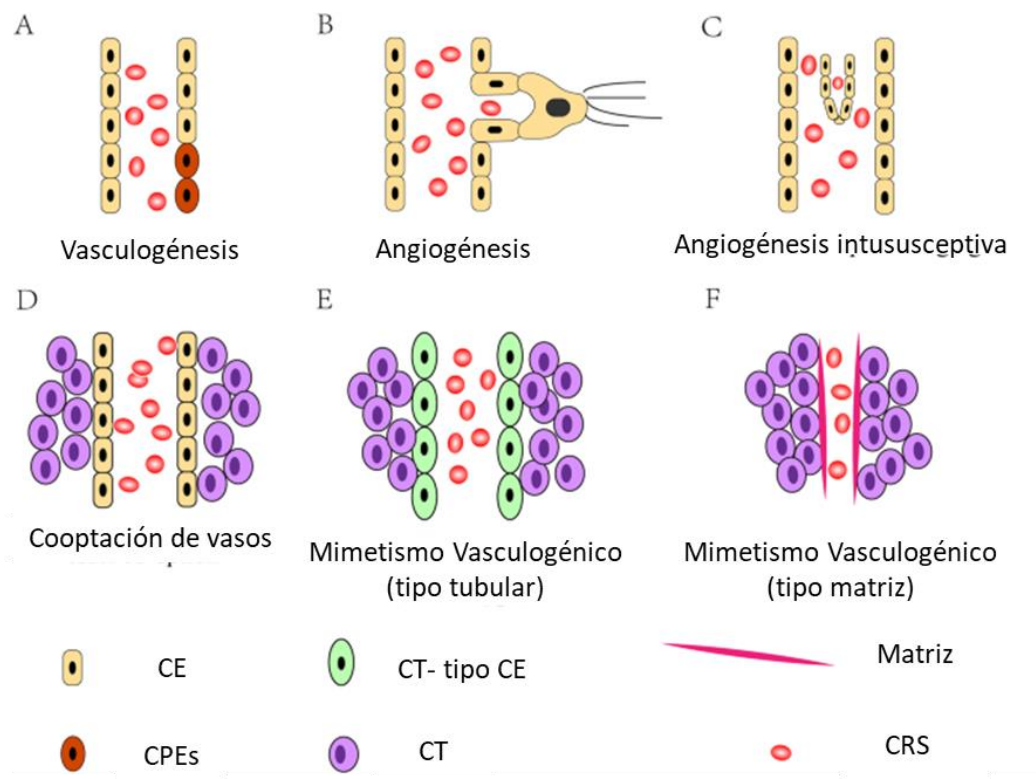


Figura 5. Tipos de vascularización presentes en los tumores. Los tumores pueden estimular la formación de diferentes tipos de vasculaciones a partir de diferentes tipos de células como la vasculogénesis, angiogénesis, cooptación de vasos y mimetismo vasculogénico. CE: células endoteliales, CPEs: células

progenitoras endoteliales, CT: Células tumorales, CRS: Células rojas de sangre (glóbulos rojos).

Cooptación de vasos. Las células cancerosas secuestran los vasos sanguíneos existentes para la perfusión a partir de dicha vasculatura (Latacz et al., 2019).

Vasculogénesis. Es un proceso en donde las células progenitoras endoteliales o EPCs (por sus siglas en inglés endothelial progenitor cells) se diferencian a células endoteliales para formar una red vascular de novo dentro del tumor (Vallée et al., 2017).

Angiogénesis. Se refiere a la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, este proceso impulsa el crecimiento tumoral y la metástasis (S. Li et al., 2019).

Angiogénesis Intususceptiva. Es la formación de un nuevo vaso sanguíneo a partir de la segmentación de un vaso sanguíneo preexistente (Q. Luo et al., 2020b).

Mimetismo vasculogénico. Canales tubulares formados por células tumorales (Wei et al., 2021).

Antecedentes particulares

2. Mimetismo Vasculogénico

Se ha propuesto que el Mimetismo Vasculogénico (MV) puede ser un nuevo hallmark del cáncer debido que es un mecanismo similar a la angiogénesis. El MV fue descrito por primera vez por Maniotis y colaboradores en 1999, en células de melanoma agresivas, este mecanismo permite que las células cancerosas adquieran nutrientes y oxígeno a través de la formación de estructuras microvasculares similares a canales tridimensionales (Maniotis et al., 1999).

El MV es una estructura de tipo capilar o tubular formada por las propias células tumorales y se caracteriza por la desregulación de genes como vimentina, Cadherinas y MMP2, entre otros. Este evento puede ser detectado por tinciones dobles de PAS+/CD31-, que a diferencia de la angiogénesis está formado por células endoteliales que son detectadas por tinciones dobles PAS+/CD31+. Este mecanismo induce la remodelación de la matriz extracelular, los cambios en el microambiente tumoral por la perfusión de los vasos que reduce el suministro de oxígeno y nutrientes favoreciendo la formación del MV (Salinas-Vera et al., 2019a). La formación de MV se ha observado en muchos tipos de tumores sólidos altamente agresivos como cáncer de mama, hígado, ovario, gástrico, próstata y melanoma. La presencia de MV en tumores se ha asociado a un mal pronóstico, al promover la resistencia a la quimioterapia y baja supervivencia en pacientes con cáncer (Hernández de la Cruz, et al, 2020). Además, se ha propuesto que el MV es un impulsor de la metástasis, al permitir la perfusión y extravasación de las células tumorales (Wagenblast., 2015).

2.1. Factores que impulsan el desarrollo del MV

Se conoce que la división y proliferación continuas de las células tumorales requiere el consumo de grandes cantidades de oxígeno y nutrientes. Por lo tanto, el aumento del tamaño del tumor favorece un microambiente hostil, debido a cambios en la acidez del pH, disminución de oxígeno, escases de nutriente y desregulación de los factores de transcripción, así como marcadores epiteliales y mesenquimales favorecen la formación del MV en cáncer (Fig. 6).

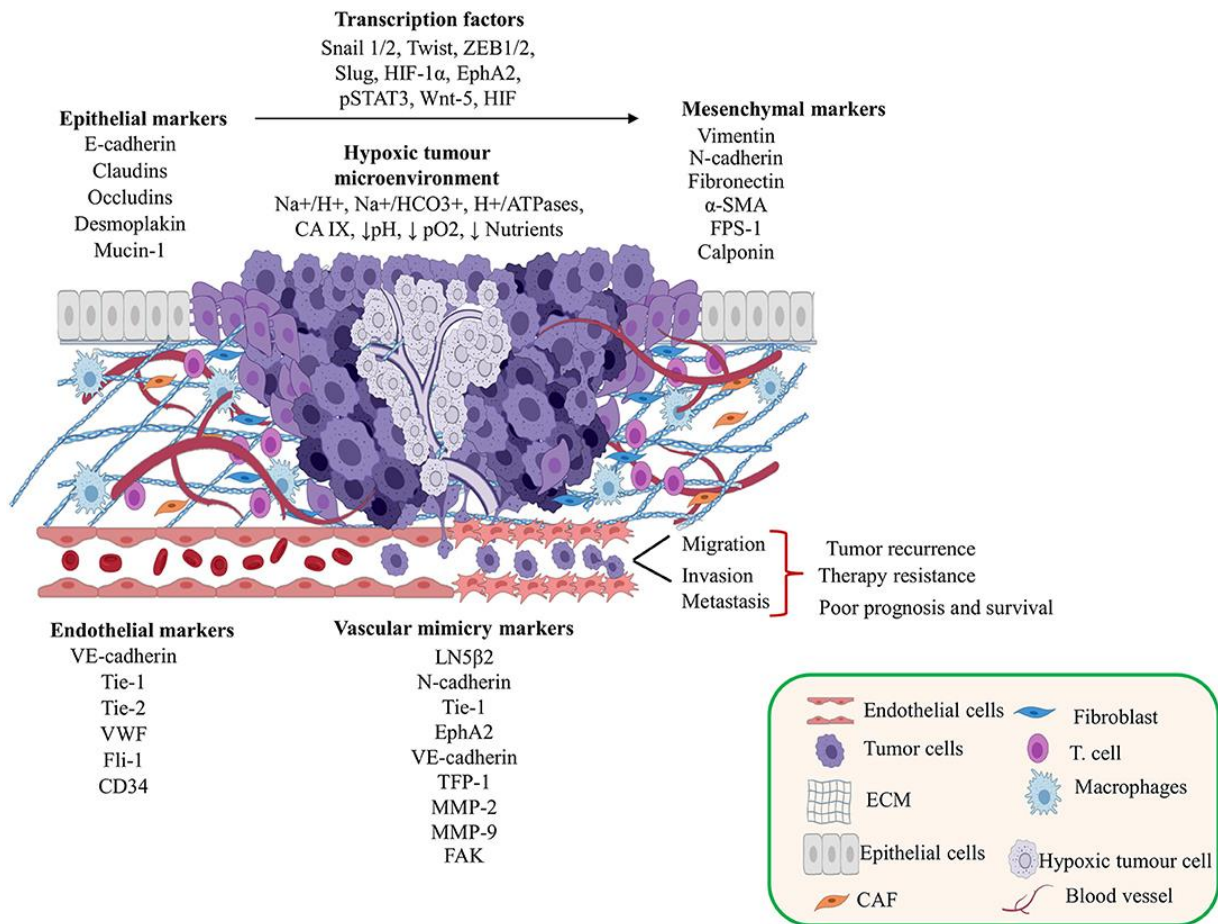


Figura 6. Marcadores moleculares y factores biológicos involucrados en el desarrollo del MV. Microambiente tumoral y la transición epitelio mesenquimal contribuyen en la formación del MV en cáncer.

pH ácido

El microambiente del tumor se caracteriza por tener un pH ácido. Debido a la alta tasa proliferativa y al alto consumo de nutrientes. En los tumores sólidos, el pH ácido se debe a la producción de ácido láctico durante el metabolismo fermentativo y otros factores como la isoforma VIII de la anhidrasa carbónica y los transportadores de monocarboxilato, entre otros que se difunden hacia el estroma favoreciendo la supervivencia y proliferación del tumor. (Hernández de la Cruz et al., 2020; Stock & Pedersen, 2017).

Hipoxia

La disminución del suministro de oxígeno hacia las células dentro del tumor genera un microambiente hipóxico que favorece el desarrollo de un fenotipo más agresivo y metastásico (Jing et al., 2019; Wei et al., 2021). En cáncer de mama, un microambiente hipóxico aumenta los niveles de HIF-1alfa, Ve-cadherina, MMP-9, EGFR, p-AKT y p-mTOR promoviendo el desarrollo del MV (Wei et al., 2021). El factor inducible por hipoxia (HIF) juega un papel importante en el MV al regular transcripcionalmente la expresión de diversos genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal como: Twist1, E-cadherina, EphA2 y VEGF-A (Q. Luo et al., 2020b)(K. Liu et al., 2015).

Macrófagos y fibroblastos asociados a tumores

Los macrófagos asociados a tumores promueven la tumorigénesis, crecimiento, migración y MV de manera dependiente de COX2 a través de la vía PGE2/EP1/PKC o a través de la vía PKC mediante la secreción de interleucinas IL-6 (Q. Luo et al., 2020b). También los fibroblastos asociados a tumores (TAF) promueven el desarrollo de MV al secretar TGF- β y SDF1 que aumentan de la expresión de VE-cadherina, MMP-2 y laminina5 γ 2 o a través de la señalización de EphA2-PI3K (Q. Luo et al., 2020b).

Cancer Stem Cells

Las células madre cancerosas (CSC) son una subpoblación de células tumorales con mayor capacidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación. Estas células presentan marcadores específicos, como CD44, CD133, CD166, transportadores ABC y aldehído deshidrogenasa-1 (ALDH1). Se ha reportado que este tipo de células, tiene la capacidad de formar estructuras tubulares similares al MV (Andonegui-Elguera et al., 2020; Delgado-Bellido et al., 2017).

Transición epitelio-mesénquima (TEM).

Es el proceso mediante el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimatoso al inhibir la expresión de moléculas de adhesión celular, transformar el citoesqueleto y al adquirir características morfológicas de células mesenquimales (Q. Luo et al., 2020b). La TEM promueven la expresión de marcadores mesenquimales como vimentinas y regulan negativamente la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina (Hernández de la Cruz et al., 2020).

2.3. Vía de señalización del MV

En distintos tipos de cáncer incluido el cáncer de mama, el MV es controlado mediante la activación de distintas vías de señalización, entre las cuales se encuentran la vía de VEGF, VE-cadherina, vía de NODAL, WNT (Fig. 7).

VE-cadherina

VE-cadherina es una proteína transmembrana, participa en la adhesión célula-célula. Es regulada por el factor transcripcional HIF. Sus niveles de expresión y fosforilación se encuentran aumentados en células de cáncer muy agresivas propensas a desarrollar MV como en el cáncer de mama (Andonegui-Elguera et al., 2020).

En respuesta a la activación de VEGF, la vía de señalización de VE-cadherina es activada mediante fosforilación y recluta el receptor de la quinasa Eprin-A2 (EphA2) a la membrana celular lo que conduce a la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK), esto, promueve la activación de la quinasa reguladora extracelular

(ERK) que a su vez induce la activación las metaloproteasas (MMP) permitiendo la degradación de la matriz extracelular e induciendo la escisión de la laminina5γ2 (Ln5γ2) en dos fragmentos pro-metastásicos denominados (Ln5γ2 ' y Ln5γ2x) (Ayala-Domínguez et al., 2019; Delgado-Bellido et al., 2017).

VEGF

El MV puede ser regulado por la unión del ligando de VEGF a su receptor iniciando la activación de la cascada de señalización de PI3K que conduce a la degradación de la matriz mediante la acción de las MMP en cáncer de mama. También, VEGF fomenta el desarrollo del MV mediante la activación de la señalización de VE-cadherina, EphA2 y Ln5γ2 (Ayala-Domínguez et al., 2019).

COX-2

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) promueve la conversión de prostaglandina H2 a prostaglandina E2 (PGE2), activando los receptores prostanoideos (EP1-4), que a su vez activan la señalización PKC. La expresión aumentada de COX2 se correlaciona con tumores agresivos, aumento de la proliferación, invasión, angiogénesis y MV (Kirschmann et al., 2012).

EphA2

El receptor hepatocelular productor de eritropoyetina (EphA2), presenta un aumento de su expresión en tumores agresivos y se ha descrito que es un potencial regulador de la formación del MV a través de la señalización de la vía PI3K y FAK en cáncer de mama (Q. Luo et al., 2020b)(Andonegui-Elguera et al., 2020).

NOTCH y NODAL

Las vías de señalización de NOTCH y NODAL están relacionadas con procesos embrionarios y de células madre, que están activados en tumores agresivos. Estos son receptores transmembrana que cuando se unen a su ligando se libera el dominio intracelular de NOTCH (NICD) translocándose al núcleo donde promueve la activación de la expresión de diversos genes como NODAL. NODAL es un factor

de crecimiento de la superfamilia de TGF β , al unirse a cripto induce la activación de los receptores AKL y ActRIIB favoreciendo la activación de las SMAD y regular el MV (Kirschmann et al., 2012).

WNT

La vía de señalización de WNT no canónica participa en muchos procesos fisiológicos, sin embargo la activación de mutaciones en esta vía conduce a la progresión de la tumorigénesis al promover el desarrollo vascular y angiogénesis al participar en la diferenciación de células endoteliales y remodelación vascular (Qi et al., 2015). Cuando WNT se une a su ligando activa los receptores Frizzled/LRP, que conduce a la estabilización de β -catenina y su translocación al núcleo, donde interactúa con los activadores transcripcionales LEF/TCF para activar la transcripción de genes como la fosforilación de LRP6 por CKI y GSK3B permitiendo la translocación de un complejo HIF-1 α , TWIST, entre otros que promueven el MV (Wei et al., 2021).

Metaloproteasas (MMP)

Las MMP son enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular contribuyendo a la invasión, migración y metástasis de las células tumorales. En cánceres altamente invasivos los niveles de expresión de las metaloproteinasas de la matriz (MMP-1, 2, 9 y 14) están sobreexpresados, facilitando la entrada de las células tumorales al sistema vascular a través de la degradación del colágeno I al X y XIV, agregano, entactina, fibronectina, tenascina, laminina y vitronectina. Por otra parte, la activación de las MMP2 y MMP14 inducen el rompimiento de la laminina 5 γ 2 en fragmentos promigratorios γ 2' y γ 2 $\times$ que inducen la migración, invasión de las células tumorales y además promueven la formación del MV en cáncer de mama (Kirschmann et al., 2012) (Andonegui-Elguera et al., 2020).

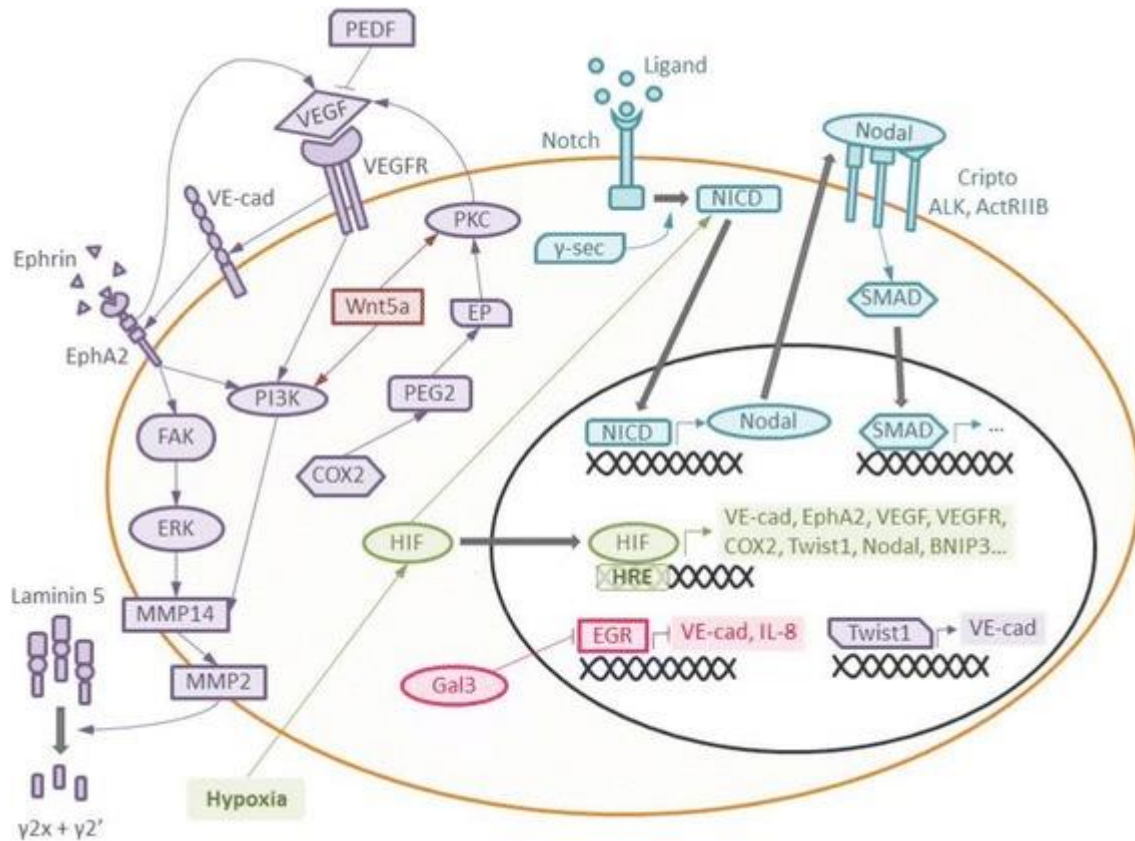


Figura 7. Regulación de las vías de señalización que promueven el MV en cáncer de mama. Esta figura muestra la activación de las vías de señalización (VEGF/PI3K/ERK, NOTCH/NICD, EphA2/FAK/ERK, NODAL/SMAD y la vía de WNT5a) que promueven la formación del MV.

3. Proceso de metástasis

El desarrollo de la metástasis en los tumores en estadios clínicos avanzados se realiza en diferentes etapas, estas son: invasión de células tumorales a tejido adyacente, extravasación, circulación, extravasación y colonización., estos pasos son requeridos para el desarrollo de un nuevo tumor secundario y es necesario concluir cada una de las etapas y desafíos con éxito (Fig. 8) (Fares et al., 2020).

Durante el crecimiento del tumor primario las capacidades metastásicas de las células tumorales es desencadenado por múltiples factores que involucra la inestabilidad genética y genómica, factores epigenéticos y microambientales (Ruiz-Espigares et al., 2021; Welch & Hurst, 2019).

El microambiente tumoral, además de presentar poblaciones heterogéneas de células tumorales, está conformado por infiltrado de células inmunitarias como células T, macrófagos, células dendríticas, células B, fibroblastos y neutrófilos. Presenta una vasculatura desregulada, matriz extracelular, colágeno, mala perfusión, pH ácido, baja concentración de oxígeno, escases de nutrientes, acumulado de subproductos metabólicos, entre otras alteraciones. La comunicación por citocinas y el contacto célula - célula contribuye a la agresividad del tumor y metástasis (Fernández et al., 2019; B. Lim et al., 2018; Ruiz-Espigares et al., 2021) Las células cancerosas desarrollan alteraciones morfológicas promovidas por la pérdida de las adhesiones célula-célula, permitiendo que las células invadan tejido circundante. Durante la invasión, las células tumorales pierden temporalmente las adhesiones célula-célula por medio de la transición epitelio mesénquima (TEM) promoviendo cambios morfológicos que favorecen la invasión local de las células cancerígenas para comenzar la metástasis. Este proceso es llevado a cabo por la expresión de diferentes factores de transcripción, siendo los más estudiados Snail, Slug, Twist y Zeb1 (Lambert et al., 2017). Posteriormente, estas células tumorales deben remodelar la matriz extracelular que las rodea, mediante la producción de enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas de matriz (MMP), Serin proteasas, cisteínas proteasas, desintegrina, la metaloproteinasa ADAM, entre otras que degradaran a la matriz para facilitar la entrada de las células tumorales al sistema vascular, proceso llamado intravasación (Welch & Hurst, 2019).

En la intravasación, las células tumorales ubicadas a lo largo del vaso sanguíneo, entran en mitosis lo que permite que la célula en división se interponga entre las células del endotelio del vaso, logrando su separación en la circulación a través de la compactación del núcleo y el reordenamiento genómico, potenciando su capacidad metastásica (Fares et al., 2020).

Una vez dentro de los vasos, las células tumorales circulantes (CTC) viajan a un nuevo sitio, ya sea de forma individual o en grupos. En esta etapa denominada circulación, solo un pequeño porcentaje (0.02-0.1%) de las células tumorales sobrevive a la circulación ya que estas células son atacadas por células del sistema inmune; por lo que la activación de la señalización de la proteína cinasa B (AKT) tiene un papel esencial en la supervivencia de estas células en la circulación. También las CTC expresan CD47 que las protege de la fagocitosis de macrófagos, la interacción con las plaquetas alrededor de las células cancerosas también ayuda a evadir el sistema inmune y soportar lesiones (Fares et al., 2020).

