

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE MICROARNS CANDIDATOS  
POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PLAUR*, RELACIONADO  
CON LA INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CÁNCER

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios  
de Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar al grado y título de Maestría  
Académica en Bioinformática y Biología de Sistemas

LUIS ANDRÉS ROJAS MATEY

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Bioinformática y Biología de Sistemas.”

---

PhD. Luis Felipe Somarribas Patterson  
**Representante de la Decanatura**  
**Sistema de Estudios de Posgrado**

---

PhD. Warner Alpízar Alpízar  
**Director de Tesis**

---

PhD. Rodrigo Mora Rodríguez  
**Asesor**

---

M.Sc. Man Sai Acón Chan  
**Asesor**

---

Dra. Elvira Salas Hidalgo  
**Representante de la Directora**  
**Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas**

---

Luis Andrés Rojas Matey  
**Candidato**

# Tabla de contenidos

Resumen en español . . . . .	VI
Resumen en inglés . . . . .	VII
Lista de cuadros . . . . .	VIII
Lista de figuras . . . . .	IX
Lista de abreviaturas . . . . .	XII
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos generales de la epidemiología del cáncer . . . . .	1
1.2. Aspectos generales de la biología del cáncer . . . . .	2
1.3. Invasión y metástasis de las células cancerosas . . . . .	3
1.4. uPAR y cáncer . . . . .	5
1.5. Regulación de la expresión génica en células eucariotas y el cáncer . . . . .	7
1.6. Regulación epigenética y su rol en el desarrollo y la progresión del cáncer . . . . .	8
1.7. Los microARNs y el cáncer . . . . .	9
1.8. Los factores de transcripción y el cáncer . . . . .	14
1.9. Biología de sistemas y el cáncer . . . . .	16
1.10. Compensación de dosis génica y biología de sistemas . . . . .	18
<b>2. Justificación</b>	<b>21</b>
2.1. Problema y propuesta de solución . . . . .	21
2.2. Hipótesis . . . . .	23
<b>3. Objetivos</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo general . . . . .	24
3.2. Objetivos específicos . . . . .	24
<b>4. Metodología</b>	<b>26</b>
4.1. Estrategia metodológica . . . . .	26
4.2. Plataformas generadoras de modelos . . . . .	28

4.3.	Flujo ('pipeline') de trabajo e iteraciones . . . . .	29
4.4.	Bases de datos utilizadas para los ajustes y las validaciones . . . . .	31
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>34</b>
5.1.	Existen interacciones reportadas con potencial de regular la expresión de <i>PLAUR</i> . . . . .	34
5.2.	Varios TFs y miRs podría interactuar con <i>PLAUR</i> y otros genes relacionados .	39
5.3.	Modelo original ajustado no muestra control de las especies sobre <i>PLAUR</i> . .	40
5.4.	Existen otras interacciones directas con <i>PLAUR</i> según las bases de datos putativas con potencial de regular su expresión . . . . .	42
5.5.	La Estimación de Parámetros del modelo híbrido con datos de NCI60 muestra valores estadísticamente bien ajustados y con potencial de regulación sobre <i>PLAUR</i> . . . . .	44
5.6.	Al perturbar las constantes de síntesis de los miRs del modelo híbrido se obtiene una reducción en los niveles de expresión de <i>PLAUR</i> . . . . .	45
5.7.	El modelo híbrido no pudo ser ajustado utilizando los datos experimentales de CCLE para tratar de comprobar el control de los miRs sobre <i>PLAUR</i> . . .	47
5.8.	Un nuevo modelo es generado al utilizar nuevos datos de interacciones con la segunda plataforma . . . . .	48
5.9.	Dos nuevos potenciales miRs candidatos con capacidad regulatoria sobre <i>PLAUR</i> emergen al analizar el nuevo modelo simplificado y ajustado . . . . .	51
5.10.	La comprobación del rol de estos dos miRs candidatos utilizando datos expe- rimentales de CCLE no muestra resultados similares . . . . .	53
5.11.	Valores de expresión con datos experimentales de CCLE muestran a FOSL1 y a miR335 con influencia importante sobre la expresión de <i>PLAUR</i> . . . . .	53
5.12.	La correlación entre los valores de expresión de los estados estables de los modelos individuales y los datos experimentales de CCLE indican que FOSL1 y miR335 tienen una influencia importante sobre la expresión de <i>PLAUR</i> . . .	56
5.13.	Datos de TCGA sugieren posible correlación entre <i>PLAUR</i> y FOSL1 en varios carcinomas . . . . .	57

5.14. FOSL1 representa un potencial candidato para el estudio experimental de su influencia sobre la expresión de <i>PLAUR</i> . . . . .	63
<b>6. Discusión</b>	<b>65</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>72</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>74</b>
<b>Anexos</b>	<b>97</b>

## RESUMEN

El cáncer es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. Se considera como un grupo de enfermedades genéticas debido a que su génesis está ligada al daño en el ADN y a la desregulación en la expresión de genes esenciales para el control del ciclo celular, o implicados en los procesos de reparación del ADN y apoptosis, entre otros. La proteína uPAR -codificada por el gen *PLAUR*- está implicada en la degradación de algunos componentes de la matriz extracelular, lo cual propicia la invasión y metástasis de las células malignas que en conjunto son considerados como una de las características distintivas ('hallmarks') del cáncer. La expresión elevada de uPAR se asocia con mal pronóstico y sobrevida global reducida en varios tipos de cáncer.

La complejidad en la regulación de la expresión génica es una característica que distingue a los organismos multicelulares superiores como los mamíferos, y en particular el ser humano. Debido a que los microARNs participan activamente en muchos procesos biológicos, estos han sido implicados en un número importante de patologías, incluido el cáncer.

En este proyecto se esperaba identificar uno o varios miRs o factores de transcripción candidatos implicados directa o indirectamente en una robusta regulación de la expresión del gen *PLAUR*, utilizando herramientas bioinformáticas y un enfoque de biología de sistemas. Luego de una búsqueda bibliográfica de microARNs, factores de transcripción y citoquinas experimentalmente implicados en la regulación de *PLAUR*, se generaron varios modelos matemáticos que, luego de optimizarlos, fueron utilizados para simular el efecto sobre *PLAUR* de varias especies potencialmente candidatas, usando principalmente el programa COPASI. Se concluyó, luego de múltiples validaciones y confirmaciones con los datos obtenidos de los repositorios de líneas celulares NCI60 y CCLE, así como de los conjuntos de datos de tumores humanos TCGA, que el principal agente regulador del gen *PLAUR* es el factor de transcripción FOSL1.

Los resultados de este proyecto servirán de base para la búsqueda de estrategias experimentales con el objetivo de disminuir la expresión de la proteína uPAR en cáncer. A futuro, una estrategia de este tipo podría tener implicaciones a nivel clínico, para bloquear la expresión de uPAR indirectamente por medio de la inhibición de FOSL1, con lo cual se reduciría la capacidad invasiva y metastásica de los tumores malignos con alta expresión de esta proteína.

## ABSTRACT

Cancer is one of the most important public health problems worldwide. It is considered a group of genetic diseases because its genesis is linked to DNA damage and deregulation in the expression of essential genes for the control of the cell cycle, or involved in the processes of DNA repair and apoptosis, among others. uPAR protein -encoded by *PLAUR* gene- is involved in the degradation of some components of the extracellular matrix, which promotes the invasion of malignant cells and metastasis that altogether are considered as one of the hallmarks of cancer. The elevated uPAR expression is associated with poor prognosis and reduced overall survival in several types of cancer.

The complexity in the regulation of gene expression is a characteristic that distinguishes higher multicellular organisms such as mammals, and in particular humans. Since microRNAs are actively involved in many biological processes, they have been implicated in a significant number of pathologies, including cancer.

The aim of this project was to identify one or more miRs or transcription factors potentially involved, either directly or indirectly, in a robust regulation of the gene expression of *PLAUR*, by using bioinformatics tools and a systems biology approach. After a literature search for microRNAs, transcription factors and cytokines experimentally implicated in the regulation of *PLAUR*, some mathematical models were generated which, after optimization, were used to simulate the effect on *PLAUR* expression of several potentially candidate species, mainly by using the COPASI application. It was concluded, after multiple validations and confirmations with the data obtained from the NCI60 and CCLE cell lines repositories, as same as from the TCGA human tumor data sets, that the main regulatory agent of *PLAUR* gene is the transcription factor FOSL1.

The results of this project will be used as the basis for building up new experimental strategies with the goal of reducing the expression of uPAR protein in cancer. In the future, a strategy like this could have clinical implications, for example blocking the expression of uPAR indirectly by inhibiting FOSL1, thus reducing the invasive and metastatic capacity of malignant tumors with high expression of this protein.

## Lista de cuadros

1.	Ejemplos de MicroARNs implicados en el cáncer . . . . .	14
2.	Ejemplos de factores de transcripción implicados en los ‘hallmarks’ del cáncer.	15
3.	Lista de factores de transcripción y sus genes según sus subunidades que fueron considerados al inicio del presente estudio. . . . .	34
4.	Lista de citoquinas y sus genes según sus subunidades. . . . .	36
5.	Estrategias y resultados de las primeras diez iteraciones . . . . .	97

## Lista de figuras

1.	Cascada invasión-metástasis . . . . .	4
2.	Mecanismo de activación del plasminógeno . . . . .	5
3.	Vía de procesamiento de miRs . . . . .	11
4.	Representación de los posibles efectos de los miRs en cáncer . . . . .	12
5.	Trece representaciones teóricas en las que un hipotético ‘motif’ de 3 nodos . .	17
6.	Ejemplo simbólico de red con especies y sus interacciones que incluyen a <i>PLAUR</i> . . . . .	22
7.	Uso de las plataformas generadoras de modelos y el programa COPASI . . .	27
8.	Menús y submenús de la página web . . . . .	27
9.	Diagrama jerárquico de unidades y subunidades de especies . . . . .	38
10.	Interacciones entre TFs, genes/ARNs y miRs con posible influencia sobre <i>PLAUR</i> . . . . .	39
11.	Valores de la Función Objetivo para las primeras ocho iteraciones . . . . .	40
12.	Valores p del ‘t-test’ de la iteración 7 . . . . .	41
13.	Valores del Análisis de Sensibilidad de la iteración 7. . . . .	41
14.	Especies que modifican directamente la expresión de <i>PLAUR</i> en modelo híbrido	43
15.	Red de interacciones del modelo híbrido . . . . .	43
16.	Análisis estadístico del modelo híbrido simplificado y ajustado . . . . .	44
17.	Análisis de Control Metabólico sobre <i>PLAUR</i> del modelo híbrido . . . . .	45
18.	Simulación de Estado Estable en el modelo híbrido . . . . .	46
19.	Simulación de Estado Estable de los 3 miRs en el modelo híbrido . . . . .	46
20.	Análisis estadístico con datos de CCLE . . . . .	47
21.	Topología del nuevo modelo con nueva versión de BioNetUCR y nuevo con- junto de interacciones . . . . .	48
22.	Ejemplo de un análisis de Control Metabólico sobre <i>PLAUR</i> contra los valores p de ‘t-test’ . . . . .	49
23.	Topología del modelo mínimo correctamente ajustado . . . . .	50

24.	Análisis de Control Metabólico contra los valores p del ‘t-test’ . . . . .	50
25.	‘Heatmap’ de los valores de expresión simulados de <i>PLAUR</i> . . . . .	52
26.	Simulación de Curso de Tiempo por mil segundos desde el Estado Estable . . .	52
27.	Análisis estadístico de ‘t-test’ con el modelo mínimo utilizando los datos de CCLE. . . . .	53
28.	Cantidad óptima de número de clústeres . . . . .	54
29.	Clústeres generados a partir de los valores de Estado Estable . . . . .	54
30.	Histogramas tipo espejo de los valores de las especies a partir de los valores de Estado Estable . . . . .	55
31.	Índice de correlación entre las 3 especies utilizando todas las líneas experi- mentales de CCLE . . . . .	57
32.	Valores óptimos de número de clústeres para cada cohorte . . . . .	58
33.	Clústeres generados a partir de ‘k-means’ . . . . .	59
34.	Probabilidades de supervivencia a partir del estimador de Kaplan-Meier com- parando ambos clústeres . . . . .	60
35.	Histogramas de las expresiones de cada especie para cada clúster, comparando ambos clústeres para cada cohorte . . . . .	62
36.	Topologías que muestran la influencia positiva de FOSL1 sobre <i>PLAUR</i> . . . .	63
37.	Red completa de interacciones con <i>PLAUR</i> y FOSL1 . . . . .	64
38.	Histogramas de las expresiones de cada especie para cada clúster de la corre- lación entre <i>PLAUR</i> y FOSL1 con los datos de BRCA en TCGA . . . . .	69
39.	Topología de interacciones directas de FOSL1 con sus ‘targets’ . . . . .	70
40.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 1. . . . .	99
41.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 2. . . . .	100
42.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 3. . . . .	101
43.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 4. . . . .	102
44.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 5. . . . .	103
45.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 6. . . . .	104
46.	Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 7. . . . .	105

47. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 8. . . . . 106

48. Simulación de Curso del Tiempo, de 0 a 1000 segundos, del descarte de todos los microARNs independiente, de la iteración 9. . . . . 107

49. Simulación de Curso del Tiempo, de 0 a 1000 segundos, de la síntesis de todos los microARNs independiente, de la iteración 10 . . . . . 108

## Lista de abreviaturas

**MYC** ‘myelocytomatosis oncogene’. 20

**PLAUR** ‘plasminogen activator, urokinase receptor’. 6, 15, 16, 21–26, 29–34, 39, 41, 42, 44, 45, 49, 51, 52, 55–57, 61, 63, 65, 66, 68–73

**ADN** ácido desoxirribonucleico. 2, 7–9, 71

**ADNc** ADN complementario. 71

**AP1** ‘activator protein 1’. 6, 69

**AP2** ‘activator protein 2’. 6

**ARN** ácido ribonucleico. 7–10, 12, 13, 18, 44, 71

**CCLE** ‘Cancer Cell Line Encyclopedia’. 28, 32, 47, 53, 56, 57, 66, 68, 73

**CHC** carcinoma hepatocelular humano. 13

**CNV** ‘copy number variation’. 51, 52

**FDA** ‘Food and Drug Administration’. 9, 13

**FOSL1** ‘Fos-like antigen-1’. 55–57, 61, 63, 65, 66, 68–73

**HER2** ‘human epidermal growth factor receptor 2’. 13

**lncARN** ARN largo no codificante. 9, 14

**MAP** ‘mitogen-activated protein’. 6

**MAPK** ‘mitogen-activated protein kinase’. 6

**mARN** ARN mensajero. 9–12, 14, 19, 71

**MEC** matriz extracelular. 3–5

**miR** microARN. 7–14, 16, 18, 20–23, 26, 29, 32, 39, 41, 42, 44, 45, 49, 51–53, 63, 67, 70, 72

**MMP** ‘matrix metalloproteinase’. 3, 4

**ncARN** ARN no codificante. 9, 12, 18

**NCI60** ‘National Cancer Institute 60’. 28, 31, 32, 40, 44, 47–49, 66, 68, 73

**PAI-1** 'plasminogen activator inhibitor-1'. 5

**PCR** 'polymerase chain reaction'. 71

**pro-miR** miR primario. 10

**pro-uPA** forma zimógena de uPA. 4

**qPCR** 'quantitative polymerase chain reaction'. 71

**rARN** ARN ribosomal. 9, 14

**RISC** 'RNA-induced silencing complex'. 10

**shARN** ARN de horquilla corta. 71

**siARN** ARN pequeño interferente. 9, 71

**snARN** ARN pequeño nuclear. 9

**snoARN** ARN pequeño nucleolar. 9

**SP1** 'specificity protein 1'. 6

**tARN** ARN de transferencia. 9, 14

**TCGA** 'The Cancer Genome Atlas'. 32, 57, 66, 68, 73

**TF** 'transcriptor factor'. 6, 8, 11, 12, 14–16, 18–23, 26, 29, 39, 41, 44, 45, 49, 67–73

**tPA** 'tissue plasminogen activator'. 4

**uPA** 'urokinase plasminogen activator'. 4, 5, 15, 23

**uPAR** 'receptor for urokinase-type plasminogen activator'. 4–6, 21, 23, 24, 68, 70–73

**WB** 'western blot'. 71

# 1. Introducción

## 1.1. Aspectos generales de la epidemiología del cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento excesivo de células que han perdido el control sobre la regulación de su proliferación [1]. Se considera un problema de salud pública a nivel mundial [2], debido a que representa aproximadamente una de cada seis muertes, y su mortalidad es solo superada por las enfermedades cardiovasculares [3].

Para el año 2020 se estimó en más de dieciocho millones el número de casos nuevos y casi diez millones de muertes globalmente debido a este grupo de enfermedades; se espera que para el año 2040 los casos nuevos lleguen a los veintiocho millones y a más de dieciséis millones de muertes [4], lo que significaría un aumento de aproximadamente un sesenta por ciento con respecto a los datos del 2018 [5]. Para el 2070 se estima que habrá treinta y cuatro millones de casos nuevos, lo que significaría el doble de lo que se diagnosticó en el 2018 [6].

Globalmente, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y el quinto en cuanto a mortalidad, mientras que el de pulmón es el segundo en incidencia pero primero en mortalidad. Otros cánceres con alta incidencia y mortalidad son: colorectal, próstata, estómago e hígado [7]. En Costa Rica, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el veintidós por ciento de las defunciones en el 2019 fueron debido a tumores malignos [8], mientras que la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) indica que el 45 % de las muertes prematuras por enfermedades crónicas se deben al cáncer [9]. Igualmente, el INEC evidencia que, entre el 2019 y el 2020, más de la mitad de los decesos son por enfermedades crónicas (clasificación donde se encuentran los tumores), aumentando este porcentaje en el 2020 por causas entre las que se incluyen varios tumores malignos: estómago, próstata, mama y pulmón [10]. Finalmente, según datos del mismo INEC, entre las diez principales categorías de causa de muerte, se encuentran cuatro tumores malignos: estómago, mama, colon y próstata [11]. También en Costa Rica, según información de la CCSS, la incidencia de tumores malignos

depende del sexo: mientras que en el hombre el de mayor incidencia es el de próstata (30 %), en la mujer corresponde al de mama (31 %); sin embargo, en términos absolutos, el cáncer de estómago es el de mayor mortalidad [9].

## **1.2. Aspectos generales de la biología del cáncer**

El cáncer se considera una enfermedad genética debido a que su génesis está ligada a alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que conducen a la desregulación en la expresión de genes esenciales para el control del ciclo celular, entre otros procesos fundamentales para el correcto funcionamiento celular [12]; incluso, se estima que entre el 60 % y el 80 % de los tumores humanos presentan anomalías cromosómicas [13]. En este sentido, las mutaciones en el ADN, las alteraciones cromosómicas y la desregulación en la expresión de los genes mediada por eventos de tipo epigenético, que desestabilizan los fenotipos celulares, son eventos necesarios en el contexto de este grupo de enfermedades. Estas alteraciones genéticas, cromosómicas y epigenéticas son causadas por factores ambientales a los que estamos expuestos, por alteraciones metabólicas o inmunológicas que conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; también pueden ser el resultado de errores fortuitos que se dan durante la replicación y reparación del ADN, la transcripción, la traducción, el empaquetamiento de la cromatina o la mitosis [14, 15]. La acumulación gradual de alteraciones, como las mencionadas en las células, conlleva a la generación de fenotipos celulares (pre)malignos con una gran variabilidad y confiere ventajas adaptativas a ciertas subpoblaciones de células (clones y subclones) ante condiciones intrínsecas (*i. e.* del microambiente) o extrínsecas (*e. g.* quimioterapia) [16].

Durante la formación, promoción y progresión del tumor maligno, este debe adquirir una serie de capacidades ('hallmarks') que son fundamentales. Específicamente, se trata de catorce características [17]: inducción de señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, evasión de la destrucción por el sistema inmune, adquisición de inmortalidad replicativa, activación de mecanismos inflamatorios protumorales, activación de mecanismos de invasión y metástasis, inducción de la angiogénesis, inestabilidad y mutación genómica,

resistencia a la muerte celular y desregulación energética; recientemente se agregaron: desbloqueo de plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes. A pesar de la importancia de todas las anteriores características, la adquisición de la capacidad invasiva y la metastásica reviste especial importancia, porque se estima que un 90 % de las muertes por cáncer obedece a enfermedad metastásica [18].

### **1.3. Invasión y metástasis de las células cancerosas**

Como ya se mencionó, uno de los eventos cruciales para el desarrollo y progresión de un cáncer es que en este las células tumorales adquieran propiedades invasivas y metastásicas [17]. La formación de un crecimiento tumoral metastásico es un proceso conocido como la cascada invasión-metástasis que consiste de múltiples etapas (Figura 1), las cuales incluyen la migración e invasión celular a nivel local (en la periferia del tumor primario), la intravasación a la vasculatura, la supervivencia en circulación, la extravasación de las células tumorales circulantes y la colonización en un órgano distante [19, 20]. La remodelación de la matriz extracelular (MEC), que consiste en una degradación proteolítica de algunos de los componentes de la MEC, es necesaria durante la fase de invasión local. Esta remodelación puede liberar factores que se encuentran secuestrados en la MEC y promueven el crecimiento tumoral; incluso generar fragmentos con nuevas bioactividades, entre ellas el reclutamiento y activación de células inmunitarias o la regulación de mecanismos angiogénicos [21, 22]. Los principales mediadores proteolíticos de la remodelación de la MEC en el contexto tumoral son las metaloproteasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) y el sistema de activación de plasminógeno [21, 23]. A continuación se detalla el segundo por ser el más relevante en el contexto de esta tesis.

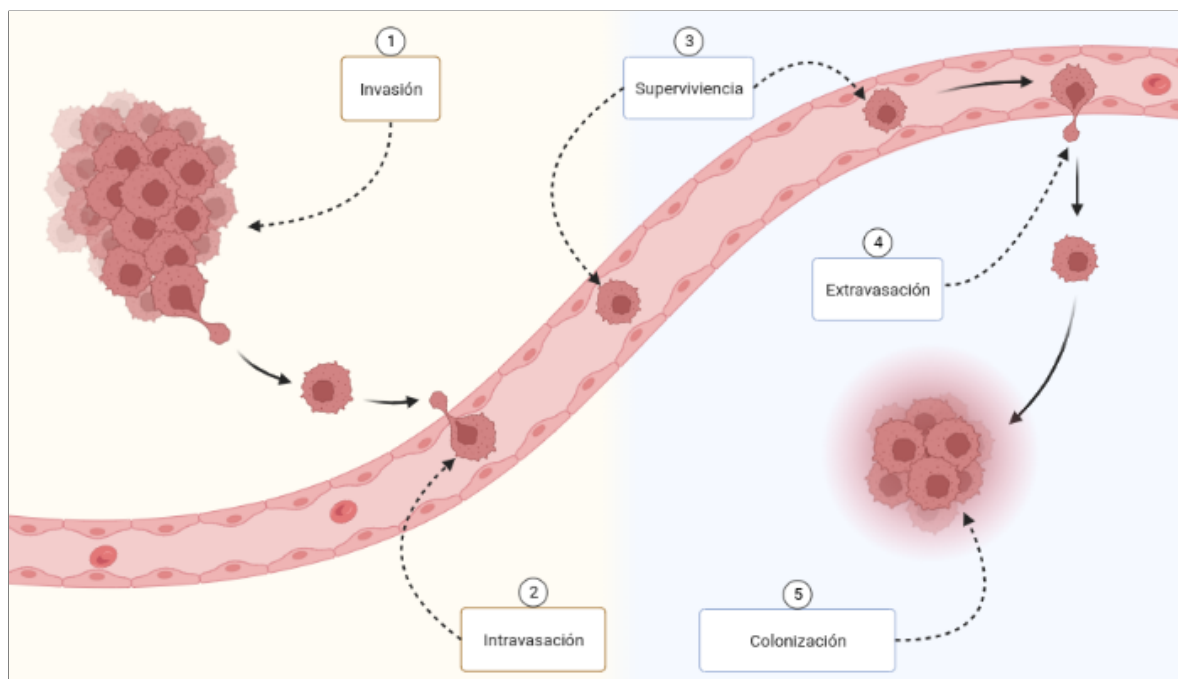


Figura 1. Cascada invasión-metástasis. Primero, las células cancerígenas invaden la periferia del tumor primario; segundo, penetran en los vasos sanguíneos; tercero, las mejor adaptadas son capaces de sobrevivir en el sistema circulatorio; cuarto, salen de la vasculatura; quinto, colonizan otro órgano y, dependiendo de varios factores, incluyendo las condiciones del nuevo microambiente, forman tumores metastásicos. Imagen adaptada de “Tumor Metastasis (Layout) (2)”, por BioRender.com (2023) y obtenida de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

El sistema de activación de plasminógeno comprende varias proteínas que, actuando en secuencia, conducen a la conversión de la proenzima plasminógeno en plasmina, siendo esta última su forma enzimática activa; de este modo, la plasmina es capaz de degradar componentes de la MEC como fibrina, fibronectina, lamininas y vitronectina, además de activar varias MMPs [24]. Este sistema comprende a los activadores de tipo uroquinasa (uPA) y de tipo tisular (tPA), siendo uPA el principal responsable de la conversión de plasminógeno en plasmina en el contexto de la invasión tumoral [21].

El mecanismo de activación de plasminógeno, según ilustra Alpízar-Alpízar, Malespín-Bendaña, Une y Ramírez-Mayorga [21], funciona de la siguiente manera: cuando se da la unión de pro-uPA con su receptor (uPAR) se genera la forma activa de uPA, lo que consecuentemente conlleva a la conversión del plasminógeno en plasmina, además de activar algunas MMPs que también contribuyen a la remodelación de la MEC. La plasmina también cataliza por retroalimentación positiva la conversión de pro-uPA en uPA, acelerando consecuentemente

este sistema de activación. Mientras tanto, las moléculas de PAI-1 ('plasminogen activator inhibitor-1') actúan como inhibidores de esta secuencia al unirse al complejo uPA-uPAR y propiciar la internalización y degradación de este complejo. La Figura 2, modificada a partir de Alpizar-Alpizar, Malespín-Bendaña, Une y Ramírez-Mayorga [21], muestra este mecanismo.

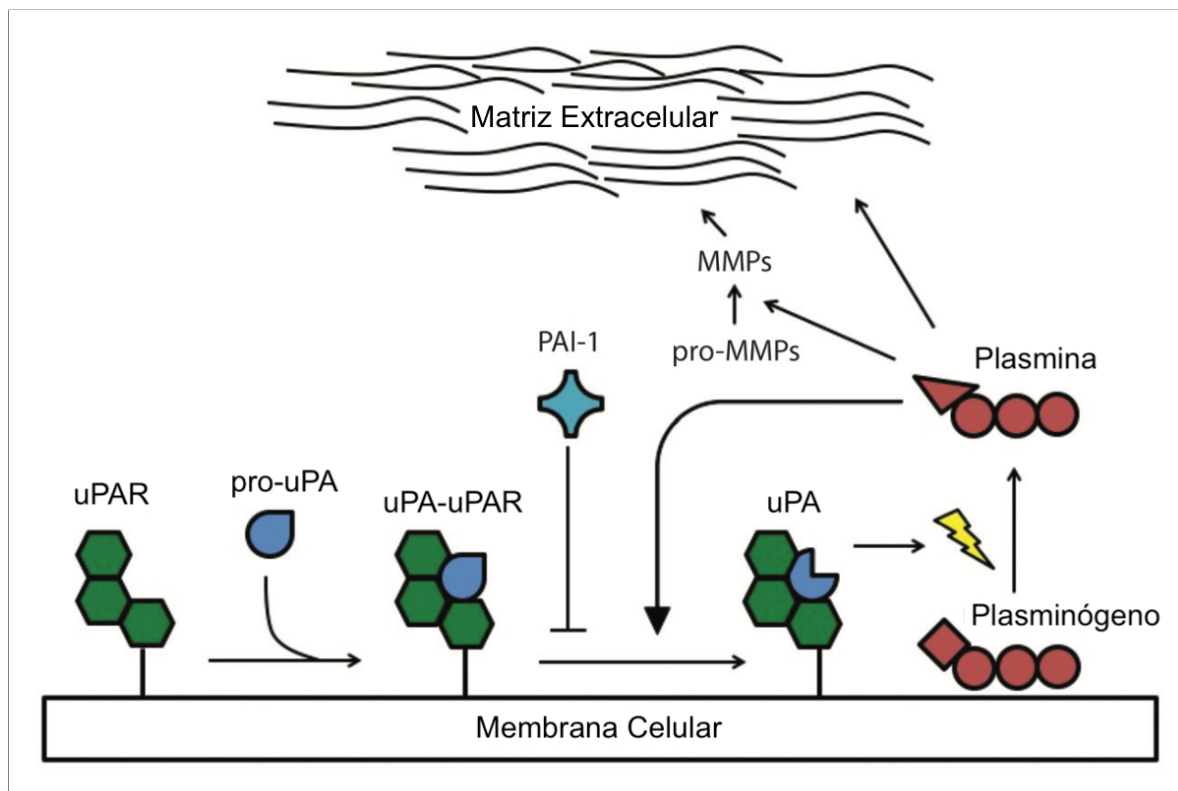


Figura 2. Mecanismo de activación del plasminógeno. La activación de la proteasa uPA se da como resultado de la unión de la forma inactiva, pro-uPA, con su receptor uPAR, lo cual es fundamental para que se dé la conversión del plasminógeno en plasmina, que mediante retroalimentación positiva también contribuye en la producción de pro-uPA en uPA; adicionalmente, la plasmina activa varias MMPs. Tanto la plasmina como las MMPs pueden degradar componentes de la matriz extracelular. La molécula PAI-1 actúa como inhibidor de esta secuencia

#### 1.4. uPAR y cáncer

Como se puede observar en la Figura 2, uPAR es un participante activo y crucial en la degradación de la MEC mediada por el sistema de activación de plasminógeno; de hecho, si este receptor no es expresado en la membrana de las células malignas o del microambiente

tumoral la activación del plasminógeno no ocurriría. Por ende, su relevancia se evidencia en la correlación que ha sido informada entre una elevada expresión de este receptor, el mal pronóstico y la sobrevida global reducida para varios tipos de cáncer, tales como el gástrico, de ovario, próstata, colorrectal, vejiga, mama y pulmón, entre otros [24-29]. Otros eventos en los que uPAR ha sido implicado son la regeneración de tejidos, la angiogénesis y las interacciones tumor-estroma, entre otros [21]. De lo anterior se desprende que uPAR participa, directa o indirectamente, en diferentes eventos que se dan durante el desarrollo y progresión tumoral [30, 31].

A la fecha, no está del todo claro cómo es que la expresión del gen que codifica para uPAR (denominado *PLAUR*) es inducida en cáncer. Se ha propuesto que la activación de algunas vías de señalización conducen a la activación de factores de transcripción (TFs, por las siglas en inglés), los cuales reconocen secuencias específicas dentro de la región promotora de dicho gen [21]. En particular, entre los mecanismos de señalización indicados como potenciales vías que culminan con el aumento de uPAR en cáncer, se encuentra la de MAP-quinasas (MAPK, por las siglas en inglés de ‘mitogen-activated protein kinase’). Esta vía se encuentra a menudo hiperactiva en varios tipos de cáncer y propicia la activación de varios TFs, entre ellos la proteína activadora 1 (AP1 o ‘activator protein 1’), la proteína activadora 2 (AP2 o ‘activator protein 2’), y la proteína de especificidad 1 (SP1 o ‘specificity protein 1’) [21, 32].

La relevancia de uPAR en cáncer ha sido ampliamente evidenciada en estudios experimentales, tanto en material biológico humano como en modelos animales y en investigaciones *in vitro*. Por ejemplo, se ha demostrado que la supresión de uPAR por medio de la técnica del CRISPR/Cas9 inhibe la proliferación, migración e invasión celular en líneas celulares cancerígenas humanas; además, el silenciamiento en su expresión disminuyó la resistencia a drogas en esas mismas células [33]. Así mismo, se ha considerado que uPAR podría ser un objetivo terapéutico potencial en el tratamiento del neuroblastoma [34]. Finalmente, se ha informado que uPAR participa en mecanismos de migración celular mediante su unión directa con integrinas [35].

## 1.5. Regulación de la expresión génica en células eucariotas y el cáncer

La regulación de la expresión génica es fundamental para la vida de los organismos. De hecho, la complejidad y diversidad que existe en los mecanismos de regulación de la expresión génica es una característica que distingue a los organismos multicelulares superiores como los mamíferos [36], y en particular el ser humano. Los errores en la regulación de la expresión génica pueden conducir a enfermedades, como es el caso del cáncer [36]. Por ejemplo, se ha sugerido que los cambios en la expresión de genes cuyos productos biológicos están implicados en el metabolismo contribuyen a la prevalencia de alteraciones del número de copias de genes específicos recurrentes en tumores humanos [37, 38].

La regulación génica se puede efectuar en varios de los pasos mediante los cuales fluye la información genética desde el ADN hasta la proteína [39]. Específicamente, los mecanismos de regulación pueden actuar en los siguientes niveles:

1. Transcripcional: controlando cuándo y con qué frecuencia se transcribe un gen.
2. Procesamiento del ARN: regulando la maduración de los ARNs transcritos.
3. Transporte y ubicación del ARN: seleccionando cuáles ARN mensajeros se exportan desde el núcleo al citosol y en qué parte de este se ubican.
4. Degradación del ARN mensajero: desestabilizando selectivamente ciertas moléculas de ARN mensajero en el citoplasma. Aquí pueden participar los miRs [40].
5. Traduccional: seleccionando cuáles ARN mensajeros en el citoplasma son traducidos por ribosomas. Aquí también pueden participar los miRs [41].
6. Actividad proteica (postraduccional): activando, inactivando, degradando o ubicando selectivamente proteínas específicas después de que estas han sido sintetizadas.

A pesar de que la regulación génica puede darse en cualquiera de los niveles anteriormente listados, el control a nivel transcripcional es posiblemente el más importante para la mayoría de los genes, lo cual se debe a que este garantiza que no se sinteticen intermediarios innecesarios,

con el consecuente gasto energético que esto conlleva [42]. La regulación al inicio de la transcripción se lleva a cabo a través de la unión (o no) de proteínas, comúnmente llamadas TFs, a elementos reguladores, los cuales son secuencias de ADN cercanas o distantes al sitio de iniciación de la transcripción [43]. La relevancia de este tipo de regulación es evidenciada en el hecho de que los genes que codifican para TFs representan aproximadamente el 8 % de todos los genes humanos; por esto, están asociados con una gran variedad de fenotipos y enfermedades [44].

Otro de los niveles regulatorios de la transcripción son las modificaciones de la cromatina, las cuales se consideran modificaciones epigenéticas [45]. La epigenética proporciona una explicación molecular para cerrar la brecha entre el genoma y las señales ambientales, que puede asociarse con el estilo de vida y las condiciones ambientales durante el desarrollo intrauterino o posnatal [46]. Así, entre los principales eventos implicados en la regulación epigenética de la expresión génica se pueden citar: la modificación de residuos de aminoácidos específicos de las histonas, la remodelación de la cromatina, la metilación del ADN y la acción de los ARN no codificantes (sobre los ARNs no codificantes se detalla posteriormente), entre los que se encuentran los miRs [45].

## **1.6. Regulación epigenética y su rol en el desarrollo y la progresión del cáncer**

Como se indica en Baylin y Jones [47], tradicionalmente las investigaciones concernientes a la biología del cáncer se centran en su base genética, es decir, en cómo la activación mutacional de los protooncogenes (para convertirlos en oncogenes) o la inactivación de los genes supresores de tumores permiten el desarrollo de células tumorales; sin embargo - también indica- que desde finales del siglo XX, un número creciente de investigaciones ha evidenciado que las alteraciones epigenéticas también pueden ser críticas para el desarrollo y progresión de los tipos de cáncer humano. Por ejemplo, algunas investigaciones señalan que la deposición de variantes de histonas (llamadas oncohistonas) está implicado en el desarrollo

y progresión de este grupo de enfermedades [48]. Así mismo, se ha descubierto que las firmas epigenéticas comúnmente alteradas en los tumores malignos tienen una importancia clínica potencial, lo que proporciona una fuerte motivación para avanzar en los estudios preclínicos relacionados con terapias epigenéticas [49]. Actualmente, se realiza mucha investigación a nivel preclínico y clínico en torno a opciones terapéuticas que buscan normalizar los patrones de metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales en las histonas que promueven o mantienen un fenotipo maligno [50]. De hecho, ya existen algunas aprobadas por la FDA ('Food and Drug Administration' o Administración de Medicamentos y Alimentos) para el tratamiento de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer [46, 51].

## **1.7. Los microARNs y el cáncer**

Las células eucariotas producen varios tipos de ARN con funciones muy diversas, los cuales juegan un papel importante tanto en la homeostasis como en procesos patológicos. Entre los principales tipos de ARNs se pueden mencionar a los mensajeros (mARNs), los ARN ribosomales (rARNs), los ARN de transferencia (tARNs), los ARN pequeños nucleares (snARNs), los ARN pequeños nucleolares (snoARNs), los ARN pequeños interferentes (siARNs), los ARN largos no codificantes (lncARNs) y los microARNs (miRs) [39]. A excepción de los mARNs, los demás pertenecen a la categoría de ARN no codificantes (ncARNs), para los cuales se ha demostrado que participan en la regulación de procesos celulares diversos, tanto en contextos homeostáticos como patológicos [52]. Incluso, la expresión desregulada de ncARNs se ha relacionado directamente con el desarrollo y la progresión del cáncer [53].

Con respecto a los miRs, estos son participantes activos de casi todos los procesos biológicos conocidos, incluyendo el crecimiento celular, la proliferación y diferenciación, así como el metabolismo y el desarrollo del organismo [54]. De hecho, el descubrimiento de miles de miRs distintos ha llevado a cambios profundos en la comprensión de los mecanismos de control de la expresión génica que operan tanto en la salud como en la enfermedad [55, 56]. El control espacio-temporal de la abundancia de miRs se hace posible, en parte, mediante la regulación de la vía de biogénesis de los miRs: esto es, una serie de pasos bioquímicos que

convierte un miR primario en un miR maduro y, por lo tanto, biológicamente activo [57].

Específicamente, los miRs son moléculas de ARN no codificante cortos (alrededor de 19 a 25 nucleótidos de longitud) que regulan la expresión génica mediante el bloqueo de la traducción, uniéndose complementariamente a los mARNs, y en algunos casos propiciando su degradación [39]. De esta manera, los miRs afectan la expresión génica postranscripcionalmente [58]. Los miRs coordinan la expresión de grupos completos de genes, dando forma al transcriptoma de mamíferos [59].

Biológicamente, según se explica en Tran, Choi, Wszolek et al. [60], la vía de procesamiento de miRs se ha considerado universal (conservada) para todos los miRs en mamíferos, aunque más recientemente se han descrito mecanismos alternativos o no canónicos. Esta maduración incluye la transcripción del miR primario (pro-miR), un preprocesamiento donde la horquilla precursora resultante (pre-miR) es exportada al citoplasma; ya en el citoplasma, la horquilla pre-miR se separa en su forma madura. La hebra funcional del miR maduro se carga junto con las proteínas Argonautas (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (o RISC, por las siglas en inglés de ‘RNA-induced silencing complex’), y le sirve de guía a este complejo para ejecutar su función: el silenciamiento de los mARNs diana a través de su rompimiento, la represión de la traducción o la deadenilación [61]. La Figura 3 ilustra este proceso.

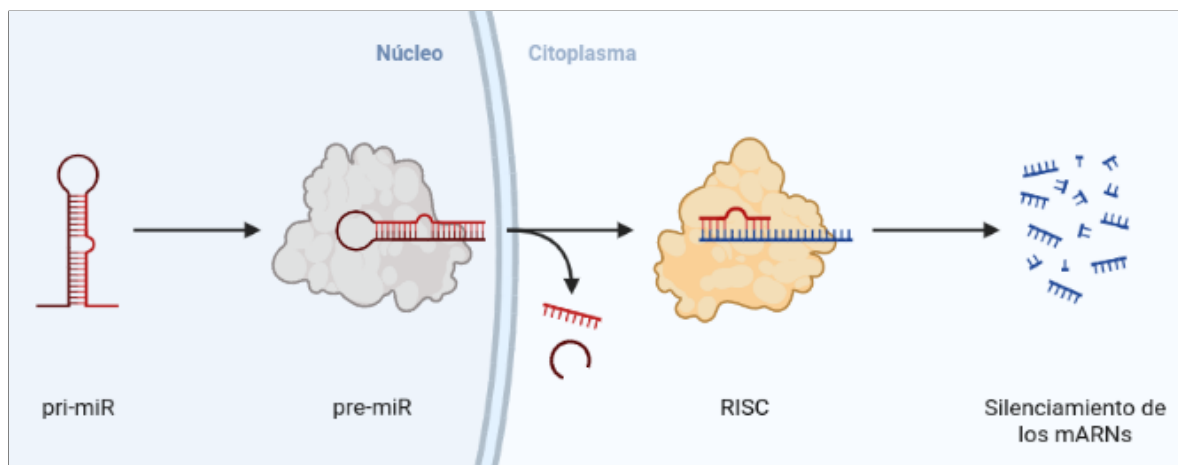


Figura 3. Representación de la vía de procesamiento de miRs. Primero, se transcribe el miR primario (pri-miR) y experimenta un pre-procesamiento (pre-miR); segundo, la horquilla precursora resultante (pre-miR) es exportada al citoplasma donde es finalmente convertida en la versión madura (miR); tercero, el miR funcional se carga en el complejo (RISC); cuarto, este complejo ejecuta su función de silenciar los mARNs objetivo. Imagen adaptada de “Intracellular Compartments Horizontal (Layout)” y “miRNA Processing”, por BioRender.com (2023) y obtenida de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Los miRs ejercen sus efectos en el contexto de redes reguladoras complejas, que a menudo se vuelven aún más extensas por la inclusión de TFs [62]. Algunas predicciones computacionales estiman que cada miR puede unirse a cientos de mARNs diferentes, lo cual implica que la regulación mediada por miRs impacta a más de la mitad de los genes que codifican para proteínas en humanos [63]. Actualmente, se acepta que los miRs se someten a los mismos mecanismos regulatorios que cualquier otro gen codificante para proteínas, incluida la regulación epigenética; a su vez, un subgrupo de estos controlan, directa e indirectamente, la expresión de efectores epigenéticos [64].

Debido a su participación activa en muchos procesos biológicos, los miRs están implicados en muchas patologías, incluido el cáncer [62], donde a menudo su expresión es aberrante [65]. Dependiendo de la regulación que ejercen sobre los distintos mARNs, a varios miRs se les ha atribuido funciones oncogénicas o supresoras de tumores [52]. La Figura 4 ilustra esta cualidad de los miRs.

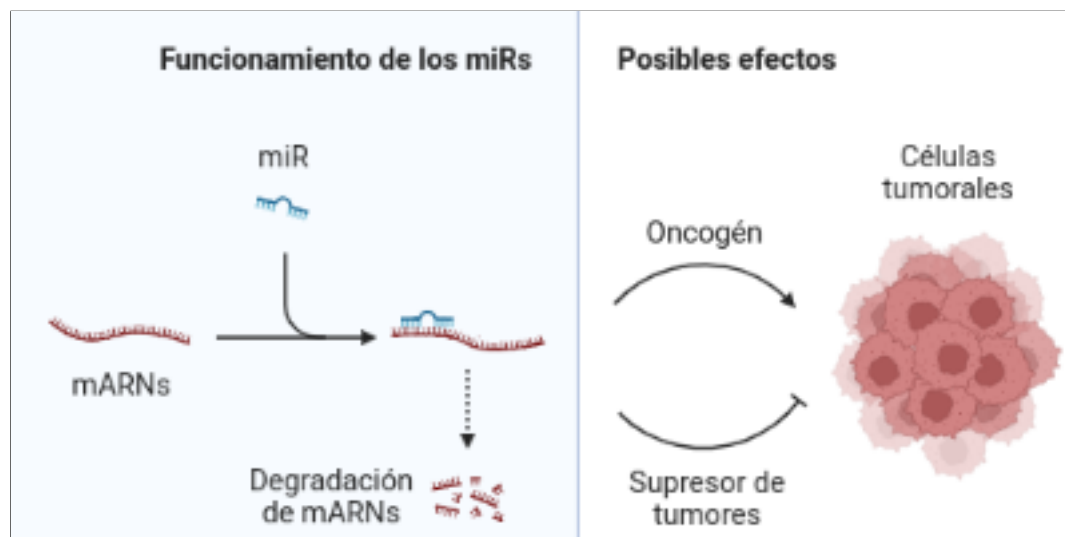


Figura 4. Representación de los posibles efectos de los miRs en cáncer, donde pueden ejercer funciones oncogénicas, o bien, de supresión tumoral, dependiendo de los mARNs objetivo de cada miR. Imagen adaptada de “lncRNA-miRNA Gene Expression Regulation in Cancer”, por BioRender.com (2023) y obtenida de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Los mecanismos responsables de la desregulación de los miRs en el cáncer son numerosos y variados; incluso, muchos genes que codifican para miRs humanos se encuentran en “sitios frágiles” (ubicaciones cromosómicas específicas que son propensas a sufrir ruptura), o en regiones genómicas con mayor tendencia a experimentar mutación, deleción, amplificación o translocación en cáncer [62]. Los miRs están incluidos en la regulación de genes que conforman redes potencialmente oncogénicas, lo que -como se indicó anteriormente- conduce a la expresión aberrante de varios miRs en el contexto tumoral [65]. No obstante, la pérdida de regulación mediada por miRs puede ser causada por varios mecanismos incluyendo la eliminación, amplificación, mutación o alteración de la actividad de TFs sobre miRs específicos [66].

La capacidad de los miRs para influir de forma importante en los eventos que conllevan a la adquisición de los fenotipos malignos sugiere que las estrategias experimentales para inhibir o aumentar la actividad de miRs específicos en las células tumorales podrían eventualmente traducirse en un beneficio terapéutico, al menos conceptualmente [67]. Esclarecer las complejas redes reguladoras en las que participan los miRs (y los ncARNs en general) es fundamental para avanzar hacia la creación de terapias anticáncer basadas en ARNs [52]. En

el caso específico de los miRs, existe un gran interés en modificar los niveles de expresión de ciertos miRs como una forma de tratamiento del cáncer [68]; de hecho, la estrategia de agregar los miRs faltantes en células cancerosas para restaurar sus funciones normales se denomina terapia de reemplazo de miR [69]. Aunque todavía no para cáncer, el uso de ARNs con fines terapéuticos, incluyendo miRs, ya es una realidad: varias terapias de reemplazo han sido aprobadas por entes regulatorios como la FDA [70, 71]. Se debe también resaltar que el uso de miRs como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y predicción son materia de intensa investigación en el contexto de la oncología clínica [72-74].

Una de las mayores dificultades para el uso de terapias abocadas a normalizar los niveles de miRs en cáncer es la identificación de los miRs relevantes para un tipo particular de cáncer. Esto obedece principalmente a que, como se mencionó anteriormente, la cantidad de miRs identificados y el hecho que cada miR puede estar implicado en la regulación de varios blancos al mismo tiempo, así como que los mecanismos subyacentes de cómo estos ejercen su efecto son muy complejos y no están del todo comprendidos [75]. Sin embargo, la predicción de las dianas de los miRs, el modelado metabólico y los datos de expresión génica para predecir miRs con potencial terapéutico se ha aplicado -por ejemplo- al carcinoma hepatocelular humano (CHC). Específicamente en este caso, se simuló la sobreexpresión de ciertos miRs para predecir su capacidad para reducir el crecimiento de células cancerosas [75]. También, se han diseñado miRs sintéticos para inhibir la expresión proteica en células cancerígenas, como es el caso de aquellos diseñados para inhibir la proteína HER2 ('human epidermal growth factor receptor 2' o receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), la cual se encontraba sobreexpresada en un sistema *in vitro* con células de cáncer de ovario [76].

En el Cuadro 1, simplificado a partir de Lujambio y Lowe [65], se listan algunos miRs cuya expresión se encuentra desregulada en varios tipos de cáncer.

Cuadro 1. Ejemplos de MicroARNs implicados en el cáncer: los oncogenes se encuentran amplificados y los supresores disminuidos en los tumores indicados.

<b>Funciones</b>	<b>MicroARNs</b>	<b>Cánceres</b>
Oncogén	miR17-92	Linfoma, cáncer de pulmón, mama, estómago, colon y páncreas
	miR155	Leucemia linfocítica crónica, linfoma, cáncer de pulmón, mama y colon
	miR21	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, glioblastoma, cáncer de páncreas, mama, pulmón, próstata, colon y estómago
Supresor tumoral	miR15a, miR16-1	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata y adenomas hipofisarios
	miR34	Colon, pulmón, mama, riñón, vejiga, neuroblastoma y melanoma
	miR29	Leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica agresiva y cáncer de pulmón

## 1.8. Los factores de transcripción y el cáncer

En todos los organismos vivos, el proceso de transcripción conduce a la expresión de ácidos ribonucleicos (mARN, rARN, tARN, lncARN, miR, etc.), controlada espacio-temporalmente. Este proceso es activado por estímulos internos o externos a través de una compleja red de señalización [77]. Así, un TF podría definirse como cualquier molécula que participe, individualmente o como parte de un complejo, en la unión a un promotor o elemento regulador de un gen dentro de esta compleja red, siendo el resultado final la regulación al alza o a la baja de la expresión de este [78].

Los TFs son actores biológicos clave en enfermedades, incluido el cáncer [79]; de hecho, su desregulación es un tema generalizado en muchas -si no en todas- las formas de cáncer humano, donde los genes que los codifican a menudo se amplifican, eliminan y reorganizan a través de la translocación cromosómica, o bien, sufren mutaciones que resultan en una ganancia o pérdida de su función [80]. Los TFs son uno de los pilares del cáncer debido a su

papel crucial en la iniciación y progresión del cáncer, incluyendo la invasión, la metástasis y la quimiorresistencia [81].

En el Cuadro 2, reducido de Bushweller [82], se ejemplifican algunos TFs diana para el tratamiento del cáncer debido a que están asociados a alguno de sus ya conocidos ‘hallmarks’ [22].

Cuadro 2. Ejemplos de factores de transcripción implicados en los ‘hallmarks’ del cáncer.

‘Hallmarks’	TFs	Cánceres
Propiedades de las células madre como la autorrenovación	CBF $\beta$ -SMMHC, MLL-AF9	Leucemia mieloide aguda (AML)
Inmortalidad replicativa	GABP	Glioblastoma
	RUNX1-ETO	AML
Transición epitelial a mesenquimal	KLF8	Gástrico
	SIX1	Mama
	RUNX2	Mama, próstata
Diferenciación y/o muerte celular	PML-RAR $\alpha$	Leucemia promielocítica aguda (APL)
Desarrollo de resistencia	FOXO	Mama
	RUNX1	AML
	RUNX2	Melanoma
Circuitos autoregulatorios	TAL1, GATA3, RUNX1	Leucemia linfoblástica aguda de células T (TALL)
	CBF $\beta$ , RUNX1, p53	AML
	ETS1, ETS2	Impulsados por RAS
Evasión inmune	MYC	Linfoma, hepatocelular
	STAT1	Melanoma
	RUNX1-ETO	AML

Las correlaciones entre TFs y *PLAUR* en cáncer han sido documentadas en varios artículos científicos. Por ejemplo, Afaloniati, Karagiannis, Hardas, Poutahidis y Angelopoulou [83] sugirieron que la deficiencia de uPA puede estar asociada con la regulación positiva de los TFs Runx durante la carcinogénesis de colon debido a la inflamación. Por esto, no es de

extrañar que puedan existir correlaciones entre TFs y la expresión de *PLAUR* en varios tipos de cánceres, asociado específicamente a la invasión y metástasis.

## 1.9. Biología de sistemas y el cáncer

Se podría decir que las bases para tratar de simular computacionalmente el comportamiento de un sistema biológico fueron concebidas desde que Alan Turing publicó, a mediados del siglo XX, un artículo donde proponía modelar matemáticamente un embrión en crecimiento [84]. Este modelo, denominado de reacción-difusión (RD), proporcionó una explicación teórica de la diversidad de patrones observados en la naturaleza y describió cómo las interacciones entre morfógenos (genes y hormonas, por ejemplo), que se difunden de forma diferente a través de un tejido, pueden dar lugar a patrones autónomos de apéndices epiteliales. En otras palabras, Turing demostró teóricamente que cuando las reacciones cinéticas no lineales se equilibran con la diferencia en los coeficientes de difusión, pueden dar como resultado la formación de un patrón periódico estable en un campo de señal inicialmente homogénea, en el que los picos del activador se alternan con el inhibidor, obteniendo así un sistema autoorganizado que define el patrón de los apéndices epiteliales [85].

Tal como se explica en Alon [86], un sistema biológico se puede representar mediante el uso de una red que incluye nodos (especies tales como miRs, genes y TFs) y arcos (indicando la regulación mediante la activación o represión de la expresión de un gen), así como una descripción matemática con ecuaciones que representan ese dinamismo. A pesar de que cada nodo puede interactuar incluso con él mismo (autoregulación), al teorizar todas las posibles interacciones entre -por ejemplo- tres nodos diferentes (ver Figura 5), no todas representan “redes reales” (‘motifs’) en su contraparte biológica. Así, cada interacción entre nodos (incluida la autoregulación) puede formularse de diferente forma (entiéndase, una ecuación distinta) para poder representar su tasa de activación/represión. Al juntar los conceptos anteriores (la topología y su descripción matemática), se obtiene un modelo que permite entender tanto un sistema conocido y estable, así como hipotetizar los productos de una perturbación en el mismo, o incluso, teorizar posibles nuevos ‘motifs’ que pueden surgir.

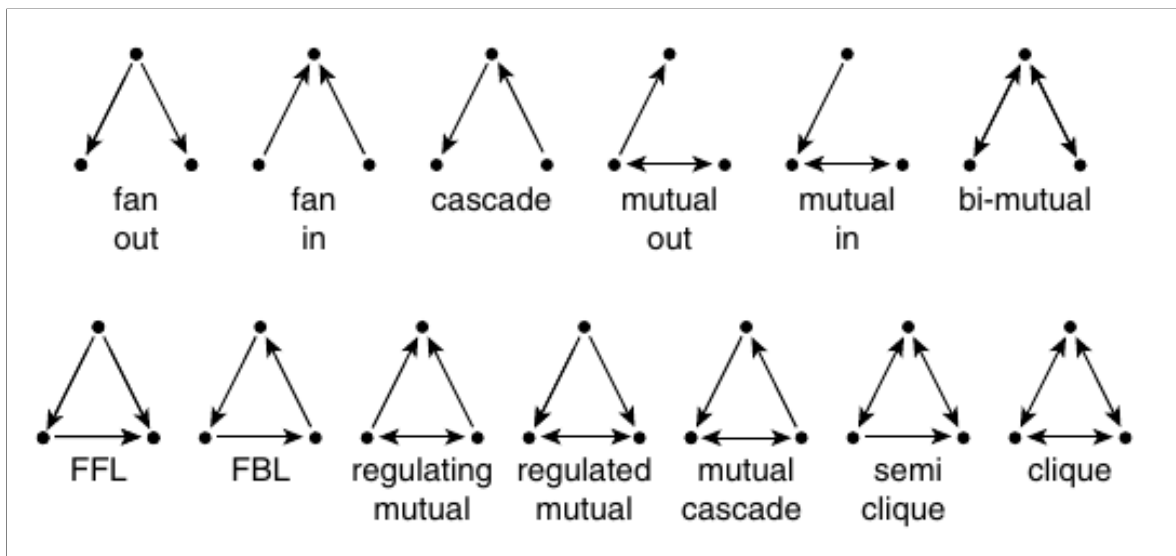


Figura 5. Trece representaciones teóricas en las que un hipotético ‘motif’ de 3 nodos puede interactuar. Cada flecha indica la dirección de la regulación, ya sea de activación o de represión (FFL: ‘Feedforward Loop’. FBL: ‘Feedforward Loop’). Imagen tomada de Alon [86].

En el campo matemático de los sistemas dinámicos, existe un marco conceptual que define el término de un Estado Estable dentro de las redes de regulación génica y que corresponde a distintos fenotipos celulares. Estas interacciones génicas son dinámicas y forman redes que pueden existir en un número finito de estados. En consecuencia, las mutaciones que pueden afectar estas redes son capaces de afectar el fenotipo celular [12]. Un enfoque basado en la biología de sistemas ayudaría a descifrar la complejidad inherente al desarrollo y progresión del cáncer; comprender las interacciones complejas que subyacen en este grupo de enfermedades aportaría en la caracterización de la fisiopatología de la enfermedad y en la estratificación de los cánceres en subtipos moleculares, lo cual facilita el desarrollo de terapias personalizadas [87].