La extravasación tiene lugar cuando las CTCs cruzan el vaso hacia el parénquima (tejido q delimita órgano), aquí también participan las integrinas y se revierte el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM), adquiriendo un fenotipo epitelial mediante la transición mesenquimal-endotelial (MET). Algunos órganos tienen vasos sinusoidales que son altamente permeables que favorecen a las CTC para la extravasación (Fares et al., 2020; Ruiz-Espigares et al., 2021).

En la colonización solo un pequeño porcentaje de las CTC entra a un sitio secundario donde se deben de enfrentar a un nuevo microambiente. Para ello, según la hipótesis de Paget semilla-suelo, previamente las células tumorales en el sitio primario o en circulación liberan componentes moleculares y celulares como factores solubles o microvesículas para establecer la formación de un nicho premetastásico para formar un “suelo” favorable que permita la colonización de las células tumorales (“semillas”) (Ruiz-Espigares et al., 2021). El establecimiento y adaptación de las células tumorales al nuevo sitio promueve la transformación en

células iniciadoras de metástasis (CMI) para el desarrollo de un nuevo tumor. Las integrinas regulan el proceso de colonización de las células metastásicas facilitando la supervivencia de las células tumorales circulantes (CTC) (Ruiz-Espigares et al., 2021).

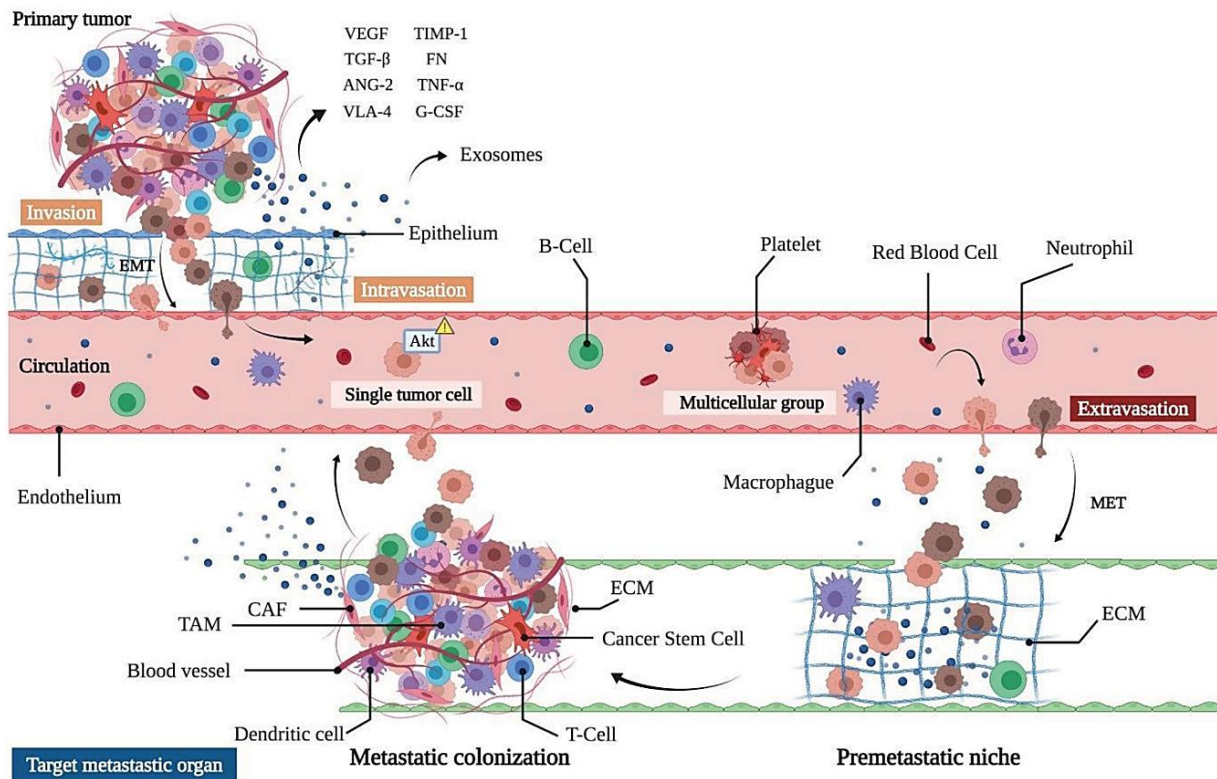


Figura 8. Proceso de metástasis. La cascada metastásica es llevada a cabo por 5 pasos: invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización. La conclusión de todos los pasos es fundamental para que las células tumorales formen un nuevo tumor en un lugar distante al cual se originó. Tomada de (Ruiz-Espigares et al., 2021).

4. Metástasis en cáncer de mama

Se estima que, en pacientes con cáncer de mama alrededor del 6% son diagnosticadas con metástasis, sin embargo, un 20 a 30% de las pacientes desarrollarán metástasis después del diagnóstico y tratamiento del tumor primario. Mientras que, del 20% y 70% de pacientes diagnosticadas con un estadio clínico avanzado (etapa clínica IV) desarrollan metástasis, el 90% de estos casos tienen un mal pronóstico y una pobre sobrevida. Mientras la tasa de sobrevivencia global a 5 años en las pacientes con cáncer de mama metastásico es aproximadamente del 25% (Liang et al., 2020; Warren, 2009). Sin embargo, alrededor de 150,000 mujeres que han sobrevivido al cáncer de mama con estadio I-III tienden a desarrollar metástasis (American Cancer Society 2019-2020).

La metástasis en cáncer de mama a sitios distantes se ha detectado en los huesos, pulmones, hígado y cerebro (Liang et al., 2020). La metástasis organotrópica se refiere a la preferencia de las células tumorales a hacer metástasis a órganos específicos. Este proceso está regulado por múltiples factores como los subtipos moleculares del cáncer de mama, cáncer ductal o lobulillar, expresión génica, vías de señalización, células madre cancerosas, entre otros. Debido a su alta agresividad, invasividad y pobre respuesta a los tratamientos el subtipo triple negativo, es más propenso de inducir metástasis a otros órganos (W. Chen et al., 2018).

De los subtipos del CMTN el carcinoma ductal infiltrante (CDI) tiene preferencia por desarrollar metástasis principalmente en los pulmones, ganglios linfáticos y sistema nervioso central, mientras que el carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) es más propenso a hacer metástasis en peritoneo, tracto gastrointestinal y ovario. Se estima que aproximadamente el 70% de las metástasis del cáncer de mama se presenta en hueso, el cual está asociado a la alta expresión del gen ANGPTL2 (proteína 2 similar a la angiopoyetina) que desregula la vía de señalización CXCR4 y Erk1 / 2. La metástasis en hígado representa el 30% y es favorecido por la elevada expresión de OPN (osteopontina) que media la señalización de TGF β 1 para aumentar los

niveles de MMP2 y uPA. Del 10-30% de las metástasis en cáncer de mama se desarrollan en cerebro y se ha descrito que está asociada por la alta expresión de las SERPINAS que inhibe la vía apoptótica mediada por FasL (Neophytou et al., 2018).

En base a los subtipos, los tipos luminales son propensos a metástasis ósea y ganglios linfáticos. El subtipo HER2+ induce mayormente metástasis en cerebro, hígado y ganglios linfáticos (W. Chen et al., 2018; Nakayama et al., 2021)

En la tabla 3 se muestran algunos de los genes que participan en la metástasis del CMTN en los diferentes órganos.

Tabla 3. Genes implicados en metástasis de cáncer de mama triple negativo.

Gene	Función	Vía de señalización	Escenario	Sitio de órganos
ANGPTL2	Promueve la osteólisis angiogénesis y migración	Activa la señalización CXCR4 y Erk1 / 2	Intravasación, extravasación Angiogénesis Colonización de micro a macrometástasis	Hueso
NOTCH1 / NOTCH2	Migración, invasión, promueve el mantenimiento de las células madre del cáncer	Activar la señalización Notch	Intravasación, extravasación Inicio del tumor y autorrenovación	Pulmones, hueso
COX2	Migración, invasión Promueve el mantenimiento de las células madre del cáncer	Media en el tallo de las células cancerosas inducidas por TGFβ	Intravasación, extravasación, autorrenovación	Hueso
CSF2	Activación de osteoclastos	Activado por señalización NFκB	Colonización de micro a macrometástasis	Hueso
OPN	Interviene en la transformación de fibroblastos, el crecimiento tumoral y la invasión asociados a MSC	Mediar la señalización de TGFβ1 para aumentar los niveles de MMP2 y uPA	Invasión de crecimiento tumoral	Hígado de pulmón
Wnt1	Mantiene la renovación de CSC, migración, invasión	Activa la señalización de Wnt / β-catenina	Intravasación, extravasación y colonización	Pulmones, hueso
CXCR4	Media la polimerización de actina y la formación de lamellopodia Migración, invasión y angiogénesis	Activado por ANGPTL2	Intravasación, extravasación y angiogénesis	Pulmones
CYR61	Vascularización	Activado por señalización Sonic-Hedgehog / Gli1	Angiogénesis Colonización de micro a macrometástasis	Pulmones
EREG	Promueve la remodelación e invasión de vasos	Independiente de VEGF	Angiogénesis, extravasación, intravasación	Pulmones
FGFR	Suprime la apoptosis y promueve la supervivencia.	Activa la señalización PI 3 K / Akt	Supervivencia, Crecimiento del tumor primario Colonización de micro a macrometástasis	Pulmones
FSCN	Migración, invasión	Activa la señalización de NFκB Aumenta la expresión de MMP2, MMP9	Intravasación, extravasación	Pulmones
SERPINAS (NS, B2, D1)	Inhibe la activación del plasminógeno, promueve la cooptación vascular	Inhibe la vía apoptótica mediada por FasL	Supervivencia, colonización	Cerebro
SLUG	Promueve la supervivencia, invasión, migración	Activado por Erk, la señalización de FGF. Activa la señalización de TGFB	Invasión local, intravasación, colonización, metástasis	Pulmones

Tomada de (Neophytou et al., 2018)

5. Mimetismo vasculogénico como impulsor de la metástasis

Se ha descrito que después de las terapias antiangiogénicas la progresión de la metástasis aumenta y promueve que las células tumorales imiten a las células endoteliales para formar redes de MV (Y. Xu et al., 2012).

Wagenblast E y colaboradores describieron a partir de un modelo de ratón que algunos clones de una heterogénea población de células contribuyen en el proceso de metástasis, estos clones presentan un aumento de la expresión de dos proteínas anticoagulantes Serpine 2 y Slpi que impulsan la formación de redes de MV, permitiendo que esta población de células ingrese a la vasculatura y migren para desarrollar metástasis. Además, estas proteínas facilitan la perfusión debido a su función anticoagulante (Fig. 9) (Wagenblast et al., 2015).

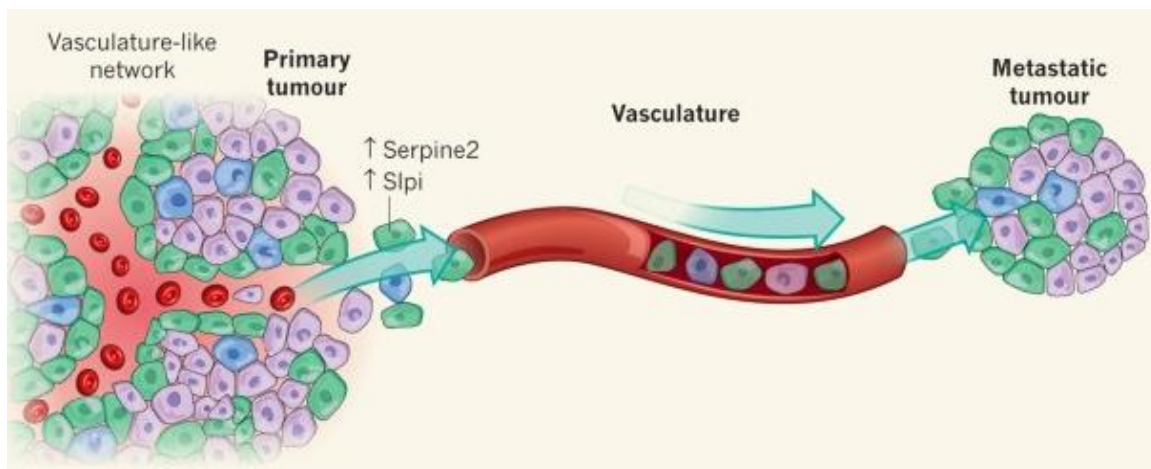


Figura 9. El MV favorece la metástasis. Se describe como un aumento de la expresión de las proteínas anticoagulantes Serpine 2 y Slpi impulsan la formación de redes de MV, permitiendo que esta población de células ingrese a la vasculatura y migren para desarrollar metástasis. Tomada de (Hendrix, 2015).

6. Biogénesis de miRNAs

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNA monocatenarios no codificantes (ncRNA) de 17-25 nucleótidos que participan en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. Estas moléculas son transcritas por la RNA polimerasa II, su transcripción primaria se llama pri-miRNA que presenta una estructura de hairpin stem-loop de aproximadamente 60-80 nucleótidos. En el núcleo el pri-miRNA es procesado por la proteína de tipo RNase-III llamada Drosha que se une al RNA bicatenario a través de la proteína de unión DGCR8. Drosha genera un corte de aproximadamente 11 nucleótidos en la unión de stem-RNAss y generando al pre-miRNA, el cual es exportado al citoplasma por exportina 5 (xpo5) a través de Ran GTP. En el citoplasma el pre-miRNA es nuevamente procesado por Dicer el cual cuenta con los dominios de ATPasa, dominio RNA helicasa, dominio DUF, PAZ, dsRBD y dos dominios RNase-III que le ayudan a unirse a los 2 nucleótidos que sobresalen del extremo 3' para producir la escisión generando un miRNA dúplex de 17-25 nucleótidos que contiene un grupo fosfato en el extremo 5' y un saliente de 2 nucleótidos en el 3'. Luego Dicer promueve la separación de las dos hebras del miRNA, permitiendo que la hebra guía se una a la proteína Argonauta (Ago) con la ayuda de la maquinaria chaperona HSP70 / HSP90 formando el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA). La otra hebra, denominada hebra pasajera o mRNA* es descartada. El miRNA se une a una secuencia específica en extremo 3'UTR del mRNA blanco y se puede llevar a cabo la inhibición de la traducción o desestabilización del mRNA blanco a través de la proteína Ago2 ya que tiene una potente actividad de corte y la proteína TNRC6 (GW182) quien genera cortes en la cola poli (A) del mRNA (Fig. 10) (Majid & Elham, 2019; Matsuyama & Suzuki, 2020). Los miRNAs también son sintetizados por la vía no canónica, como la vía del mirtron donde el pre-miRNA es exportado al citoplasma y procesados por Dicer sin necesidad del procesamiento por Drosha. El miRNA también es generado por la actividad endonucleasa de Ago2 en la vía dependiente de Drosha e independiente de Dicer.

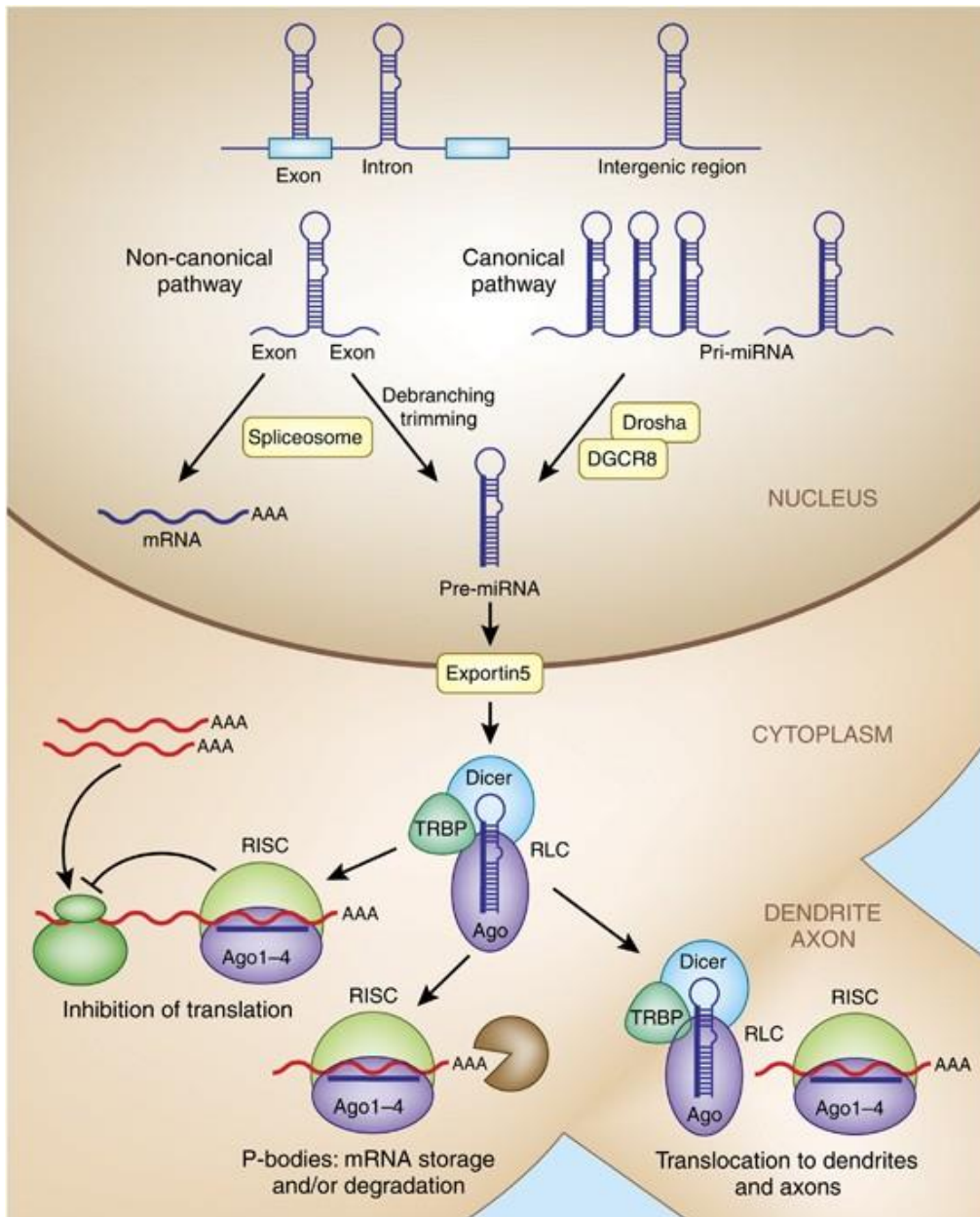


Figura 10. Biosíntesis de miRNA canónicos y no canónicos. Los miRNAs primarios son sintetizados en el núcleo por la DNA pol II, dentro del núcleo es procesado por la RNAs tipo III Drosha, generando un pri-miRNA el cual es exportado al citoplasma por exportina 5, donde es nuevamente procesado por la enzima Dicer. El miRNA es reconocido por el complejo RISC lo que permite que la región semilla del miRNA maduro se una al extremo 3' UTR de su blanco causando la degradación o la represión del RNAm blanco. Tomada de (O'Carroll & Schaefer, 2012).

6. Regulación del MV y la metástasis por miRNAs.

Los miRNAs tienen funciones importantes en la regulación de la expresión génica que impactan en los procesos celulares normales y patológicos, incluyendo el cáncer. Algunos miRNAs actúan como supresores de tumores u oncogenes. Su expresión desregulada se ha descrito promueve la iniciación, regulan procesos como el MV que guían a la progresión y metástasis de los tumores. Algunos miRNAs como el miR-34a y el miR-93 a través de la regulación de AXL y vimentina respectivamente, son fundamentales para la regulación de la formación de VM y metástasis en cáncer de mama (D. Lim et al., 2021)(An et al., 2021).

8. Regulación del MV por miRNAs como impulsor de la metástasis en cáncer de mama

La expresión alterada de los miRNAs juega un papel muy importante en diversas enfermedades incluyendo en cáncer de mama, mediante la modulación de la expresión génica a través de la inhibición o el secuestro de sus mRNAs blancos. Por lo tanto, la identificación de los perfiles de expresión de los miRNAs desregulados, son de suma importancia para determinar los mecanismos por los cuales se promueven los hallmarks del cáncer.

Diversos estudios han demostrado que la desregulación de miRNAs puede contribuir al desarrollo y progresión de los tumores, a través, del MV en diversos tipos de cáncer, incluyendo el CMTN al reconocer de manera específica a mRNA involucrados en la formación de este proceso. Por ejemplo, Salinas Vera y colaboradores demostraron que el miR-765 se encuentra reprimido en cáncer de ovario y su sobreexpresión promueve la inhibición del MV (Salinas y col., 2019), por otro lado, los resultados de Sun Q y colaboradores sugieren que el miR-200a inhibe MV al regular directamente a EphA2 (Sun y col., 2014).

En células de cáncer de mama se describió que la sobreexpresión del miR-34a inhibe el MV, invasión, migración y metástasis al dirigirse al receptor de la tirosina quinasa AXL (AXL) (D. Lim et al., 2021).

En otro estudio se reportó que el nivel de expresión del miR-93 en líneas celulares de cáncer de mama se encuentra aumentado comparado con una línea de mama

normal, por lo que al inhibir la expresión de este miRNA aumentaron los niveles de los marcadores epiteliales E-cadherina y ocludina y disminuyó la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y N-cadherina por lo que las capacidades migratorias e invasivas de las células disminuyeron considerablemente, además, el silenciamiento del miR-93 promovió la inhibición del MV (An et al., 2021). Por otra parte, se ha demostrado que la formación del MV puede ser promovido por factores paracrinós derivados de células endoteliales a través de la elevada expresión de IL-6 y STAT3 en células de CMTN, los cuales están regulados por la baja expresión del miR-125a y let-7 en respuesta al tratamiento con cisplatino, guiando al desarrollo de metástasis (Park & Kim, 2019a).

La osteoponina (OPN) es una oncoproteína relacionada con la progresión y metástasis del tumor. Esta proteína es altamente secretada por las subpoblaciones de células de cáncer de mama formadoras de esferoides cuando se encuentran estresadas por la baja concentración de nutrientes, lo que le otorga un aumento en la plasticidad fenotípica para formar MV. Las subpoblaciones de células de cáncer de mama formadoras de esferoides secretan altos niveles de OPN que favorecen la formación de estructuras vasculares que participan en la formación del MV a través de la baja regulación del miR-299-5p (Shevde et al., 2010).

En otro estudio en CMTN, demostraron que la sobreexpresión miR-126-3p causa la inhibición de la proliferación celular, migración, invasión, angiogénesis y reprime la formación del MV a través de la inhibición de RGS3 (Z. Hong et al., 2019a).