Así mismo, como se indica en Wong y Gunawardena [36], el tratamiento de enfermedades (por ejemplo el cáncer) mediante terapia génica ya es una realidad y los mecanismos reguladores de los ácidos nucleicos sintéticos que se utilizan con este fin deben ser tomados en cuenta. El problema central, indica, es pasar de la identificación de los componentes como entidades individuales a la integración de su comportamiento colectivo para así determinar la función biológica que emerge. Los conceptos necesarios para este tipo de biología de sistemas

se originan en las matemáticas y la física. El uso de estos acercamientos adquiere cada vez más relevancia a medida que los datos experimentales se vuelven más cuantitativos.

Los enfoques computacionales proporcionan, entonces, información valiosa sobre cuáles son los mecanismos mediante los cuales operan los miRs. Así mismo, el uso de este tipo de herramientas reduce la complejidad al extraer los principales determinantes de las complejas interacciones en las que participan estos ARNs, lo que hace que la verificación experimental de elementos centrales en la regulación de la expresión génica en los sistemas biológicos sea viable, más rápida y significativamente menos costosa. De hecho, los métodos computacionales han ayudado al descubrimiento de firmas moleculares putativas de la desregulación de miRs en tumores humanos [88]. Dado el alto nivel de complejidad y costo que en muchos casos implica realizar procedimientos experimentales en un laboratorio, las predicciones computacionales de las interacciones de los miRs con otros elementos, por ejemplo TFs, emergen como una alternativa muy apropiada para facilitar la caracterización experimental de estas asociaciones [89].

Tal como se explica en Friedman, Linial, Nachman y Pe'er [90], el uso de modelos matemáticos para comprender la progresión de un tumor conlleva al diseño de nuevos experimentos en los que se determina la participación de moléculas (proteínas o ncARNs) con potencial para ser utilizados como biomarcadores o dianas terapéuticas. A medida que nos enfrentamos a nuevos desafíos en biología, medicina y biotecnología, existen grandes oportunidades para aplicar enfoques de biología sintética a organismos de orden superior [91].

### **1.10. Compensación de dosis génica y biología de sistemas**

La mayoría de los productos génicos interactúan con otros componentes celulares, donde los desequilibrios estequiométricos en dichas redes de interacción pueden generar defectos de aptitud [92]. Por ello, hacerle frente a las variaciones en la dosis de la red es crucial para mantener una función óptima en las redes de genes; sin embargo, esta dosificación se puede alterar en situaciones como el cambio de algunos organismos entre formas de vida haploides y

diploides, la duplicación de cromosomas durante el ciclo celular, la duplicación del contenido genético en todo el genoma y la variación global en la expresión génica [93]. Por lo tanto, la estequiometría de los miembros de los complejos sistemas de múltiples subunidades puede afectar la cantidad de producto completo funcional, lo que a su vez afecta los patrones de expresión génica (si el complejo es regulador) y, en última instancia, el fenotipo y su aptitud evolutiva [94].

Los genomas diploides complejos (como el humano) no son solo colecciones de genes, sino redes bien equilibradas de expresión génica [95]. Estos niveles de expresión génica dependen del equilibrio entre la tasa de producción de mRNA y su degradación [92]. Se sugiere que los sistemas de compensación de dosis existentes son relativamente antiguos, donde algunos genes implicados han sido adaptados para esta compensación mientras conservan sus funciones ancestrales, y otros que codifican proteínas específicas de compensación de dosis habrían surgido por la duplicación de genes implicados en otros procesos [96].

Debido a la gran cantidad de genes coregulados, los sistemas de compensación de dosis brindan excelentes oportunidades para el análisis de la regulación génica en general [95]. Un hipotético mecanismo de compensación de dosis génica implica la combinación de una región del genoma que produce un efecto de dosis inversa en un producto génico particular, junto con el gen que codifica ese producto [94]. Así mismo, los efectos de los cambios en la dosis de genes pueden amortiguarse mediante mecanismos que actúan a nivel transcripcional, por ejemplo, a través de fenómenos epigenéticos relacionados con la cromatina, retroalimentación negativa de la síntesis de TF u otros efectos basados en la red [92].

Se han propuesto modelos matemáticos que representan las interacciones de compensación de dosis génica en una red. Entre ellos, por ejemplo, Acar, Pando, Arnold, Elowitz y Oudenaarden [93] proponen un diseño general para la estructura de la red de genes en las células, cuyo mecanismo de invariancia de dosis consiste en un circuito genético de dos componentes con elementos de actividad reguladora opuesta (el activador o elemento positivo, y el inhibidor o elemento negativo) que deben interactuar con una estequiometría efectiva uno a uno y tener topologías específicas que permitan que solo uno de ellos afecte directamente la transcripción.

Específicamente en cáncer, por ejemplo, este teórico mecanismo de balance de dosis génica ha sido utilizado (mediante la aplicación de varias estrategias y herramientas computacionales con énfasis en biología de sistemas) para crear un modelo matemático que permitió explicar la compensación de la dosis del gen *MYC* mediante una red de interacción con miRs y TFs que lo regulan [97].

## 2. Justificación

### 2.1. Problema y propuesta de solución

A pesar de los notables avances en la comprensión y el tratamiento de los tumores primarios, la supervivencia relacionada con el cáncer metastásico sigue siendo muy reducida; el 90 % de las muertes relacionadas con el cáncer están, de hecho, vinculadas a los tumores metastásicos [98]. Los pacientes con los carcinomas más comunes, como los que afectan al pulmón, la próstata, el intestino o la mama, mueren con frecuencia por metástasis, incluso después de una cirugía con intención curativa, radioterapia, terapia farmacológica o una combinación de estos [99]. Entonces, la metástasis continúa siendo la última frontera del cáncer, por lo que es necesario identificar nuevas moléculas que sean potenciales candidatos terapéuticos, idealmente con participación directa en la regulación de eventos que promueven invasión y metástasis que deriven en terapias o combinaciones terapéuticas novedosas y ante todo más eficaces [100]. Una estrategia novedosa en esta línea sería impedir que las células cancerosas invadan o diseminen a sitios distantes y formen metástasis.

La activación del mecanismo de diseminación metastásica es una propiedad fundamental ('hallmark') del cáncer [22]. Aunque se conoce relativamente bien la secuencia de eventos, no está claro cómo es que algunos de los actores implicados en este fenómeno son inducidos; este es el caso del mecanismo de inducción de la proteína uPAR en el contexto de la diseminación local de las células malignas. Una posible estrategia es recurrir a la biología de sistemas y las herramientas bioinformáticas para averiguar qué conjuntos de especies están implicados en la regulación de *PLAUR* directa e indirectamente -por ejemplo miRs y TFs- y así crear una o varias redes que permitan simular y analizar computacionalmente esta regulación, como se sugiere en Busch, August y Busch [101].

Tal como indican Anastasiadou, Jacob y Slack [52], la arquitectura de las interacciones moleculares que transducen señales en las células puede ilustrarse mediante el uso de la teoría de redes, donde los nodos son los miembros participantes y los arcos son los vínculos o

interacciones entre esos miembros. Esto es exactamente lo que se pretende con los modelos matemáticos a crear y utilizar en este trabajo: mediante un enfoque de biología de sistemas, simular el comportamiento de una red de especies que interactúan entre sí, con el objetivo de conocer el comportamiento teórico del gen *PLAUR* con su “vecindario” (especies con quien interactúa directa o indirectamente) y cómo este “vecindario” se ve afectado, enfocándose primordialmente en los miRs y TFs que están potencialmente implicados en este interactoma (Figura 6).

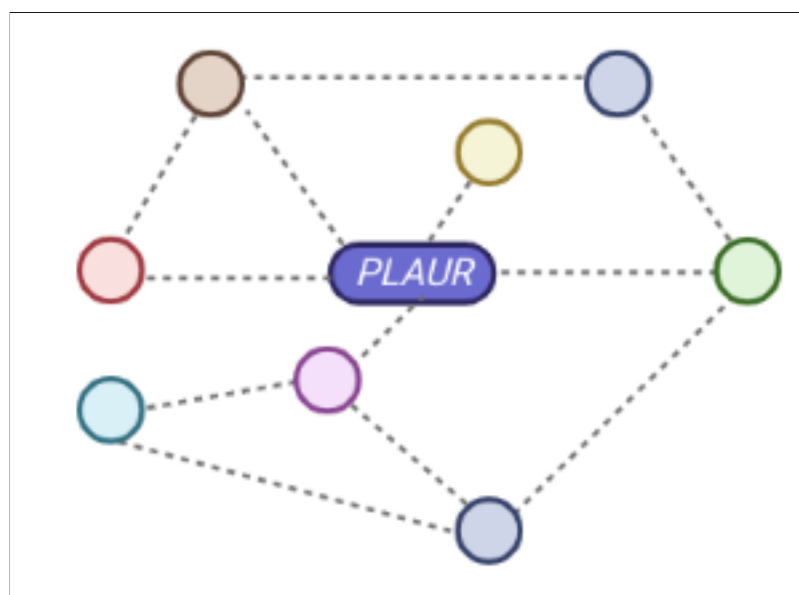


Figura 6. Ejemplo simbólico de una red de especies (nodos) y sus interacciones (arcos) que incluyen al gen *PLAUR*, la cual sería una representación topológica de un modelo matemático. Imagen adaptada de “Icon Pack - Network”, por BioRender.com (2023) y obtenida de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Finalmente, tal como explican Bracken, Scott y Goodall [62], los enfoques computacionales pueden revelar no solo las vías del cáncer controladas por miRs individualmente, sino también redes reguladoras entrelazadas controladas por múltiples miRs, los cuales usualmente participan en interacciones de retroalimentación recíproca con los objetivos (‘targets’) que regulan. En el marco del presente proyecto se busca definir, analizar, simular y validar, al menos conceptualmente, las redes reguladoras de *PLAUR*, haciendo uso de herramientas computacionales y datos experimentales disponibles en bases de datos generados a partir de sistemas de cultivo *in vitro*, así como de perfiles moleculares de pacientes humanos.

Ha habido varios intentos, *in vitro* e *in vivo*, para encontrar moléculas que regulan la expresión de uPA (el ligando de uPAR), principalmente a nivel de TFs [29, 102]; sin embargo, hasta donde sabemos a partir de la búsqueda exhaustiva en la literatura, no hay ningún intento documentado de encontrar otras especies, tal como miRs o TFs, mediante estrategias *in silico* como la que se plantea en este proyecto. Los resultados obtenidos a partir de este proyecto (*in silico*) servirían de base para una eventual validación experimental, haciendo uso de estrategias *in vitro*, en un segundo proyecto. Esta secuencia lógica de pasos vendría a demostrar que la biología de sistemas y las herramientas bioinformáticas pueden ayudar a resolver problemas de índole biológico. De hecho, esto es precisamente ilustrado en la publicación reciente de un grupo de la UCR, liderado por el Dr. Rodrigo Mora, quien es lector en esta tesis [97].

## **2.2. Hipótesis**

Existen uno o varios microARNs y factores de transcripción que controlan la expresión del gen *PLAUR*, directa o indirectamente en cáncer, los cuales pueden ser distintos dependiendo del tipo de cáncer o de características moleculares específicas, y que podrían servir como dianas terapéuticas.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Identificar *in silico* microARNs y factores de transcripción potencialmente implicados en la regulación de la expresión del gen *PLAUR*, como una posible estrategia de disminución de la expresión de la proteína uPAR en cáncer.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Crear una topología general de las interacciones de *PLAUR* con factores de transcripción y microARNs que participan directa o indirectamente en la regulación de *PLAUR*, para visualizar la interacción de las diferentes especies y su posible influencia sobre la expresión de *PLAUR*.
2. Identificar perfiles de expresión de los genes implicados en la topología de interacciones del gen *PLAUR*, para caracterizar la heterogeneidad tumoral en cuanto a la regulación de este gen.
3. Construir y optimizar el o los modelos matemáticos de regulación de *PLAUR* en diversos subgrupos tumorales por medio de técnicas bioinformáticas, para la generación de simulaciones que ayuden a inferir, por medio de análisis de datos, los posibles microARNs y factores de transcripción que influyen en la regulación de la expresión de *PLAUR*.
4. Realizar análisis de sensibilidad y control metabólico en los modelos alternativos de regulación de *PLAUR* para identificar sus circuitos principales de regulación génica y encontrar el efecto de los microARNs y factores de transcripción identificados para evaluar el potencial terapéutico de estos.

5. Validar *in silico* si los microARNs y factores de transcripción candidatos verdaderamente regulan la expresión de *PLAUR* de acuerdo con lo predicho en los modelos matemáticos construidos y optimizados.

## 4. Metodología

### 4.1. Estrategia metodológica

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura de factores de transcripción y citoquinas que a nivel experimental han mostrado tener influencia sobre la expresión de *PLAUR*, con lo cual se obtuvo una lista inicial de genes. Con la lista obtenida y dos plataformas biocomputacionales para la construcción automatizada de modelos matemáticos de redes de factores de transcripción y microARNs a gran escala [97, 103], se generaron varios modelos de interacciones, los cuales se analizaron por medio del programa COPASI<sup>1</sup> [104]. Haciendo uso de este último, se realizaron varios procesos de ajuste de los modelos, es decir, procesos para encontrar los valores óptimos de sus especies utilizando como base un conjunto de datos experimentales; para esto, se usó la estrategia de Estimación de Parámetros.

Cuando se llegó a un modelo estadísticamente ajustado, se generaron simulaciones (de escaneo de parámetros, de Estado Estable y de Curso de Tiempo) para conocer los posibles efectos de las especies (de miRs y TFs) sobre la expresión de *PLAUR*. Las diferentes opciones ofrecidas por COPASI para el análisis del modelo incluye un conjunto de datos de salida para cada tipo de tarea o técnica (como Análisis de Sensibilidad y Análisis de Control Metabólico) que fueron interpretados mediante rutinas programadas tanto para continuar con el ajuste del modelo como para la toma de decisiones que involucraron incluso su reducción o minimización mediante, por ejemplo, la eliminación de especies que no parecían tener influencia importante sobre *PLAUR* (ver Figura 7). Así mismo, se elaboró un sitio web<sup>2</sup>, el cual aún se encuentra en línea y resume los pasos (iteraciones) con las estrategias seguidas para cumplir con los objetivos, así como gráficos interactivos que permiten conocer y analizar los resultados obtenidos de una manera más amigable (ver Figura 8).

---

<sup>1</sup><https://copasi.org>

<sup>2</sup><https://www.larmcr.com>

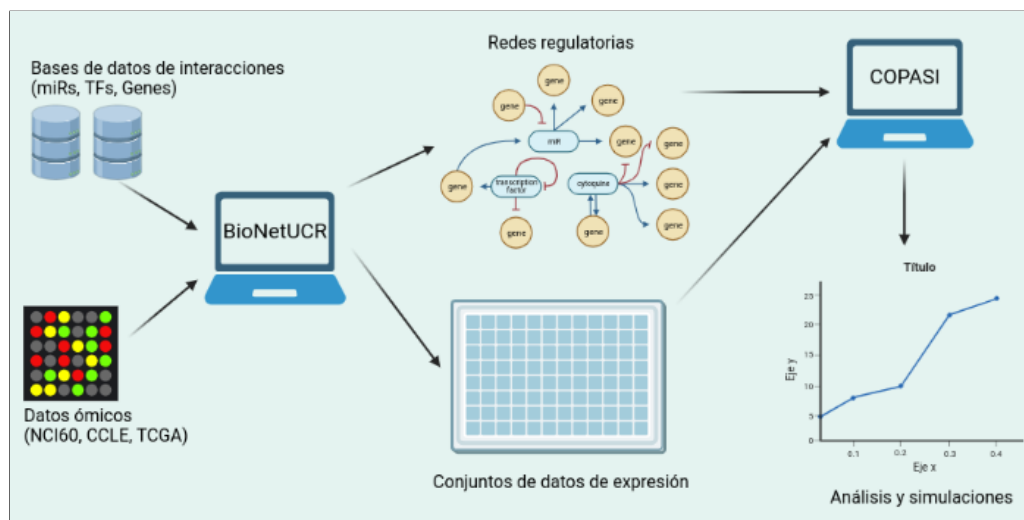


Figura 7. Esquema resumen del uso de las plataformas generadoras de modelos y el programa COPASI. Estas plataformas generadoras reciben un ‘set’ de datos de interacciones y otro de datos ómicos (‘input’), para producir un modelo matemático con su respectiva topología (‘output’), el cual es posible cargar en el software COPASI para ejecutar los correspondientes análisis y simulaciones. Imagen creada con BioRender.com.

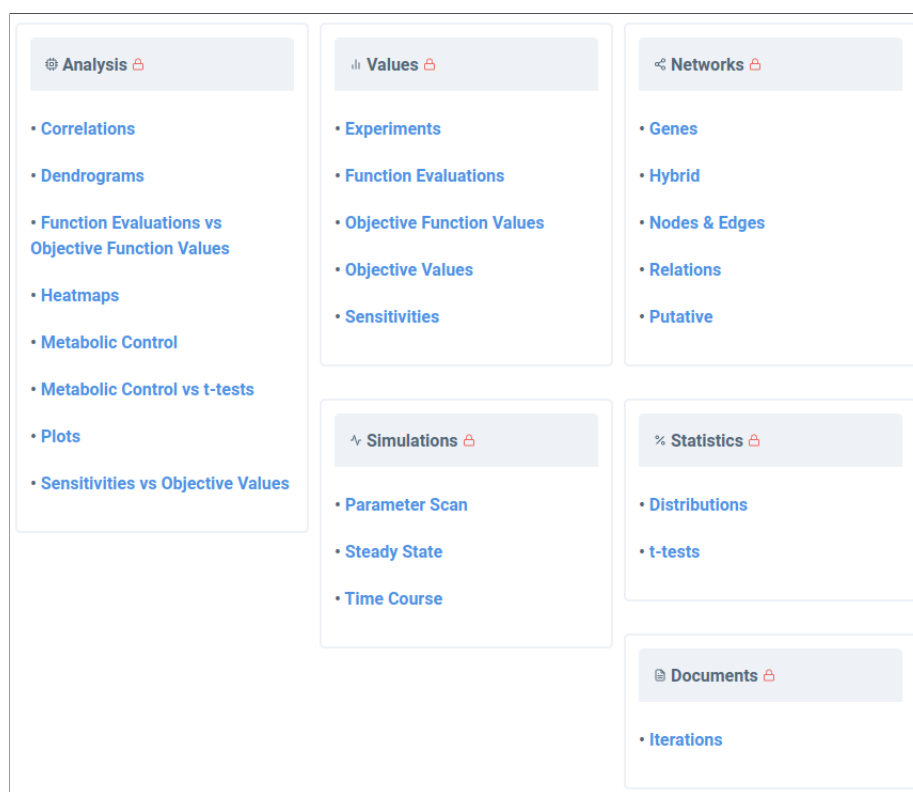


Figura 8. Menú y submenús de la página web donde se hallan los gráficos interactivos. En esta, es posible visualizar de forma interactiva varios de los procedimientos y resultados de cada iteración.

## 4.2. Plataformas generadoras de modelos

Tal como se indicó, para la creación (generación) de los modelos matemáticos se usaron dos plataformas, las cuales permiten construir automáticamente modelos matemáticos a gran escala para estudios sobre compensación de dosis génica. Estas plataformas utilizan bases de datos de interacciones, tienen por entrada una lista de genes y un conjunto de datos experimentales (como pueden ser las de NCI60 o CCLE -que se detallarán más adelante-, por ejemplo, debidamente curadas y formateadas), y por salida lo necesario para que el modelo pueda ser utilizado por el programa COPASI, es decir: un archivo tipo XML<sup>3</sup> cuyo formato corresponde a un proyecto de COPASI para ejecución de tareas, así como un archivo de experimentos con los valores de cada especie para cada línea.

### Primera plataforma generadora de modelos

Esta plataforma permitía utilizar interacciones tanto validadas como putativas para la generación de los modelos. Así mismo, además de los archivos generados para utilizar con COPASI, generaba un archivo de texto con las interacciones de las especies seleccionadas, lo que permitía -por ejemplo- fácilmente visualizar la topología generada en programas tales como Circos<sup>4</sup>.

### Segunda plataforma generadora de modelos

Denominada **BioNetUCR**, constituye una evolución de la primera plataforma. Se distingue de la primera plataforma -entre otras razones- porque en vez de un archivo de texto que contiene las interacciones de las especies seleccionadas, utiliza el programa Cytoscape<sup>5</sup>, lo que permite utilizar este programa con todas sus capacidades, tal como mostrar y manipular visualmente la red generada.

---

<sup>3</sup><https://www.w3.org/XML>

<sup>4</sup><https://circos.ca>

<sup>5</sup><https://cytoscape.org>

### 4.3. Flujo (‘pipeline’) de trabajo e iteraciones

Con el fin de obtener posibles miRs o TFs candidatos con probable regulación sobre *PLAUR*, se utilizó un ‘pipeline’ que se divide en estas secciones:

1. Generación de un modelo: a partir del uso de las plataformas generadores de modelos, este paso contempla un archivo específico para el programa COPASI (que permite ejecutar varias tareas sobre el mismo), un conjunto de datos experimentales enlazados a las especies del archivo anterior, así como la representación de las interacciones entre las especies. Para efectos prácticos, en adelante este será referenciado como “modelo generado”, debido a que es un modelo completamente creado a partir de los parámetros que reciben dichas plataformas.
2. Ajuste del modelo: esto se logra con la ejecución de la tarea de COPASI denominada Estimación de Parámetros<sup>6</sup>, la cual es un caso especial de un problema de optimización, en el que se intenta encontrar valores para un conjunto de parámetros del modelo que minimicen la distancia entre el comportamiento del modelo (resultados de la simulación) y los datos [105]. Cuando la ejecución de esta tarea finaliza, los valores de las especies son actualizadas en el archivo para COPASI (además de sus parámetros), generando un archivo de texto con un resultado detallado, que incluye los diferentes valores, los argumentos de entrada y los valores finales calculados. De aquí en adelante, este modelo se le llamará “ajustado”, aunque no necesariamente este ajuste esté correcto (como se explica en el siguiente paso).
3. Análisis del modelo ajustado: a partir de los resultados obtenidos en el paso anterior, se ejecutan una serie de tareas propias de COPASI (ver Sahle, Gauges, Pahle et al. [105] y Hoops, Gauges, Lee et al. [104]), así como otros análisis para asegurarse que dicho ajuste es estadísticamente correcto. Así, se ejecutan varios de los siguientes análisis:
  - a) Valor de la función objetivo: valor mínimo o máximo de una función. En este caso, este valor debería ser lo más pequeño posible.

---

<sup>6</sup>[https://copasi.org/Support/User\\_Manual/Tasks/Parameter\\_Estimation](https://copasi.org/Support/User_Manual/Tasks/Parameter_Estimation)

- b) Valores de las especies y sus parámetros (“k”). Los parámetros son constantes cinéticas, concentraciones iniciales, etc., cuyos valores no se conocen exactamente y se ajustan para minimizar la función objetivo. Estos “k” están usualmente mostrados en el modelo como “ks” (representando un parámetro de “síntesis de”) o “kd” (que sería “degradador de”).
- c) ‘t-tests’: pruebas estadísticas pareadas para comprobar si los valores experimentales comparados con los ajustados (calculados) son probabilísticamente significativos.
- d) Sensibilidad<sup>7</sup> y Control Metabólico<sup>8</sup>: tareas de COPASI para conocer el “nivel de influencia” de una especie sobre otra en una escala de  $-1$  a  $1$  ( $[-1, 1]$ ), donde los valores cercanos al cero indican poca o nula influencia, mientras que los valores más cercanos a los extremos indican alta influencia; además, los valores negativos indican represión y, por lo tanto, los positivos significan activación. El Análisis de Sensibilidad describe cuánto cambia un parámetro específico el comportamiento del modelo, mientras que el Análisis de Control Metabólico permite cuantificar cuánto afectan las velocidades de las diversas reacciones de una red a las concentraciones y los flujos en el Estado Estable. En ambos casos siempre será basado en la influencia sobre *PLAUR*.
- e) Simulaciones de Estado Estable<sup>9</sup>, de Curso de Tiempo<sup>10</sup> y de Escaneo de Parámetros<sup>11</sup>: un Estado Estable es una condición en la que las concentraciones de las especies químicas no cambian (si el estado estacionario es tal que los flujos también son cero, entonces el sistema está en equilibrio químico; de lo contrario, los flujos son finitos, lo que significa que las concentraciones no cambian porque las tasas de síntesis se equilibran con las tasas de degradación para cada especie química). El Escaneo de Parámetros permite especificar una serie de cambios jerárquicos en los parámetros del modelo. Estas tareas de COPASI permiten conocer los posibles

---

<sup>7</sup>[https://copasi.org/Support/User\\_Manual/Tasks/Sensitivity\\_Analysis](https://copasi.org/Support/User_Manual/Tasks/Sensitivity_Analysis)

<sup>8</sup>[https://copasi.org/Support/User\\_Manual/Methods/Metabolic\\_Control\\_Analysis](https://copasi.org/Support/User_Manual/Methods/Metabolic_Control_Analysis)

<sup>9</sup>[https://copasi.org/Support/User\\_Manual/Tasks/Steady-State\\_Analysis](https://copasi.org/Support/User_Manual/Tasks/Steady-State_Analysis)

<sup>10</sup>[https://copasi.org/Support/User\\_Manual/Tasks/Time\\_Course\\_Simulation](https://copasi.org/Support/User_Manual/Tasks/Time_Course_Simulation)

<sup>11</sup>[https://copasi.org/Support/User\\_Manual/Tasks/Parameter\\_Scan](https://copasi.org/Support/User_Manual/Tasks/Parameter_Scan)

valores de las especies a partir de perturbaciones manuales, como por ejemplo aumento o disminución de número de copias.

f) Clústeres, gráficos, más análisis, y curaciones de los datos de entrada y salida podrían ser necesarios.

4. Siguiendo pasos: basado en los resultados del análisis (paso anterior) se toman decisiones de un cambio de estrategia (como agregar o quitar especies del modelo, utilizar otro algoritmo de ajuste, cambiar argumentos iniciales como pesos, entre otros) y se empieza de nuevo por el primer paso en caso de que la información resultante del análisis no sea satisfactoria (por ejemplo, los ‘t-tests’ no son estadísticamente significativos). En resumen, un modelo bien ajustado y con especies candidatas que influyen de forma importante sobre la expresión de *PLAUR*, debería cumplir con lo siguiente:

- a) Valor Objetivo bajo.
- b) Valor de significancia del ‘t-test’ del 95 %: valor p (‘p-value’)  $> 0.05$ .
- c) Sensibilidad o Control Metabólico con valores absolutos altos de especies candidatas sobre *PLAUR*.
- d) Simulaciones que muestren una disminución significativa de *PLAUR* a partir de las perturbaciones manuales sobre las especies candidatas.

Teniendo claro lo que implica el flujo de trabajo del proyecto, una iteración constituye de -al menos- uno de los pasos (o “subpasos”) anteriores; esto es, las iteraciones constituyen la bitácora de los valores de entrada de las tareas y sus salidas para cada paso.

#### 4.4. Bases de datos utilizadas para los ajustes y las validaciones

- NCI60 (‘National Cancer Institute 60’)<sup>12</sup>: panel de líneas celulares de cáncer humano que contiene 60 líneas de nueve tipos de tejido diferentes: sanguíneo, pulmón, colon,

<sup>12</sup>[https://ntp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60](https://ntp.cancer.gov/discovery_development/nci-60)

sistema nervioso central, melanoma, ovario, renal, próstata y mama. Este panel ofrece un modelo *in vitro* de primer nivel para ampliar la comprensión de la biología del cáncer y desde el año 1990 ha sido utilizado por la comunidad científica investigadora del cáncer para encontrar compuestos con actividad anticancerígena potencial [106-108]. En el presente proyecto, este panel fue el que se utilizó de forma inicial para encontrar un modelo mínimo (simplificado) y correctamente ajustado que, a la hora de simular las perturbaciones, la expresión de *PLAUR* disminuyera notablemente.

- CCLE ('Cancer Cell Line Encyclopedia')<sup>13</sup>: recopilación de datos de expresión génica, número de copias del gen y secuenciación paralela masiva de alrededor de mil líneas celulares de cáncer humano, al que luego se le agregaron perfiles de histonas, de secuenciación de ARN, de metilación de ADN, de metabolitos y de miRs, así como la secuenciación del genoma completo, datos de sensibilidad asociados a fármacos, y actualmente también incluye la cuantificación de proteínas específicas [109, 110]. En este proyecto, estos datos se utilizaron para validar el modelo mínimo y sus perturbaciones, con el objetivo de observar si son similares a lo hallado cuando se utilizó el panel NCI60.
- TCGA ('The Cancer Genome Atlas')<sup>14</sup>: base de datos que ha recopilado información de anotaciones clinicopatológicas junto con perfiles moleculares de más de once mil tumores humanos en treinta y tres tipos de cáncer diferentes. El TCGA es uno de los conjuntos de datos biológicos más amplios, profundos y caracterizados de forma integral, que por la cantidad y calidad de datos moleculares ha dado como resultado estudios que han avanzado significativamente en la comprensión de la biología del cáncer [111, 112]. Específicamente en el proyecto, estos datos se utilizaron para establecer la potencial correlación entre lo obtenido por los modelos generados y las perturbaciones simuladas, con la supervivencia de los pacientes con ciertos tipos de cáncer. Más concretamente, el uso del TCGA tuvo como fin el comprobar que las especies candidatas (con notable influencia sobre el gen *PLAUR*) coincidían con lo observado en las simulaciones; es

---

<sup>13</sup><https://sites.broadinstitute.org/ccle>

<sup>14</sup><https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>

decir, si la sobrevida de los pacientes se veía influenciada por la expresión de esos candidatos y *PLAUR*, de la siguiente forma:

- Menor sobrevida:
  - *PLAUR* alto.
  - Especies candidatas que amplifican la expresión de *PLAUR* altas.
  - Especies candidatas que disminuyen la expresión de *PLAUR* bajas.
- Mayor sobrevida:
  - *PLAUR* bajo.
  - Especies candidatas que amplifican la expresión de *PLAUR* bajas.
  - Especies candidatas que disminuyen la expresión de *PLAUR* altas.

## 5. Resultados

### 5.1. Existen interacciones reportadas con potencial de regular la expresión de *PLAUR*

Según la búsqueda bibliográfica (ver sección 4.1 de Metodología en página 26), se identificó un conjunto de factores de transcripción y citoquinas que tienen influencia sobre *PLAUR*. Los Cuadros 3 y 4 muestran las características de estos, mientras la Figura 9 esquematiza gráficamente las unidades y subunidades.

Cuadro 3. Lista de factores de transcripción y sus genes según sus subunidades que fueron considerados al inicio del presente estudio.

<b>Complejo Factor de Transcripción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Subunidades o genes codificantes</b>
AP-1	Interviene en la regulación génica en respuesta a una plétora de estímulos fisiológicos y patológicos, incluidas citoquinas, factores de crecimiento, señales de estrés, infecciones bacterianas y víricas, así como estímulos oncogénicos; también se asocia a una variedad de eventos celulares involucrados en el desarrollo normal o la transformación neoplásica que causa cáncer [113]	JUN, JUNB, JUND, FOS, FOSB

Cuadro 3. Lista de factores de transcripción y sus genes según sus subunidades que fueron considerados al inicio del presente estudio (continuación).

<b>Complejo Factor de Transcripción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Subunidades o genes codificantes</b>
AP-2	Se considera que tiene funciones reguladoras en el control de la apoptosis, el ciclo celular y la expresión génica, por lo que se asocia al crecimiento celular, la diferenciación y la muerte programada [114]	TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, TFAP2D, TFAP2E
HIF1 $\alpha$	Subunidad reguladora del factor de transcripción heterodimérico HIF1 que desempeña un papel clave en la respuesta celular a la baja tensión de oxígeno [115]	HIF1A
NF- $\kappa$ B	Complejo multiproteico especializado para inducir rápidamente la síntesis de proteínas de defensa y señalización tras la exposición de las células a una amplia variedad de agentes, en su mayoría patógenos [116]	NFKB1, NFKB2, RELA
SP1	Regula la expresión de una serie de genes que participan en múltiples aspectos de la tumorigénesis, como la angiogénesis, el crecimiento celular y la resistencia a la apoptosis [117]	SP1

Cuadro 4. Lista de citoquinas y sus genes según sus subunidades.

<b>Citoquina</b>	<b>Descripción</b>	<b>Subunidades o genes codificantes</b>
FGF	Tienen diversas funciones en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, mientras que en el organismo adulto son factores homeostáticos funcionando también en la reparación de tejidos y en la respuesta a una lesión, así como que -un subconjunto de esta familia- es importante para la transducción de señales neuronales en los sistemas nerviosos central y periférico; sin embargo, cuando se expresan de manera inapropiada, pueden contribuir a la patogénesis del cáncer [118]	FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23
IL-1 $\beta$	Participa en la regulación de las respuestas inmunitarias, reacciones inflamatorias y hematopoyesis [119]	IL1B
MIC-1	Se sugiere que puede ser un regulador autocrino de la activación de macrófagos [120]	GDF15
TNF $\alpha$	Tiene un amplio espectro de propiedades proinflamatorias, que incluyen -entre otras- la producción de una amplia gama de citoquinas y quimioquinas inflamatorias, la activación de macrófagos y la regulación de proteínas de supervivencia [121]	TNF

Cuadro 4. Lista de citoquinas y sus genes según sus subunidades (continuación).

<b>Citoquina</b>	<b>Descripción</b>	<b>Subunidades o genes codificantes</b>
TNF $\beta$	Tiene un papel crucial en la respuesta inmunoinflamatoria, la defensa del huésped y el desarrollo del sistema inmunitario; así mismo, se sugiere que está estrechamente relacionada con enfermedades inmunoinflamatorias [122]	LTA

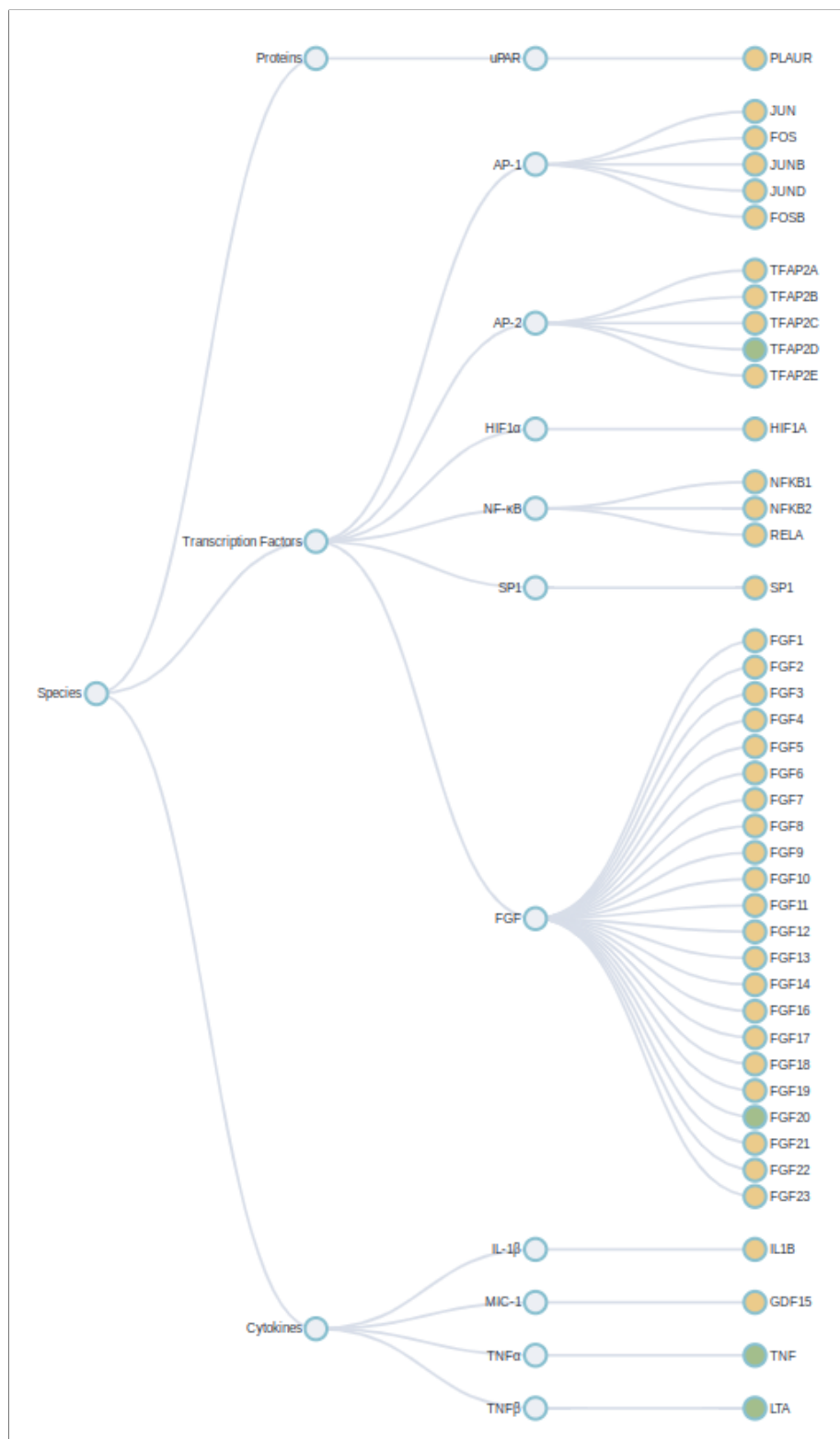


Figura 9. Diagrama jerárquico de unidades y subunidades de las especies originalmente contempladas en esta tesis a partir de la búsqueda bibliográfica, las cuales sirvieron como información de entrada para las plataformas generadoras de modelos.

## 5.2. Varios TFs y miRs podría interactuar con *PLAUR* y otros genes relacionados

En este trabajo se encontró una red compleja de factores de transcripción, genes y micro-ARNs que interactúan entre ellos, según las diferentes bases de datos de interacciones que se utilizan en la primera plataforma generadora de modelos [103] (ver sección 4.2 de Metodología en página 28). En adelante, a este primer modelo generado (ver punto 1 en sección 4.3 de Metodología en página 29) se denominará “modelo original”, el cual contiene 38 genes objetivo (incluyendo *PLAUR*), 82 TFs y 16 miRs. La Figura 10 es una representación de las relaciones (999) entre las diferentes especies (136) que tendrían influencia sobre la expresión de *PLAUR*.

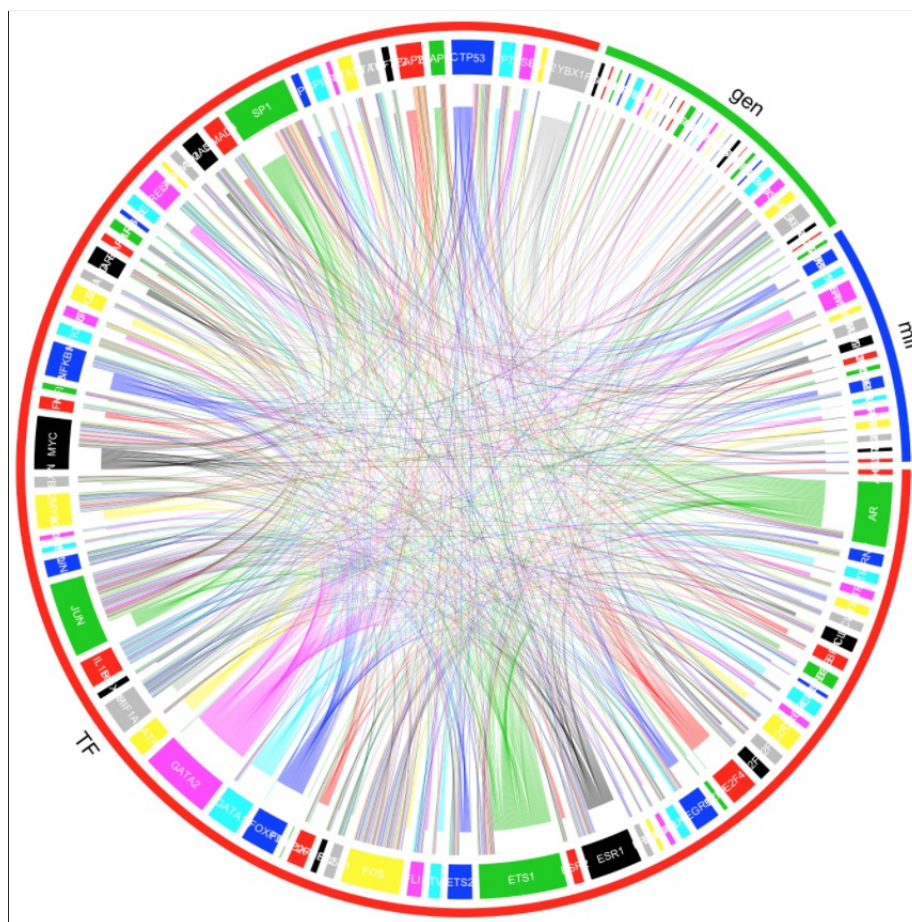


Figura 10. Interacciones entre TFs ( $n = 82$ ), genes/ARNs ( $n = 38$ ) y miRs ( $n = 16$ ) que tendrían influencia directa o indirectamente sobre *PLAUR*, a partir de sus relaciones ( $n = 999$ )

### 5.3. Modelo original ajustado no muestra control de las especies sobre *PLAUR*

Tal como se explicó en el capítulo de Metodología, utilizando la aplicación COPASI se procedió con el Ajuste del modelo original (ver punto 2 en sección 4.3 de Metodología en página 29) utilizando los datos del NCI60 (ver sección 4.4 de Metodología en página 31), y se realizaron los diferentes Análisis y Simulaciones (ver punto 3 en sección 4.3 de Metodología en página 29). En la Figura 11 se muestran los Valores de la Función Objetivo para las primeras 8 iteraciones (ver Cuadro y Figuras de los Anexos en página 97): en esta figura, se puede evidenciar que no existe una diferencia notable entre estos valores objetivo, a pesar de que en cada iteración se aplicaron varias estrategias de ajuste.

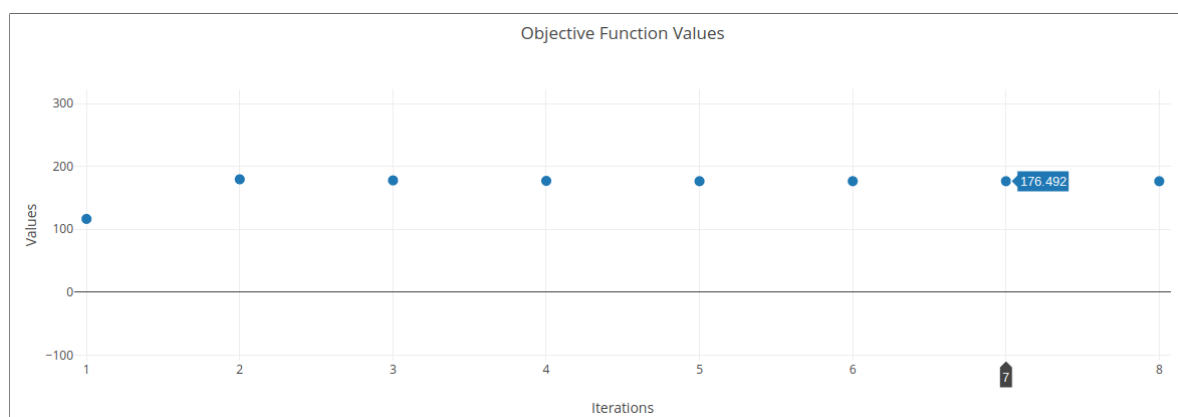


Figura 11. Valores de la Función Objetivo (eje Y) para las primeras ocho iteraciones (eje X), las cuales no muestran una diferencia importante entre ellas.

Se destacó el valor de la iteración 7 para ejemplificar los resultados del mismo debido a que son similares con las restantes iteraciones en cuanto a resultados. Así, en la Figura 12 se puede observar que, según el análisis estadístico de ‘t-test’ (ver punto 3c en sección 4.3 de Metodología en página 30), la mayoría de sus especies están matemáticamente bien ajustadas (excepto FGF3 y FGF4, los cuales se encuentran debajo del “límite” de 0.05 de los valores p).

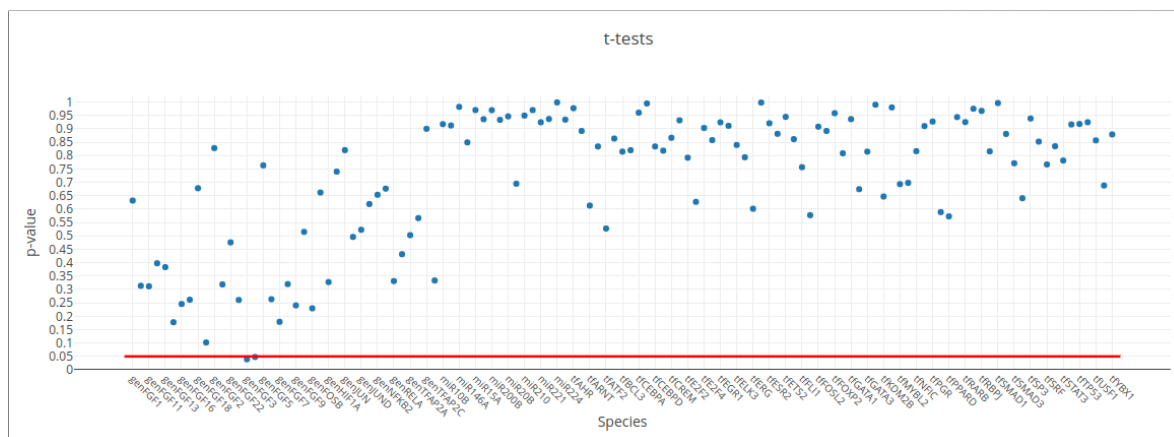


Figura 12. Valores p del ‘t-test’ de la iteración 7 (eje Y) que muestran un ajuste matemáticamente ideal para la mayoría de las especies (eje X), debido a que sus valores están por encima de la línea roja que representa el valor p de 0.05.

A pesar de los buenos resultados del Valor de la Función Objetivo y los Valores Objetivos de cada especie, además de los prometedores resultados del ‘t-test’ de la iteración 7, al efectuar el Análisis de Sensibilidad (ver punto 3d en sección 4.3 de Metodología en página 30), sus valores indican poca o casi nula influencia de las diferentes especies sobre *PLAUR* (Figura 13) debido a que muestra valores muy cercanos al cero.

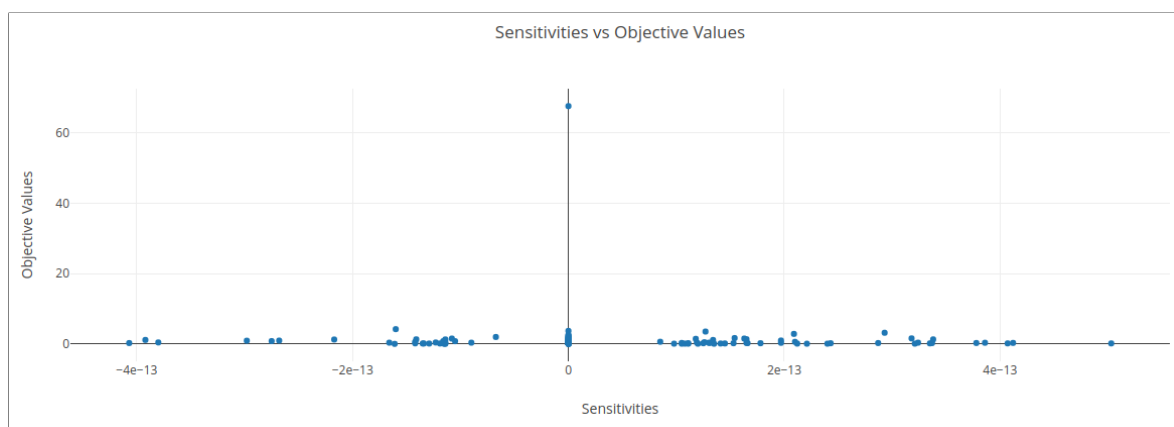


Figura 13. Valores del Análisis de Sensibilidad (eje X) con los Valores Objetivos por especie (eje Y) de la iteración 7. A pesar de tener Valores Objetivos bajos (la gran mayoría por debajo de 5), sus influencias sobre *PLAUR* son insignificantes, con valores cercanos al cero.

Finalmente, después de las diez iteraciones con el modelo original, se llegó a la conclusión de que ningún miR o TF parecía influir de forma importante en la regulación de *PLAUR*, por lo que se procedió a utilizar un nuevo modelo que incluyera interacciones putativas o

predichas a nivel bioinformático sin una validación experimental (modelo putativo).

#### **5.4. Existen otras interacciones directas con *PLAUR* según las bases de datos putativas con potencial de regular su expresión**

La utilización de un modelo putativo completo no es factible computacionalmente debido a la gran cantidad de especies y sus relaciones. Por esa razón, primeramente se procedió a hacer una simplificación de dicho modelo (denominado “putativo” a partir de este punto), lo que consistía en remover varios nodos (especies) y sus arcos (interacciones). Dicha simplificación implicó enfocarse en los miRs proveídos en el modelo putativo, para agregarlos al modelo original (al no putativo, de los pasos anteriores), hallar sus interacciones y reguladores, para descartar aquellos que no parecían participar activamente. A la vez, debido a que es una estructura computacional de árbol (con ramas y subramas), se debió analizar cada nivel (hijos, padres, abuelos, bisabuelos, etc.) y, de ser necesario, reducir esta estructura hasta cierto nivel para obtener un modelo manejable.

Al final, este abordaje no fue completamente ejecutado; sin embargo, se decidió utilizar un planteamiento similar: en vez de incorporar las especies en el modelo original, se fueron presentando candidatos e incorporando al modelo putativo simplificado los elementos según su nivel (hijos, padres, abuelos, bisabuelos, etc. del árbol de especies) para continuar con el ciclo de Ajuste, Análisis y Simulaciones, con el objetivo de seguir agregando niveles.

Así, al simplificar el modelo putativo a la versión más pequeña con solamente aquellos elementos que modifican directamente a *PLAUR* (Figura 14) y que podrían tener también relación entre ellos, se obtuvo un modelo “híbrido” (que incluye interacciones validadas y no validadas) cuyo esquema es presentado en la Figura 15 y consiste de 25 especies y sus 276 interacciones.

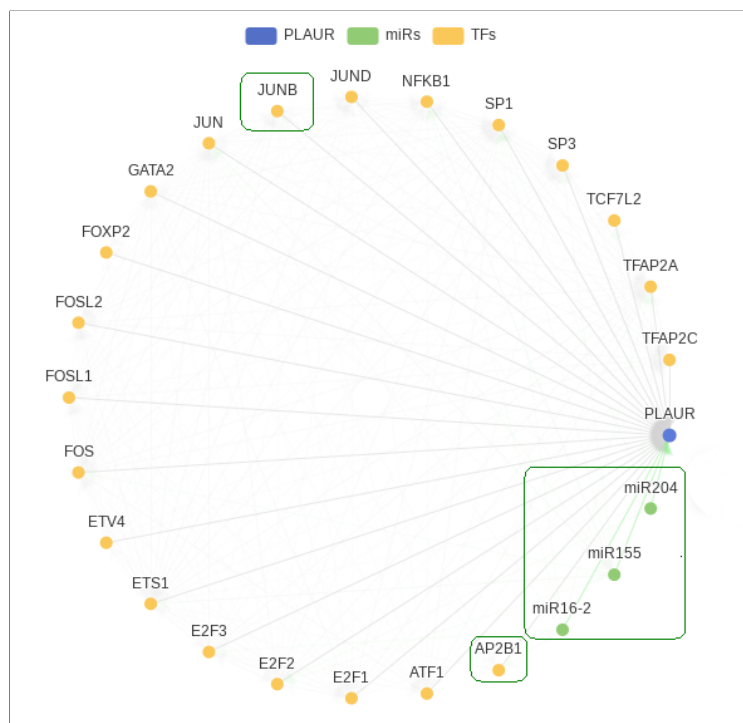


Figura 14. Especies que modifican directamente la expresión de *PLAUR*. Los encerrados en semicua-drados son especies cuya interacción directa con *PLAUR* es de tipo putativa.

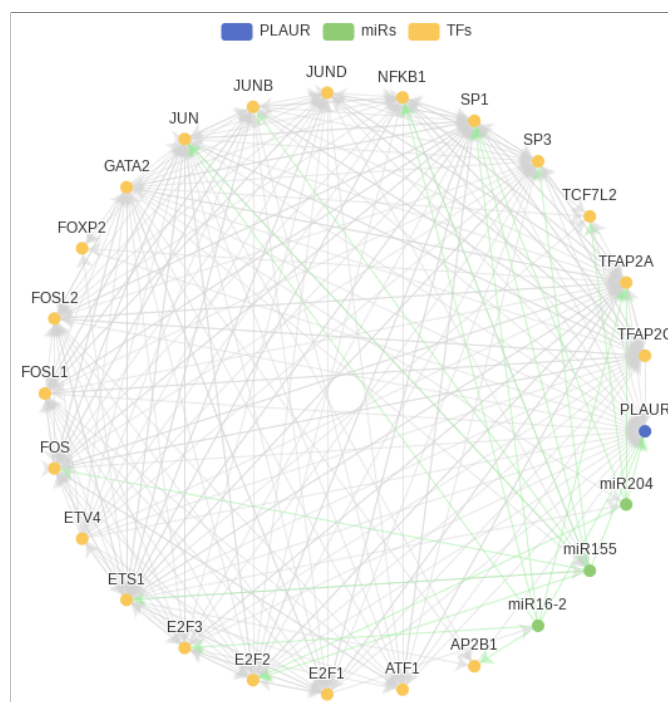


Figura 15. Red de interacciones del modelo híbrido que incluye a *PLAUR*, 3 miRs y 21 TFs, produciendo 276 arcos que representan sus relaciones.

## 5.5. La Estimación de Parámetros del modelo híbrido con datos de NCI60 muestra valores estadísticamente bien ajustados y con potencial de regulación sobre *PLAUR*

Luego de varias iteraciones utilizando el modelo híbrido anterior y los datos de NCI60, se obtuvo el Valor de la Función Objetivo más bajo que se había presentado en el proyecto hasta ese momento (89.5). A esto se le aplicó el análisis estadístico ('t-test') y se determinó que el modelo estaba matemáticamente bien ajustado (Figura 16). Entonces, se procedió a realizar el Análisis de Control Metabólico, con el fin de conocer cuál procedimiento (síntesis o degradación de miRs y TFs, así como transcripción o degradación de ARNs) de cada especie es el que modifica negativamente (disminuye) más a *PLAUR* (Figura 17). Se halló, entonces, tres miRs (miR155, miR16-2 y miR204) y tres TFs (ETV4, AP2B1 y TCF7L2) con el control más importante y con potencial para disminuir la expresión de *PLAUR*.

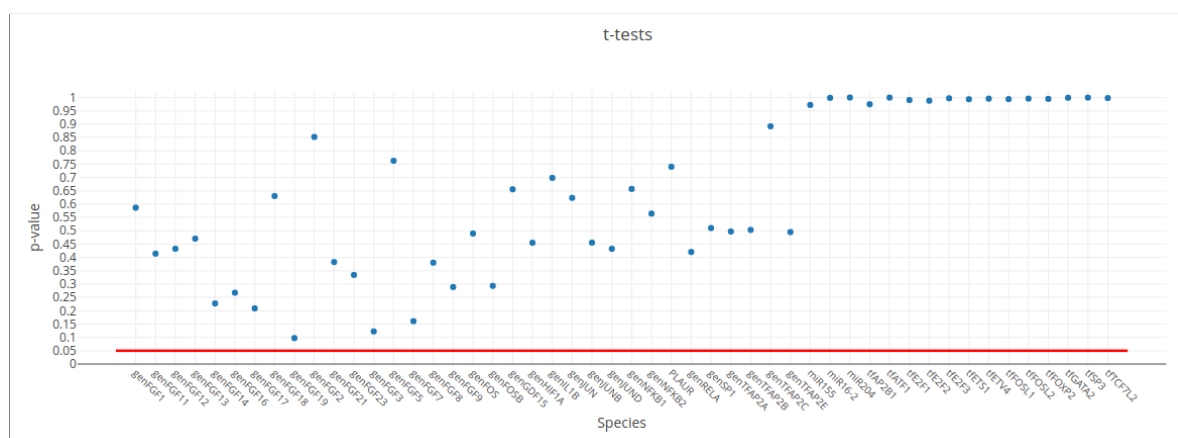


Figura 16. Resultado del análisis estadístico del modelo híbrido simplificado y ajustado donde se puede observar todas las especies (eje X) con un valor p mayor a 0.05 (eje Y), indicando que estarían bien ajustados estadísticamente.