Los metastamiRs son una clase de miRNAs que promueven o suprimen varios pasos en la migración, invasión y metástasis de las células cancerosas al dirigirse a proteínas que participan en estos mecanismos (Lopez-Camarillo et al., 2012). La participación de ciertos miRNAs en el proceso de metástasis ha sido ampliamente estudiados en distintos tipos de cáncer. La alta expresión del miR-142-3p inhibe al mRNA de Bach-1 reprimiendo la formación de la transición epitelio mesénquima, invasión y migración en cáncer de mama invasivo (Mansoori et al., 2019). Otro estudio en cáncer de mama reportó que la proliferación, invasión y TEM es

promovida por la sobreexpresión del miR-325-3p mediante la regulación negativa de S100A2 (H. Wang et al., 2021).

En CMTN se ha reportado perfiles de expresión diferencial de miRNAs que promueven la metástasis, por ejemplo, let-7a/b/c, miR-100, miR-101, miR-10a, miR-125b, miR-126, miR-130, miR-135, miR-143, miR-195, miR-1977, miR-199a/b, miR-205, miR-210, miR-214, miR-34a y miR-497. Estos miRNAs modulan las vías de señalización Wnt, TGF-beta, PI3K y EGFR (Avery-Kiejda et al., 2014). Estos y otros estudios demuestran que la desregulación de la expresión de algunos miRNAs puede regular la metástasis en CMTN. En base a estos antecedentes mencionados, nos dimos a la tarea de identificar los miRNAs que se desregulan durante la metástasis en CMTN que promueven el desarrollo de MV.

9. Justificación

El mimetismo vasculogénico (MV) permite que los tumores obtengan nutrientes y oxígeno para su crecimiento, este mecanismo está relacionado con una mayor agresividad del tumor y un aumento de la metástasis. Se ha descrito ampliamente que los miRNAs se encuentran desregulados en distintos tipos de cáncer actuando como oncogenes o supresores tumorales, por lo que la restauración de la expresión de ciertos miRNAs en líneas células tumorales modulan la formación del MV y la metástasis. Por ello, identificar miRNAs que están siendo modulados durante el MV en pacientes con tumores metastásicos es de suma importancia para conocer la regulación de la metástasis y el MV a través de miRNAs en cáncer de mama, e implementar estrategias que ayuden a disminuir estas características tumorales, con la esperanza de que los pacientes tengan una mejor sobrevida.

10. Hipótesis

Si los microRNAs están involucrados en la regulación del MV y la metástasis entonces su expresión se modificará en los tumores de pacientes con cáncer de mama metastásico.

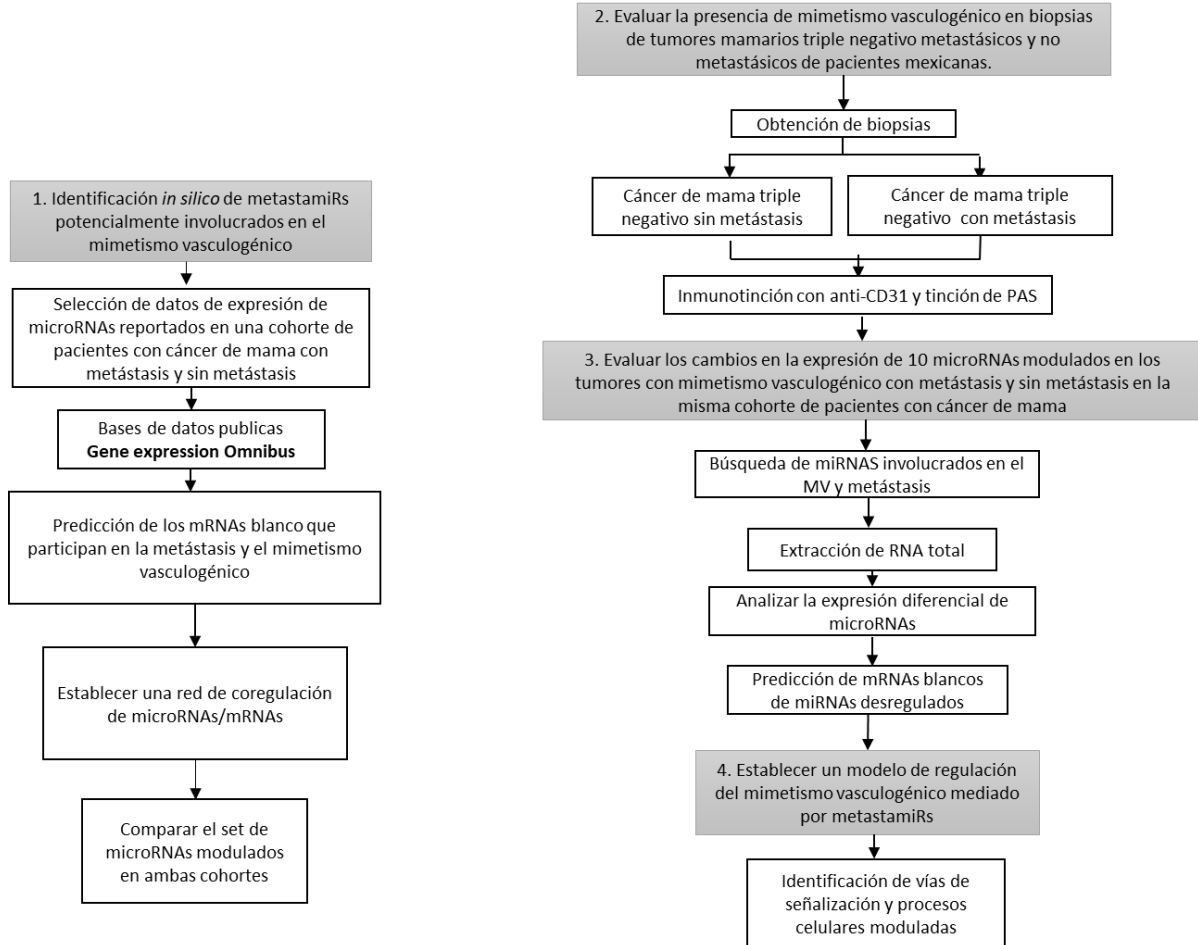
11. Objetivo general

Identificar los microRNAs en tumores de cáncer de mama que contribuyan con los procesos metastásicos y de MV.

12. Objetivos particulares

1. Identificación *in silico* de metastamiRs que participen en el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.
2. Evaluar la presencia de MV en biopsias de tumores mamarios triple negativo metastásicos y no metastásicos de pacientes mexicanas.
3. Evaluar los cambios en la expresión de 10 miRNAs en los tumores con mimetismo vasculogénico con metástasis y sin metástasis en la misma cohorte de pacientes con cáncer de mama y en una cohorte de datos de TCGA.
4. Establecer un modelo de regulación del MV mediado por metastamiRs en pacientes mexicanas con cáncer de mama.

13. Estrategia experimental



14. Métodos

14.1 Obtención de biopsias de cáncer de mama triple negativo.

Se obtuvieron 10 biopsias de tejidos de cáncer de mama triple negativo en estadio clínico II- IV sin ningún tratamiento previo con metástasis (n=4) y sin metástasis (n=5) del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HRAEI) con previo consentimiento firmado por las pacientes. Este proyecto está bajo la aprobación del comité de ética con el número de registro No. NR-16-2020 del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca.

14.2 Identificación de MV por doble tinción de CD31/PAS en CMTN mediante inmunohistoquímica.

Se realizaron cortes de 3 μ m para la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo CD31 monoclonal de ratón (BioSB clon 1A10) que es un marcador altamente específico y sensible para células endoteliales vasculares. Las secciones tumorales se desparafinaron en xileno y se rehidrataron con gradiente decreciente de etanol. Para la recuperación del antígeno se colocaron las lamillas con buffer de citratos (pH=6) en ebullición durante 30 min y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con peróxido de hidrógeno al 3% en etanol al 50% durante 30 min a temperatura ambiente. Después, los sitios de unión no específicos se bloquearon con BSA al 2% (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados 2 min con PBS-1x/Tween-20 (0.05%) y 2 lavados 2 min con PBS-1x. Después se adicionó el anti-CD31 sobre las laminillas a una dilución 1:200, y se incubó por 1h a 37°C seguido de una incubación a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados 2 min con PBS/tween-20 y 2 lavados 2 min con PBS-1x, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado acoplado a HRP (ab205718) (1:1000) durante 1 h a 37°C seguido de 3 lavados con PBS1x / tween y 2 lavados PBS-1x. Luego se realizó el revelado de la marca del anticuerpo biotinilado usando el sustrato de diaminobenzidina como cromógeno (kit de sustrato DAB (ab64238)) en un periodo de incubación de 2 a 7 min. Posteriormente, la reacción se paró con agua corriente (potable). Para la tinción de

PAS se utilizó el reactivo de Schiff (No. Cat. 3952016 Sigma Aldrich), las laminillas se incubaron a la obscuridad a temperatura ambiente por 10 min y se lavaron con agua corriente 3 veces por 30 segundos. Finalmente, se realizó una tinción de contraste con hematoxilina/eosina 1 min. Para la deshidratación, se realizaron 10 baños de las laminillas con etanol al 80%, 10 baños con etanol al 96 %, 10 baños con etanol absoluto. Finalmente, se realizó un aclaramiento de la tinción con 10 baños de xilol y se realizó el montaje de las laminillas con una gota de resina sintética y se colocó un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron al microscopio y se escanearon con Aperio ImageScope - Software (Leica). Los vasos sanguíneos y la formación de canales se contaron utilizando el software ImageJ Fiji para inmunohistoquímica.

14.3 Extracción de RNA total a partir de muestras embebidas en parafina.

La extracción de RNA total de las biopsias en parafina se realizó utilizando el kit RNeasy FEEP Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello se utilizaron 3 cortes de 20 micras cada una de las biopsias, los tres cortes se colocaron juntos en tubos de microtubos estériles eppendorf de 1.5 ml y se añadió 1 ml de xileno para desparafinar. Posteriormente, se mezclaron vigorosamente durante 30 segundos. Los tubos se incubaron a 63 °C durante 1 h. Terminado el tiempo de incubación, el xileno se retiró de cada tubo por pipeteo. Este procedimiento se realizó dos veces más, pero sin agitación, para retirar los restos de parafina. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol absoluto grado biología molecular y se mezcló por inversión. Se retiró el etanol cuidadosamente y los tubos se incubaron a 63 °C durante 10 min para lograr la evaporación del etanol. Luego, se adicionaron 150 µl de Buffer de lisis PKD (buffer de digestión de la proteinasa K) a cada tubo para la digestión de la muestra y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Inmediatamente se agregaron 10 µl de proteínasa K a cada tubo y se incubaron a 56 °C durante 15 min. Luego se incubaron a 80 °C por 15 min. Terminado este tiempo se colocaron los tubos en hielo durante 3 min, y se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante de cada tubo y se pasó a un tubo nuevo. Se le adicionó 20 µl de

DNasa I, y se mezclaron por inversión suavemente y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 320 µl de Buffer RBC y se mezclaron suavemente. Después se agregaron 720 µl de etanol (grado biología molecular) y se mezclaron suavemente. La solución se transfirió a una columna RNeasy Mini Elute Spin (Quiagen), la cual se colocó dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml para cada muestra, los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Se repitieron los dos pasos anteriores hasta pasar completamente toda la muestra por la columna. Posteriormente, se agregaron 500 µl de Buffer RPE por cada columna para lavar el RNA unido a la membrana y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 segundos. Se repitió el paso anterior colocando 500 µl de Buffer RPE a cada columna, centrifugando a 10,000 rpm durante 2 min. Se colocaron las columnas en un tubo nuevo y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Las columnas fueron colocadas en tubos de microcentrífuga nuevos de 1.5 ml y se adicionaron 20 µl de agua libre de RNAsas a cada una de ellas para la elución del RNA. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Las muestras se cuantificaron en nanodrop y, finalmente, se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

14.4 Determinación de la expresión de miRNAs.

Para llevar a cabo el análisis de la expresión individual de los miRNAs en muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama metastásico y no metastásico, se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído de cada muestra. Para ello se utilizaron sondas stem-loop RT (Applied Biosystem) específicas para el miR-526b, miR-9*, miR-126, miR-29b, miR-145, miR-125b, miR-148a, miR-142-3p, miR-31, miR-200b, y el RNU44 como control endógeno. Se mezclaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml los siguientes componentes.

Componente	Volumen de reacción
DNTP 100 mM	0.15 µl
Transcriptasa reversa MultiScribe™ 50 U/µl	1.00 µl
Buffer RT 10 X	1.50 µl
Inhibidor de RNAasa 20 U/µl	0.19 µl
Agua libre de nucleasas	4.16 µl
Primer RT (específico para cada miRNA)	3 µl
10 ng RNA total	5 µl

La mezcla se agitó suavemente. La reacción de RT se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems), con las siguientes condiciones a 16 °C por 30 min; 42 °C por 30 min; y 85 °C por 5 min, más un paso final a 4 °C ∞. Al finalizar la reacción de transcripción, se realizó la reacción de PCR en tiempo real en la que se usaron sondas TaqMan, para lo cual se empleó una placa de 96 pozos. LA mezcla de reacción para la PCR en tiempo real consistió en:

Componente	Volumen por una reacción
Sondas TaqMAN (20X)	1.00 µl
Producto de RT	1.33 µl
TaqMan Universal Master Mix (2X) sin UNG	10.00 µl
Agua libre de nucleasas	7.67 µl
Volumen total	20.00 µl

Cada una de estas reacciones se realizó por triplicado para cada muestra. La reacción se corrió en un equipo QuanStudio 12K Flex con las siguientes condiciones de ciclaje un ciclo de 50°C 2 minutos, un ciclo de 95°C 10 min y 40 ciclos: 95°C 15 segundos y 60°C 60 segundos. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta ct}$), usando como normalizador la expresión del control endógeno RNU44. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativo.

14.5 Análisis bioinformáticos de los datos públicos de cáncer de mama. El perfil de expresión diferencial se descargó de CMEP que contiene información de la base de datos de Gene Expression Omnibus (GEO) de la serie GSE68373. Los blancos hipotéticos de los miRNAs se identificaron utilizando los programas TargetScan 7.0 (http://www.targetscan.org/vert_71/) y miRDB (<http://mirdb.org/>) y las redes de interacción miRNAs-mRNA se identificaron mediante miRNET (<https://www.mirnet.ca/>). Solo los genes predichos por los programas antes mencionados fueron seleccionados para un análisis posterior. Los análisis de enriquecimiento se realizaron utilizando la herramienta de Mienturnet (<http://userver.bio.uniroma1.it/>). Además de descargar los datos públicos del nivel de expresión de 10 miRNAs de pacientes con CMTN de la herramienta bioinformática <https://www.cbioportal.org/datasets> con nombre de estudio Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Nature 2012) para comparar su expresión con los niveles de expresión de los miRNAs en las pacientes mexicanas.

14.6 Análisis estadísticos. Los análisis estadísticos de los miRNAs evaluados experimentalmente en los grupos de cáncer de mama de población mexicana se realizaron análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism 7.0. Los datos se presentarán como la media $\pm$ el error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3$). Se considerará valores de $p < 0,05$ con significación estadística.

15. Resultados

15.1 Identificación *in silico* de miRNAs asociados con metástasis en pacientes con cáncer de mama.

Con el fin de identificar *in silico* algunos miRNAs modulados diferencialmente durante la metástasis se obtuvo un análisis de expresión con los datos de GEO (Gene Expression Omnibus) de la serie GSE68373, este estudio contiene el perfil de expresión diferencial de 26 miRNAs en 17 muestras de pacientes con cáncer de mama con metástasis y 26 sin metástasis. Los datos del perfil obtenido de <http://syslab5.nchu.edu.tw/CMEP> sugiere una baja expresión de 26 miRNAs en tumores mamarios con metástasis (metastamiRs) en comparación con los tumores que no desarrollaron metástasis (Fig. 11). Posteriormente, para determinar los posibles blancos de estos miRNAs se usó el programa Targetscan. Para ello, identificamos los blancos con funciones en la metástasis que podrían estar regulando por los metastamiRs reprimidos en pacientes metastásicos. Los transcritos blancos que participan en la migración, invasión y metástasis regulados por los miRNAs se muestran en la tabla 4. Este resultado propone que los metastamiRs analizados del perfil potencialmente tienen un efecto en la metástasis a través de la regulación de sus mRNA.

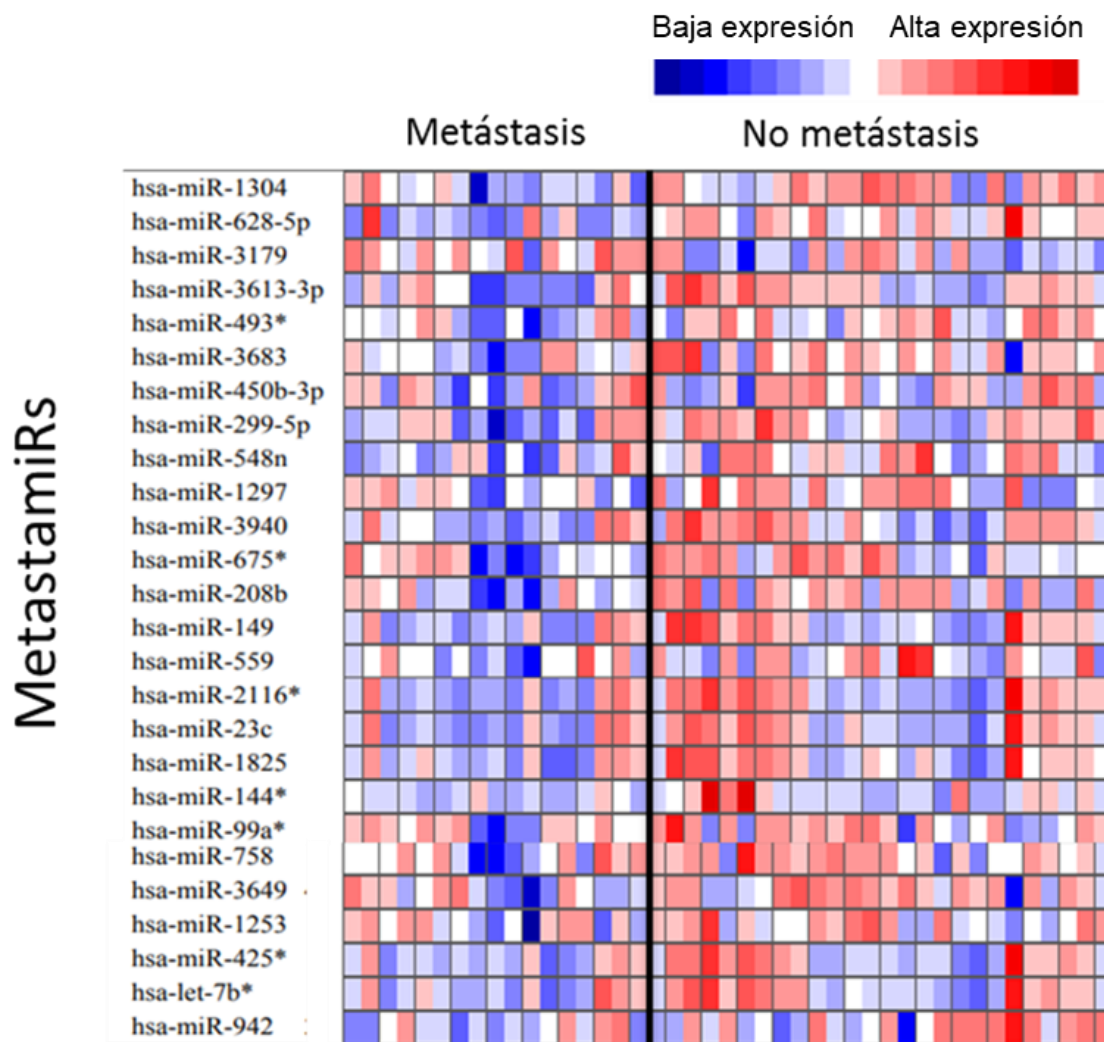


Figura 11. Perfil de expresion de miRNA en tumores de mama metástasico y no metastásico. Datos obtenidos de GEO de la serie GSE68373. Rn color azul se muestran los miRNAs con un bajo nivel de expresión, mientras que en rojo se observan los miRNAs con una alta expresión de cáncer de mama con metástasis y no metástasico respectivamente.

Tabla 4. Predicción de metastamiRs que regulan mRNAs pro-metastásicos

MetastamiRS	Blanco pro-metastásicos
hsa-miR-1304	AKT1, ZEB2, ROCK1/ROCK2 Serpine
hsa-miR-628-5p	Serpine, FOXO3, STAT1
hsa-miR-3179	CCND1, MMP2, ZEB1, ZEB2, B-Cat,
hsa-miR-3613-3p	MMP14, AKT, SNAI2, VIM
hsa-miR-493*	ROCK1, STAT, ITG
hsa-miR-3683	OCLN, ITGA7, RAS
hsa-miR-450b-3p	CTN, ITGA2, ROCK2, MMP
hsa-miR-299-5p	ATF2, ROCK1
hsa-miR-548n	NOTCH, MMP, PDK1, STAT3
hsa-miR-1297	SRBP1, SMAD1, ROCK1
hsa-miR-3940	CCND1, LOXL1, MMP, AKT
hsa-miR-675*	STAT1, RAS, TGFB1
hsa-miR-208b	PI3k, ZEB2, SMAD5
hsa-miR-149	ATF, SMAD1/2
hsa-miR-559	OCLN, ATF, ITGA6
hsa-miR-2116*	LOXL3, PI3k, twist1
hsa-miR-23c	PI3k, ZEB1, TGFB, CCDN1
hsa-miR-1825	SRF, SERBP1, WNT
hsa-miR-144*	FOXO1, STAT1, SMAD1, GRB, ROCK
hsa-miR-99a*	ND
hsa-miR-758	ROCK, LOXL3, TGFB2, ZEB1
hsa-miR-364	ND
hsa-miR-1253	CCDN1, MMP9, AKT3, ROCK1, LOXL2
hsa-miR-425*	Serpine1, NOTCH, STMN1
hsa-let-7b*	MMP, AKT2, LOXL4, AKT
hsa-miR-942	ZEB2, ZEB1, MMP2

ND. No determinado

15.2. Redes de interacción de los metastamiRs con genes blancos que promueven la metástasis en cáncer de mama.

Para determinar la relación entre los metastamiRs con sus respectivos mRNAs blancos y para poder establecer si su interacción puede ser específica en tejido de cáncer de mama, se realizó una red de interacción de los metastamiRs con los posibles mRNAs blancos pro-metastásicos empleando el programa miRNET. El resultado que se obtuvo revela una red de interacción compleja y específica en tejido de cáncer de mama que demostró que 20 de los 26 metastamiRs interaccionaron con transcritos de genes pro-metastásicos. Por lo tanto, 20 metastamiRs (miR-1253, miR-493*, miR-450-3b, miR-559, miR-1297, miR-628-5p, miR-149, miR-675*, miR-528n, miR-425*, miR-23c, miR-299-5p, miR-3179, miR-3613-3p, miR-99a, let-7b, miR-144*, miR-942, miR-1825 y miR-1304) desempeñaron un papel en el control de la metástasis en cáncer de mama, al unirse a mRNA relacionados con los procesos de TEM, invasión y metástasis (Figura 12). Por lo que estos resultados que se obtuvieron mediante miRNET nos indican que la interacción entre los miRNAs y sus mRNAs blancos están estrechamente relacionados con el desarrollo de la metástasis en cáncer de mama.