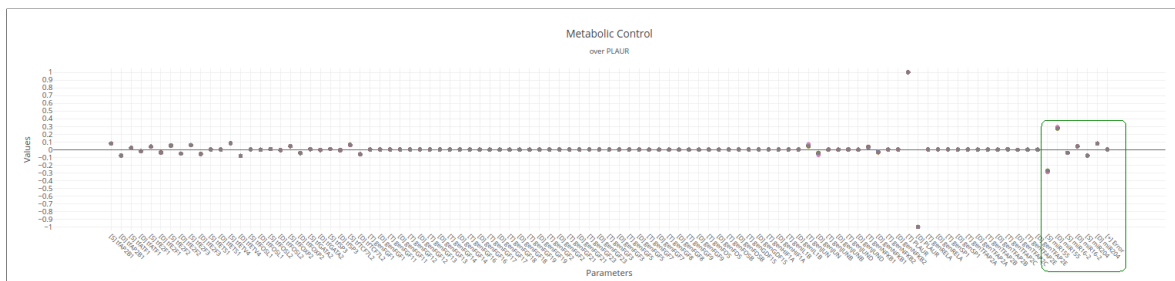


Figura 17. Resultados del Análisis de Control Metabólico sobre *PLAUR* del modelo híbrido simplificado y ajustado. Los señalados con un semicuartado en la parte derecha indican los 6 parámetros, uno por cada especie (3 miRs y 3 TFs).

## 5.6. Al perturbar las constantes de síntesis de los miRs del modelo híbrido se obtiene una reducción en los niveles de expresión de *PLAUR*

Posteriormente, se continuó con la Simulación de Estado Estable para la confirmación de esos tres miRs candidatos, incluyendo también los tres TFs que parecían modificar de forma importante la expresión de *PLAUR*. Debido a que, basado en los resultados de esta simulación, los TFs parecían no influir sustancialmente en la regulación de *PLAUR* (Figura 18, donde los TFs y su casi nula influencia sobre *PLAUR* se resaltan entre cuadros), se descartaron de los gráficos y se dejaron únicamente los 3 miRs (Figura 19, donde -por ejemplo- la expresión de *PLAUR* se reduce desde un valor de casi 7 hasta a cerca de 1 cuando el parámetro “ks” del miR155 aumenta a un poco más allá de 1.5).

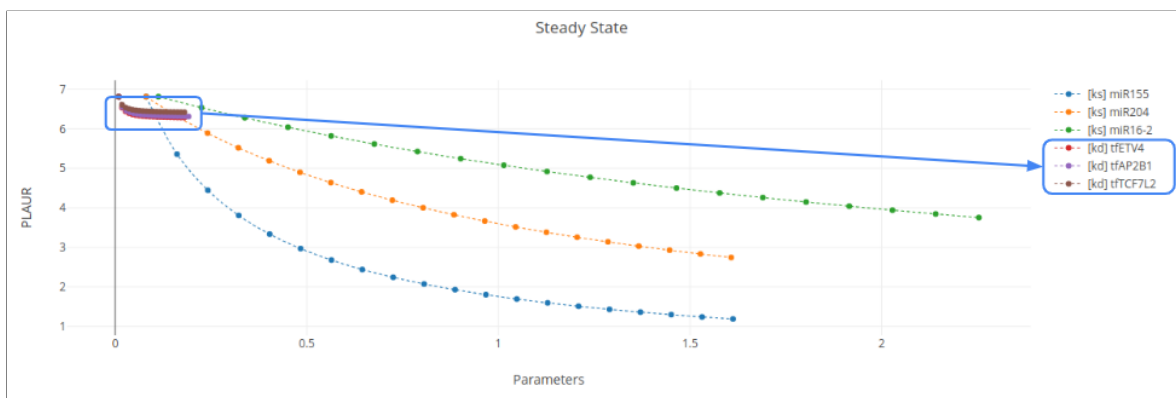


Figura 18. Simulación de Estado Estable que muestra la posible influencia de los 3 miRs y 3 TFs candidatos sobre *PLAUR* en el modelo híbrido. Como se puede observar en la parte superior izquierda, las perturbaciones de los parámetros de los TFs no parecieran influir sustancialmente sobre la expresión de *PLAUR*.

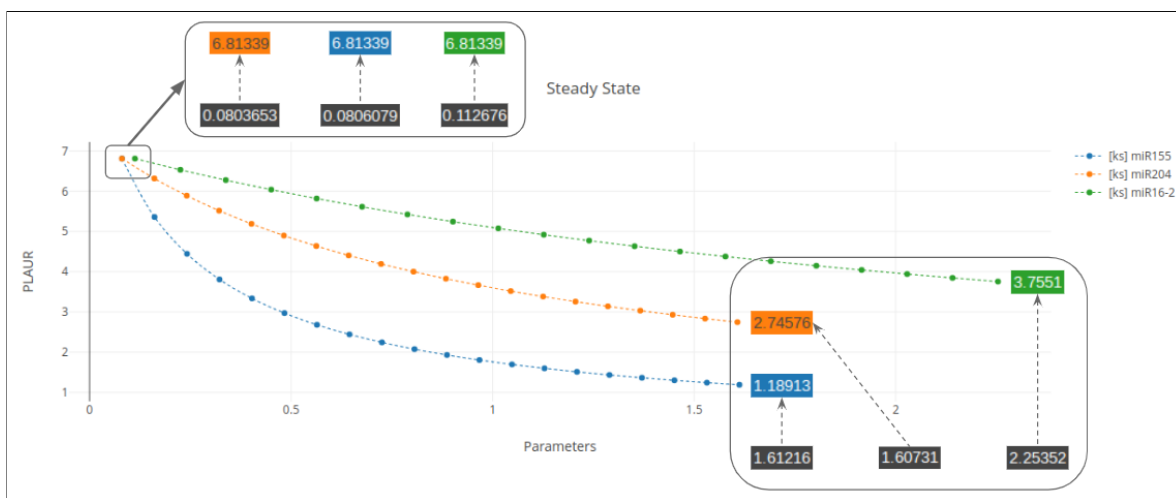


Figura 19. Simulación de Estado Estable que muestra la posible influencia de los 3 miRs candidatos sobre *PLAUR* en el modelo híbrido. Se puede observar tanto los valores iniciales como finales tanto de los parámetros (sobre fondo negro) como de los valores de expresión de *PLAUR* según la perturbación de cada parámetro.

## 5.7. El modelo híbrido no pudo ser ajustado utilizando los datos experimentales de CCLE para tratar de comprobar el control de los miRs sobre *PLAUR*

A pesar de que los resultados anteriores eran satisfactorios, cuando se trataron de confirmar con los datos de CCLE (ver sección 4.4 de Metodología en página 31), no se logró siquiera ajustar el modelo en ese nuevo set de datos. La Figura 20 muestra uno de los resultados al intentar ajustar utilizando todas las líneas experimentales y ejecutar los análisis de ‘t-tests’, donde se puede apreciar que ninguna especie tiene un valor de ajuste estadísticamente significativo. Este desajuste se podría deber a la heterogeneidad de los datos de CCLE, además de la diferencia en la cantidad de datos (NCI60 contiene unas sesenta líneas celulares mientras que CCLE tiene alrededor de mil).

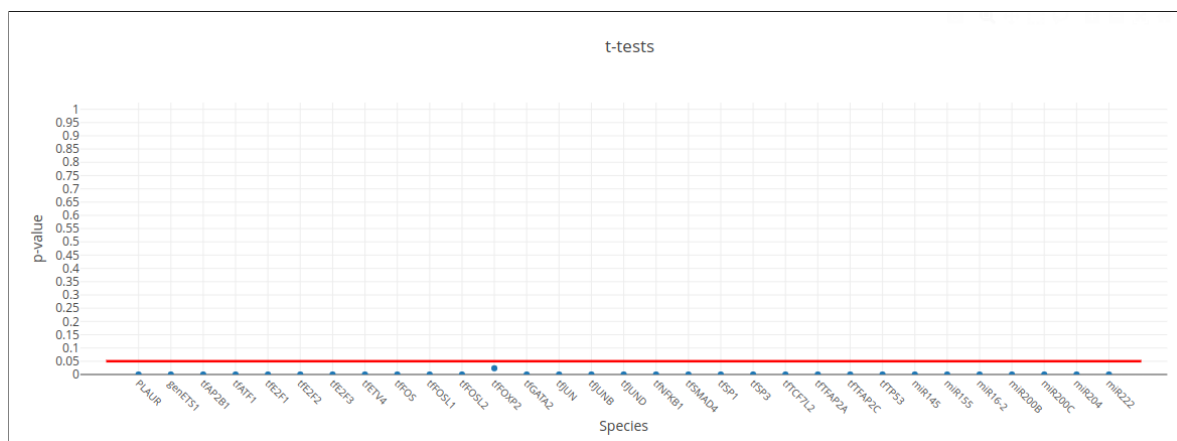


Figura 20. Resultado del análisis estadístico de ‘t-tests’ luego de varias iteraciones utilizando datos de CCLE. Como se puede observar, todos los valores de las especies están por debajo de la línea roja horizontal (0.05), lo que implica que no están bien ajustados.



Por lo tanto, se procedió a tratar de simplificarlo. Como parte de las estrategias utilizadas se removieron especies no ajustadas, se aumentaron los pesos de las mismas y se cambiaron los valores de los límites de sus parámetros.

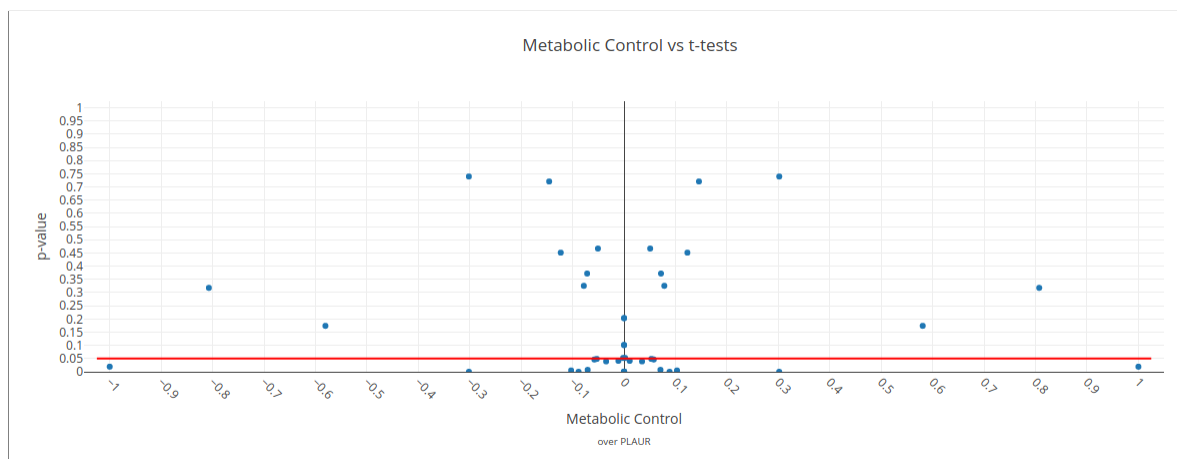


Figura 22. Ejemplo de uno de los análisis de Control Metabólico sobre *PLAUR* (eje X) contra los valores p de 't-test' (eje Y), cuando se trató de ajustar el nuevo modelo con todos los datos de NCI60. Se pueden observar valores tanto por encima como por abajo de la línea roja, indicando desajustes estadísticos de una cantidad considerable de especies; así como valores de Control Metabólico muy cercanos al cero en la mayoría de los casos.

De esta forma, se llegó a un posible modelo mínimo con el cual trabajar y que demostró estar bien ajustado estadísticamente con todos los datos de NCI60. La topología de este modelo simplificado se representa en la Figura 23. Dicho modelo contiene 7 nodos y 8 arcos, de los cuales uno corresponde al gen de *PLAUR*, dos son miRs y cuatro TFs. Además, en la Figura 24 se puede observar no solo que sus parámetros están correctamente ajustados (valores  $p > 0.05$ ), sino que varios de estos podrían influir sobre la expresión de *PLAUR*, con base en lo mostrado por el Análisis de Control Metabólico (ver punto 4 en sección 4.3 de Metodología en página 31).

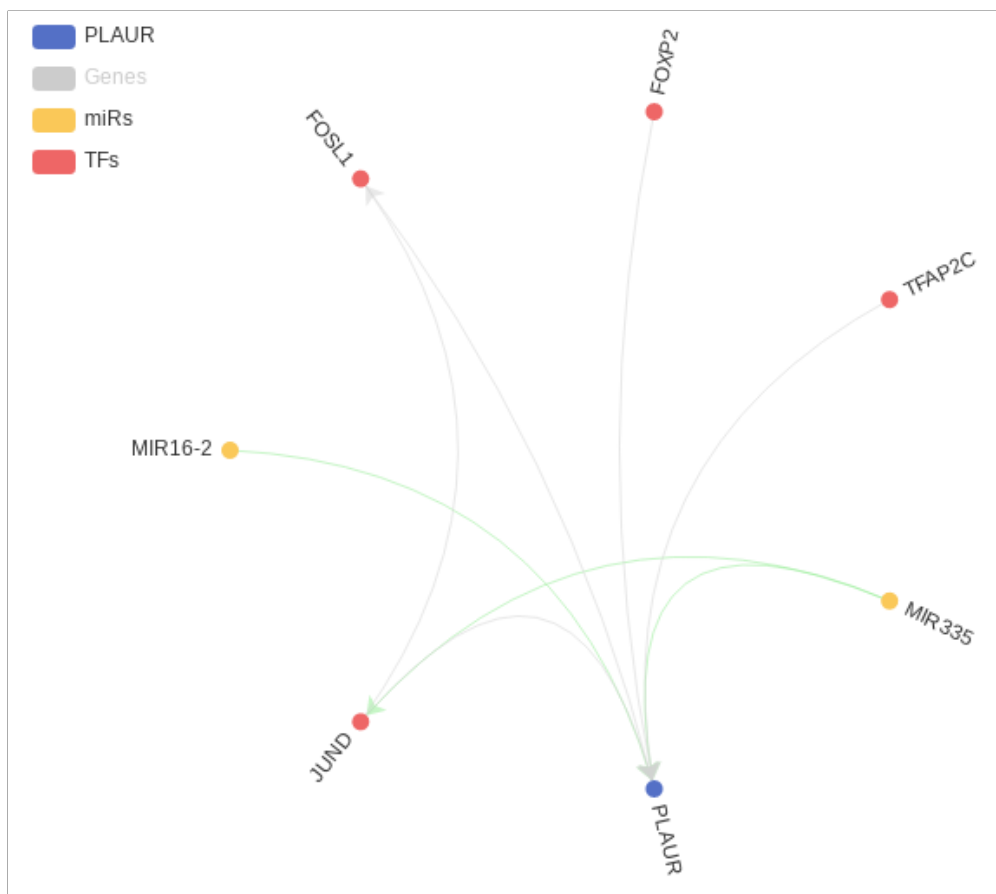


Figura 23. Topología del modelo mínimo correctamente ajustado con 7 nodos y 8 arcos, los cuales corresponden a *PLAUR*, 2 miRs y 4 TFs.

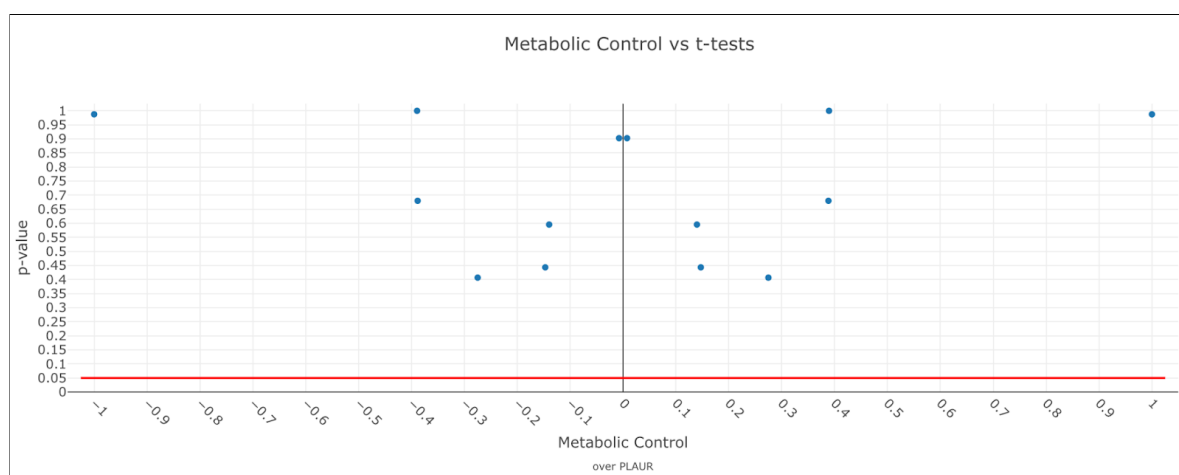


Figura 24. Análisis de Control Metabólico contra los valores p del 't-test': todos los parámetros indican estar bien ajustados y varios de ellos que ejercen algún tipo de control importante sobre la expresión de *PLAUR*.

## **5.9. Dos nuevos potenciales miRs candidatos con capacidad regulatoria sobre *PLAUR* emergen al analizar el nuevo modelo simplificado y ajustado**

Se utilizó la tarea denominada Escaneo de Parámetros a partir del modelo mínimo ajustado del paso anterior. Dicho escaneo permitió simular los posibles valores de expresión de *PLAUR* a partir del incremento progresivo de los números de copias (CNVs) de las otras especies del modelo. Específicamente, como se puede inferir del modelo mínimo, se usaron los dos miRs que tendrían más control sobre la expresión de *PLAUR* (miR16-2 y miR335) y se procedió a simular los valores de expresión de este gen cuando estos miRs tendrían diferentes cantidades de copias, simulando así un posible experimento de sobreexpresión de estos miRs y la evaluación de su impacto en la expresión de *PLAUR*. En la Figura 25 se puede observar el 'heatmap' generado a partir de dichos escaneos, donde se aprecia que, entre más se incrementan los valores de los CNVs de los miRs, más disminuye el valor de expresión de *PLAUR* (así, por ejemplo, al usar los CNVs de los miRs en conjunto -desde 1 hasta 5-, *PLAUR* disminuye poco más de un 70 %, pasando de 6.90 a 2.01). Así, se podría concluir que estos dos miRs serían potenciales candidatos para la disminución de la expresión *PLAUR* tanto de forma individual como en conjunto.

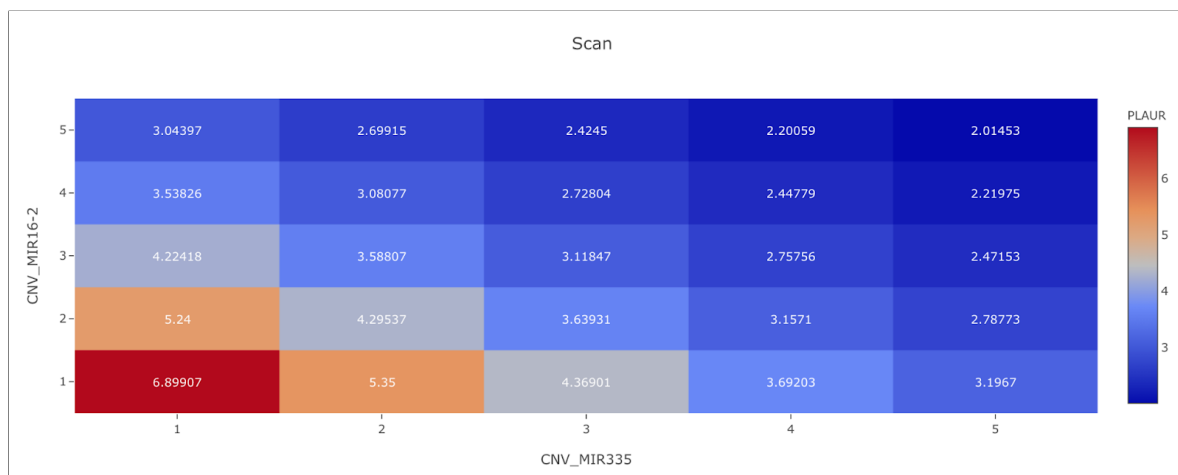


Figura 25. 'Heatmap' de los valores de expresión simulados de *PLAUR* a partir del aumento del número de copias (CNVs) de los miRs 155 y 16-2. Se puede notar que conforme aumentan los CNVs de los miRs, ya sea tanto de forma individual como dual, los valores de *PLAUR* disminuyen.

Basado en lo observado en el 'heatmap' anterior, se procedió a hacer una simulación de Curso de Tiempo (Figura 26). En dicho análisis se observó que al utilizar CNVs con valores de 10 en los miRs (simulando un incremento de 10x su expresión), tanto de forma individual como en conjunto, se obtiene una reducción importante de la expresión de *PLAUR* (desde un valor de casi 7 hasta casi 1 cuando se utilizan en conjunto los 3 miRs). Con este análisis, se puede concluir que efectivamente ambos miRs son potenciales candidatos para el control de la expresión de *PLAUR*.

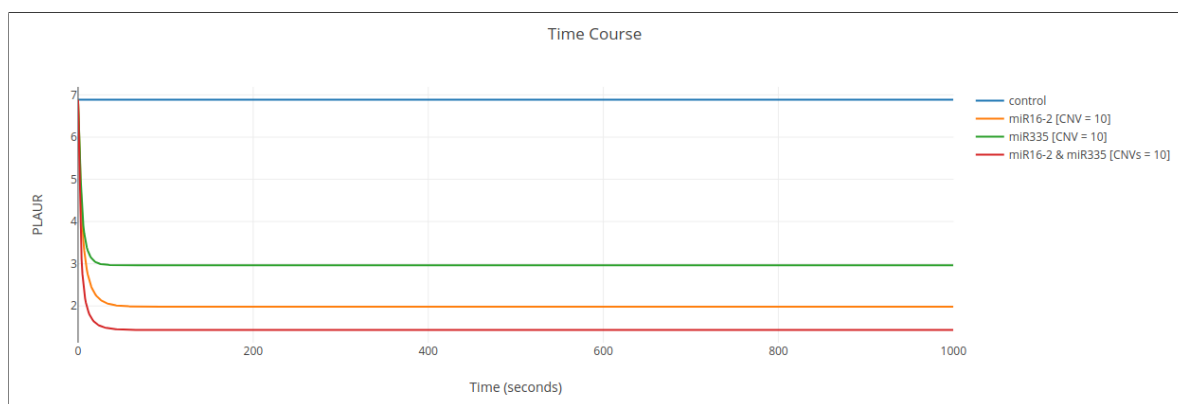


Figura 26. Simulación de Curso de Tiempo por mil segundos desde el Estado Estable, que representa un aumento (10x) del número de copias de los miRs (tanto en solitario como en conjunto) y su influencia en la expresión de *PLAUR*. Basado en la línea de control, se puede observar la disminución de *PLAUR* tanto cuando los CNVs aumentados de los miRs son utilizados de forma individual como grupal

### 5.10. La comprobación del rol de estos dos miRs candidatos utilizando datos experimentales de CCLE no muestra resultados similares

Con el fin de verificar si los miRs candidatos son potencialmente útiles para cumplir con los objetivos, y con base en el mismo modelo mínimo de los pasos anteriores, se decidió continuar con estrategias similares, específicamente de Estimaciones de Parámetros y Escaneos de Parámetros. Para esto, se utilizaron todas las líneas de CCLE simultáneamente. Sin embargo, y tal como se puede observar en la Figura 27, al final el ajuste no fue posible.

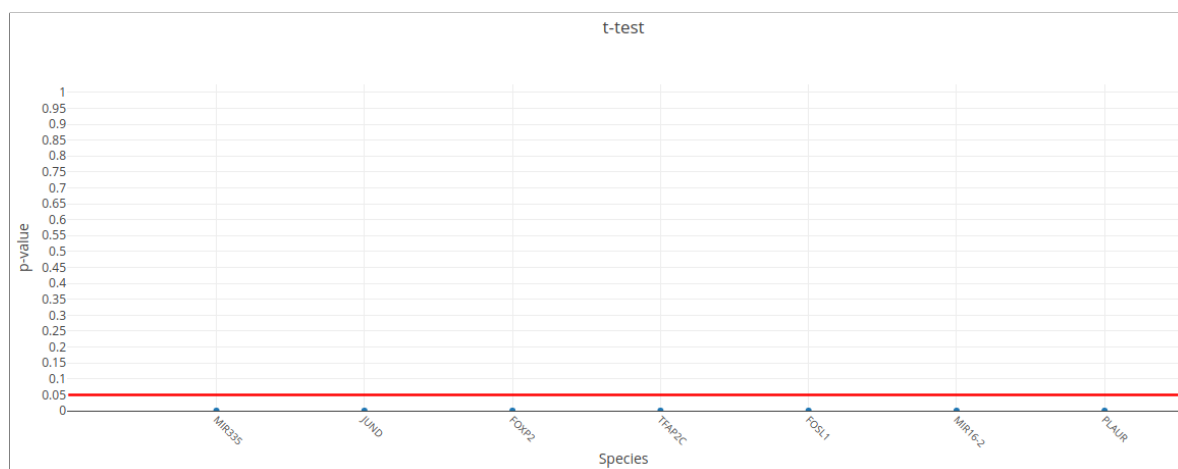


Figura 27. Análisis estadístico de 't-test' al tratar de ajustar el modelo mínimo utilizando todos los datos experimentales de CCLE. Se puede notar que todos los valores están por debajo de la línea roja, indicando que no están bien ajustados estadísticamente.

### 5.11. Valores de expresión con datos experimentales de CCLE muestran a FOSL1 y a miR335 con influencia importante sobre la expresión de PLAUR

Utilizando el mismo modelo mínimo, se procedió a utilizar una estrategia similar a la empleada anteriormente: a partir de cada una de las líneas celulares de CCLE, se calculó el Estado Estable individualmente para obtener y analizar los valores resultantes para cada especie. Seguidamente, se procedió a averiguar la cantidad de valores óptimos de clusterización;

para esto, se utilizó el algoritmo denominado ‘Average Silhouette Width’ (ASW)<sup>15</sup>, el cual indicó un número de 2 clústeres. La Figura 28 muestra dicho gráfico.

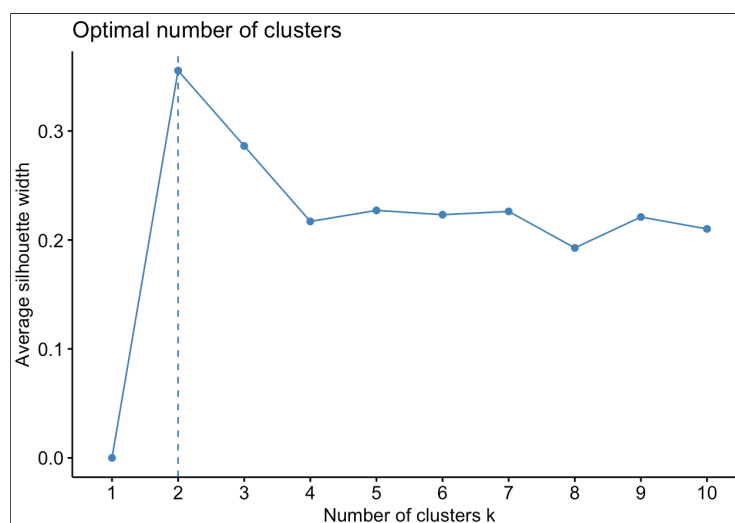


Figura 28. Cantidad óptima de número de clústeres (eje X) basado en el algoritmo ASW (eje Y) al aplicarse sobre los valores del Estado Estable de cada línea experimental de CCLE.

Como siguiente paso, se procedió a graficar los clústeres generados utilizando la técnica de ‘k-means’<sup>16</sup>. La Figura 29 presenta este gráfico.



Figura 29. Clústeres generados a partir de los valores de Estado Estable con la técnica de ‘k-means’, basado en los 2 clústeres indicados por el algoritmo ASW sobre los valores del Estado Estable de cada línea de CCLE.

<sup>15</sup><https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167947321000244>

<sup>16</sup><https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031320302000602>

Para el último paso, dado que los valores indicaron 2 clústeres, se crearon histogramas tipo espejo para cada especie (Figura 30). Así, según lo mostrado en dichos histogramas, se podría intuir que *FOSL1* (en mayor medida) y *miR335* (en menor medida) influyen notablemente sobre la expresión de *PLAUR*, debido a que se observa un comportamiento bimodal en dichos gráficos.

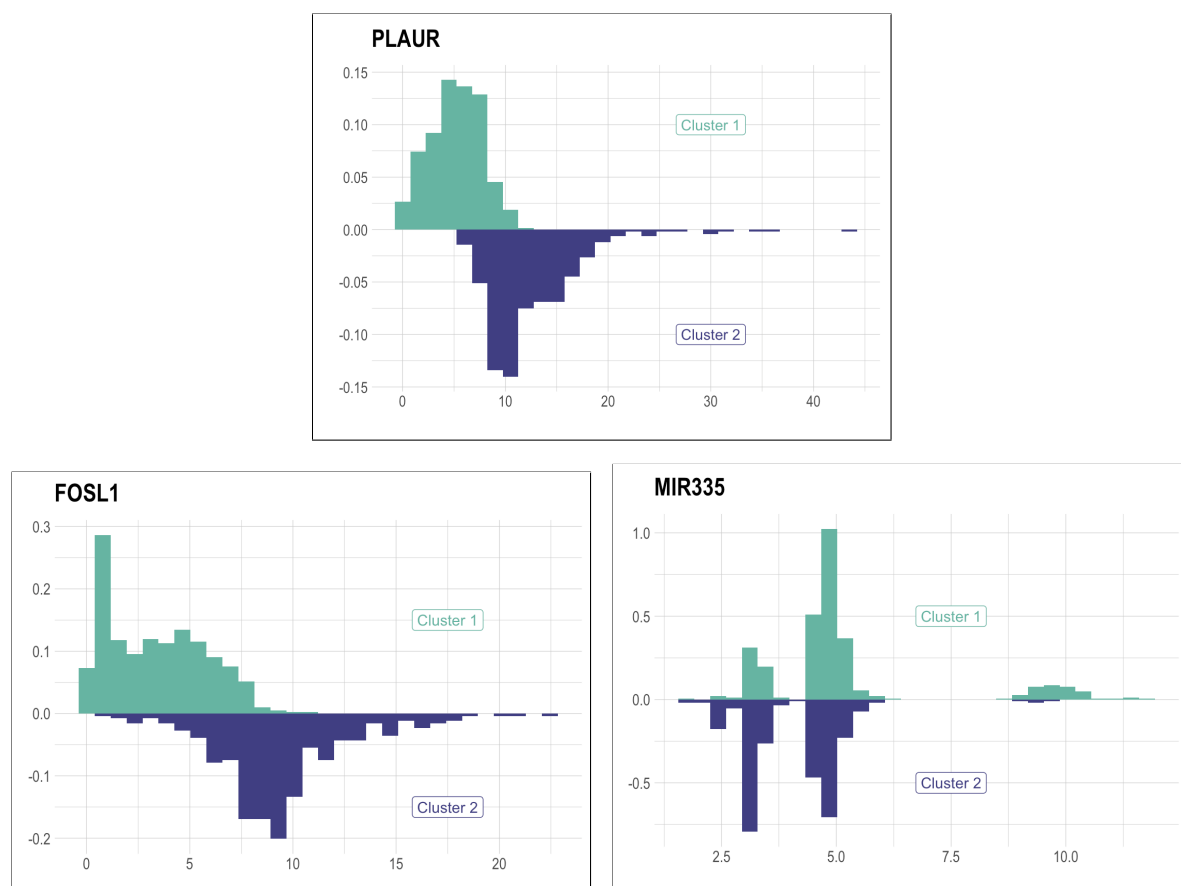


Figura 30. Histogramas tipo espejo de los valores de las especies a partir de los valores de Estado Estable. Se puede observar un comportamiento casi bimodal en *PLAUR*, *FOSL1* y en menor medida para *miR335*, pero no así con las demás especies.

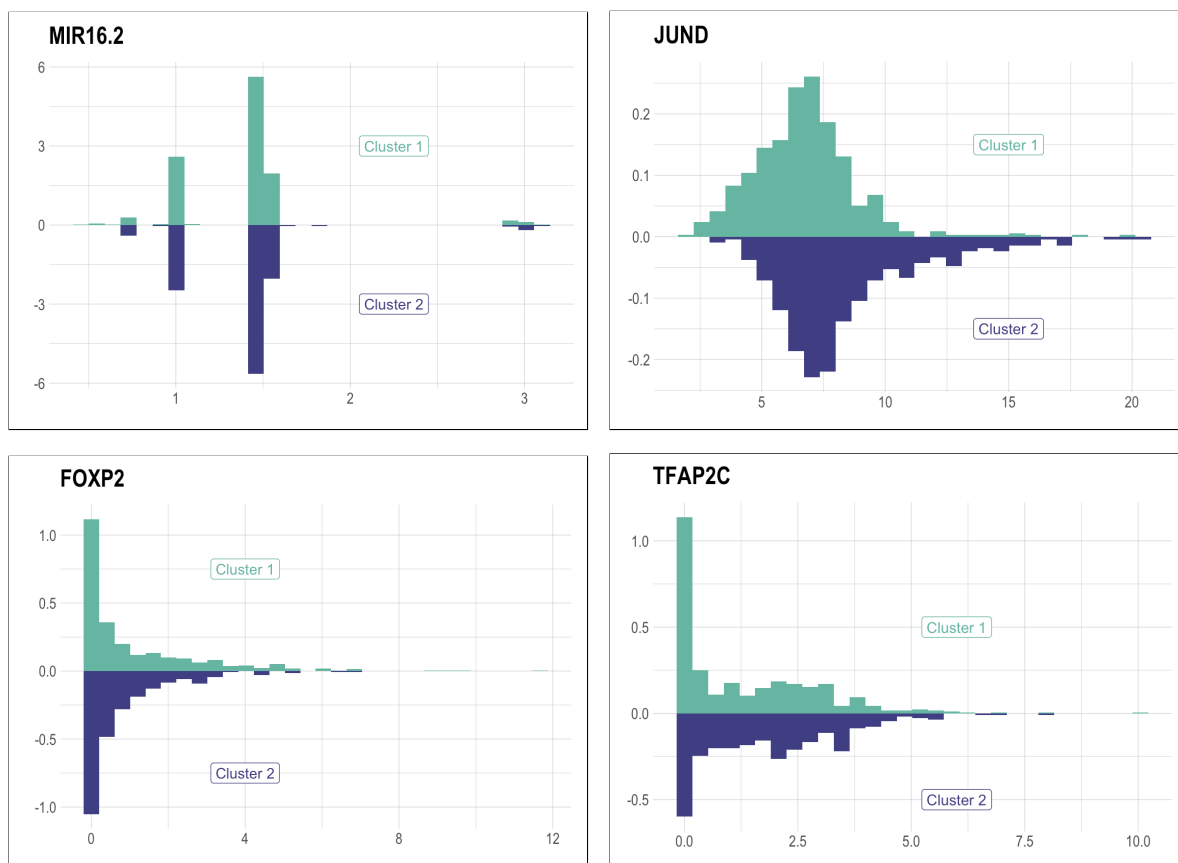


Figura 30. Histogramas tipo espejo de los valores de las especies a partir de los valores de Estado Estable. Se puede observar un comportamiento casi bimodal en *PLAUR*, *FOSL1* y en menor medida para *miR335*, pero no así con las demás especies (continuación).

### 5.12. La correlación entre los valores de expresión de los estados estables de los modelos individuales y los datos experimentales de CCLE indican que *FOSL1* y *miR335* tienen una influencia importante sobre la expresión de *PLAUR*

Al utilizar solo los valores para las 3 especies obtenidas del paso anterior (*FOSL1*, *miR335* y *PLAUR*) y tomar en cuenta todas las líneas de CCLE (Figura 31), se ve una correlación positiva importante entre *PLAUR* y *FOSL1* (de casi un 70 %), indicando una notable influencia entre ambas especies; aunque también se puede notar una ligera correlación negativa entre

miR335 y FOSL1 (-21 %), así como de entre *PLAUR* y miR335 (-32 %).

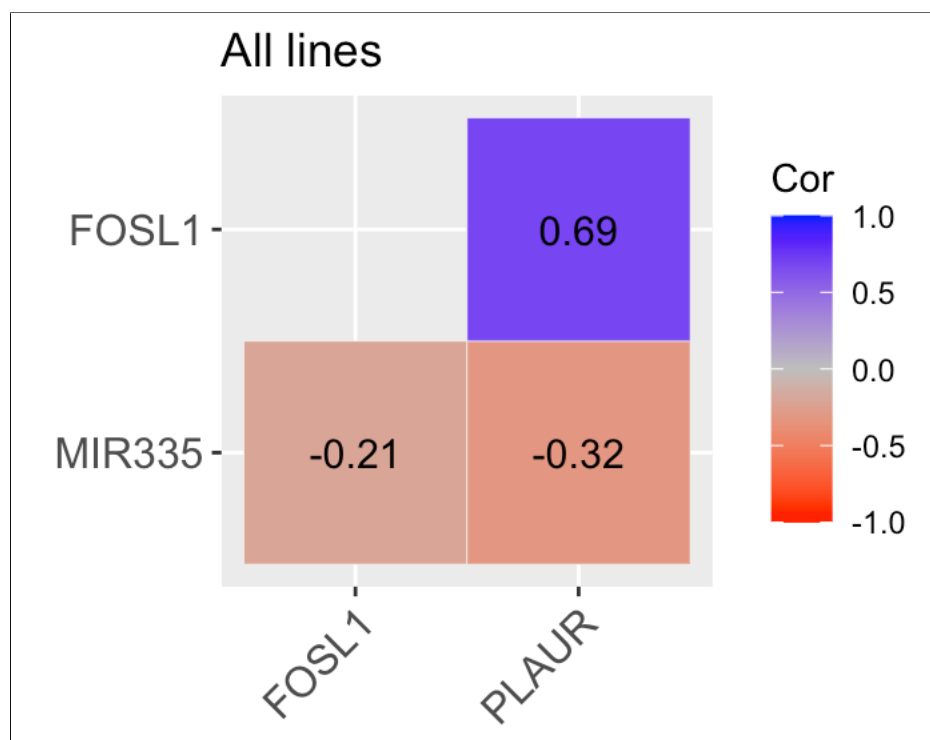


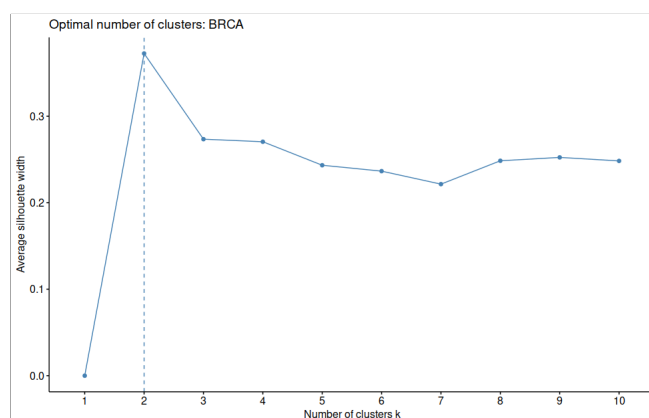
Figura 31. Índice de correlación entre las 3 especies utilizando todas las líneas experimentales de CCLE. Se puede notar una correlación positiva importante entre *PLAUR* y FOSL1, así como una negativa entre *PLAUR* y miR335; también, una posible correlación negativa entre miR335 y FOSL1.

### 5.13. Datos de TCGA sugieren posible correlación entre *PLAUR* y FOSL1 en varios carcinomas

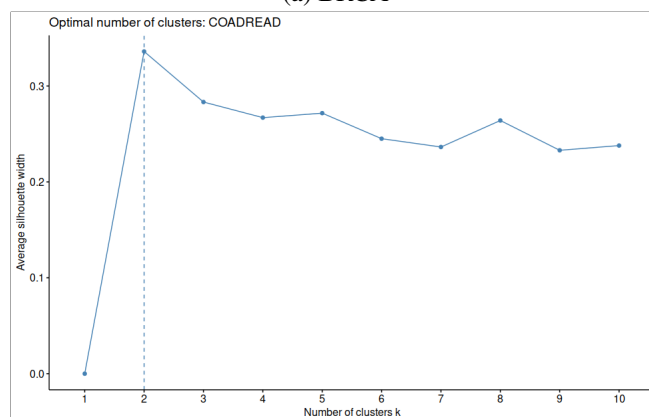
Para una sucesiva verificación de los resultados obtenidos en el paso anterior (con los datos de CCLE), se utilizó la información de tres tipos de cáncer de TCGA (ver sección 4.4 de Metodología en página 31): carcinoma invasivo de mama (BRCA), adenocarcinoma colorrectal (COADREAD) y adenocarcinoma de estómago (STAD). Con los datos de supervivencia y los valores normalizados (usando logaritmo en base 2) provistos por **FireBrowse**<sup>17</sup> de las expresiones de *PLAUR*, miR335 y FOSL1, se procedió primeramente a agrupar (clusterizar) la información por cada tipo de cáncer. De esta forma, para los 3 tipos de carcinomas, se halló

<sup>17</sup><https://firebrowse.org>

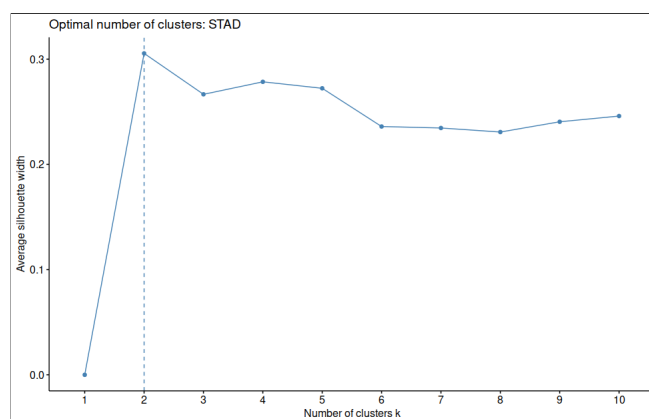
el valor óptimo de números de clústeres, dando todos como resultado un valor de 2 (Figura 32).



(a) BRCA



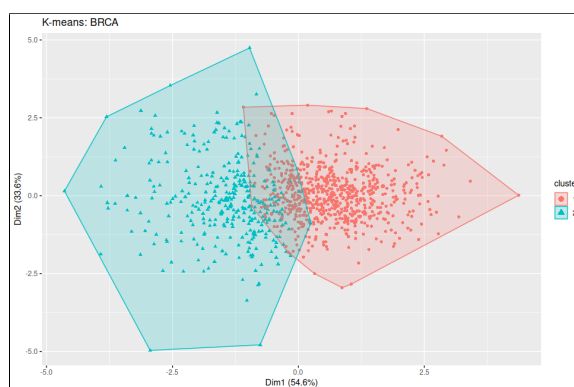
(b) COADREAD



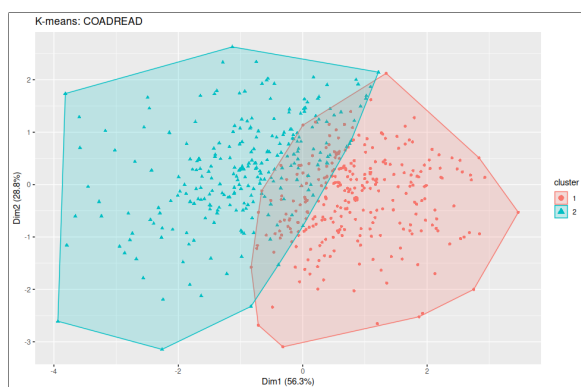
(c) STAD

Figura 32. Valores óptimos de número de clústeres (eje X) para cada cohorte (a: cáncer de mama (BRCA); b: cáncer colorectal (COADREAD); c: cáncer gástrico (STAD)), según el algoritmo ASW (eje Y), aplicado a los valores de *PLAUR*, *miR335* y *FOSL1* de la base de datos TCGA.

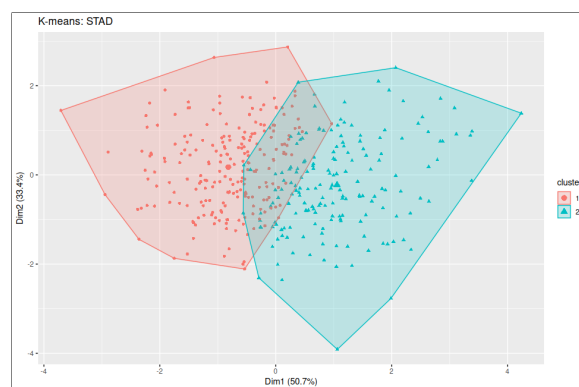
Con base en lo anterior, se procedió a generar dichos clústeres para cada cohorte utilizando la técnica de ‘k-means’ (Figura 33), así como conocer la probabilidad de supervivencia por medio del estimador de Kaplan-Meier<sup>18</sup> (Figura 34). En este último punto, se debe hacer énfasis en el hecho de que si bien es cierto que al clusterizar no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de ninguno de los tipos de cáncer, es posible observar tendencias, siendo particularmente evidente para BRCA.



(a) BRCA



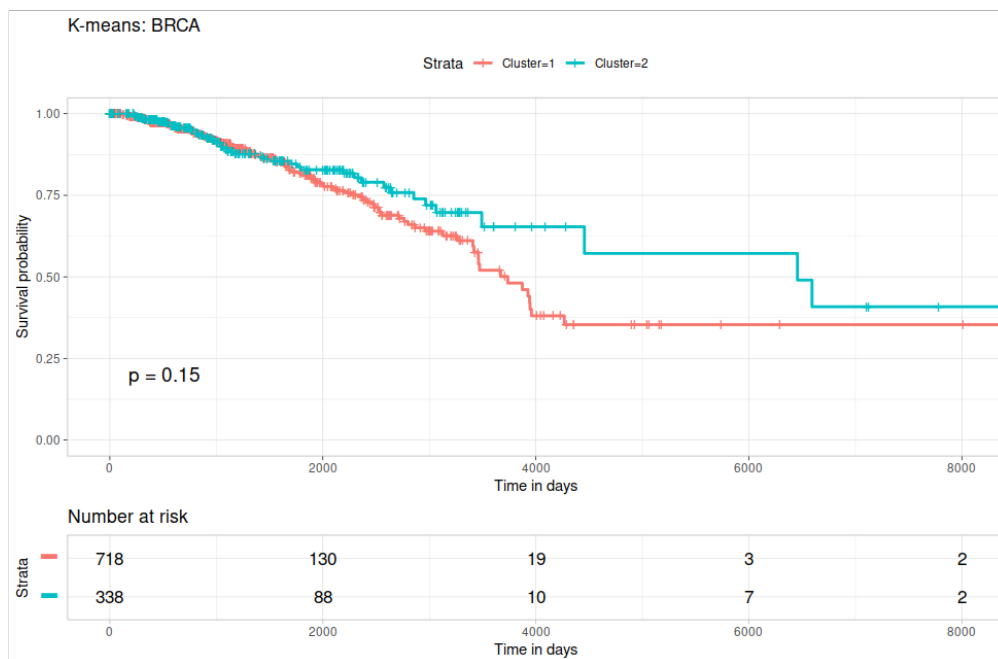
(b) COADREAD



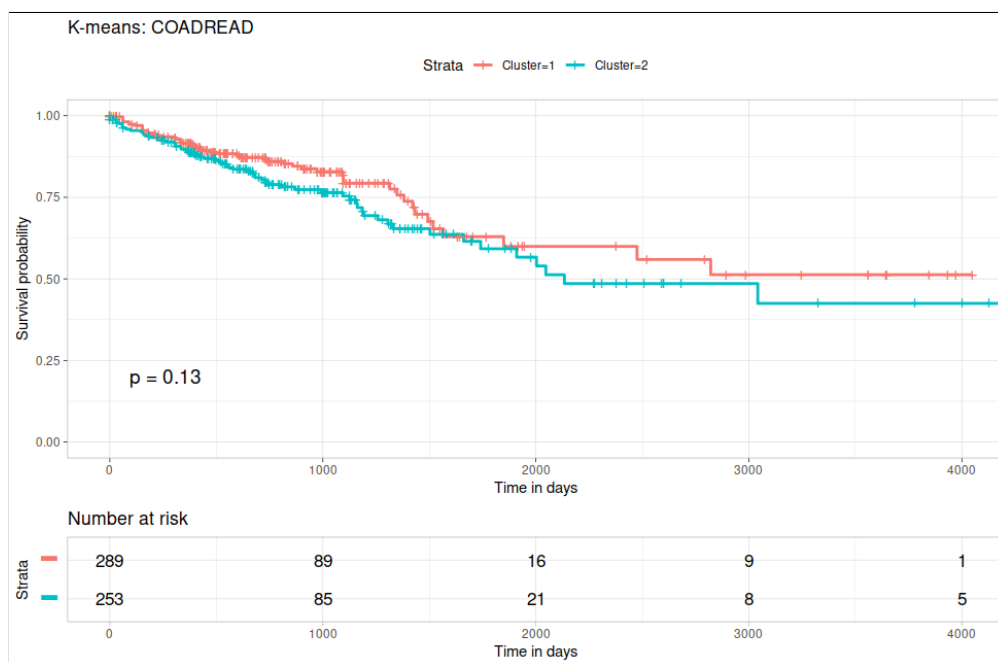
(c) STAD

Figura 33. Clústeres generados a partir de ‘k-means’ con dos centros para cada cohorte (a: cáncer de mama (BRCA); b: cáncer colorectal (COADREAD); c: cáncer gástrico (STAD)), utilizando como referencia los números de clústeres indicados por el algoritmo ASW y los valores de TCGA.

<sup>18</sup><https://www.bmj.com/content/317/7172/1572>

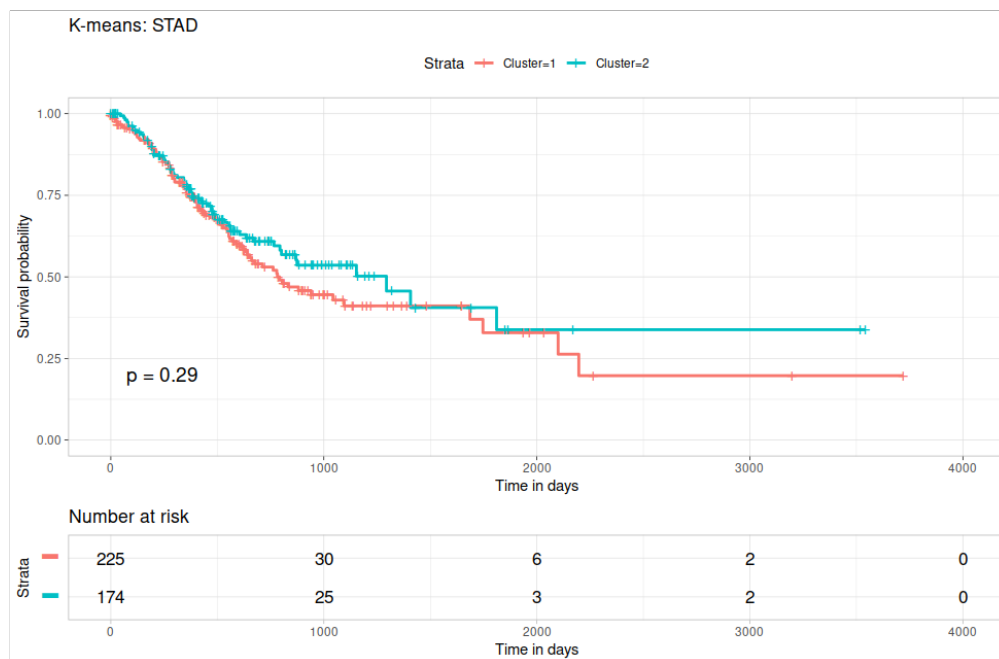


(a) BRCA



(b) COADREAD

Figura 34. Probabilidades de supervivencia a partir del estimador de Kaplan-Meier comparando ambos clústeres para cada cohorte (a: cáncer de mama (BRCA); b: cáncer colorectal (COADREAD); c: cáncer gástrico (STAD)). Se puede apreciar que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tipos de cáncer, sin embargo, sí es posible observar tendencias, especialmente para BRCA (a).



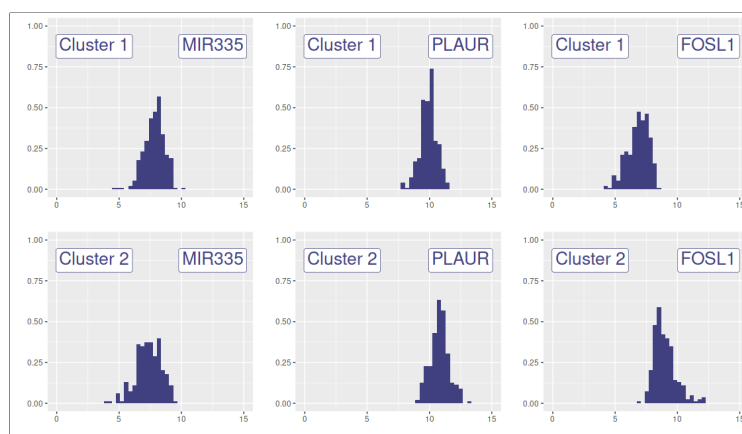
(c) STAD

Figura 34. Probabilidades de supervivencia a partir del estimador de Kaplan-Meier comparando ambos clústeres (continuación).

Analizando los gráficos anteriores y al aplicar histogramas para los dos clústeres de estos cohortes con cada especie (Figura 35), se obtuvo un resultado muy importante: *FOSL1* y *PLAUR* se comportan de manera bastante bimodal y contribuyen a la separación de los clústeres, no así el *miR335*.



(a) BRCA



(b) COADREAD



(c) STAD

Figura 35. Histogramas de las expresiones de cada especie (columnas) para cada clúster (filas), comparando ambos clústeres para cada cohorte (a: cáncer de mama (BRCA); b: cáncer colorectal (COADREAD); c: cáncer gástrico (STAD)). Se puede apreciar que el comportamiento entre *PLAUR* y *FOSL1* es bastante bimodal, especialmente en BRCA (a): *PLAUR* aumenta conforme lo hace *FOSL1*, y viceversa, es decir, conforme disminuye *FOSL1* así mismo lo hace *PLAUR*.

## 5.14. FOSL1 representa un potencial candidato para el estudio experimental de su influencia sobre la expresión de *PLAUR*

Basado en los resultados anteriores, se puede inferir que hay una importante relación entre la expresión de FOSL1 y *PLAUR* (Figura 36). Entonces, a futuro, se plantea como siguiente paso el conocer, analizar y demostrar cuáles miRs contribuyen directa e indirectamente con la regulación de la expresión de FOSL1 y, por consiguiente, indirectamente a la expresión de *PLAUR*. Esto, sin embargo, no fue parte de los objetivos de este proyecto por lo que deberá realizarse en un nuevo estudio. A manera de referencia, la Figura 37 muestra la red completa generada de *PLAUR* y FOSL1 con **BioNetUCR**, usando los datos de interacciones del 2020. Esta red contiene 132 nodos y 348 arcos.

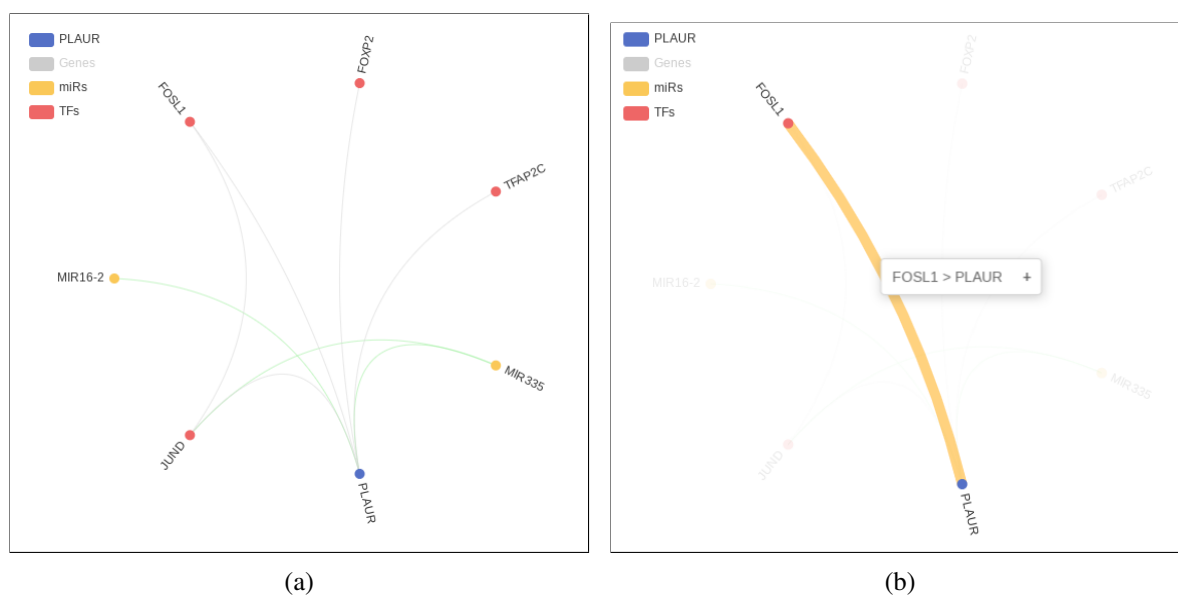


Figura 36. Topología completa del modelo mínimo (a) y en destacado (b) el arco que va desde FOSL1 hasta *PLAUR*, mostrando la influencia positiva directa de este TF sobre el gen.