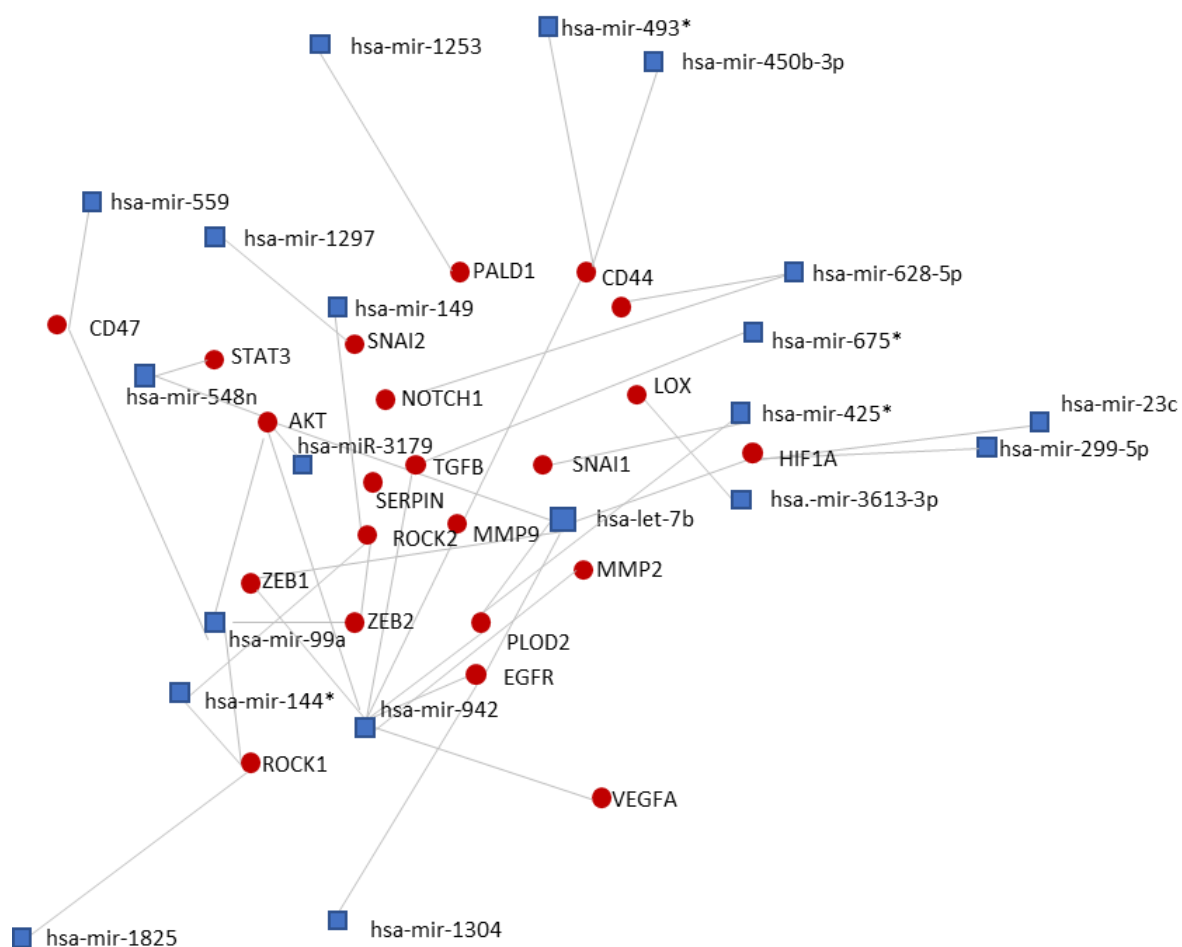


Figura 12. Red de interacción de metastamiRs y mRNA pro-metastásicos en tejido de cáncer de mama. Los puntos rojos ilustran los genes, los cuadros azules los miRNAs y las líneas indican si existe una interacción entre ambos. Predicción de miRNET.

15.3. Predicción de metastamiRs que regulan mRNAs involucrados en el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.

Posteriormente, se investigó si los 26 metastamiRs están involucrados en la formación del MV. En la literatura se ha reportado diferentes vías de señalización inducen el MV, como la vía de VEGF, la vía de señalización de PI3K/AKT/FAK, HIF, entre otros (Salinas-Vera et al., 2018; J. G. Zhang et al., 2020). Por lo tanto, se usó nuevamente la herramienta Targetscan para identificar los posibles blancos biológicos de miRNAs que participen en el desarrollo de este mecanismo. Las predicciones indican que estos metastamiRs tienen sitio de unión en la 3'UTR a los transcritos que participan en diversas vías involucradas en proceso de desarrollo del MV (Tabla 5). Estos resultados sugieren que además de regular metástasis, los metastamiRs posiblemente también puedan modular el MV a través de sus blancos.

Tabla 5. MetastamiRs predichos que regulan mRNAs involucrados en el mimetismo vasculogénico

metastamiRs	Transcritos blancos del mimetismo vasculogénico
hsa-miR-1304	VEGFC, AKT1, EGFR, SMAD2
hsa-miR-628-5p	MMP2, ALDH2, AKT1
hsa-miR-3179	AKT1, VEGF
hsa-miR-3613	LAMB2, MMP11, ITGB1
hsa-miR-493	ITGB1, ITGA10, ROCK1
hsa-miR-450b	ROCK1, MMP, ALDH1
hsa-miR-299-5p	CDHR5, ITGA9
hsa-miR-548n	ITGB1, MMP8, AKT
hsa-miR-675	MMP14, ITGB8, SMAD
hsa-miR-149-5p	SMAD2, MMP
hsa-miR-559	VEGF, ZEB2, AKT
hsa-miR-23c	SMAD3, HIF1A
hsa-miR-1825	HIF1A, VEGFA, AKT
hsa-miR-144-5p	SMAD1, ITGB8
hsa-miR-99a-5p	FZD8
hsa-miR-364	ND
hsa-miR-1253	TWIST1, SMAD2, NOTCH
hsa-miR-425	TGFBR2, SMAD, FZD4
hsa-let-7b	HIF1A, STAT3
hsa-miR-942	AKT1, VEGFA, TWIST1, MMP2, MMP14

ND. No determinado

15.4. Redes de interacción de los metastamiRs con genes blancos que promueven el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.

Para identificar si las interacciones entre los metastamiRs y los transcritos que promueven el MV en tejidos de cáncer de mama se usó el programa miRNET. La red de interacción identificó 13 de los 26 metastamiRs con posible función en este proceso biológico a través de la regulación de los transcritos blancos. Entre los mRNA blancos los MMP, VEGF, TWIST, LOXL2, ZEB, ROCK1/2 y WNT fueron los objetivos con funciones importantes en el desarrollo del MV en los tumores en cáncer de mama (Fig. 13). Por lo tanto, el miR-3613-3p, let-7b-5p, miR-99*, miR-1825, miR-493, miR-144*, miR23c, miR-299-5p, miR-942, miR-1297, miR-3940, miR-548 y miR-675-5p potencialmente participan en la regulación del MV en pacientes con cáncer de mama metastásico. Este resultado nos proporciona información para caracterizar los blancos, posibles vías celulares y los mecanismos funcionales de los miRNAs en la progresión del cáncer de mama.

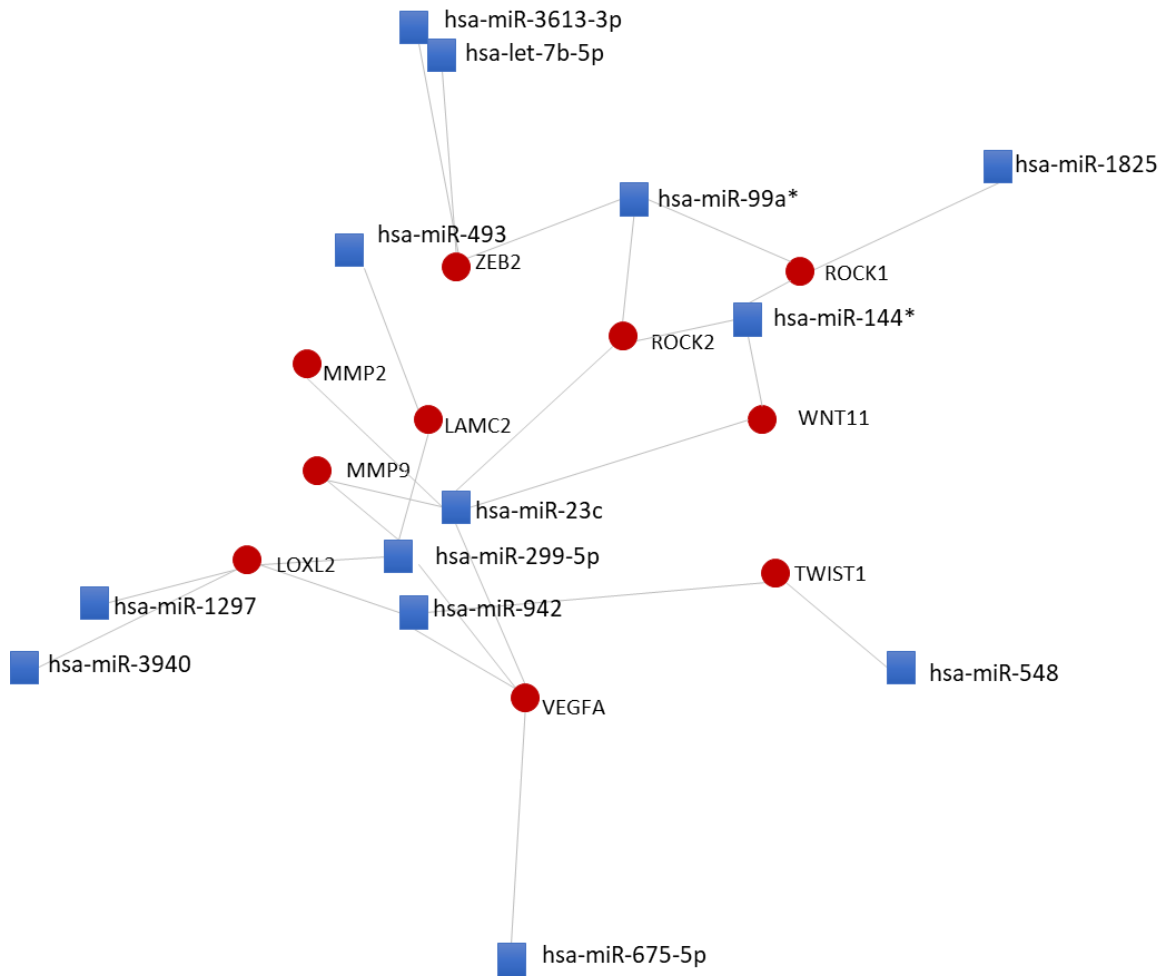


Figura 13. Red de interacción de metastamiRs que participan en el MV en tejido de cáncer de mama. Esta red predicha nos permite visualizar y vincular los miRNAs con sus blancos. Los puntos rojos ilustran los genes, los cuadros azules los miRNAs y las líneas indican si existe una interacción entre ambos. Predicción de miRNET.

15.5. Genes relacionados en la metástasis y MV.

Dado que, el MV favorece la metástasis al promover la diseminación de las células tumorales. Investigamos cuales genes pudieran estar compartiendo estos dos procesos. Para ello, buscamos en la literatura algunos genes que promuevan la activación de estos de la metástasis y MV. Nosotros encontramos 96 proteínas que participan en el proceso de metástasis y 71 que han sido reportados en el MV. En el cuadro rosa de la figura 13 se muestra algunas proteínas que contribuyen en la formación del MV, mientras que en el cuadro azul se muestran las que contribuyen a la metástasis. Para determinar la relación entre los dos mecanismos biológicos realizamos un diagrama de Venn con el programa de BEG. El resultado mostro que 25 proteínas participan en ambos mecanismos (Fig. 14). El diagrama de Venn indica que NOTCH, MMP, TGFB y AKT, entre otras son algunas de las proteínas que presenta una superposición entre los dos mecanismos. Este análisis indica que la formación del MV favorece la metástasis a través de la activación de los genes antes mencionados.

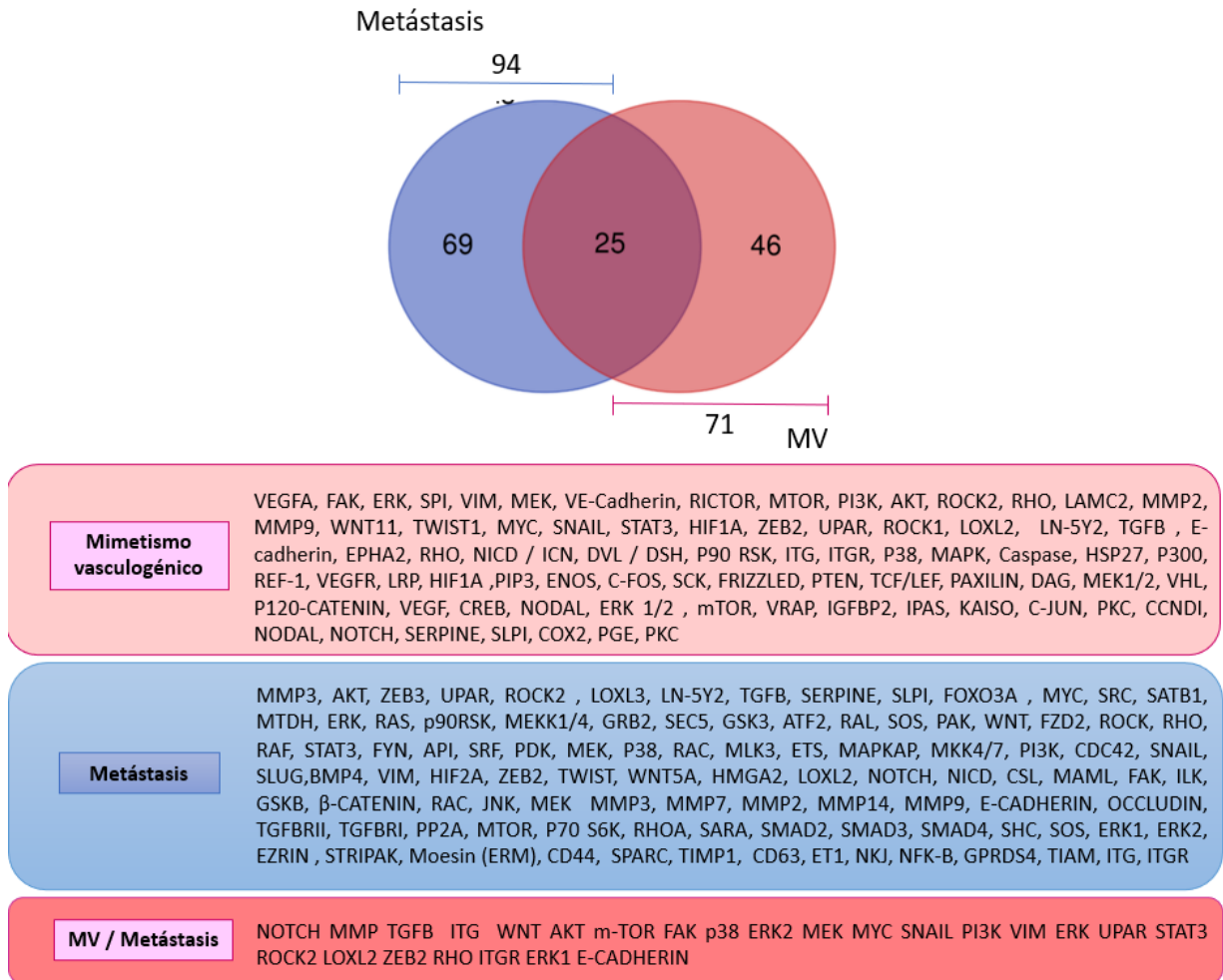
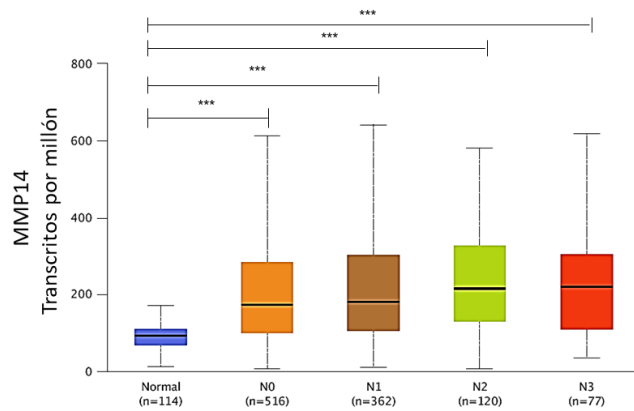


Figura 14. Diagrama de Venn que agrupa a los genes que participan en el mimetismo vasculogénico y en la metástasis en cáncer de mama.

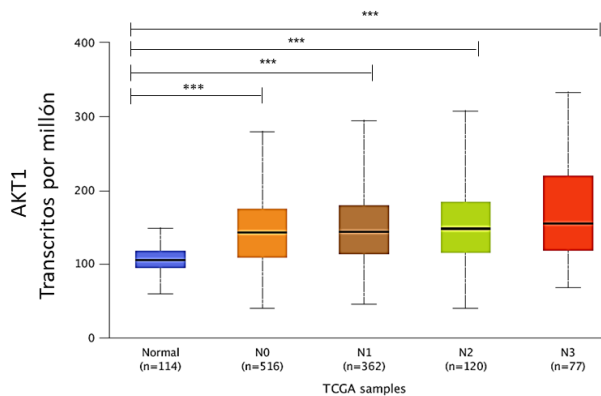
15.6. El nivel de expresión de las proteínas TGFB1, AKT1, MMP14 promueven la metástasis en cáncer de mama.

Para determinar los niveles de expresión de las proteínas que promueven la metástasis en pacientes con cáncer de mama, evaluamos el grado de afección a los nodos linfáticos. Se analizó el nivel de expresión de estas proteínas a través de la herramienta UALCAN, el cual, analiza los datos “omicos” de diferentes tipos de cáncer. Este programa permite elegir el tipo de cáncer que se desea analizar. Nosotros elegimos cáncer de mama metastásico e introdujimos las proteínas de nuestro interés, las cuales fueron: TGFB1, AKT1, y MMP14 debido a su relevancia en ambos mecanismos, especialmente su participación durante el proceso de la metástasis (las MMP promueven la invasión, AKT participa en la supervivencia de las células tumorales en circulación y TGFB media la ETM).

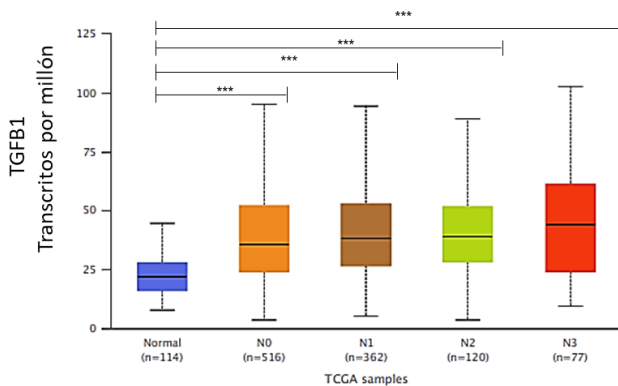
El análisis mostró que la expresión de la MMP14 aumentó de manera estadísticamente significativa en pacientes con cáncer metastásico con respecto al tejido normal. Además, la MMP14 correlacionaron positivamente con el grado de afección a los ganglios linfáticos. De igual manera, se observó esta afección con el nivel de expresión para TGFB1, y AKT1 (Fig.15). Este resultado sugiere que el nivel de expresión de las proteínas TGFB1, AKT1, y MMP14 está directamente relacionado con el grado de invasión a nodos linfáticos y que son estadísticamente significativos $p < 0.05$.



Comparación	Significancia estadística
Normal-vs-N0	<1E-12
Normal-vs-N1	1.62436730732907E-12
Normal-vs-N2	1.62447832963153E-12
Normal-vs-N3	1.22169999672295E-08



Comparación	Significancia estadística
Normal-vs-N0	1.62458935193399E-12
Normal-vs-N1	<1E-12
Normal-vs-N2	1.68276503842435E-12
Normal-vs-N3	3.25840465720262E-11



Comparación	Significancia estadística
Normal-vs-N0	<1E-12
Normal-vs-N1	1.11022302462516E-16
Normal-vs-N2	1.62503344114384E-12
Normal-vs-N3	7.90922882742962E-13



Figura 15. La expresión de las proteínas que promueven la metástasis en pacientes con cáncer de mama. N=0 indica que las células no han invadido ningún nodo linfático. N1, indica metástasis en 1 a 3 nodos. N2, metástasis en 4 a 9 nodos y N3 metástasis en más de 10 nodos. *** $p < 0.05$.

15.7. Analisis de enriquecimiento funcional y vías de señalizacion de los metastamiRs en cáncer de mama.

Posteriormente, se determinó de que manera estos metastamiRs promueven el MV en pacientes con cáncer metastásico. Se planteó la hipótesis de que las funciones potenciales de los genes blancos podrían reflejar los posibles roles de los miRNAs expresados diferencialmente. Por lo tanto, se identificaron los procesos biológicos y las funciones moleculares regulados por los metastamiRs a través de sus genes blanco en el cáncer de mama.

El análisis de enriquecimiento funcional se determinó mediante el programa Mienturnet (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>) que almacena datos de KEGG, Reactome, y otras bases de datos. Este sitio web permite tener una visión más general de las funciones colectivas de los miRNAs. Los resultados del análisis mostrarán que estos metastamiRs regularon RNAs blancos con distintas funciones biológicas en cáncer de mama, a través, de la modulación de las vías de señalización TGF β , PI3K, AKT, NOTCH, RUNX entre otras (Figura 16). El análisis mostró que let-7b-5p se asoció con la regulación de la expresión de RUNX1, el cual promueve la metástasis al activar la vía WNT/beta-catenina y la TEM en cáncer (Q. Li et al., 2019). El miR-1297 se encontró involucrado en la senescencia celular, este mecanismo tiene una función dual en el cáncer ya que se ha reportado que restringe la tumorigenesis o induce la progresión del tumor (Guccini et al., 2021). El miR-144-5p se asoció con la modulación de la señalización de PI3K/AKT y regulación del factor transcripcional RUNX1/2 promoviendo la TEM entre otras funciones biológicas en el cáncer de mama. El miR-149-5p se encontró involucrado principalmente en la senescencia celular y en la regulación de la transcripción de las SMAD, mientras que el miR-299 participa en diferentes fases de la mitosis celular, daño al DNA, senescencia y la señalización de la vía PI3K/AKT. La señalización de esta vía y la regulación de la expresión de este miRNA se ha descrito en la promoción de la formación de MV en cáncer de mama (Salinas-Vera et al., 2018; Shekar et al., 2020). El miR-3940-5p y el miR-425 también participan

en la regulación de RUNX1 y regulación de la transcripción de NOTCH que promueven la TEM. El miR-675-5p y miR-942-5p participaron en funciones como regulación de la transcripción de RUNX2 y señalización de PI3K/AKT respectivamente los cuales se han reportado en la promoción de la TEM y MV(Cao et al., 2017). Este análisis de enriquecimiento demostro que los metastamiRNAs regulan los blancos transcripcionales que promueven el desarrollo del MV y la metastasis en cáncer de mama.

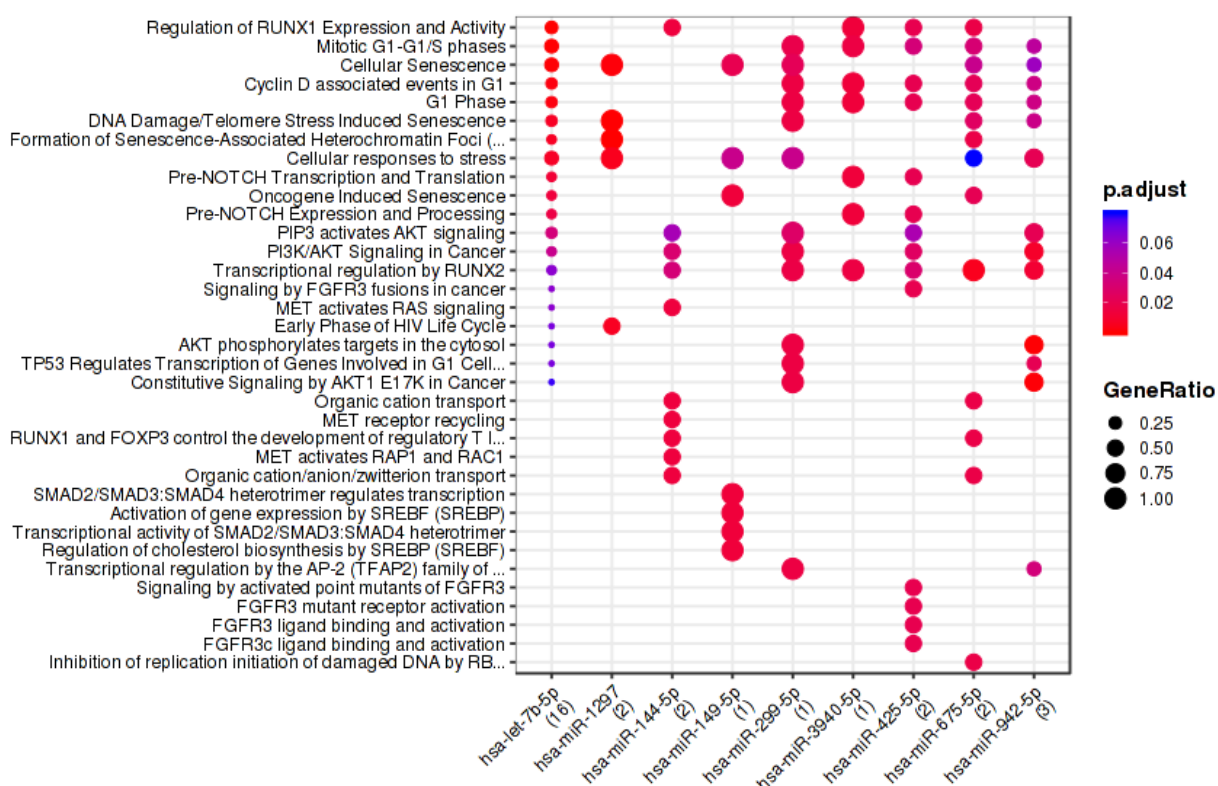


Figura 16. Análisis de enriquecimiento funcional de las vías de señalización que participan en el MV y metástasis regulada por los metastamiRs. El gráfico muestra el enriquecimiento funcional de 9 metastamiRs. El eje Y informa las vías de señalización reguladas y el eje X muestra los 9 metastamiRs. El color de los puntos representa los valores p ajustados, mientras que el tamaño de los puntos representa la proporción de genes blancos regulados por los miRNAs identificados en cada categoría. Obtenida por el programa MIENTURNET.

15.8. Características clínicas de las pacientes con cáncer de mama.

Con el objetivo de identificar la presencia del MV en tejidos de pacientes con cáncer de mama y determinar su asociación con la metástasis, se recolectaron muestras de tumores mamarios embebidos en parafina fijados con formalina (FFPE) entre 2020 y 2021, se colectaron un total de 10 muestras de pacientes con CMTN. Por análisis de IHQ y tinción de hematoxilina y eosina se detectó que estas muestras presentaron un 80 % de células tumorales. En la tabla 6 se describen las principales características clínicas de los tumores de los pacientes incluidos en el presente estudio. Todas las muestras de tejidos tumorales se diagnosticaron con cáncer de mama triple negativo (100%), se incluyeron tumores con grado histológico y estadio clínico > 2. Se incluyeron una muestra con estadio IIA-IIB (10%), 5 de los pacientes se detectaron en estadio clínico IIIA-IIIB (50%) y 4 pacientes con estadio clínico IIIC - IV (40%). En el momento del diagnóstico, 6 (60%) pacientes no presentaban metástasis mientras que los otros 4 (40%) presentaban metástasis.

Tabla 6. Características clínicas y patológicas de las pacientes con cáncer de mama (n=10).

Características	No. de pacientes n= 10 (100%)
Grado histológico	
1	0 (0%)
2	2 (20%)
3	8 (80%)
Grado de diferenciación	
IA-IB	0
IIA-IIIB	1 (10%)
IIIA-IIIB	5 (50%)
IIIC-IV	4 (40%)
Subtipo molecular	
Luminal A	0 (0%)
Luminal B	0 (0%)
Triple negative	10 (100%)
Estadio TNM	
T1	1 (10%)
T2	2 (20%)
T3	3 (30%)
T4	2 (20%)
N0	1 (10%)
N1	3 (30%)
N2	4 (40%)
N3	1 (10%)
M0	6 (60%)
M1	4(40%)
Estatus de metástasis	
No metástasis	6 (60%)
Metástasis	4 (40%)

15.9 Identificación del MV mediante tinciones dobles de CD31/PAS en tejido tumoral de CMTN.

Para identificar las estructuras de MV y diferenciar vasos formados por células endoteliales se empleó el anticuerpo CD31. Su visualización se realizó mediante tinciones dobles CD31/PAS y como control positivo empleamos amígdala. La tinción CD31+ se observa en color marrón, el cual, es un marcaje de células endoteliales indicativo de la presencia de vasos sanguíneos típicos (flechas rojas), mientras que la tinción de PAS+ (tinción magenta) indica membrana basal. Por lo tanto, un marcaje CD31+/PAS+ fue considerado como indicativo de vasos sanguíneos (angiogénesis, por lo tanto, es MV-), mientras que un marcaje CD31-/PAS+ fue considerado indicativo de la formación del MV positivo (MV+) (figura 17 y 18). Posteriormente se realizó una contra tinción con hematoxilina y eosina para identificar la forma y estructura celular. La hematoxilina tiñe de violeta los núcleos y eosina tiñe de rosa o rojizo el citoplasma. En la micrografía de la figura 17A se muestra la tinción con hematoxilina y eosina en tejido de CMTN, en violeta se visualiza células tumorales que conforman el tejido y de rojo se muestran los eritrocitos presentes dentro de las vasculaturas (asteriscos) (Figura 17A). Como control positivo para CD31 se seleccionó un tejido de amígdala de humano, debido a que es altamente vascularizado. El tejido de amígdala mostró regiones con tinción positiva para CD31 y reacción positiva para PAS (CD31+/PAS+) (Figura 16B). Para determinar la especificidad del anticuerpo se empleó como control negativo para CD31 el tejido de amígdala teñido con PAS sin emplear el anticuerpo primario de CD31 y se colocó el anticuerpo secundario, por lo tanto, no se identificó tinción café en el tejido, lo que indico que el anticuerpo de CD31 es altamente específico para células endoteliales (Figura 17C). Por lo tanto, CD31 es un indicador de vasos sanguíneos, por lo que nos ayudó a identificar y diferenciar entre vasos formados por células endoteliales y las estructuras tipo tubular formadas con células tumorales en CMTN.

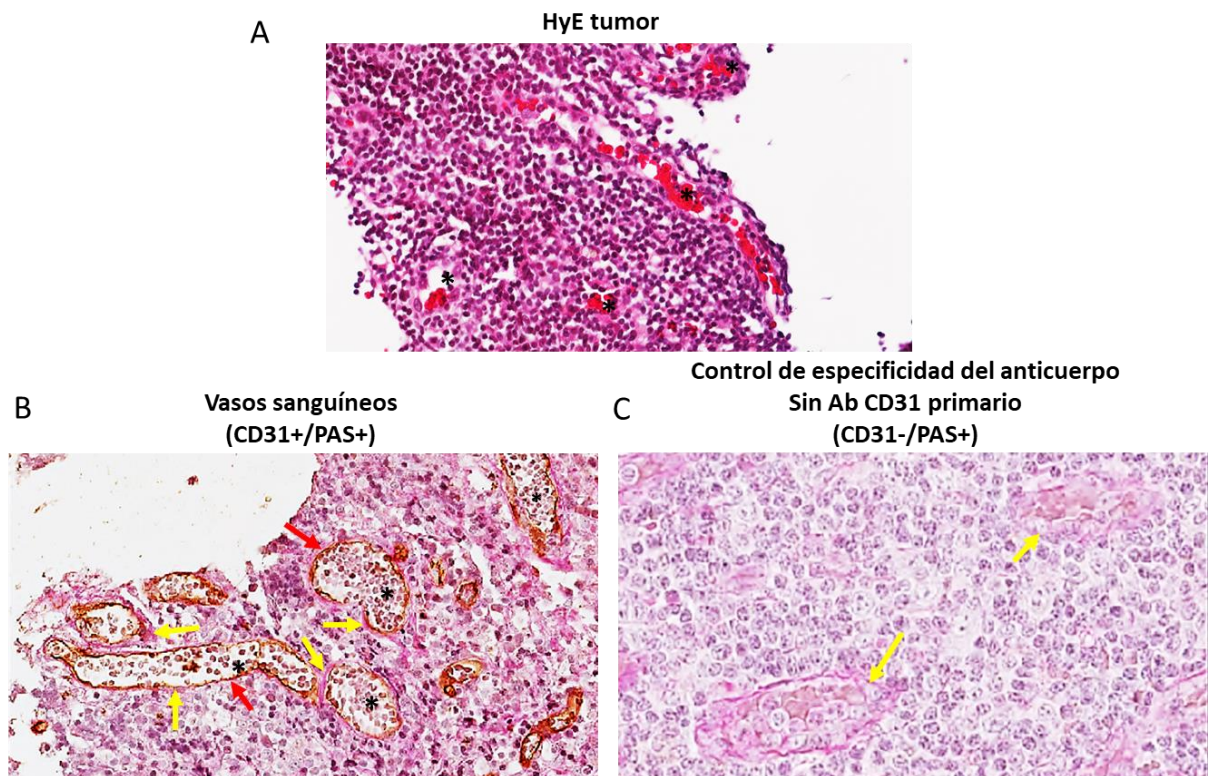


Figura 17. Controles para las tinciones dobles CD31/PAS en amígdala y cáncer de mama. A) Tejido mamario tumoral teñido con hematoxilina y eosina, la hematoxilina evidencia los núcleos de las células, y la eosina evidencia el citoplasma. El tejido está conformado por células tumorales y estructuras vasculares con presencia eritrocitos (asterisco). B) Control positivo para CD31. Tejido de amígdala teñido con CD31/PAS, se observan estructuras vasculares positivas a CD31 lo que indica que están formadas por células endoteliales (vasos sanguíneos). C) Control negativo para detectar la especificidad del anticuerpo CD31. Tejido de amígdala teñido con PAS omitiendo CD31, se observan estructuras vasculares negativas a CD31 y PAS positivo. Las flechas rojas muestran células endoteliales (CD31+), flechas amarillas señalan tinción de PAS+ y los asteriscos señalan los eritrocitos dentro de los vasos.

15.10. Identificación de la presencia de MV en biopsias de tumores mamarios triple negativo metastásicos y no metastásicos de pacientes mexicanas.

Para identificar la presencia del MV en muestras de CMTN ductales con y sin metástasis, se realizaron tinciones dobles CD31/PAS. La tinción se realizó en 10 tejidos de diferentes mujeres con las características anteriormente mencionadas (Tabla 6), 4 presentaron metástasis y 6 no presentaron metástasis. En las 10 biopsias de cáncer de mama se identificaron vasos sanguíneos típicos (CD31+/PAS+), así como estructuras tipo capilar propias del MV+ (CD31-/PAS+) (Figura 18). Estos ensayos se hicieron por duplicado para cada muestra. Posteriormente, todas las muestras fueron escaneadas empleando el Apeiro scanning system y las muestras se analizaron mediante el software ImageScope J fiji IHQ.

Las imágenes revelan que las estructuras típicas de vasos sanguíneos mostraron una coloración marrón alrededor del canal (CD31+) y presencia positiva a tinción de PAS, esto es indicativo de detención de vasos sanguíneos formados por células endoteliales, y en su interior se detectó la presencia de eritrocitos teñidos de color rosa translucidos (asteriscos). Mientras que las estructuras indicativas de MV+ mostraron que los canales tipo capilar estaban revestidos de células tumorales, esta se observó una tinción de PAS+ con ausencia de tinción a CD31, de igual forma se encontraron eritrocitos en los espacios de los canales tipo canal. Posteriormente, se cuantificaron y graficaron las estructuras de vasos sanguíneos (CD31+/PAS+) y MV+ (CD31-/PAS+) en muestras no metastásicas (Fig. 19 A y B) y metastásicas (Fig. 19 C y D). En cada una de las biopsias teñidas y escaneadas se seleccionaron 10 diferentes campos al azar y se observaron a 40 incrementos (40x) mediante el software ImageScope J fiji IHQ (Tabla 7). De estas observaciones obtuvo como resultado el promedio y desviación estándar del conteo de vasos sanguíneos en muestras metastásicas y no metastásicas (Fig. 19 E), así como el promedio y desviación estándar tipo capilar de MV+ en muestras no metastásicas y metastásicas (Fig. 19 F). Los resultados mostraron que los tejidos tumorales de

pacientes que no presentaron metástasis presentaron menor cantidad de estructuras tipo capilar positivas a MV en comparación con estructuras de vasos sanguíneos (a excepción de la muestra H-743), mientras que las muestras que presentaron metástasis exhibieron una mayor cantidad de estructuras tipo capilar (MV+) en comparado con vasos sanguíneos.

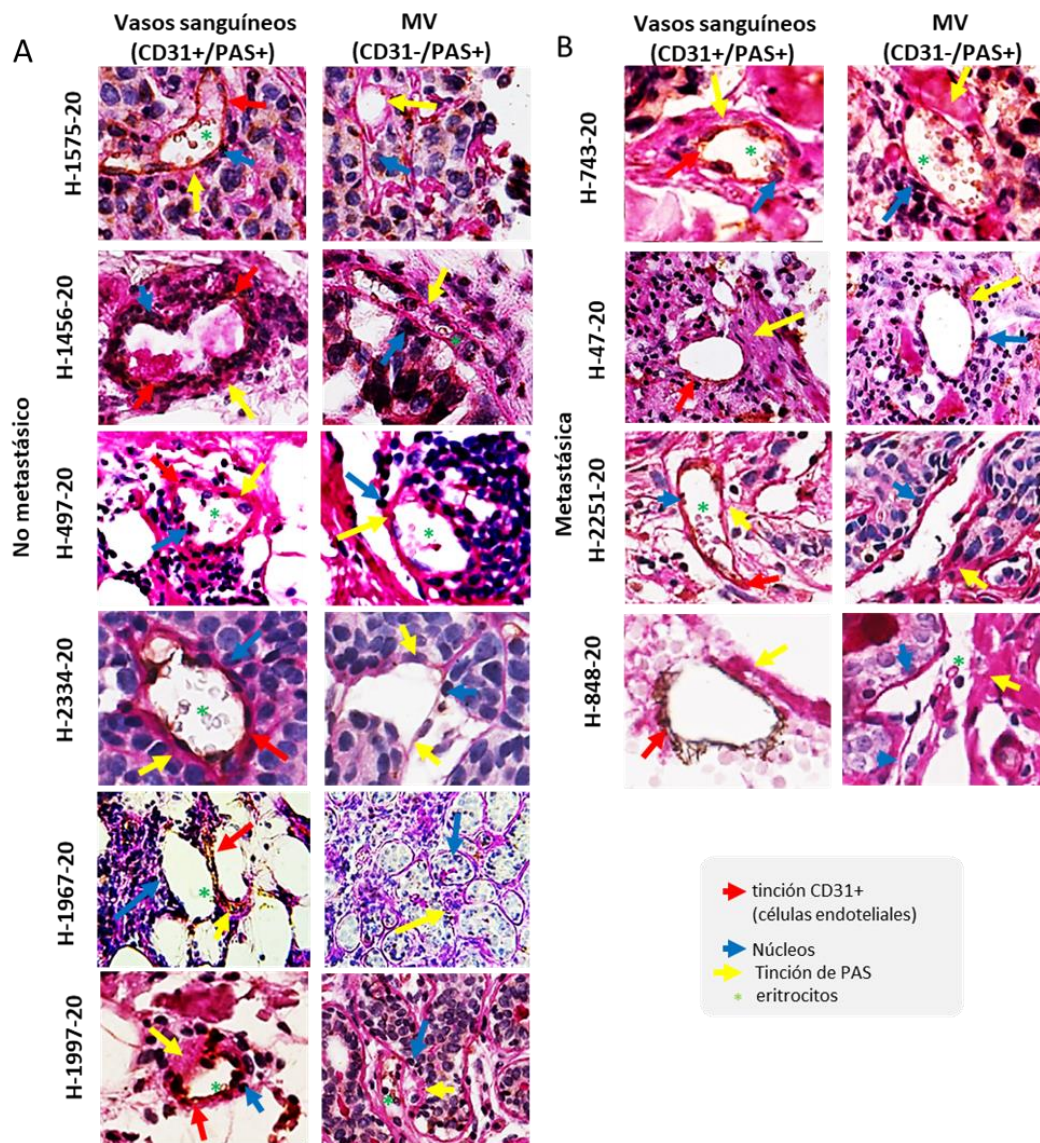


Figura 18. Identificación de estructuras vasculares y tipo capilar en muestras de tejidos de cáncer de mama triple negativo con y sin metástasis. En A) se observa los tejidos tumorales no metastásicos de los 6 pacientes diagnosticados con CMTN y en B) se observan el tejido tumoral metastásico de 4 pacientes con CMTN. En ambas micrografías se observa las estructuras formadas por células endoteliales (PAS+/CD31+), y las estructuras de tipo capilar formadas por las células tumorales (MV+) (PAS+/CD31-). Las flechas rojas señalan el marcaje positivo a CD31 indicativo de células endoteliales, flechas amarillas señalan la tinción de PAS+ rodeada de células tumorales, flechas azules señalan los núcleos de las células tumorales, (*) indica eritrocitos.

Tabla 7. Cuantificación de vasos sanguíneos y MV por micra cuadrada en 10 campos.

No metastásicas											
H-1575-20		H-1456-20		H-497-20		H-2334-20		H-1967-20		H-1997-20	
Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV
8	18	1	2	0	3	2	0	2	1	1	4
4	17	0	2	0	0	1	0	2	1	0	1
3	9	1	1	0	0	1	0	3	0	2	4
3	14	1	0	0	1	1	0	1	0	1	8
2	5	1	0	0	2	2	0	1	0	3	5
5	7	2	0	0	2	3	0	1	0	1	4
2	16	1	0	0	1	3	1	1	0	0	4
4	22	1	0	0	1	4	1	1	0	1	6
0	26	0	0	0	1	2	2	1	0	1	5
3	12	1	0	0	1	1	2	3	0	1	5
34	146	9	5	0	12	20	6	16	2	11	46

Metastásicas							
H-743-20		H-2251-20		H-848-20		H-47-20	
Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV	Vasos sanguíneos	MV
1	5	4	3	4	5	0	4
5	5	2	3	2	4	3	8
2	3	2	2	4	0	3	10
3	5	0	1	3	0	1	10
4	3	0	2	0	0	0	5
2	0	0	1	0	0	0	3
3	2	0	2	0	1	1	10
6	2	0	1	0	2	3	14
3	3	1	0	0	2	0	5
5	3	2	0	0	3	0	4
34	31	11	15	13	17	11	73

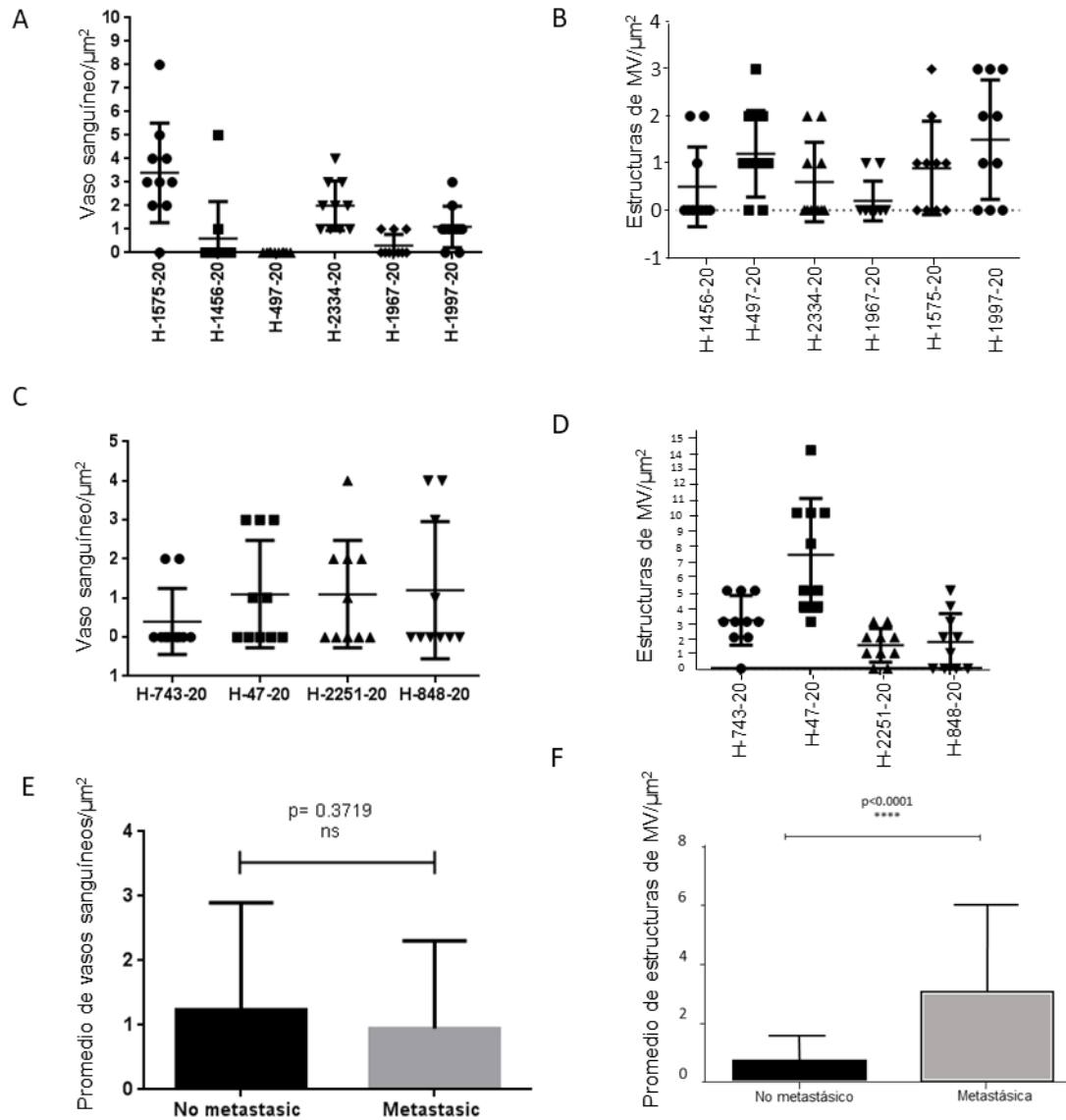


Figura 19. Cuantificación de estructuras vasculares y tubulares en tejidos de CMTN. Se determinó el conteo de los vasos sanguíneos y estructuras de MV en muestras no metastásicas (A, B) y muestras metastásicas (C, D) respectivamente y se obtuvo el promedio y desviación estándar. El promedio del conteo de las estructuras de vasos sanguíneos (E) y MV (F) se determinó en ambos grupos. Se observó que en muestras no metastásicas hay una proporción mayor de vasos sanguíneos, mientras que en las muestras metastásicas hay una mayor proporción de estructuras MV+. Con un valor de $p < 0.05$ estadísticamente significativo en el promedio de las estructuras de MV+.

15.11. Análisis de expresión de miRNAs que regulan el MV y metástasis en CMTN.

Se ha descrito que la desregulación de los miRNAs en las células tumorales sugiere que tienen efectos moderatorios sobre el desarrollo del tumor. Algunos miRNAs pueden actuar como genes supresores de tumores u oncogenes, esto dependerá del tejido donde están siendo expresados (Si et al., 2019). En cáncer de mama se ha identificado diferentes perfiles de expresión diferencial de los miRNAs que regulan el MV y la metástasis. En este proyecto previamente se realizó un ensayo *in silico* de 10 miRNAs que regulan el MV y la metástasis en diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer de mama. Los miRNAs que se emplearon para determinar su perfil de expresión en el MV y metástasis fueron el miR-526b, miR-9*, miR-126, miR-29b, miR-145, miR-125b, miR-148a, miR142-3p, miR-31 y miR-200b. Todos estos miRNAs han sido reportados con una baja expresión en cáncer de mama y modulan diversos hallmarks del cáncer (ver tabla 8). Adicionalmente, se realizó la identificación de los blancos predichos de estos miRNAs y se encontraron que estos miRNAs modulan a VEGF, HIF-1a, NOTCH, estos factores promueven la formación del MV y metástasis en cáncer de mama. Por ejemplo, la baja expresión del miR-526b pudiera estar favoreciendo la activación de VEGF, TWIST, NOTCH2, entre otras. Por lo que posiblemente, la expresión de estos miRNAs en cáncer de mama metastásicos este más suprimido, comparado, con los no metastásicos.

Tabla 8. miRNAs que modulan potenciales genes blancos que participan en la formación del MV y metástasis en cáncer de mama.

miRNA	Expresión en C. mama	Blancos en MV/Met Targetscan	Hallmark del cáncer	Mimetismo Vascuológico	Referencia
miR-526b	Baja	VEGF, TWIST, ZEB2, NOTCH2, WNT2, AKT3, PIC3CA, MMP2, Myc	Angiogénesis, transición epitelio mesenquima, proliferación, invasión	No reportado	Stephanie Hunter, et al 2019. Liu, Y. et al. 2020
miR-9*	Baja	STMN1, VEGF, TWIST, NOTCH, WNT2B, MMP16, ITGA2, FAK2	Progresión del tumor, metástasis	Inhibe el MV en glioma	Song, Y., et al. 2013. Ma, L., et al. 2010
miR-126	Baja	RGS3, VEGF	Proliferación, invasión, migración, angiogénesis	Inhibe el MV en cáncer de mama	Hong, Z., et al. 2019
miR-29b	Baja	MMP2, VEGFA, WNT, AKT, STAT3, ITGB1, ITGB6	Metástasis	Inhibe el MV en cáncer colorectal	Song, Y., et al. 2021
miR-145-5p	Baja	AKT, PI3K, mTOR, ZEB2, Serpine1, MMP16, MMP19, crecimiento ITGB8, VEGF	Metástasis, angiogénesis y crecimiento	Inhibe el MV en cáncer de pulmón	Zou C, et al. 2012. (Huang, Y. et al. 2020)
miR-125b	Baja	AKT, PI3K, mTOR, MMP11	Angiogénesis, metástasis	No reportado	Riquelme et al. 2016
miR-148a	Baja	WNT, HIF1A, NOTCH2, VEGFC, ITGA1, ITGA8, ITGA6, ZEB1, ZEB2, STAT1, STAT2, MMP16	Migración, invasión	No reportado	Jiang, Q., et al. 2016
miR-142-3p	Baja	Integrina	Invasión	No reportado	Yu, W., et al. 2019
miR-31	Baja	ROCK1, MMP16, RASA1, WNT	Progresión y metástasis	No reportado	Zhang et al 2020
miR-200b	Baja	NOTCH, ZEB1, ZEB2, VEGFA, SNAI2, AKT2, MMP16	Transición epitelio mesenquima, metástasis	No reportado	Soheilyfar, S., et al 2018

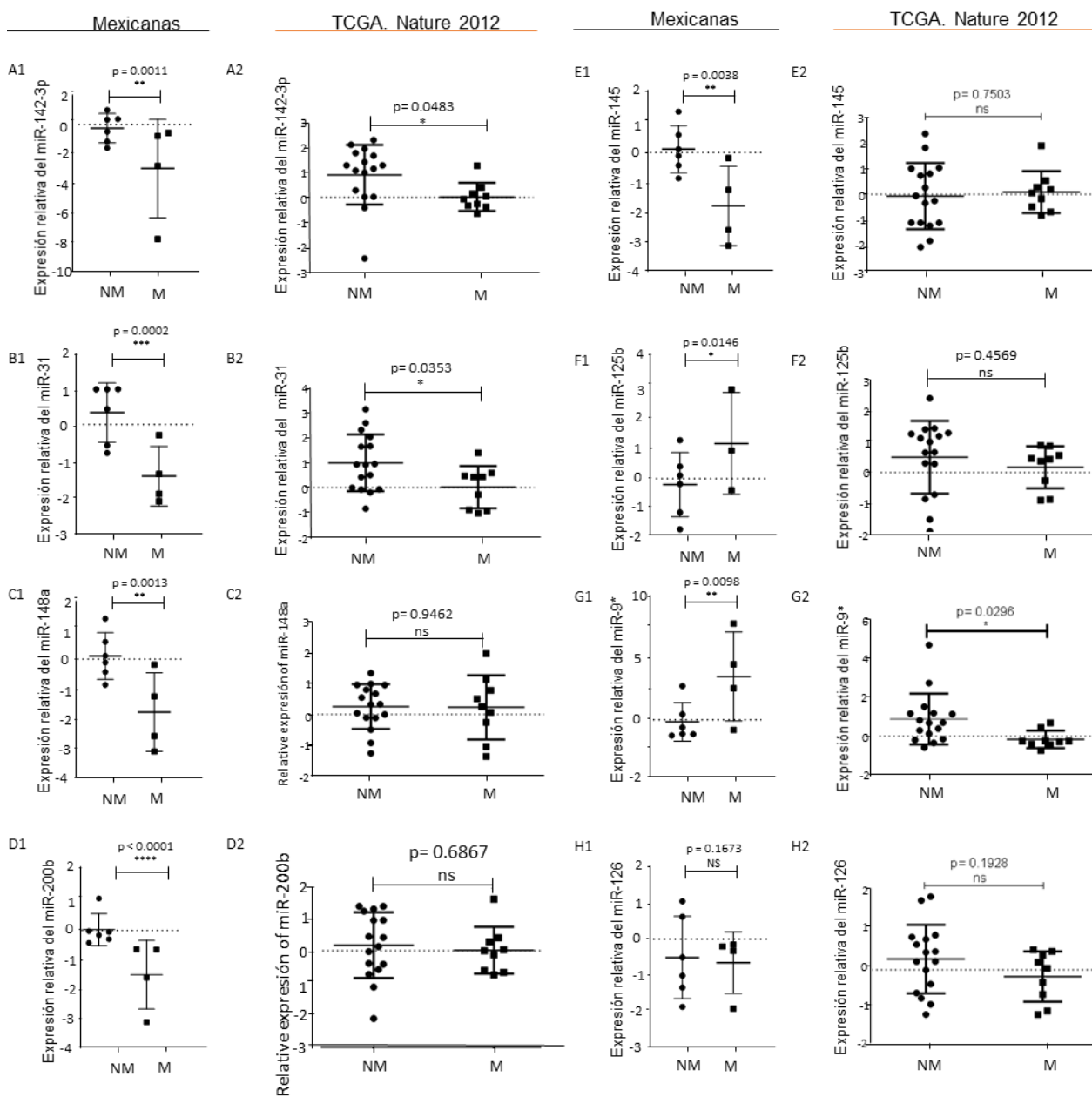
15.12. Expresión relativa de miRNAs que regulan la metástasis y el MV en CMTN.

Se determinó el análisis de la expresión relativa de los 10 miRNAs antes mencionados (miR-526b, miR-9*, miR-126, miR-29b, miR-145, miR-125b, miR-148a, miR-142-3p, miR-31 y miR-200b) por RT-PCR en muestras de tejidos de cáncer de mama metastásicos y no metastásicos. Se obtuvieron los siguientes resultados, se observó un nivel de expresión diferencial de 8 miRNAs entre los tejidos tumorales metastásicos y no metastásicos, mientras que los otros dos miRNAs no hubo diferencias significativas entre los grupos. De estos 6 de los miRNAs: el miR-142-3-p, miR-145, miR-31, miR-148a, miR-200b y miR-526 se detectaron altamente expresados en muestras no metastásicas comparado con las metastásicas con un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) entre ambos grupos en pacientes mexicanas con CMTN. Mientras que 2 miRNAs: el miR-125b y miR-9* se detectaron en alta expresión en los tejidos metastásicos comparado con el no metastásicos con valor de $p < 0.05$. Sin embargo 2 de los miRNAs: el miR-125 y miR-29b no mostraron cambios en su nivel de expresión en la población mexicana seguetas al estudio (ver Fig. 20).

Posteriormente, realizamos el análisis de expresión de estos miRNAs en una cohorte de pacientes de cáncer de mama que se obtuvo de los datos públicos de TCGA. Para esto, los datos de expresión fueron obtenidas de la herramienta bioinformática <https://www.cbioportal.org/datasets> del estudio carcinomas mamarios invasivos. De estos carcinomas invasivos se eligieron únicamente los datos de los tumores de CMTN. Los resultados que observamos mostraron que tres miRNAs: A2) el miR-142-3p, B2) miR-31 y G2) miR-9* están altamente expresados en tejidos no metastásicos de CMTN en comparación con los tejidos metastásicos. Mientras que 6 de los miRNAs, el C2) miR-148a, D2) miR-200b, E2) miR-145, F2) miR-125b, H1) miR-126 y I2) miR-29b no mostraron cambios significativos en su nivel de expresión entre ambos tipos de muestras. Por otro lado, el miR-526b no ha sido reportado en la base de datos de TCGA en este tipo de muestras.

El análisis de la base de datos de TCGA sugieren que solo 3 de los miRNAs se encuentran altamente desregulados en tejidos no metastásicos en comparación con los metastásicos y es posible que estos tejidos puedan ser positivas a la formación de MV.

De manera interesante, cuando comparamos los perfiles de expresión de las muestras de la población mexicana con CMTN con metástasis y sin metástasis con los niveles de expresión de miRNAs de las pacientes con CMTN de la base de datos se observó que el A1, A2) miR-142-3p y B1, B2) miR-3 se encuentran en alta expresión en ambos grupos de estudio. El nivel de expresión en ambas cohortes se muestra en la tabla 9.



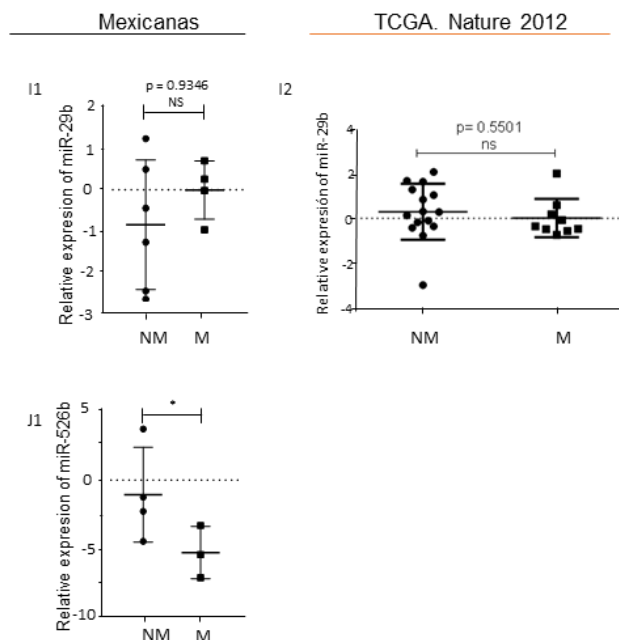


Figura 20. Análisis de expresión relativa de miRNAs en CMTN metastático y no metastático. En los gráficos se muestra la alta expresión diferencial de 6 miRNAs en CMTN no metastático en comparación con el grupo metastático. Mientras que 2 miRNAs: F1) el miR-125 y G1) miR-9* muestran un bajo nivel de expresión en el tejido no metastático en comparación con los metastáticos y 2 miRNAs H1) miR-125 y I1) miR-29b no mostraron cambios en su expresión en ambos grupos. También mostramos una desregulación en el nivel de expresión relativa de 9 de los miRNAs que analizamos en las muestras mexicanas A1) miR-142-3p, B1) miR-31, C1) miR-148a, D1) miR-200b, E1) miR-145, F1) miR-125b, G1) miR-9*, J1) miR-526b. El A2) el miR-142-3p, B2) miR-31 y G2) miR-9* mostraron un perfil de expresión diferencial estadísticamente significativo en las muestras de CMTN obtenidas de la base de datos de TCGA. Además, encontramos que el nivel de expresión del A1, A2) miR-142-3p, B1, B2) miR-31 y G1, G2) miR-9* en pacientes mexicanas concuerdan con los datos de TCGA. El análisis mostró una expresión heterogénea en todas las muestras de tumores. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Tabla 9. Comparación de los perfiles de expresión de miRNAs desregulados en CMTN contra TCGA

	Expresión en pacientes mexicanas		Expresión en datos de TCGA	
miRNA	NM	M	NM	M
miR-142-3p	↑	↓	↑	↓
miR-145	↑	↓	No significativo	No significativo
miR-31	↑	↓	↑	↓
miR-125b	↓	↑	No significativo	No significativo
miR-148a	↑	↓	No significativo	No significativo
miR-9*	↓	↑	↑	↓
miR-200b	↑	↓	No significativo	No significativo
miR-125b	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
miR-29b	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
miR-526b	↑	↓	No comparable	No comparable

↑ Alta expresión. ↓ Baja expresión.

15.13. Vías de señalización que promueven el MV y la metástasis regulada por miRNAs en CMTN en población mexicana.

Con el objetivo de integrar la expresión desregulada de los 10 miRNAs seleccionados en la etapa experimental de este proyecto. Se propuso un modelo que ilustra las vías de señalización y los transcritos blancos que impactan en el desarrollo del MV y la metástasis en CMTN (Ver Fig. 21). En este modelo ilustramos las vías de señalización de las integrinas, EphA2, Ve-Cad, VEGF, NOTCH, NODAL, hipoxia y WNT. Por lo tanto, nosotros proponemos una explicación hipotética de la desregulación de los miRNAs en la vía de señalización VEGF/PI3K/ERK.

Se ha descrito que VEGF promueve la formación de estructuras de MV, invasión y metástasis en cáncer de mama. Cuando el VEGFR-2 se fosforila tras su activación por VEGFA promueve a su vez la cascada de señalización de PI3K/ AKT que a su vez induce la fosforilación de ERK. Por otra parte, ERK regula tanto la actividad y la expresión de la metaloproteínasa de matriz 14 (MMP-14) en células altamente

invasivas de CMTN. La MMP-14, a su vez, activa la MMP-2 produciendo la escisión la cadena de laminina $5\gamma^2$ para producir fragmentos $\gamma 2'$ y $\gamma 2$, que se secretan en la matriz extracelular para promover la migración, invasión y metástasis del tumor (Delgado-Bellido et al., 2017) (Nilsson & Heymach, 2006).

Dado que en cáncer los miRNAs pueden actuar como genes supresores de tumores u oncogenes, la desregulación de estos miRNAs impacta en el desarrollo del cáncer. Nuestros resultados muestran que la baja expresión de los miRNAs: miR-142-3p, miR-145, miR-31, miR-148a, miR-200b y miR526 presentan una función supresora de tumores en CMTN metastásico, por lo tanto, sus blancos están sobreexpresados. Por ello, proponemos a partir de los análisis de predicción (Targetscan) que las vías de señalización VEGF/PI3K/AKT, ITG/FAK/ERK, Hipoxia puede ser regulada por estos miRNAs. Por ejemplo, el miR-145 ejerce un papel de un supresor tumoral, este miRNA tiene sitios de reconocimiento en la región 3'UTR de transcritos como VGFR-2, PI3K y MMP-14. Esto posiblemente indica que la desregulación de este miRNA puede afectar directa o indirectamente la activación y fosforilación de proteínas que participan río bajo de la vía de señalización VEGF/PI3K/AKT. Por lo que, al aumentar los niveles de expresión del miR-145 en CMTN metastásico se verá disminuida la expresión de PI3K y MMP-14 y la inhibición de la degradación de la matriz extracelular. Por otra parte, el miR-145 puede unirse al RNAm de ZEB1/2 disminuyendo sus niveles de expresión, y afectando a la transcripción de TWIST1, Snail y SLUG, lo cual, impacta en la inhibición de la metástasis de los tumores de CMTN metastásicos en este estudio.

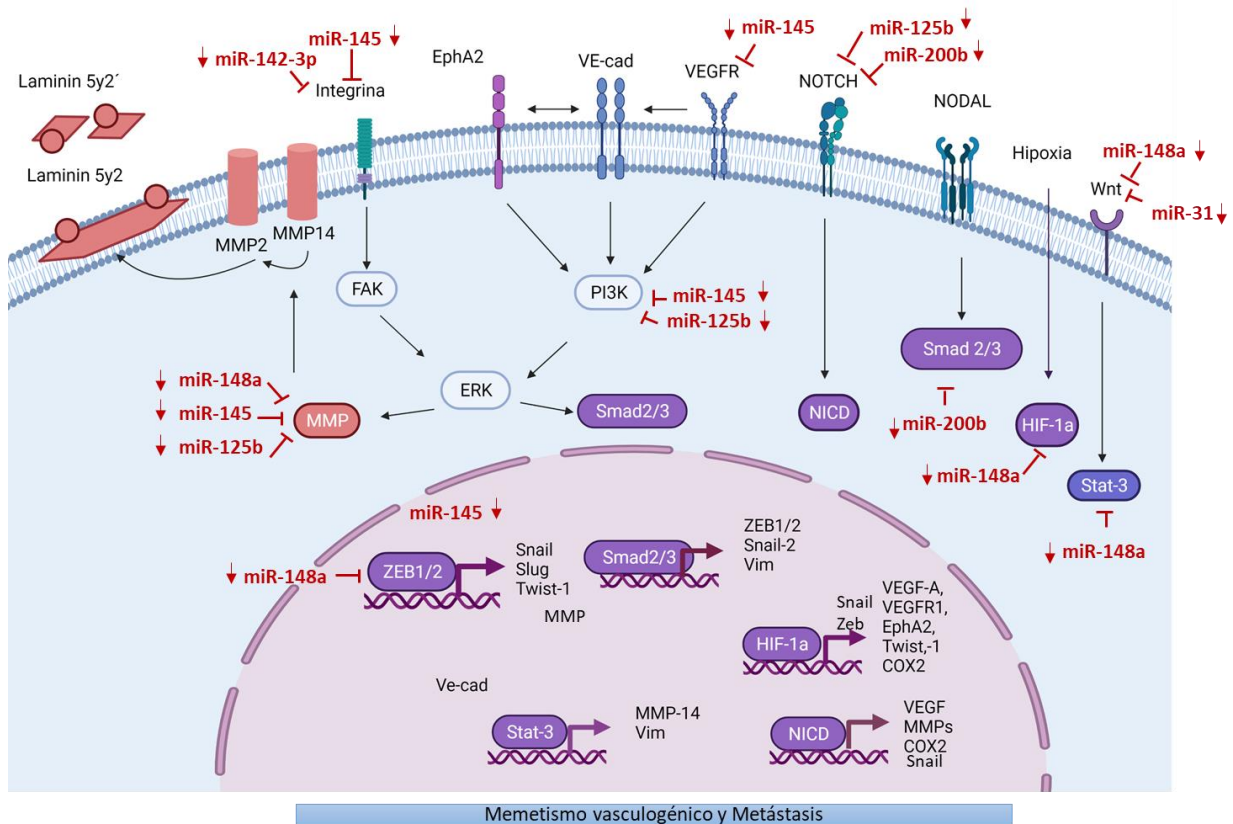


Figura 21. Modelo de regulación del mimetismo vasculogénico y metástasis mediada por metastamiRs. En rojo se muestran los miRNAs y los factores de transcripción en morado. Se indican las rutas de señalización de VEGF, PI3K, ERK, SMADS/TGF- β , e integrinas impactadas por los microRNAs desregulados en los tumores que presentaron MV y metástasis.

16. Discusión

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial. El CMTN es el subtipo más agresivo, de mal pronóstico debido a su capacidad a desarrollar metástasis, resistencia a las terapias y desarrollar MV (Deepak et al., 2020). Razón por la cual es importante identificar moléculas con elevada sensibilidad y especificidad que puedan ser utilizados como biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico de este tipo de tumor para poder establecer en un futuro tratamientos de medicina traslacional específicos en pacientes con CMTN. Estudios previos han reportado que la metástasis se ve favorecida por un mecanismo denominado mimetismo vasculogénico (MV) (Hendrix, 2015). El MV es un sistema de microvasculación tumoral para la adquisición de oxígeno y nutrientes al tumor (Maniotis et al., 1999). Este mecanismo se ha correlacionado con la agresividad y progresión del tumor al relacionarse con la baja supervivencia de los pacientes, invasión y metástasis (Luo et al., 2020; H. Song et al., 2018).

Este proyecto se realizó en dos etapas, en la primera etapa se realizó un análisis *in silico* empleando herramientas bioinformáticas de datos públicos con el objetivo de conocer el perfil de expresión diferencial de miRNAs en pacientes con cáncer de mama. Detectamos la expresión diferencial de 26 miRNAs (miR-1304, miR-628-5p, miR-3179, miR-3613-3p, miR-493*, miR-3683, miR-450b-3p, miR-299-5p, miR-548n, miR-1297, miR-3940, miR-675, miR-208b, miR-149, miR-559, miR-2116, miR-23c, miR-1825, miR-144, miR-99a*, miR-758, miR-3649, miR-1253, miR-425, let-7b, miR-942) en cáncer de mama, los cuales, mostraron un bajo nivel de expresión en los tumores metastásicos, con respecto a los pacientes que no presentaron metástasis.

Estudios previos demuestran la participación de estos miRNAs en la metástasis en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Por ejemplo, el aumento de los niveles de expresión del miR-1304 inhibe la migración e invasión en cáncer de vejiga a través de Myc (Q. Liu et al., 2020). Sin embargo, su participación en la metástasis y el MV en cáncer de mama no ha sido reportado previamente. Por lo

tanto, para investigar la importancia biológica de estos miRNAs en los procesos de metástasis y MV, realizamos una búsqueda de los genes blancos de los miRNAs antes mencionados mediante análisis de predicción (Targetscan). Los resultados de predicción sugieren que el miR-1304 tiene como RNAm blancos a AKT1, ZEB2, ROCK1/2, VEGF-C y serpine. El análisis *in silico* mostró que estos genes están asociados en el desarrollo de la metástasis y el MV. Por otra parte, Lin y col., reportaron que el incremento en la expresión del miR-628 suprime la migración e invasión a través de la regulación de SOS1 en CSC de cáncer de mama (Lin et al., 2018). Sin embargo, su participación en el MV no ha sido reportado en ningún tipo de cáncer. La búsqueda de blancos biológicos de este miRNA mostró que el miR-628-5p tiene sitios de unión en el sitio 3'UTR para los RNAm de serpine, STAT1, MMP2 y AKT1, por lo cual, el miR-628-5p sea un potencial biomarcador para el diagnóstico y pronóstico en el desarrollo del cáncer de mama.

Actualmente, de los 26 miRNAs desregulados que detectamos en el perfil de expresión bioinformático (CMEP), solo se ha reportado la participación del miR-299-5p en el desarrollo del MV en cáncer de mama, el cual, es un regulador negativo de osteopontina una proteína oncogénica que contribuye en el MV (Shevde et al., 2010). Sin embargo, el resto de los miRNAs no se ha reportado su participación en el MV. Nosotros encontramos que el conjunto de los 26 miRNAs tienen sitio de unión en diferentes factores de transcripción que están relacionados en el MV y metástasis. Por otra parte, mediante la construcción de redes de interacción entre miRNAs-RNAm, se determinaron funciones reguladoras claves de los miRNAs identificados a través de sus blancos. Las redes mostraron una importante relación regulatoria entre los miRNAs y mRNA relacionados con el MV y metástasis. Los resultados de las redes de interacción demostraron que la MMP2, AKT1, STAT3, HIF1A, VEGFA, TWIST1 están regulados por el miR-23c, let-7b, miR-548n, miR-299-5p, miR-675-5p y miR-942. El estudio de Hameiri y col., reportaron que el supresor de tumores let-7b regular negativamente a HIF-1a modulando la metástasis, lo cual, concuerda con el resultado predicho (Hameiri-Grossman et al., 2015). En otro estudio en células de carcinoma renal metastásicas se reportó que,

los altos niveles de expresión del miR-942 aumenta la secreción de la MMP-9 y VEGF promoviendo la migración y resistencia a la terapia (Prior et al., 2014). Sin embargo, no hay estudios reportados que indiquen la participación de la interacción de estos miRNAs en el desarrollo del MV en cáncer de mama.

En la segunda etapa del presente estudio se analizaron tejidos de CMTN con y sin metástasis mediante inmunohistoquímica, la detección y reconocimiento de las estructuras características del MV en los dos grupos de estudio se realizó a través de dobles tinciones CD31/PAS. Los resultados observados muestran que el MV (CD31-/PAS+) se detectó en ambos grupos de tejidos tumorales con y sin metástasis. Sin embargo, los tumores metastásicos presentaron mayor MV comparado con los no metastásicos. Este resultado concuerda con el estudio de Sun y colaboradores quienes identificaron que en pacientes con carcinoma hepatocelular el desarrollo de MV se relacionó con la alta tasa de metástasis comparado con los tejidos no metastásicos (Sun et al., 2006). Además, estudios previos determinaron la asociación entre el MV y los parámetros clínico patológicos en cáncer de mama. Shen y col., incorporaron diferentes datos de estudio y mostraron que el MV se correlaciona significativamente con el tamaño del tumor, grado de diferenciación (III-IV) y metástasis (Shen et al., 2017). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que las muestras de pacientes que desarrollaron metástasis presentaron un grado de diferenciación (IV) y la presencia de MV fue mayor en estas muestras comparado con las muestras no metastásicas que presentaron un menor grado tumoral (I a II) y menor MV.

Por otra parte, se ha descrito que los miRNAs participan en la regulación transcripcional de diversos procesos celulares. Sin embargo, la expresión desregulada de estas moléculas puede tener funciones promotoras o inhibidores de diversos procesos como los hallmarks del cáncer. Diversos estudios han propuesto el uso de miRNAs como posibles biomarcadores para el pronóstico, diagnóstico y terapéutico en CMTN. Sin embargo, pocos estudios muestran la participación conjunta de los miRNAs, el desarrollo del MV y metástasis en tumores de CMTN.

Previamente se informó que en células de CMTN, la disminución de la expresión del miR-93 inhibe la formación del MV y metástasis a través del aumento de la expresión de E-cadherina y ocludina genes involucrados en la transición epitelio mesénquima y disminución de la expresión de marcadores mesenquimales de vimentina y N-cadherina (An et al., 2021). En CMTN se reportó que el miR-490-3p es esponjeado por el lncRNA TP73-AS1 lo que promueve la sobreexpresión de TWIST1 favoreciendo la formación de MV (Tao et al., 2018). Por otro lado, los bajos niveles del miR-9 se asociaron al desarrollo del MV al inducir la sobreexpresión de STMN1 en glioma (Y. Song et al., 2013). Por otra parte, este miRNA promueve la supresión de la metástasis y la transición epitelio mesenquimal a través de la regulación negativa de FOXP2 en cáncer colorectal (W. X. Wang et al., 2019).

Para determinar si los 10 miRNAs analizados experimentalmente están relacionados con la metástasis en pacientes que desarrollaron MV, se realizó la búsqueda de RNAm blancos potenciales mediante la predicción de Targetscan. El resultado mostró que el miR-9* puede potencialmente regular la expresión de NOTCH2, FAK2, TWIST1, VEGF-C. Twist1 promueve la formación del MV en CMTN al reprimir la actividad promotora de Claudin15 (D. Zhang et al., 2020). La activación de la vía de señalización de NOTCH/NICD/NODAL participa en la angiogénesis, el MV y metástasis a través de la activación por Jagged1/2 (Vartanian et al., 2013; Y. Wang et al., 2018). La activación de la vía de señalización de la vía FAK/Src promovida por VEGF se ha implicado en el desarrollo de la angiogénesis y MV en CMTN (Lozano-Romero et al., 2020; Zang et al., 2015) (Salinas-Vera et al., 2018). Mientras que la alta expresión de VEGF activa la cascada de señalización de PI3K/AKT impulsando el desarrollo del MV (Salinas-Vera et al., 2018)(X. Xu et al., 2019). Al analizar su expresión mediante RT-PCR encontramos que el miR-9* se encuentra altamente expresado en tejidos de CMTN con MV+ y metástasis con respecto a los no metastásicos. Parte de este resultado, concuerda con los resultados de Wang y col., quienes demostraron que la sobreexpresión del miR-9 se asocia con la metástasis en cáncer de mama (J. Wang et al., 2013).

Recientemente se ha reportado en cáncer de mama que el miR-526b mostró una baja expresión promoviendo la proliferación celular, invasión, transición epitelio mesénquima y metástasis en ganglios linfáticos mediante la sobrerregulación de Twist1 (Y. Q. Liu et al., 2020). Por otra parte, en cáncer de cuello uterino se encontró que la expresión aumentada del miR-526b suprime la transición epitelio mesenquimal a través de la represión de PBX3 (H. Li et al., 2019). Este miRNA en cáncer de pulmón inhibe la metástasis mediante STAT3/PDL1 (K. Bing Chen et al., 2021). No obstante, no hay estudios que demuestren su participación en el MV en ningún tipo de cáncer. Sin embargo, nosotros demostramos que el miR-526b en CMTN positivos a MV y metástasis mostraron bajos niveles de expresión. Los análisis de predicción para este miRNA identificaron que sus posibles blancos predichos son: Twist1, ZEB2, WNT2, AKT3, NOTCH2, MMP2 y que posiblemente estén participando en los procesos biológicos antes mencionados. Por otra parte, Zhang y col., encontraron que la restauración de la expresión del miR-526b regula negativamente a HIF-1 α suprimiendo la proliferación celular y la metástasis en cáncer de colon (R. Zhang et al., 2016).

Por otra parte, se ha informado que el miR-145 tiene como genes blanco a MMP11, ROCK1, entre otros que participan en la invasión y metástasis en cáncer de mama (W.-X. Xu et al., 2019). En cáncer colorectal la sobreexpresión del miR-145-5p afecta la proliferación celular y la metástasis a través de CXCL1 y ITGA2 (Zhuang et al., 2021). Mientras, en el análisis de predicción detectamos que este miRNA tiene como blanco a la integrina ITGB8, la cual, podría estar implicada en la metástasis de CMTN. Adicionalmente, analizamos el nivel de expresión relativa de este miRNA y se encontró disminuido en las muestras de CMTN que presentaron MV y metástasis con respecto a los tejidos no metastásicos.

Un estudio previo identificó un perfil de expresión diferencial de miRNAs modulados por la hipoxia antes de la formación del MV, entre los cuales, se identificó la baja expresión del miR-148a que se asoció con la baja supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario (Salinas-Vera et al., 2019b). Nosotros obtuvimos resultados

similares en los tejidos de CMTN que son positivos al MV y que desarrollaron metástasis. El análisis de predicción mostró que este miRNA tiene como genes blancos a TGFBR2, MMP16 y HIF-3a, los cuales participan en la angiogénesis, metástasis y MV. Además de estos blancos ya reportados, en nuestra búsqueda se sugiere que el miR-148a puede unirse a ZEB2 y STAT1/2 para participar en los procesos de metástasis.

Otras investigaciones han demostrado que los niveles de expresión del miR-125a y let-7e tras el tratamiento con cisplatino disminuyen provocando un incremento en la expresión de IL-6 dando como resultado la formación de MV en cáncer de mama (Park & Kim, 2019b). Por otro lado, el miR-125b en tejidos y líneas celulares de CMTN se encuentra sobreexpresado, por lo que su inhibición disminuye la proliferación celular, migración y TEM al inhibir las vías WNT/ β -catenina (Nie et al., 2019). Estos datos coinciden con nuestro resultado. Sin embargo, es importante señalar que este miRNA está desregulado en pacientes metastásicos que son positivos a MV. Los resultados de predicción identificaron que este miRNA tiene sitio de unión para AKT, PI3K, mTOR, MMP, WNT, HIF, VEGF, ZEB1 entre otros y que posiblemente estén promoviendo la angiogénesis, MV y metástasis.

La función del miR142-3p en el proceso de la metástasis en cáncer de mama ha sido reportado previamente, donde Mansoori y col., demostraron que la restauración en sus niveles de expresión de este miRNA reduce los niveles del RNAm de Bach-1 causando la inhibición de la transición epitelio mesenquimal, proliferación celular, migración y metástasis en este cáncer (Mansoori et al., 2019). Nosotros reportamos que el miR-142-3p se encuentra inhibido significativamente en los tumores triples negativos de mama metastásicos con MV. El análisis de predicción mostró que este miRNA tiene sitios de unión 3'UTR a la IGB1, las cuales, son proteínas que activan la vía de señalización de FAK para promover la metástasis y la formación de redes similares al MV en CMTN (Kawahara et al., 2018).

En células de CMTN y luminales los niveles de expresión del miR-31 y miR-143 se encuentran disminuidos en comparación con células mamarias normales, la

restauración en su expresión disminuyo eficazmente la invasión y metástasis (L. Ji Luo et al., 2016; Soheilyfar et al., 2018). Sin embargo, no muestran a través de que vías se restauran esos eventos. Nosotros observamos un resultado similar en el nivel de expresión del miR-31 en muestras de pacientes con CMTN con metástasis y MV que esta significativamente disminuido en contraste con el grupo de pacientes que no presentaron metástasis. Por otra parte, la participación de este miRNA no ha sido estudiada en la formación del MV. A través de análisis predictivo, nosotros identificamos que este miRNA tiene como genes blancos predichos como las MMP-16, ROCK1, RAS1 y WNT, estas moléculas pueden los procesos de vascularización y la metástasis.

Por otra parte, la familia los miR-200, en particular el miR-200b se ha reportado su participación en los procesos de transición epitelio mesenquimal, migración, invasión y metástasis en cáncer de mama (H. Hong et al., 2016; Humphries et al., 2017; Sossey-Alaoui et al., 2018; Watson et al., 2018; Zheng et al., 2017). Actualmente su función en el MV no ha sido reportado, no obstante se ha descrito que el miR-200b inhibe la angiogénesis al regula negativamente la señalización de VEGF (Choi et al., 2011). Además, de VEGF, los blancos predichos con sitio de unión para el miR-200b que modulan el proceso de MV y metástasis son SNAI2, AKT, MMP, SMAD2, NOTCH. Nuestros resultados demuestran que el miR-200b esta disminuido significativamente en pacientes con metástasis, esto sugiere que sus blancos mencionados anteriormente estén sobreexpresados promoviendo dichos procesos.

Por otra parte, encontramos que el miR-126-5p y miR-29b que no presentaron una expresión significativa en CMTN metastásicos y con presencia de MV. Sin embargo, se ha reportado su participación en el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, se ha reportado la sobreexpresión del miR-126-3p inhibe la proliferación, migración y angiogénesis al regular negativamente a RGS3 en CMTN (Z. Hong et al., 2019b). Además, el miR-126-5p inhibe la angiogénesis mediante la regulación de VEGF-A en cáncer de mama (Alhasan, 2019). En cáncer hepatocelular la restauración de la

expresión del miR-126-3p inhibe la metástasis y la angiogénesis al dirigirse a LRP6 y PIK3R2 (Du et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento no hay estudios sobre la participación del miR-126-5p en la regulación del MV en cáncer. Las predicciones indican que este miRNA tiene sitios de unión en genes como: VEGF-A, HIF-1A y TWIST1.

Por otra parte, diversas investigaciones han demostrado que el miR-29b se encuentra en baja expresión en líneas celulares en cáncer de mama comparado con tejido normal. Por ejemplo, se ha informado que el aumento de la expresión del miR-29b en cáncer colorectal promovió la apoptosis, inhibe la migración, invasión y el MV a través de la regulación del eje ETV4/ERK/EGFR (Leng et al., 2021). En carcinoma hepatocelular, se reportó que el miR-29b inhibe el MV promovido por la IL-6 al unirse a STAT3 y MMP2 (Fang et al., 2017). Nuestros resultados de las predicciones sugieren que el miR-29b puede unirse a genes involucrados en la transición epitelio mesenquimal y metástasis como MMP2, STAT3, AKT1 y en genes involucrados en el desarrollo del MV como VEGF-A y WNT. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el nivel de expresión de estos miRNAs en los tejidos analizados en el presente estudio. A pesar de eso, consideramos que el número de muestras evaluadas en este trabajo es pequeño, pero quizá con un número mayor de muestras podremos observar una tendencia significativa en el nivel de expresión de estos miRNAs entre los grupos de estudio.

17. Conclusión

En el presente estudio identificamos un perfil de expresión diferencial de 26 metastamirs mediante herramientas bioinformáticas que sugieren, que los miRNAs (miR-1253, miR-493, miR-450b, miR-559, miR-1297, miR-149, miR-628-5p, miR-548n, miR-675*, miR-3179, miR-425*, let-7b, miR-23c, miR-299-5p, miR-3613-3p, miR-99^a, miR-144*, miR-942, miR-1825, miR-1304) tienen un papel de supresores de tumores ya que sus niveles de expresión se encontraron disminuidos en muestras de cáncer de mama con metástasis. A través de las predicciones encontramos que estos miRNAs tienen diferentes sitios de unión en el extremo 3'UTR de genes que participan en diferentes vías de señalización como la de VEGF/PI3K/AKT. Por lo que se sugiere, que estos miRNAs podrían estar participando en la formación del MV y metástasis a través de redes de interacción entre miRNA-RNAm. Además, se identificaron 7 miRNAs expresados diferencialmente que están siendo modulados en la metástasis y MV en tumores de pacientes mexicanas con CMTN. Detectamos dos miRNAs (miR-125b y miR-9*) en CMTN con metástasis, los cuales, pudieran estar participando como oncomiRNAs. Mientras que los miRNAs (miR-142-3p, miR-145, miR-31, miR-148a, miR-200b y miR-526) que mostraron una baja expresión en CMTN pudieran tener una función supresora de tumores con metástasis. El modelo propuesto en este trabajo integra las diversas vías de señalización como: ITG/FAK/ERK, VEGF/PI3K/ERK, WNT/STAT entre otras que promueven la formación del MV regulado por los miRNAs. Esto posiblemente indica los mecanismos por los cuales, la desregulación de estos miRNAs puede afectar directa o indirectamente la activación y fosforilación de proteínas que participan río bajo de estas vías de señalización.

Nuestros resultados sugieren que la expresión desregulada de los miRNAs analizados en el presente estudio modulan la metástasis y el MV a través de la unión con sus mRNA blancos que participan en diferentes vías de señalización.

18. Perspectivas a futuro para este proyecto

1. Realizar un análisis global de la expresión diferencial de los miRNAs en una cohorte con mayor número de muestras de CMTN.
2. Realizar análisis funcionales mediante la restauración o inhibición de la expresión de algunos miRNAs desregulados en CMTN para validar y confirmar si su función está involucrada en el desarrollo de la metástasis y formación del MV a través de la regulación de sus RNAm blancos.
3. Analizar la función de los miRNAs desregulados en modelos murinos.

20. Cronograma de actividades

	2020	2020	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2022
Objetivo	Nov	Dic	En	Feb	Mar	Ab	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene / Feb
1. Identificación <i>in silico</i> de metastamiRs que participen en el mimetismo vasculogénico en cáncer de mama.															
2. Evaluar la presencia de MV en biopsias de tumores mamario TN metastásico y no metastásico en pacientes mexicanas															
3. Evaluar los cambios en la expresión de 10 microRNAs en los tumores con mimetismo vasculogénico con metástasis y sin metástasis en la misma cohorte de pacientes con cáncer de mama y una cohorte de TCGA.															
4. Establecer un modelo de regulación del mimetismo vasculogénico mediado por metastamiRs en pacientes mexicanas con cáncer de mama.															
Escritura de tesis															

21. Referencias

- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1), 33. <https://doi.org/10.1186/S40659-017-0140-9>
- Alhasan, L. (2019). MiR-126 Modulates Angiogenesis in Breast Cancer by Targeting VEGF-A mRNA. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(1), 193. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.193>
- An, G., Lu, F., Huang, S., Bai, J., He, L., Liu, Y., & Hou, L. (2021). Effects of miR-93 on epithelial-to-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 23(1), 1–8. <https://doi.org/10.3892/MMR.2020.11668>
- Andonegui-Elguera, M. A., Alfaro-Mora, Y., Cáceres-Gutiérrez, R., Caro-Sánchez, C. H. S., Herrera, L. A., & Díaz-Chávez, J. (2020). An Overview of Vasculogenic Mimicry in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 220. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00220>
- Avery-Kiejda, K. A., Braye, S. G., Mathe, A., Forbes, J. F., & Scott, R. J. (2014). Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-51>
- Ayala-Domínguez, L., Olmedo-Nieva, L., Muñoz-Bello, J. O., Contreras-Paredes, A., Manzo-Merino, J., Martínez-Ramírez, I., & Lizano, M. (2019). Mechanisms of vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, 9(SEP), 998. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00998/BIBTEX>
- Cao, Z., Sun, B., Zhao, X., Zhang, Y., Gu, Q., Liang, X., Dong, X., & Zhao, N. (2017). The expression and functional significance of runx2 in hepatocellular carcinoma: Its role in vasculogenic mimicry and epithelial–Mesenchymal transition. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030500>
- Chang-Qing, Y., Jie, L., Shi-Qi, Z., Kun, Z., Zi-Qian, G., Ran, X., Hui-Meng, L., Ren-Bin, Z., Gang, Z., Da-Chuan, Y., & Chen-Yan, Z. (2020). Recent treatment progress of triple negative breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 151, 40–53. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2019.11.007>
- Chen, K. bing, Yang, W., Xuan, Y., & Lin, A. jun. (2021). miR-526b-3p inhibits lung cancer cisplatin-resistance and metastasis by inhibiting STAT3-promoted PD-L1. *Cell Death & Disease*, 12(8). <https://doi.org/10.1038/S41419-021-04033-8>
- Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., & Liu, X. (2018). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *Npj Precision Oncology* 2018 2:1, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0>
- Choi, Y. C., Yoon, S., Jeong, Y., Yoon, J., & Baek, K. (2011). Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b. *Molecules and Cells* 2011 32:1, 32(1), 77–82. <https://doi.org/10.1007/S10059-011-1042-2>
- Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/S00428-018-2301-9>
- Deepak, K. G. K., Vempati, R., Nagaraju, G. P., Dasari, V. R., Nagini, S., Rao, D. N., & Malla, R. R. (2020). Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacological Research*, 153. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104683>
- Delgado-Bellido, D., Serrano-Saenz, S., Fernández-Cortés, M., & Oliver, F. J. (2017). Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Molecular Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0631-X>

- Du, C., Lv, Z., Cao, L., Ding, C., Gyabaah, O. ansah K., Xie, H., Zhou, L., Wu, J., & Zheng, S. (2014). MiR-126-3p suppresses tumor metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by targeting LRP6 and PIK3R2. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12967-014-0259-1/FIGURES/5>
- Fang, J. H., Zheng, Z. Y., Liu, J. Y., Xie, C., Zhang, Z. J., & Zhuang, S. M. (2017). Regulatory Role of the MicroRNA-29b-IL-6 Signaling in the Formation of Vascular Mimicry. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 8, 90–100. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2017.06.009>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fernández, J. P., Luddy, K. A., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2019). Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174131>
- Gao, J. J., & Swain, S. M. (2018). Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist*, 23(5), 556. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2017-0535>
- Guccini, I., Revandkar, A., D'Ambrosio, M., Colucci, M., Pasquini, E., Mosole, S., Troiani, M., Brina, D., Sheibani-Tezerji, R., Elia, A. R., Rinaldi, A., Pernigoni, N., Rüschoff, J. H., Dettwiler, S., De Marzo, A. M., Antonarakis, E. S., Borrelli, C., Moor, A. E., Garcia-Escudero, R., ... Alimonti, A. (2021). Senescence Reprogramming by TIMP1 Deficiency Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Cell*, 39(1), 68-82.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.10.012>
- Hameiri-Grossman, M., Porat-Klein, A., Yaniv, I., Ash, S., Cohen, I. J., Kodman, Y., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Kloog, Y., Chepurko, E., Feinmesser, M., Issakov, J., Sher, O., Luria, D., Kollender, Y., Weizman, A., & Avigad, S. (2015). The association between let-7, RAS and HIF-1a in Ewing Sarcoma tumor growth. *Oncotarget*, 6(32), 33834–33848. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5616>
- Hamidi, H., & Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 18(9), 533. <https://doi.org/10.1038/S41568-018-0038-Z>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/3F528E16-8B3C-4D8D-8DE5-43E0C98D8475/MMC1.PDF>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnani, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hendrix, M. J. C. (2015). An extravascular route for tumour cells. *Nature* 2015 520:7547, 520(7547), 300–302. <https://doi.org/10.1038/nature14382>
- Hernández de la Cruz, O. N., López-González, J. S., García-Vázquez, R., Salinas-Vera, Y. M., Muñoz-Lino, M. A., Aguilar-Cazares, D., López-Camarillo, C., & Carlos-Reyes, Á. (2020). Regulation Networks Driving Vasculogenic Mimicry in Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*, 9, 1419. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01419/BIBTEX>
- Hong, H., Yu, H., Yuan, J., Guo, C., Cao, H., Li, W., & Xiao, C. (2016). MicroRNA-200b Impacts Breast Cancer Cell Migration and Invasion by Regulating Ezrin-Radixin-Moesin. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 1946–1952. <https://doi.org/10.12659/MSM.896551>
- Hong, Z., Hong, C., Ma, B., Wang, Q., Zhang, X., Li, L., Wang, C., & Chen, D. (2019a). MicroRNA-126-3p inhibits the proliferation, migration, invasion, and angiogenesis of triple-negative breast cancer cells by targeting RGS3. *Oncology Reports*, 42(4), 1569–

1579. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7251/HTML>
- Hong, Z., Hong, C., Ma, B., Wang, Q., Zhang, X., Li, L., Wang, C., & Chen, D. (2019b). MicroRNA-126-3p inhibits the proliferation, migration, invasion, and angiogenesis of triple-negative breast cancer cells by targeting RGS3. *Oncology Reports*, 42(4), 1569–1579. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7251/HTML>
- Humphries, B., Wang, Z., Li, Y., Jhan, J. R., Jiang, Y., & Yang, C. (2017). ARHGAP18 Downregulation by miR-200b Suppresses Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer by Enhancing Activation of RhoA. *Cancer Research*, 77(15), 4051–4064. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3141>
- Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H., & Shu, Y. (2019). Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-019-1089-9>
- Kawahara, R., Niwa, Y., & Simizu, S. (2018). Integrin β 1 is an essential factor in vasculogenic mimicry of human cancer cells. *Cancer Science*, 109(8), 2490–2496. <https://doi.org/10.1111/CAS.13693>
- Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Hardy, K. M., Seftor, R. E. B., & Hendrix, M. J. C. (2012). Molecular Pathways: Vasculogenic Mimicry in Tumor Cells: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clinical Cancer Research*, 18(10), 2726. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3237>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.037>
- Latacz, E., Caspani, E., Barnhill, R., Lugassy, C., Verhoef, C., Grünhagen, D., Van Laere, S., Fernández Moro, C., Gerling, M., Dirix, M., Dirix, L. Y., & Vermeulen, P. B. (2019). Pathological features of vessel co-option versus sprouting angiogenesis. *Angiogenesis* 2019 23:1, 23(1), 43–54. <https://doi.org/10.1007/S10456-019-09690-0>
- Leng, Y., Chen, Z., Ding, H., Zhao, X., Qin, L., & Pan, Y. (2021). Overexpression of microRNA-29b inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis of colorectal cancer through the ETV4/ERK/EGFR axis. *Cancer Cell International*, 21(1), 17. <https://doi.org/10.1186/S12935-020-01700-2>
- Li, H., Wang, J., Xu, F., Wang, L., Sun, G., Wang, J., & Yang, Y. (2019). By downregulating PBX3, miR-526b suppresses the epithelial-mesenchymal transition process in cervical cancer cells. *Future Oncology (London, England)*, 15(14), 1577–1591. <https://doi.org/10.2217/FON-2018-0575>
- Li, Q., Lai, Q., He, C., Fang, Y., Yan, Q., Zhang, Y., Wang, X., Gu, C., Wang, Y., Ye, L., Han, L., Lin, X., Chen, J., Cai, J., Li, A., & Liu, S. (2019). RUNX1 promotes tumour metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signalling pathway and EMT in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1330-9>
- Li, S., Xu, H. X., Wu, C. T., Wang, W. Q., Jin, W., Gao, H. L., Li, H., Zhang, S. R., Xu, J. Z., Qi, Z. H., Ni, Q. X., Yu, X. J., & Liu, L. (2019). Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications. *Angiogenesis*, 22(1), 15–36. <https://doi.org/10.1007/S10456-018-9645-2>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., & Yang, Q. (2020). Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 60(August), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Lim, B., Woodward, W. A., Wang, X., Reuben, J. M., & Ueno, N. T. (2018). Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nature Reviews Cancer*, 18(8), 485–499. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0010-y>
- Lim, D., Cho, J. G., Yun, E., Lee, A., Ryu, H. Y., Lee, Y. J., Yoon, S., Chang, W., Lee, M. S., Kwon, B. S., & Kim, J. (2021). MicroRNA 34a–AXL Axis Regulates Vasculogenic

- Mimicry Formation in Breast Cancer Cells. *Genes*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/GENES12010009>
- Lin, C., Gao, B., Yan, X., Lei, Z., Chen, K., Li, Y., Zeng, Q., Chen, Z., & Li, H. (2018). MicroRNA 628 suppresses migration and invasion of breast cancer stem cells through targeting SOS1. *OncoTargets and Therapy*, 11, 5419–5428. <https://doi.org/10.2147/OTT.S164575>
- Liu, K., Sun, B., Zhao, X., Wang, X., Li, Y., Qiu, Z., Gu, Q., Dong, X., Zhang, Y., Wang, Y., & Zhao, N. (2015). Hypoxia induced epithelial–mesenchymal transition and vasculogenic mimicry formation by promoting Bcl-2/Twist1 cooperation. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(2), 383–391. <https://doi.org/10.1016/J.YEXMP.2015.08.009>
- Liu, Q., Zhou, Q., & Zhong, P. (2020). circ_0067934 increases bladder cancer cell proliferation, migration and invasion through suppressing miR-1304 expression and increasing Myc expression levels. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3751–3759. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8648>
- Liu, Y. Q., Cong, Y. Z., Jiang, J., Sheng, J. Z., Li, X. H., Zhao, M., & Peng, M. Y. (2020). MiR-526b suppresses cell proliferation, cell invasion and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by targeting Twist1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(6), 3113–3121. https://doi.org/10.26355/EURREV_202003_20678
- Ljuslinder, I. (2009). *Studies of LRIG1 and the ERBB receptor family in breast and colorectal cancer* (Issue May). <http://hig.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2:233108>
- Lopez-Camarillo, C., Marchat, L. A., Arechaga-Ocampo, E., Perez-Plasencia, C., del Oral-Hernandez, O., Castaneda-Ortiz, E. J., & Rodriguez-Cuevas, S. (2012). MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1347. <https://doi.org/10.3390/IJMS13021347>
- 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., & 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*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/NCRNA6020019>
- Luo, L. ji, Yang, F., Ding, J. ji, Yan, D. li, Wang, D. dan, Yang, S. jin, Ding, L., Li, J., Chen, D., Ma, R., Wu, J. zhong, & Tang, J. hai. (2016). MiR-31 inhibits migration and invasion by targeting SATB2 in triple negative breast cancer. *Gene*, 594(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2016.08.057>
- Luo, Q., Wang, J., Zhao, W., Peng, Z., Liu, X., Li, B., Zhang, H., Shan, B., Zhang, C., & Duan, C. (2020a). Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00858-6>
- Luo, Q., Wang, J., Zhao, W., Peng, Z., Liu, X., Li, B., Zhang, H., Shan, B., Zhang, C., & Duan, C. (2020b). Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology* 2020 13:1, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00858-6>
- Majid, T., & Elham, H. (2019). MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. *MicroRNA*, 8(1), 4–27. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180827111633>
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955. <https://doi.org/10.4161/CBT.10.10.13879>
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'er, J., Trent, J. M.,

- Meltzer, P. S., & Hendrix, M. J. C. (1999). Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 739. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65173-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65173-5)
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Ghasabi, M., Shirjang, S., Dehghan, R., Montazeri, V., Holmskov, U., Kazemi, T., Duijf, P., Gjerstorff, M., & Baradaran, B. (2019). miR-142-3p as tumor suppressor miRNA in the regulation of tumorigenicity, invasion and migration of human breast cancer by targeting Bach-1 expression. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 9816–9825. <https://doi.org/10.1002/JCP.27670>
- Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2020). Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS21010132>
- Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hernández, J. M. H., Rotello, V. M., & Ramirez, J. T. (2020). Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/IJERPH17062078>
- Nakayama, J., Han, Y., Kuroiwa, Y., Azuma, K., Yamamoto, Y., & Semba, K. (2021). The In Vivo Selection Method in Breast Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041886>
- Neophytou, C., Boutsikos, P., & Papageorgis, P. (2018). Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 8(FEB), 31. <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00031>
- Nie, J., Jiang, H. C., Zhou, Y. C., Jiang, B., He, W. J., Wang, Y. F., & Dong, J. (2019). MiR-125b regulates the proliferation and metastasis of triple negative breast cancer cells via the Wnt/ β -catenin pathway and EMT. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(6), 1062–1071. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1584521>
- Nilsson, M., & Heymach, J. V. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(8), 768–770. [https://doi.org/10.1016/s1556-0864\(15\)30404-4](https://doi.org/10.1016/s1556-0864(15)30404-4)
- O'Carroll, D., & Schaefer, A. (2012). General Principals of miRNA Biogenesis and Regulation in the Brain. *Neuropsychopharmacology* 2013 38:1, 38(1), 39–54. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.87>
- Park, Y., & Kim, J. (2019a). Regulation of IL-6 signaling by miR-125a and let-7e in endothelial cells controls vasculogenic mimicry formation of breast cancer cells. *BMB Reports*, 52(3), 214. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2019.52.3.308>
- Park, Y., & Kim, J. (2019b). Regulation of IL-6 signaling by miR-125a and let-7e in endothelial cells controls vasculogenic mimicry formation of breast cancer cells. *BMB Reports*, 52(3), 214. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2019.52.3.308>
- Prior, C., Perez-Gracia, J. L., Garcia-Donas, J., Rodriguez-Antona, C., Guruceaga, E., Esteban, E., Suarez, C., Castellano, D., Del Alba, A. G., Lozano, M. D., Carles, J., Climent, M. A., Arranz, J. A., Gallardo, E., Puente, J., Bellmunt, J., Gurrpide, A., Lopez-Picazo, J. M., Hernandez, A. G., ... Calvo, A. (2014). Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086263>
- Qi, L., Song, W., Liu, Z., Zhao, X., Cao, W., & Baocun Sun, B. S. (2015). Wnt3a Promotes the Vasculogenic Mimicry Formation of Colon Cancer via Wnt/ β -Catenin Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18564. <https://doi.org/10.3390/IJMS160818564>
- Ruiz-Espigares, J., Nieto, D., Moroni, L., Jiménez, G., & Marchal, J. A. (2021). Evolution of Metastasis Study Models toward Metastasis-On-A-Chip: The Ultimate Model? *Small*, 17(14), 2006009. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202006009>
- Russnes, H. G., Lingjærde, O. C., Børresen-Dale, A. L., & Caldas, C. (2017). Breast Cancer

- Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *The American Journal of Pathology*, 187(10), 2152–2162. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2017.04.022>
- Sabatier, R., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Chaffanet, M., Viens, P., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2014). Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Molecular Cancer*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-228>
- Salinas-Vera, Y. M., Gallardo-Rincón, D., García-Vázquez, R., Hernández-De la Cruz, O. N., Marchat, L. A., González-Barrios, J. A., Ruíz-García, E., Vázquez-Calzada, C., Contreras-Sanzón, E., Resendiz-Hernández, M., Astudillo-De la Vega, H., Cruz-Colin, J. L., Campos-Parra, A. D., & López-Camarillo, C. (2019a). HypoxamiRs Profiling Identify miR-765 as a Regulator of the Early Stages of Vasculogenic Mimicry in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 381. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00381>
- Salinas-Vera, Y. M., Gallardo-Rincón, D., García-Vázquez, R., Hernández-De la Cruz, O. N., Marchat, L. A., González-Barrios, J. A., Ruíz-García, E., Vázquez-Calzada, C., Contreras-Sanzón, E., Resendiz-Hernández, M., Astudillo-De la Vega, H., Cruz-Colin, J. L., Campos-Parra, A. D., & López-Camarillo, C. (2019b). HypoxamiRs Profiling Identify miR-765 as a Regulator of the Early Stages of Vasculogenic Mimicry in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 381. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00381>
- Salinas-Vera, Y. M., Marchat, L. A., García-Vázquez, R., González de la Rosa, C. H., Castañeda-Saucedo, E., Tito, N. N., Flores, C. P., Pérez-Plasencia, C., Cruz-Colin, J. L., Carlos-Reyes, Á., López-González, J. S., Álvarez-Sánchez, M. E., & López-Camarillo, C. (2018). Cooperative multi-targeting of signaling networks by angiomiR-204 inhibits vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Cancer Letters*, 432, 17–27. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.06.003>
- Sawaki, M., Shien, T., & Iwata, H. (2019). TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 49(3), 228–231. <https://doi.org/10.1093/JJCO/HYY182>
- Shekar, N., Mallya, P., Gowda, D. V., & Jain, V. (2020). Triple-negative breast cancer: Challenges and treatment options. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 1977–1986. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i2.2127>
- Shen, Y., Quan, J., Wang, M., Li, S., Yang, J., Lv, M., Chen, Z., Zhang, L., Zhao, X., & Yang, J. (2017). Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer. *Oncotarget*, 8(34), 56408–56416. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16919>
- Shevde, L. A., Metge, B. J., Mitra, A., Xi, Y., Ju, J., King, J. A., & Samant, R. S. (2010). Spheroid-forming subpopulation of breast cancer cells demonstrates vasculogenic mimicry via hsa-miR-299–5p regulated de novo expression of osteopontin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6b), 1693. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2009.00821.X>
- Si, W., Shen, J., Zheng, H., & Fan, W. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0587-8>
- Soheilyfar, S., Velashjerdi, Z., Hajizadeh, Y. S., Fathi Maroufi, N., Amini, Z., Khorrami, A., Azimian, S. H., Isazadeh, A., Taefehshokr, S., & Taefehshokr, N. (2018). In vivo and in vitro impact of miR-31 and miR-143 on the suppression of metastasis and invasion in breast cancer. *JBUON*, 23(5), 1290–1296.
- Song, H., Ci, H., Xu, J., Xu, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Wu, S., & Tao, Y. (2018). Vasculogenic mimicry and expression of slug and vimentin correlate with metastasis and prognosis

- in non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(5), 2749–2758. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31938392> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6958269>
- Song, Y., Mu, L., Han, X., Li, Q., Dong, B., Li, H., & Liu, X. (2013). MicroRNA-9 inhibits vasculogenic mimicry of glioma cell lines by suppressing Stathmin expression. *Journal of Neuro-Oncology* 2013 115:3, 115(3), 381–390. <https://doi.org/10.1007/S11060-013-1245-9>
- Sossey-Alaoui, K., Pluskota, E., Szpak, D., Schiemann, W. P., & Plow, E. F. (2018). The Kindlin-2 regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer metastasis is mediated through miR-200b. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-25373-0>
- Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., & Hajduch, M. (2018). Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 18(5), e841–e850. <https://doi.org/10.1016/J.CLBC.2018.07.023/ATTACHMENT/8DD9B9A3-0CC2-4C2F-8A98-4A9811ADDC15/MMC1.XML>
- Stock, C., & Pedersen, S. F. (2017). Roles of pH and the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in cancer: From cell biology and animal models to an emerging translational perspective? *Seminars in Cancer Biology*, 43, 5–16. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2016.12.001>
- Sun, B., Zhang, S., Zhang, D., Du, J., Guo, H., Zhao, X., Zhang, W., & Hao, X. (2006). Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 16(4), 693–698. <https://doi.org/10.3892/OR.16.4.693/HTML>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & 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*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tao, W., Sun, W., Zhu, H., & 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*, 504(4), 629–634. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.08.122>
- Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K., & Ortiz-López, R. (2016a). Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria*, 18(71), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2016.05.007>
- Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K., & Ortiz-López, R. (2016b). Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria*, 18(71), 105–114. <https://doi.org/10.1016/J.RMU.2016.05.007>
- Vallée, A., Guillemin, R., & Vallée, J. N. (2017). Vasculogenesis and angiogenesis initiation under normoxic conditions through Wnt/β-catenin pathway in gliomas. *Reviews in the Neurosciences*, 29(1), 71–91. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0032>
- Vartanian, A., Gatsina, G., Grigorieva, I., Solomko, E., Dombrovsky, V., Baryshnikov, A., & Stepanova, E. (2013). The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry. *Clinical and Experimental Medicine*, 13(3), 201–209. <https://doi.org/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., & Knott, S. R. V. (2015). A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis. *Nature* 2015 520:7547, 520(7547), 358–362. <https://doi.org/10.1038/nature14403>
- Wang, H., Hu, X., Yang, F., & Xiao, H. (2021). miR-325-3p Promotes the Proliferation,

- Invasion, and EMT of Breast Cancer Cells by Directly Targeting S100A2. *Oncology Research*, 28(7), 731–744. <https://doi.org/10.3727/096504020X16100888208039>
- Wang, J., Zhao, H., Tang, D., Wu, J., Yao, G., & Zhang, Q. (2013). Overexpressions of microRNA-9 and microRNA-200c in human breast cancers are associated with lymph node metastasis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(4), 283–288. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1293>
- Wang, W. X., Yu, H. L., & Liu, X. (2019). MiR-9-5p suppresses cell metastasis and epithelial-mesenchymal transition through targeting FOXP2 and predicts prognosis of Colorectal carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 12(15), 6467–6477. https://doi.org/10.26355/EURREV_201908_18530
- Wang, Y., Yang, R., Wang, X., Ci, H., Zhou, L., Zhu, B., Wu, S., & Wang, D. (2018). Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, Notch4, DLL4, and KAI1/CD82 in the prediction of metastasis and prognosis in non-small cell lung cancer. *Medicine*, 97(52). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013817>
- Warren, M. (2009). Metastatic breast cancer recurrence: a literature review of themes and issues arising from diagnosis. *International Journal of Palliative Nursing*, 15(5), 222–225. <https://doi.org/10.12968/ijpn.2009.15.5.42347>
- Watson, K. L., Jones, R. A., Bruce, A., & Moorehead, R. A. (2018). The miR-200b/200a/429 cluster prevents metastasis and induces dormancy in a murine claudin-low mammary tumor cell line. *Experimental Cell Research*, 369(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2018.04.024>
- Wawruszak, A., Halasa, M., Okon, E., Kukula-Koch, W., & Stepulak, A. (2021). Valproic acid and breast cancer: State of the art in 2021. *Cancers*, 13(14), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers13143409>
- 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., & Zeng, Z. (2021). Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Molecular Cancer*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-020-01288-1>
- Welch, D. R., & Hurst, D. R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research*, 79(12), 3011–3027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- Xu, W.-X., Liu, Z., Deng, F., Wang, D.-D., Li, X.-W., Tian, T., Zhang, J., & Tang, J.-H. (2019). MiR-145: a potential biomarker of cancer migration and invasion. *American Journal of Translational Research*, 11(11), 6739. <https://pmc/articles/PMC6895535/>
- Xu, X., Zong, Y., Gao, Y., Sun, X., Zhao, H., Luo, W., & Jia, S. (2019). VEGF Induce Vasculogenic Mimicry of Choroidal Melanoma through the PI3k Signal Pathway. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3909102>
- Xu, Y., Li, Q., Li, X. Y., Yang, Q. Y., Xu, W. W., & Liu, G. L. (2012). Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 31(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-16>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research : BCR*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S13058-020-01296-5>
- Zang, M., Zhang, Y., Zhang, B., Hu, L., Li, J., Fan, Z., Wang, H., Su, L., Zhu, Z., Li, C., Yan, C., Gu, Q., Liu, B., & Yan, M. (2015). CEACAM6 promotes tumor angiogenesis and vasculogenic mimicry in gastric cancer via FAK signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(5), 1020–1028. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2015.02.005>
- Zhang, D., Sun, B., Zhao, X., Sun, H., An, J., Lin, X., Zhu, D., Zhao, X., Wang, X., Liu, F., Zhang, Y., Liu, J., Gu, Q., Dong, X., Qiu, Z., Liu, Z., Qi, H., Che, N., Li, J., ... Zheng, X. (2020). Twist1 accelerates tumour vasculogenic mimicry by inhibiting Claudin15

- expression in triple-negative breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(13), 7163. <https://doi.org/10.1111/JCMM.15167>
- Zhang, J. G., Zhou, H. M., Zhang, X., Mu, W., Hu, J. N., Liu, G. L., & Li, Q. (2020). Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1 α , RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling. *BMC Cancer*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-019-6501-8>
- Zhang, R., Zhao, J., Xu, J., Wang, J., & Jia, J. (2016). miR-526b-3p functions as a tumor suppressor in colon cancer by regulating HIF-1 α . *Am J Transl Res*, 8(6), 2783–2789. www.ajtr.org
- Zheng, Q., Cui, X., Zhang, D., Yang, Y., Yan, X., Liu, M., Niang, B., Aziz, F., Liu, S., Yan, Q., & Liu, J. (2017). miR-200b inhibits proliferation and metastasis of breast cancer by targeting fucosyltransferase IV and α 1,3-fucosylated glycans. *Oncogenesis*, 6(7). <https://doi.org/10.1038/ONCSIS.2017.58>
- Zhuang, W., Niu, T., & Li, Z. (2021). MicroRNA miR-145-5p regulates cell proliferation and cell migration in colon cancer by inhibiting chemokine (C-X-C motif) ligand 1 and integrin α 2. *Bioengineered*, 12(2), 9909–9917. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2000243>