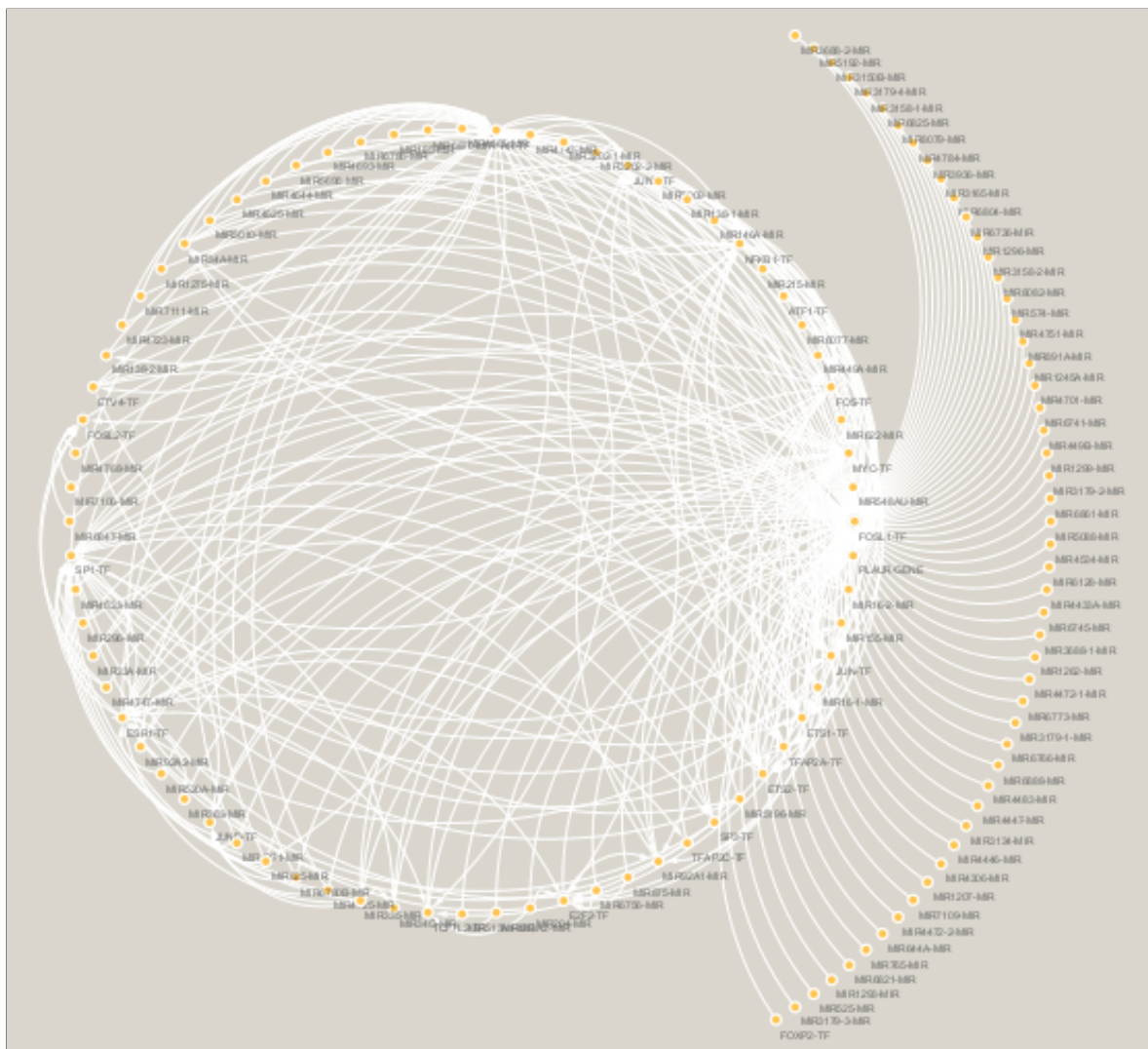


Figura 37. Red completa de interacciones con *PLAUR* y *FOSL1* creada con **BioNetUCR**, donde se puede apreciar una compleja topología de interacciones entre estas y sus especies reguladoras.

## 6. Discusión

El cáncer continúa siendo un problema de salud pública, que sigue cobrando vidas año tras año y al que es casi imposible encontrar una cura universal, especialmente por la complejidad y heterogeneidad de este grupo de enfermedades. Es precisamente por lo anterior que, en vez de tratar de atacar el problema del cáncer como una enfermedad, se han desarrollado diferentes estrategias para cada tipo de cáncer que permiten desde la detección temprana de tumores hasta contrarrestar su efecto mediante diferentes tratamientos. En este proyecto, la estrategia utilizada fue la de enfocarse en una de las cualidades del cáncer que se ha indicado provoca unas nueve de cada diez muertes por estas enfermedades: la invasión y su consecuente metástasis. Por lo tanto, al menos conceptualmente, se podría decir que esta estrategia permitiría reducir significativamente las muertes por este mal.

El principal hallazgo del proyecto es que, mediante un enfoque de biología de sistemas, fue posible revelar que la expresión del gen *PLAUR* es regulada principalmente por el factor de transcripción FOSL1, el cual no había sido contemplado originalmente en este proyecto como un candidato para la regulación de dicho gen. Aunque dicha observación deberá ser validada experimentalmente, esto pone en evidencia la relevancia que tiene el uso de las estrategias *in silico* para resolver problemas biológicos complejos. La utilización de herramientas informáticas permite un análisis más rápido y profundo de la información para la toma de decisiones. En este mismo punto, las herramientas bioinformáticas (‘software’ especializado en tareas biológicas) y un enfoque de biología de sistemas (técnicas investigativas que incluye ‘software’ para el análisis y simulaciones de procesos biológicos) permiten un ahorro de tiempo y otros insumos (dinero, infraestructura, personal investigador, etc.), al agilizar el proceso investigativo enfocado al hallazgo de posibles componentes biológicos que interactúan entre sí para encontrar o descartar hipótesis de forma más expedita.

La cantidad de datos biológicos y/o clínicos disponibles de forma libre y gratuita de las diferentes fuentes (bases de datos, artículos de investigación, libros de texto, etc.) con sus estructuras no siempre estandarizadas (nombres, valores, etc.), provoca que sea complicado buscar y obtener datos que se puedan procesar estadísticamente de forma sencilla. Lo anterior

conlleva a que el trabajo de curación de los datos sea extenuante, propensa a errores e, incluso, irrelevante desde el punto de vista investigativo: en vez de utilizar el tiempo y potencia informática en resolver problemas específicos, se debe utilizar bastante de esta potencia en tratar de ordenar toda la información para luego examinarla [123-129].

Un aspecto de crucial relevancia para que la biología de sistemas sea de utilidad -en el sentido que exponga información relevante-, es contar con datos cuantificables robustos de bases de datos biológicas [130-132]. Para este proyecto, se recurrió a tres bases de datos biológicas, dos de ellas con líneas celulares (NCI60 y CCLE) y una con datos de pacientes de cáncer (TCGA); una fue utilizada para hallar un modelo mínimo (NCI60), una segunda para validar este modelo con un ‘set’ más amplio de datos (CCLE), y la tercera para comprobar si los resultados obtenidos de las iteraciones con las dos bases ya mencionadas tenía relevancia biológica/clínica (TCGA). En el último caso se pudo evidenciar que FOSL1 y el miR335, los dos principales candidatos obtenidos a partir del modelaje en NCI60 y CCLE, influyen notablemente sobre la expresión de *PLAUR* en al menos tres tipos de cáncer, que el perfil de expresión de dichos candidatos presenta un comportamiento bimodal y se revelaron tendencias que indican que los niveles de expresión de FOSL1 y miR335 podrían predecir una tendencia en la supervivencia de pacientes con cáncer. No obstante, es importante mencionar que la obtención del modelo mínimo finalmente validado en TCGA fue uno de los procesos que más tiempo y trabajo tomó, debido a las diferencias entre las tres bases de datos biológicas. Dichas diferencias son más que evidentes tanto en la estructura, los metadatos, las unidades utilizadas y la forma de obtener su información. Este comportamiento (similares datos, muchas diferencias) es vasto conocido dentro del mundo científico; incluso, hay literatura que se enfoca en exponer estas complicaciones y sugiere pasos para “arreglarlo” o, al menos, evitarlo. Entre esa literatura, Pinu, Beale, Paten et al. [133] expone varias razones de dichas diferencias, entre las cuales están:

- Limitaciones del diseño de los estudios multiómicos:
  - Biomasa limitada de muestra.
  - Heterogeneidad del tipo/composición celular.

- Diferencias en biomoléculas específicas en tipos de muestra.
- Contaminación de fondo.
- Diferencias de las plataformas analíticas.
- Desafíos en la integración de datos multiómicos:
  - La naturaleza de los conjuntos de datos.
  - Conjuntos de datos dispersos y herramientas no interoperables.
  - Herramientas de visualización de datos inadecuadas.
  - No demostrar la utilidad de los datos.
  - Financiamiento de investigación limitado.

Así mismo, indica los elementos que se requieren para que un estudio multiómico sea de alta calidad, entre los cuales se encuentran:

- Un diseño experimental adecuado.
- Una cuidadosa selección, preparación y almacenamiento de muestras biológicas apropiadas.
- Una meticulosa recopilación de datos cuantitativos multiómicos y metadatos asociados.
- Mejores herramientas para la integración e interpretación de los datos.
- Estándares mínimos acordados para métodos multiómicos y metadatos.

Tal como se evidencia en la sección de resultados, la creación de una topología de interacciones de genes, miRs y TFs puede aumentar exponencialmente la cantidad de arcos con solo la inclusión de una especie, lo que se debe a las nuevas interacciones que emergen con las demás especies. En este sentido, y debido en parte a las capacidades computacionales actuales, un modelo se puede volver inmanejable; de ahí que la simplificación de un modelo es crucial para lograr un análisis del mismo. Para este proceso de simplificación se pueden utilizar varias técnicas [134], sin embargo, en este proyecto la mayoría se basan en los valores

de las diferentes bases de datos que, al utilizar con las fórmulas que simulan las interacciones del modelo y sus algoritmos para análisis, se obtienen “candidatos a eliminar del modelo”. Esta estrategia de simplificación, como se puede notar, recae sobre los valores cuantitativos proveídos, por lo que es de total importancia la calidad de los mismos en las bases de datos. Otro punto a tomar en cuenta en la topología es el hecho de que las interacciones se representan por medio de arcos y, por lo tanto, este valor (o valores) representan el punto de partida para discernir entre lo que se puede simplificar o no.

La proteína uPAR, así como el gen que la codifica (*PLAUR*), ha sido muy estudiada por la gran relevancia en el complejo proceso invasivo y metastásico tumoral; sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se da la regulación de dicho gen y las alteraciones que estos experimentan en el contexto tumoral están lejos de ser completamente esclarecidos. Es en este contexto que, precisamente en el hecho de haber determinado que principalmente FOSL1 y en menor medida miR335 están potencialmente implicados en la regulación de la expresión de *PLAUR*, es de mucha relevancia. Específicamente, los resultados de este proyecto aportan en la comprensión de cómo estas especies funcionan en el entorno regulatorio de la proteína uPAR, lo que a futuro podría servir de base para idear estrategias terapéuticas que disminuyan su expresión y con ello la capacidad invasiva y metastásica del cáncer. En este sentido, luego de analizar la relación entre *PLAUR* y FOSL1, basado en lo mostrado por los modelos generados a partir de las bases de datos (NCI60 y CCLE) y los datos clínicos de sobrevida proveídos por TCGA, se indica que este TF juega un rol bastante importante en la regulación de *PLAUR*. Esto se puede evidenciar, de entre todos los resultados, en la forma bimodal que se genera a partir de los valores clusterizados de TCGA (ver Figura 35a en página 62), donde al trazar dos líneas imaginarias en los histogramas que muestran los valores de expresión de las especies en ambos clústeres (Figura 38) generados a partir de los datos de BRCA, se puede observar cómo incrementan los valores de *PLAUR* conforme aumentan los valores de FOSL1; así mismo, y quizás más relevante para el objetivo de esta investigación, entre más se reducen los valores de FOSL1, más disminuyen los de *PLAUR*.



Figura 38. Histogramas, a partir de los datos de BRCA en TCGA, de las expresiones de cada especie (columnas) para cada clúster (filas), donde se puede ver el comportamiento bimodal de la correlación entre *PLAUR* y *FOSL1*: entre más aumenta el valor de *FOSL1*, así incrementa el de *PLAUR*; siendo lo contrario especialmente válido, es decir, entre más disminuye el valor de *FOSL1*, así mismo decrece el de *PLAUR*

En términos generales, *FOSL1* ('Fos-like antigen-1') es un componente del complejo AP1 que comprende un heterodímero de proteínas de la familia Fos-Jun [135] y forma parte de una red de factores de transcripción que se regulan entre sí, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional [136]. Este TF participa activamente en diversos procesos biológicos tales como el desarrollo óseo, así como en la proliferación y diferenciación celulares, incluyendo la tumorigénesis y la apoptosis [135-137]. De hecho, debido a que la influencia de AP1 sobre la transcripción es compleja y depende de muchas proteínas, las cuales a su vez están reguladas por múltiples vías de señalización, *FOSL1* es un regulador transcripcional multifacético (un regulador maestro) [136].

*FOSL1* se encuentra sobreexpresado en múltiples tumores, entre ellos de pulmón, páncreas, vejiga, mama, ameloblastoma y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [138-144]. De hecho, parece haber un consenso científico en cuanto a la correlación de *FOSL1* y *PLAUR*, mostrado por múltiples trabajos *in vitro* [145-147] y análisis de bases de datos [148], donde

exponen no solo la influencia de este TF sobre uPAR directamente, sino también en forma recíproca indirectamente, es decir, de *PLAUR* sobre *FOSL1* por medio de otros componentes intermedios [149]. Así mismo, según las bases de datos de interacciones del 2020 utilizada por **BioNetUCR**, este TF influye directamente en la expresión de 5 genes además de *PLAUR* y 3 miRs, como se puede observar en la Figura 39.

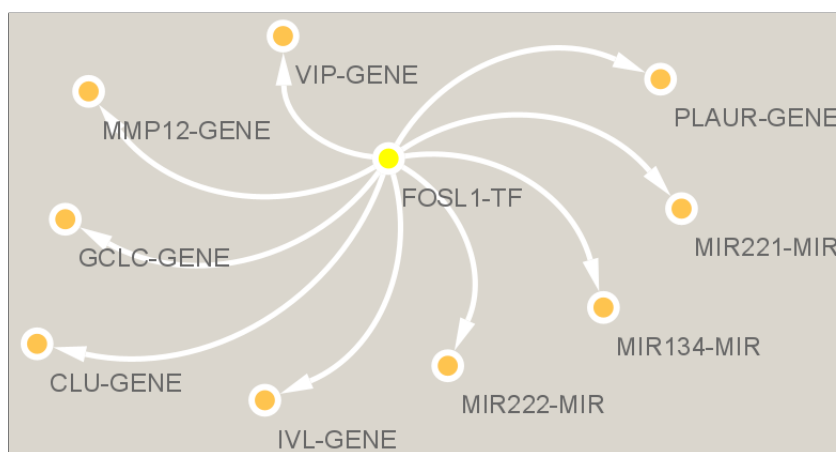


Figura 39. Topología de interacciones directas de *FOSL1* con sus ‘targets’, según las bases de datos de interacciones del 2020 utilizada por **BioNetUCR**. Se pueden apreciar los 3 miRs y los 6 genes (incluyendo *PLAUR*) que estarían regulados directamente por *FOSL1*.

Haciendo una breve búsqueda bibliográfica, se puede observar que varios de esos genes y miRs están también relacionados con invasión y/o metástasis en diferentes tipos de tumores. Por ejemplo:

- *VIP* en intestinal [150].
- *MMP12* en pulmonar [151], cervical [152], prostático [153, 154], nasofaríngeo [155], colorectal [156] y en carcinoma hepatocelular [157].
- *GCLC* en varios tipos [158-163].
- *CLU* en cáncer de próstata [164-166], colon [167, 168], ovario [169], renal [170] y en carcinoma hepatocelular [171, 172].
- *IVL* en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [173, 174], adenocarcinoma de colon [175, 176] y melanoma cutáneo [177].

- miR221 en carcinoma hepatocelular [178], carcinoma de células escamosas de cuello uterino [179], pancreático [180] y de vejiga [181].
- miR222 en el cáncer de seno [182], en el renal [183] y en el melanoma [184].
- miR134 en osteosarcoma [185], carcinoma hepatocelular [186], carcinoma nasofaríngeo [187], adenocarcinoma de pulmón [188], y cáncer de seno [189].

Lo anterior indica que FOSL1 tiene una influencia muy relevante como agente directo o indirecto en la invasión y metástasis de varios tipos de cáncer. Entonces, es de esperar que una investigación tomando como punto de partida este TF sería de mucha ayuda en la comprensión de su influencia en los procesos tumorales. Tal como se puede observar en el Cuadro 3 (página 34), FOSL1 no formaba parte de los TFs a investigar inicialmente. Fue precisamente gracias al uso de las versiones actualizadas de **BioNetUCR**, que esta especie fue incluida en el modelo final. Conociendo esto, se pueden utilizar técnicas para comprobar *in vitro* los resultados *in silico* aquí expuestos.

Así, se puede hacer lo que se denomina ‘gene knockdown’, cuya técnica consiste -a grandes rasgos- en aplicar inhibidores al gen objetivo para disminuir su expresión. En este caso el gen objetivo sería FOSL1, por lo que se podrían utilizar tanto siARNs como shARNs (ARNs de horquilla corta) cuyo gen diana sea precisamente el que codifica este TF y, posteriormente, evaluar los cambios en la expresión de *PLAUR*. Más específicamente, el fin último sería comprobar que efectivamente la expresión de *PLAUR* también disminuye ante la inhibición de FOSL1. Para esta comprobación se podría usar la técnica conocida como ‘western blot’ (WB), que consiste -en resumen- en detectar, cuantificar y visualizar la cantidad de una proteína específica en algún tejido. En este caso específico, la proteína a evaluar por WB sería la que codifica el gen *PLAUR*, es decir, uPAR. También se podría evaluar los niveles de expresión de mRNA de *PLAUR* mediante PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR), lo cual consiste en utilizar transcriptasa inversa para crear copias de ADN complementarias (ADNc) del ARN de la muestra y luego se realiza qPCR con ese ADNc, con el fin de obtener la cantidad de mRNA presente en la muestra original sin transcripción inversa (por esto este proceso se denomina “reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa”).

## 7. Conclusiones

El propósito general de este proyecto era hallar posibles especies candidatas en la regulación efectiva de la proteína uPAR, la cual es codificada por el gen *PLAUR*, a partir de la construcción, validación y análisis de varios modelos matemáticos que permitieran esclarecer -a partir de técnicas de biología de sistemas y herramientas bioinformáticas como COPASI- cuáles de estas especies eran las candidatas. Con la realización del proyecto se concluye, entonces, que la especie con mayor influencia sobre uPAR es el factor de transcripción FOSL1 de una red con un total de 7 nodos reguladores (y 8 arcos), incluyendo microARNs y factores de transcripción. Esta información es importante porque a la fecha se han sugerido varias moléculas como potenciales reguladores de la expresión de uPAR en cáncer (incluyendo TFs y miRs), sin embargo, todos han emergido de estudios experimentales donde se estudian las moléculas de forma individual. Este es, hasta donde sabemos, el primer estudio en el que se propone un potencial regulador de *PLAUR* mediante un enfoque biocomputacional integrativo, es decir, FOSL1 emerge a partir de una estrategia más “holística” basada en sets de datos e interacciones mucho más complejas. No obstante, este hallazgo debe ser validado posteriormente a nivel experimental.

Como se describió en su momento, un modelo implica -en resumen- una topología de red (nodos y arcos) y su contraparte matemática que relaciona (a partir de ecuaciones diferenciales) las interacciones de los miembros de esa red. De hecho, un aporte que se hace en el marco de este trabajo es la construcción de modelos utilizando las capacidades de las plataformas generadoras, las cuales proveyeron todo lo necesario para la creación eficiente de conjuntos de líneas celulares y/o modelos específicos para cada tumor de forma automática. Fue gracias a estas que se logró comprender la regulación de *PLAUR* por medio de interacciones directas e indirectas de miRs y TFs.

Debido especialmente a las capacidades de las plataformas generadoras, que permiten la generación expedita de modelos con diferentes características, fue posible construir no uno sino varios modelos; esto permitió, entre otras cosas, crear modelos simplificados con los cuales fue posible ir contestando las diferentes hipótesis que surgían en cada iteración. Esto

constituye un aporte en sí mismo del presente trabajo, ya que no solo fue crucial para contestar o descartar dichas hipótesis, sino que derivó en un ‘pipeline’ que podría ser eventualmente utilizado para proyectos futuros con objetivos similares a los planteados para este estudio.

En este proyecto se puso en evidencia la valía de utilizar bases de datos biológicos para esclarecer aspectos con potencial relevancia en la biología del cáncer. Por su simplicidad, la base de datos NCI60 permitió encontrar modelos mínimos que pudieran ser analizados y validados. Para esta validación se recurrió principalmente a una segunda base de datos de líneas celulares (CCLE) y, posteriormente, gracias a la información de sobrevida del repositorio TCGA (con datos de pacientes de cáncer), se pudo confirmar la influencia de FOSL1 sobre la expresión de *PLAUR* y su relación con sobrevida. El hecho de ser datos de pacientes (TCGA), hizo de esto último un paso fundamental en la identificación de FOSL1 como potencial regulador de la expresión de *PLAUR* en el contexto tumoral real.

En resumen, el uso de herramientas bioinformáticas y de biología de sistemas como la plataforma generadora de modelos y el programa COPASI, así como la información proveída por las diferentes bases de datos, permitieron llevar a buen término este proyecto y, con esto, dejar la puerta abierta a seguir utilizando estas y otras herramientas para el análisis complejo de la regulación de este TF candidato (FOSL1) con el fin de -más adelante- utilizar pruebas *in vitro* e *in vivo* que ayuden a resolver o minimizar el efecto de uPAR sobre la invasión y la metástasis, así como incrementar la sobrevida de las personas con estos padecimientos. Este proyecto es una prueba más de la importancia del uso de las tecnologías que ayuden a contestar las grandes incógnitas o problemas de índole biológico y médico.

## Bibliografía

1. ACS. Datos y estadísticas sobre el cáncer entre los Hispanos/Latinos 2021-2023. 2021. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/cancer-facts-and-figures-for-hispanics-and-latinos/cancer-facts-and-figures-for-hispanics-and-latinos-2021-2023-spanish.pdf>.
2. Siegel RL, Miller KD, Sandeep N et al. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 1 2023;73:17-48. doi: 10.3322/caac.21763. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21763>.
3. ACS. Cancer Facts & Figures 2022. 2022. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/2022-cancer-facts-and-figures.pdf>.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 3 2021;71:209-49. doi: 10.3322/caac.21660. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>.
5. Bray AJLTISF y Adams C. *The Cancer Atlas*. Third. 2019. Disponible en: [www.cancer.org](http://www.cancer.org).
6. Soerjomataram I y Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nature Reviews Clinical Oncology* 10 2021;18:663-72. doi: 10.1038/s41571-021-00514-z.
7. Ferlay J, Ervik M, Lam F et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>.
8. INEC. Indicadores demográficos 2013 y 2019. 2021. Disponible en: [https://www.inec.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/replacerv-indicadoresdemograficos\\_2013y2019.pdf](https://www.inec.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/replacerv-indicadoresdemograficos_2013y2019.pdf).

9. CCSS. Costa Rica tiene 30 casos nuevos de cáncer cada día. 2022. Disponible en: [https://www.ccss.sa.cr/noticias/salud\\_noticia?costa-rica-tiene-30-casos-nuevos-de-cancer-cada-dia](https://www.ccss.sa.cr/noticias/salud_noticia?costa-rica-tiene-30-casos-nuevos-de-cancer-cada-dia).
10. INEC. Defunciones 2020, el impacto de la enfermedad COVID-19 DATOS PRELIMINARES. 2021. Disponible en: [https://www.inec.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/replacdef2020covid-19preliminar\\_0.pdf](https://www.inec.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/replacdef2020covid-19preliminar_0.pdf).
11. INEC. Estadísticas Vitales 2020 POBLACIÓN, NACIMIENTOS DEFUNCIONES Y MATRIMONIOS. 2021. Disponible en: [https://www.inec.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/replacdef-2020a-estadisticas\\_vitales\\_2020.pdf](https://www.inec.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/replacdef-2020a-estadisticas_vitales_2020.pdf).
12. Peralta R, Garcés H, Cocho G y Miramontes P. Análisis no lineal de la dinámica del cáncer. *Inventio* 32 2018;14:29-35. doi: 10.30973/inventio/2018.14.32/6. Disponible en: <https://doi.org/10.30973/inventio/2018.14.32/6>.
13. Bakhoun SF y Cantley LC. The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. *Cell* 6 2018;174:1347-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.027>.
14. Stuart D y Sellers WR. Linking somatic genetic alterations in cancer to therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology* 2 2009;21:304-10. doi: 10.1016/j.ceb.2009.02.001.
15. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA y Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 6127 2013;340:1546-58. doi: 10.1126/science.1235122.
16. Cárcer G de, Huertas P y López-Contreras AJ. Chromosome instability: From molecular mechanisms to disease. *DNA Repair* 2018;66-67:72-5. doi: 10.1016/J.DNAREP.2018.04.006.
17. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 1 2022;12:31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-Dimensions>.
18. Seyfried TN y Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* 1-2 2013;18:43-73. doi: 10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40.

19. Talmadge JE y Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research* 14 2010;70:5649-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610625/>.
20. Lambert AW, Pattabiraman DR y Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 4 2017;168:670-91. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(16\)31609-9](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(16)31609-9).
21. Alpízar-Alpízar W, Malespín-Bendaña W, Une C y Ramírez-Mayorga V. Relevance of the plasminogen activation system in the pathogenesis and progression of gastric cancer. *Revista de Biología Tropical* 1 2018;66:28-47.
22. Hanahan D y Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 5 2011;144:646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
23. Kessenbrock K, Plaks V y Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 1 2010;141:52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
24. Alpízar-Alpízar W, Christensen IJ, Santoni-Rugiu E et al. Urokinase plasminogen activator receptor on invasive cancer cells: a prognostic factor in distal gastric adenocarcinoma. *International journal of cancer* 4 2012;131:E329-E336. doi: 10.1002/ijc.26417.
25. Illemann M, Laerum OD, Hasselby JP et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) on tumor-associated macrophages is a marker of poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer medicine* 4 2014;3:855-64. doi: 10.1002/cam4.242.
26. Hau AM, Leivo MZ, Gilder AS, Hu JJ, Gonias SL y Hansel DE. mTORC2 activation is regulated by the urokinase receptor (uPAR) in bladder cancer. *Cellular signalling* 2017;29:96-106. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.10.010.
27. Hwang IH, Kwon YK, Cho CK et al. Modified Panax ginseng extract inhibits uPAR-mediated  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin signaling by modulating caveolin-1 to induce early apoptosis in lung cancer cells. *The American journal of Chinese medicine* 05 2016;44:1081-97. doi: 10.1142/S0192415X16500609.

28. Jing Y, Chavez V, Ban Y et al. Molecular Effects of Stromal Selective Targeting by uPAR Retargeted Oncolytic Virus in Breast Cancer. *Molecular Cancer Research* 2017;molcanres-0016. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0016.
29. Lund IK, Illemann M, Thurison T, Christensen IJ y Hoyer-Hansen G. uPAR as anti-cancer target: evaluation of biomarker potential, histological localization, and antibody-based therapy. *Current drug targets* 12 2011;12:1744-60. doi: 10.2174/138945011797635902.
30. Pillay V, Dass CR y Choong PF. The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer. *Trends in Biotechnology* 1 2007;25:33-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.10.011.
31. Duffy M. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Current Pharmaceutical Design* 1 2004;10:39-49. doi: 10.2174/1381612043453559.
32. Vial E, Sahai E y Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 1 2003;4:67-79. doi: 10.1016/s1535-6108(03)00162-4.
33. Wang K, Xing ZH, Jiang QW et al. Targeting uPAR by CRISPR/Cas9 System Attenuates Cancer Malignancy and Multidrug Resistance. *Frontiers in Oncology* 2019;9. doi: 10.3389/fonc.2019.00080.
34. Rysenkova KD, Semina EV, Karagyaur MN et al. CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation. *Oncotarget* 50 2018;9:29414. doi: 10.18632/oncotarget.25647.
35. Gorrasi A, Petrone AM, Santi AL, Alfieri M, Montuori N y Ragno P. New Pieces in the Puzzle of uPAR Role in Cell Migration Mechanisms. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 2531 12 2020;9:2531. doi: 10.3390/cells9122531.
36. Wong F y Gunawardena J. Gene Regulation in and out of Equilibrium. *Annual Review of Biophysics* 2020;49:199-226. doi: 10.1146/annurev-biophys-121219-081542.

37. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010 463:7283-7283. doi: 10.1038/nature08822.
38. Carter SL, Cibulskis K, Helman E et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nature Biotechnology* 2012 30:5-5. doi: 10.1038/nbt.2203.
39. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2015.
40. Gebert LF y MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 20:1-1. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0045-7>.
41. Bushati N y Cohen SM. microRNA Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2007;23:175-205. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406>.
42. Alberts B, Bray D, Hopkin K et al. *Essential cell biology*. Garland Science, 2015.
43. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology* 12 1997;29:1305-12. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00085-X.
44. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF et al. The human transcription factors. *Cell* 4 2018;172:650-65. doi: doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029.
45. Allis D, Caparros ML, Jenuwein T, Reinberg D y Lachlan M. *Epigenetics*. Second edition. CSH Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
46. Berdasco M y Esteller M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. *Nature Reviews Genetics* 2018 20:2-2. doi: 10.1038/s41576-018-0074-2.
47. Baylin SB y Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 2016;8. doi: 10.1101/cshperspect.a019505.

48. Mitra S, Chakrabarti J y Ganguli S. Cancer and Noncoding RNAs. *Cancer and Non-coding RNAs* 2018;1-23. doi: 10.1016/B978-0-12-811022-5.00001-2.
49. Allis CD y Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* 2016 17:8 8 2016;17:487-500. doi: 10.1038/nrg.2016.59.
50. Fernández AF, Assenov Y, Martin-Subero JI et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome research* 2012;22:407-19. doi: 10.1101/gr.119867.110.
51. Bates SE. Epigenetic Therapies for Cancer. *New England Journal of Medicine* 7 2020;383:650-63. doi: 10.1056/NEJMra1805035.
52. Anastasiadou E, Jacob LS y Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2017 18:1 1 2017;18:5-18. doi: 10.1038/nrc.2017.99.
53. Anastasiadou E, Faggioni A, Trivedi P y Slack FJ. The Nefarious Nexus of Noncoding RNAs in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2072 7 2018;19:2072. doi: 10.3390/ijms19072072.
54. Ameres SL y Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013 14:8 8 2013;14:475-88. doi: 10.1038/nrm3611.
55. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 1 2018;173:20-51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
56. Ebert MS y Sharp PA. Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell* 3 2012;149:515-24. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.005.
57. Kim VN, Han J y Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:2 2 2009;10:126-39. doi: 10.1038/nrm2632.
58. Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI et al. Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell* 1 2010;140:111-22. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.023.
59. Martello G, Rosato A, Ferrari F et al. A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 7 2010;141:1195-207. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.017.

60. Tran MN, Choi W, Wszolek MF et al. THE p63 ISOFORM  $\delta$ Np63 $\alpha$  INHIBITS EPITHELIAL - MESENCHYMAL TRANSITION BY PROMOTING THE EXPRESSION OF MIR-205 IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS. The Texas Medical Center Library 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.408104. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/299304477\\_THE\\_p63\\_ISOFORM\\_Np63a\\_INHIBITS\\_EPITHELIAL\\_-\\_MESENCHYMAL\\_%20TRANSITION\\_BY\\_PROMOTING\\_THE\\_EXPRESSION\\_OF\\_MIR-205%20\\_IN\\_HUMAN\\_BLADDER\\_CANCER\\_CELLS](https://www.researchgate.net/publication/299304477_THE_p63_ISOFORM_Np63a_INHIBITS_EPITHELIAL_-_MESENCHYMAL_%20TRANSITION_BY_PROMOTING_THE_EXPRESSION_OF_MIR-205%20_IN_HUMAN_BLADDER_CANCER_CELLS).
61. Czech B y Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:1 1 2010;12:19-31. doi: 10.1038/nrg2916. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2916>.
62. Bracken CP, Scott HS y Goodall GJ. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2016 17:12 12 2016;17:719-32. doi: 10.1038/nrg.2016.134.
63. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB y Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 1 2009;19:92-105. doi: 10.1101/gr.082701.108. Disponible en: <https://genome.cshlp.org/content/19/1/92>.
64. Valeri N, Vannini I, Fanini F, Calore F, Adair B y Fabbri M. Epigenetics, miRNAs, and human cancer: A new chapter in human gene regulation. *Mammalian Genome* 9-10 2009;20:573-80. doi: 10.1007/s00335-009-9206-5. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00335-009-9206-5>.
65. Lujambio A y Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature* 2012 482:7385 7385 2012;482:347-55. doi: 10.1038/nature10888. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature10888>.
66. Carrillo MG. El papel de los miRNAs en el cáncer. Universidad de Cantabria 2018.
67. Bui TV y Mendell JT. Myc: maestro of microRNAs. *Genes & cancer* 6 2010;1:568-75. doi: 10.1177/1947601910377491.

68. Svoronos AA, Engelman DM y Slack FJ. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer research* 13 2016;76:3666-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.
69. Wu W. Modulation of microRNAs for potential cancer therapeutics. *Methods in molecular biology* 2010:59-70. doi: 10.1007/978-1-60761-863-8\_5.
70. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G y Lee SS. Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of Advanced Research* 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>.
71. Titze-de-Almeida SS, Soto-Sánchez C, Fernandez E, Koprach JB, Brotchie JM y Titze-de-Almeida R. The Promise and Challenges of Developing miRNA-Based Therapeutics for Parkinson's Disease. *Cells* 4 2020;9:841. doi: 10.3390/cells9040841.
72. Paz BLZ de, Trejo-Rodríguez MÁ y Sampieri-Cabrera R. miRNA's involucrados en el cáncer de mama: Un enfoque terapéutico. *SSRN Electronic Journal* 2019. doi: 10.2139/SSRN.3387098. Disponible en: <https://www.readcube.com/articles/10.2139%2Fssrn.3387098>.
73. Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 7 2006;103:2257-61. doi: 10.1073/pnas.0510565103. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16461460/>.
74. Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 435:7043 7043 2005;435:834-8. doi: 10.1038/nature03702. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature03702>.
75. Wu M y Chan C. Prediction of therapeutic microRNA based on the human metabolic network. *Bioinformatics* 8 2014;30:1163-71. doi: 10.1093/bioinformatics/btt751. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt751>.
76. Tsuda N, Kawano K, Efferson C y Ioannides C. Synthetic microRNA and double-stranded RNA targeting the 3-untranslated region of HER-2/neu mRNA inhibit HER-2

- protein expression in ovarian cancer cells. *International Journal of Oncology* 2005. doi: 10.3892/ijo.27.5.1299. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/ijo.27.5.1299>.
77. Lambert M, Jambon S, Depauw S y David-Cordonnier MH. Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1479 6 2018;23:1479. doi: 10.3390/molecules23061479. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1479>.
  78. Nebert DW. Transcription factors and cancer: an overview. *Toxicology* 2002;181-182:131-41. doi: 10.1016/S0300-483X(02)00269-X.
  79. Henley MJ y Koehler AN. Advances in targeting ‘undruggable’ transcription factors with small molecules. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:9 9 2021;20:669-88. doi: 10.1038/s41573-021-00199-0. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41573-021-00199-0>.
  80. Bhagwat AS y Vakoc CR. Targeting Transcription Factors in Cancer. *Trends in Cancer* 1 2015;1:53-65. doi: 10.1016/j.trecan.2015.07.001.
  81. Vishnoi K, Viswakarma N, Rana A y Rana B. Transcription Factors in Cancer Development and Therapy. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2296 8 2020;12:2296. doi: 10.3390/cancers12082296. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2296>.
  82. Bushweller JH. Targeting transcription factors in cancer — from undruggable to reality. *Nature Reviews Cancer* 2019 19:11 11 2019;19:611-24. doi: 10.1038/s41568-019-0196-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41568-019-0196-7>.
  83. Afaloniati H, Karagiannis GS, Hardas A, Poutahidis T y Angelopoulou K. Inflammation-driven colon neoplasmatogenesis in uPA-deficient mice is associated with an increased expression of Runx transcriptional regulators. *Experimental Cell Research* 2017;361:257-64. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.025.
  84. Turing AM. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 641 1952;237:37-72. doi: 10.1098/rstb.1952.0012.

85. Cooper RL, Thiery AP, Fletcher AG, Delbarre DJ, Rasch LJ y Fraser GJ. An ancient Turing-like patterning mechanism regulates skin denticle development in sharks. *Science Advances* 11 2018;4. doi: 10.1126/sciadv.aau5484.
86. Alon U. *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. Second Edition. CRC press, 2019.
87. Yurkovich JT, Tian Q, Price ND y Hood L. A systems approach to clinical oncology uses deep phenotyping to deliver personalized care. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 17:3 3 2019;17:183-94. doi: 10.1038/s41571-019-0273-6.
88. Oulas A, Karathanasis N y Poirazi P. Computational Identification of miRNAs Involved in Cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2011;676:23-41. doi: 10.1007/978-1-60761-863-8\_2.
89. León EA. *Análisis computacional de las redes de regulación de la expresión génica en cáncer basadas en microARNs*. Universidad Autónoma de Madrid 2017. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10486/680442>.
90. Friedman N, Linial M, Nachman I y Pe'er D. Using Bayesian Networks to Analyze Expression Data. *Journal of computational biology* 3-4 2004;7:601-20. doi: 10.1089/106652700750050961.
91. Ye H, Aubel D y Fussenegger M. Synthetic mammalian gene circuits for biomedical applications. *Current Opinion in Chemical Biology* 6 2013;17:910-7. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.10.006.
92. Veitia RA, Bottani S y Birchler JA. Gene dosage effects: nonlinearities, genetic interactions, and dosage compensation. *Trends in Genetics* 7 2013;29:385-93. doi: 10.1016/j.tig.2013.04.004.
93. Acar M, Pando BF, Arnold FH, Elowitz MB y Oudenaarden AV. A general mechanism for network-dosage compensation in gene circuits. *Science* 5999 2010;329:1656-60. doi: 10.1126/science.1190544. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1190544>.

94. Birchler JA y Veitia RA. Gene balance hypothesis: Connecting issues of dosage sensitivity across biological disciplines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 37 2012;109:14746-53. doi: 10.1073/pnas.1207726109. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1207726109>.
95. Straub T y Becker PB. Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nature Reviews Genetics* 2007 8:1 1 2007;8:47-57. doi: 10.1038/nrg2013. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2013>.
96. Marín I, Siegal ML y Baker BS. The evolution of dosage-compensation mechanisms. *Bioessays* 2020. doi: 10.1002/1521-1878(200012)22:12<1106::AID-BIES8>3.0.CO;2-W. Disponible en: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-1878\(200012\)22:12%3C1106::AID-BIES8%3E3.0.CO;2-W](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-1878(200012)22:12%3C1106::AID-BIES8%3E3.0.CO;2-W).
97. Acón MS, Geiß C, Torres-Calvo J et al. MYC dosage compensation is mediated by miRNA-transcription factor interactions in aneuploid cancer. *iScience* 12 2021;24:103407. doi: 10.1016/j.isci.2021.103407. Disponible en: <https://www.cell.com/article/S258900422101378X/fulltext>.
98. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine* 2006 12:8 8 2006;12:895-904. doi: 10.1038/nm1469. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nm1469>.
99. Martin OA, Anderson RL, Narayan K y MacManus MP. Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis? *Nature reviews Clinical oncology* 1 2017;14:32. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.128.
100. Birkbak NJ y McGranahan N. Cancer genome evolutionary trajectories in metastasis. *Cancer Cell* 1 2020;37:8-19. doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.004.
101. Busch HS, August E y Busch H. BIOLOGICAL NETWORK DETERMINATION WITH APPLICATION TO KERATINOCYTE MIGRATION CONTROL. 2011. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/236324749>.
102. Smith HW y Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature reviews Molecular cell biology* 1 2010;11:23. doi: 10.1038/nrm2821.

103. Acón MS, Siles-Canales F y Mora-Rodríguez R. A biocomputational platform for the automated construction of large-scale mathematical models of miRNA-transcription factor networks for studies on gene dosage compensation. 2016 IEEE 36th Central American and Panama Convention, CONCAPAN 2016 2016. doi: 10.1109/CONCAPAN.2016.7942348.
104. Hoops S, Gauges R, Lee C et al. COPASI — a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics* 24 2006;22:3067-74. doi: 10.1093/bioinformatics/btl485. Disponible en: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/24/3067/208398>.
105. Sahle S, Gauges R, Pahle J et al. Simulation of Biochemical Networks Using COPASI: A Complex Pathway Simulator. *Proceedings of the 38th Conference on Winter Simulation* 2006:1698-706. doi: 10.1109/WSC.2006.322945.
106. Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:10 2006;6:813-23. doi: 10.1038/nrc1951. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc1951>.
107. Guo T, Luna A, Rajapakse VN et al. Quantitative Proteome Landscape of the NCI-60 Cancer Cell Lines. *iScience* 2019;21:664-80. doi: 10.1016/j.isci.2019.10.059.
108. Ji Z, Hernández-Hernández S y Ballester PJ. On the Best Way to Cluster NCI-60 Molecules. *Biomolecules* 2023, Vol. 13, Page 498 3 2023;13:498. doi: 10.3390/biom13030498. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/3/498>.
109. Barretina J, Caponigro G, Stransky N et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012 483:7391 7391 2012;483:603-7. doi: 10.1038/nature11003. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature11003>.
110. Nusinow DP, Szpyt J, Ghandi M et al. Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell* 2 2020;180:387-402.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.023.
111. Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* 2 2018;173:400-416.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.052.

112. Gao GF, Parker JS, Reynolds SM et al. Before and After: Comparison of Legacy and Harmonized TCGA Genomic Data Commons' Data. *Cell Systems* 1 2019;9:24-34.e10. doi: 10.1016/j.cels.2019.06.006. Disponible en: <https://www.cell.com/article/S2405471219302017/fulltext>.
113. Hess J, Angel P y Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* 25 2004;117:5965-73. doi: 10.1242/jcs.01589. Disponible en: <https://journals.biologists.com/jcs/article/117/25/5965/28119/AP-1-subunits-quarrel-and-harmony-among-siblings>.
114. Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H y Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 1-2 2000;260:1-12. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00454-6.
115. Freedman SJ, Sun ZYJ, Poy F et al. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 8 2002;99:5367-72. doi: 10.1073/pnas.082117899. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.082117899>.
116. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF- $\kappa$ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1 1991;1072:63-80. doi: 10.1016/0304-419X(91)90007-8.
117. Deniaud E, Baguet J, Mathieu AL, Pagès G, Marvel J y Leverrier Y. Overexpression of Sp1 transcription factor induces apoptosis. *Oncogene* 2006 25:53 53 2006;25:7096-105. doi: 10.1038/sj.onc.1209696. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/1209696>.
118. Ornitz DM e Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001 2:3 3 2001;2:1-12. doi: 10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005. Disponible en: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005>.
119. Sims JE, March CJ, Cosman D et al. cDNA Expression Cloning of the IL-1 Receptor, a Member of the Immunoglobulin Superfamily. *Science* 4865 1988;241:585-9. doi:

- 10.1126/science.2969618. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2969618>.
120. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 21 1997;94:11514. doi: 10.1073/pnas.94.21.11514. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23523/>.
121. Nie H, Zheng Y, Li R et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Nature Medicine* 2013 19:3 3 2013;19:322-8. doi: 10.1038/nm.3085. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nm.3085>.
122. Guo Z, Qiu C, Mecca C et al. Elevated lymphotoxin- $\alpha$  (TNF $\beta$ ) is associated with intervertebral disc degeneration. *BMC Musculoskeletal Disorders* 1 2021;22:1-10. doi: 10.1186/s12891-020-03934-7. Disponible en: <https://bmcmusculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12891-020-03934-7>.
123. Gomez-Cabrero D, Abugessaisa I, Maier D et al. Data integration in the era of omics: current and future challenges. *BMC systems biology* 2 2014;8:I1. doi: 10.1186/1752-0509-8-S2-I1. Disponible en: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-0509-8-S2-I1>.
124. Hyduke DR, Lewis NE y Palsson BO. Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism. *Molecular BioSystems* 2 2013;9:167-74. doi: 10.1039/C2MB25453K. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/mb/c2mb25453k>.
125. Noor E, Cherkaoui S y Sauer U. Biological insights through omics data integration. *Current Opinion in Systems Biology* 2019;15:39-47. doi: 10.1016/j.coisb.2019.03.007.
126. Subramanian I, Verma S, Kumar S, Jere A y Anamika K. Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinformatics and Biology Insights* 2020;14. doi: 10.1177/1177932219899051. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1177932219899051>.

127. Yizhak K, Benyamini T, Liebermeister W, Ruppin E y Shlomi T. Integrating quantitative proteomics and metabolomics with a genome-scale metabolic network model. *Bioinformatics* 2010;26:i255-i260. doi: 10.1093/bioinformatics/btq183. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq183>.
128. Maturana EL de, Alonso L, Alarcón P et al. Challenges in the Integration of Omics and Non-Omics Data. *Genes* 2019, Vol. 10, Page 238 3 2019;10:238. doi: 10.3390/genes10030238. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/3/238>.
129. Yoo S, Huang T, Campbell JD et al. MODMatcher: Multi-Omics Data Matcher for Integrative Genomic Analysis. *PLOS Computational Biology* 8 2014;10:e1003790. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003790. Disponible en: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003790>.
130. Ba R, Geffard E, Douillard V et al. Surfing the Big Data Wave: Omics Data Challenges in Transplantation. *Transplantation* 2 2022;106:E114-E125. doi: 10.1097/TP.0000000000003992. Disponible en: [https://journals.lww.com/transplantjournal/fulltext/2022/02000/surfing\\_the\\_big\\_data\\_wave\\_\\_omics\\_data\\_challenges.11.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/fulltext/2022/02000/surfing_the_big_data_wave__omics_data_challenges.11.aspx).
131. Conesa A y Beck S. Making multi-omics data accessible to researchers. *Scientific Data* 2019 6:1 1 2019;6:1-4. doi: 10.1038/s41597-019-0258-4. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41597-019-0258-4>.
132. Michalska-Falkowska A, Niklinski J, Juhl H et al. Applied Molecular-Based Quality Control of Biobanked Samples for Multi-Omics Approach. *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 3742 14 2023;15:3742. doi: 10.3390/cancers15143742. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/14/3742>.
133. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites* 2019, Vol. 9, Page 76 4 2019;9:76. doi: 10.3390/metabo9040076. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/4/76>.

134. Surovtsova I, Simus N, Hübner K, Sahle S y Kummer U. Simplification of biochemical models: A general approach based on the analysis of the impact of individual species and reactions on the systems dynamics. *BMC Systems Biology* 1 2012;6:1-16. doi: 10.1186/1752-0509-6-14. Disponible en: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-0509-6-14>.
135. Lee BK, Uprety N, Jang YJ et al. FOSL1 overexpression directly activates trophoblast-specific gene expression programs in embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 2018;26:95-102. doi: 10.1016/J.SCR.2017.12.004.
136. Sobolev VV, Khashukoeva AZ, Evina OE et al. Role of the Transcription Factor FOSL1 in Organ Development and Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 1521 3 2022;23:1521. doi: 10.3390/IJMS23031521. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1521>.
137. Zhu J, Zhao YP y Zhang YQ. Low expression of FOSL1 is associated with favorable prognosis and sensitivity to radiation/pharmaceutical therapy in lower grade glioma. *Neurological Research* 6 2020;42:522-7. doi: 10.1080/01616412.2020.1748323. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01616412.2020.1748323>.
138. Saitoh Y, Bureta C, Sasaki H et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 inhibits undifferentiated pleomorphic sarcoma growth via downregulation of FOS-like antigen 1. *Molecular Carcinogenesis* 2 2019;58:234-46. doi: 10.1002/mc.22922. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mc.22922>.
139. Vallejo A, Perurena N, Guruceaga E et al. An integrative approach unveils FOSL1 as an oncogene vulnerability in KRAS-driven lung and pancreatic cancer. *Nature Communications* 2017 8:1 1 2017;8:1-14. doi: 10.1038/ncomms14294. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ncomms14294>.
140. Pecce V, Verrienti A, Ficon G et al. The role of FOSL1 in stem-like cell reprogramming processes. *Scientific Reports* 2021 11:1 1 2021;11:1-11. doi: 10.1038/s41598-021-94072-0. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94072-0>.

141. Li L, Wang N, Xiong Y, Guo G, Zhu M y Gu Y. Transcription Factor FOSL1 Enhances Drug Resistance of Breast Cancer through DUSP7-Mediated Dephosphorylation of PEA15. *Molecular Cancer Research* 4 2022;20:515-26. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0658. Disponible en: <https://aacrjournals.org/mcr/article/20/4/515/682313/Transcription-Factor-FOSL1-Enhances-Drug>.
142. Cui YP, Xie M, Pan WX, Zhang ZY y Li WF. HOXA10 promotes the development of bladder cancer through regulating FOSL1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 6 2020;24:2945-54. doi: 10.26355/eurrev\_202003\_20659.
143. Xiong G, Ouyang S, Xie N et al. FOSL1 promotes tumor growth and invasion in ameloblastoma. *Frontiers in Oncology* 2022;12:4783. doi: 10.3389/fonc.2022.900108.
144. Zhang M, Hoyle RG, Ma Z et al. FOSL1 promotes metastasis of head and neck squamous cell carcinoma through super-enhancer-driven transcription program. *Molecular Therapy* 8 2021;29:2583-600. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.03.024. Disponible en: <https://www.cell.com/article/S1525001621001532/fulltext>.
145. Evellin S, Galvagni F, Zippo A et al. FOSL1 Controls the Assembly of Endothelial Cells into Capillary Tubes by Direct Repression of  $\alpha v$  and  $\beta 3$  Integrin Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 6 2013;33:1198. doi: 10.1128/MCB.01054-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592019/>.
146. Galvagni F, Orlandini M y Oliviero S. Role of the AP-1 transcription factor FOSL1 in endothelial cells adhesion and migration. *Cell Adhesion & Migration* 5 2013;7:408-11. doi: 10.4161/cam.25894. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.25894>.
147. Zhang L, Liu M, Li Q et al. Identification of differential gene expression in endothelial cells from young and aged mice using RNA-Seq technique. *American Journal of Translational Research* 10 2019;11:6553. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834518/>.

148. Casalino L, Talotta F, Matino I y Verde P. FRA-1 as a Regulator of EMT and Metastasis in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 8307-9 2023;24:8307. doi: 10.3390/ijms24098307. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/9/8307>.
149. Annis MG, Ouellet V, Rennhack JP et al. Integrin-uPAR signaling leads to FRA-1 phosphorylation and enhanced breast cancer invasion. *Breast Cancer Research* 1 2018;20:1-15. doi: 10.1186/s13058-018-0936-8. Disponible en: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-018-0936-8>.
150. Waschek JA, Richards ML y Bravo DT. Differential expression of VIP/PACAP receptor genes in breast, intestinal, and pancreatic cell lines. *Cancer Letters* 2 1995;92:143-9. doi: 10.1016/0304-3835(95)03768-R.
151. Hofmann HS, Hansen G, Richter G et al. Matrix Metalloproteinase-12 Expression Correlates with Local Recurrence and Metastatic Disease in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 3 2005;11:1086-92. doi: 10.1158/1078-0432.1086.11.3. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.1086.11.3>.
152. Lin CL, Ying TH, Yang SF et al. MTA2 silencing attenuates the metastatic potential of cervical cancer cells by inhibiting AP1-mediated MMP12 expression via the ASK1/MEK3/p38/YB1 axis. *Cell Death & Disease* 2021 12:5 5 2021;12:1-12. doi: 10.1038/s41419-021-03729-1. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03729-1>.
153. Nabha SM, Santos EBD, Yamamoto HA et al. Bone marrow stromal cells enhance prostate cancer cell invasion through type I collagen in an MMP-12 dependent manner. *International Journal of Cancer* 11 2008;122:2482-90. doi: 10.1002/ijc.23431. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.23431>.
154. Larson SR, Zhang X, Dumpit R et al. Characterization of osteoblastic and osteolytic proteins in prostate cancer bone metastases. *The Prostate* 9 2013;73:932-40. doi: 10.1002/pros.22639. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pros.22639>.

155. Chung IC, Chen LC, Chung AK et al. Matrix metalloproteinase 12 is induced by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 14 2014;14:1-14. doi: 10.1186/1471-2407-14-348. Disponible en: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-348>.
156. Nguyen SV, Skarstedt M, Löfgren S et al. Gene polymorphism of matrix metalloproteinase-12 and-13 and association with colorectal cancer in Swedish patients. *Anticancer Research* 8 2013;33:3247-50. Disponible en: <https://ar.iijournals.org/content/33/8/3247>.
157. Ng KTP, Qi X, Kong KL et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) correlates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer* 15 2011;47:2299-305. doi: 10.1016/j.ejca.2011.05.032.
158. You GR, Chang JT, Li YL et al. MYH9 Facilitates Cell Invasion and Radioresistance in Head and Neck Cancer via Modulation of Cellular ROS Levels by Activating the MAPK-Nrf2-GCLC Pathway. *Cells* 18 2022;11:2855. doi: 10.3390/cells11182855. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/18/2855>.
159. Jardim BV, Moschetta MG, Leonel C et al. Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study. *Oncology Reports* 3 2013;30:1119-28. doi: 10.3892/or.2013.2540. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2540>.
160. Yan X, Zhang X, Wang L et al. Inhibition of thioredoxin/thioredoxin reductase induces synthetic lethality in lung cancers with compromised glutathione homeostasis. *Cancer Research* 1 2019;79:125-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1938. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1938>.
161. Hiramoto K, Satoh H, Suzuki T et al. Myeloid lineage-specific deletion of antioxidant system enhances tumor metastasis. *Cancer Prevention Research* 8 2014;7:835-44. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0094. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0094>.

162. Mougiakakos D, Okita R, Ando T et al. High expression of GCLC is associated with malignant melanoma of low oxidative phenotype and predicts a better prognosis. *Journal of Molecular Medicine* 8 2012;90:935-44. doi: 10.1007/s00109-012-0857-4. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-012-0857-4>.
163. Sun J, Zhou C, Ma Q et al. High GCLC level in tumor tissues is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Journal of Cancer* 15 2019;10:3333. doi: 10.7150/jca.29769. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6603424/>.
164. Shiota M, Zardan A, Takeuchi A et al. Clusterin mediates TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate cancer cells. *Cancer Research* 20 2012;72:5261-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0254. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0254>.
165. Bettuzzi S, Davalli P, Davoli S et al. Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumorigenesis and metastatic spread. *Oncogene* 2009 28:49 49 2009;28:4344-52. doi: 10.1038/onc.2009.286. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/onc2009286>.
166. Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME y Chi KN. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 2014 12:1 1 2014;12:26-36. doi: 10.1038/nrurol.2014.320. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2014.320>.
167. Shapiro B, Tocci P, Haase G, Gavert N y Ben-Ze'ev A. Clusterin, a gene enriched in intestinal stem cells, is required for L1-mediated colon cancer metastasis. *Oncotarget* 33 2015;6:34389. doi: 10.18632/oncotarget.5360. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741460/>.
168. Cheriyaundath S y Ben-Ze'ev A. Wnt/ $\beta$ -Catenin Target Genes in Colon Cancer Metastasis: The Special Case of L1CAM. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 3444 11 2020;12:3444. doi: 10.3390/cancers12113444. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3444>.

169. Wei L, Xue T, Wang J et al. Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 4 2009;125:791-806. doi: 10.1002/ijc.24316. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.24316>.
170. Wang X, Luo L, Dong D, Yu Q y Zhao K. Clusterin Plays an Important Role in Clear Renal Cell Cancer Metastasis. *Urologia Internationalis* 1 2014;92:95-103. doi: 10.1159/000351923. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1159/000351923>.
171. Lau SH, Sham JS, Xie D et al. Clusterin plays an important role in hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene* 2006 25:8 8 2005;25:1242-50. doi: 10.1038/sj.onc.1209141. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/1209141>.
172. Wang C, Jin G, Jin H et al. Clusterin facilitates metastasis by EIF3I/Akt/MMP13 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 5 2015;6:2903. doi: 10.18632/oncotarget.3093. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413626/>.
173. Wiechec E, Magan M, Matic N et al. Cancer-associated fibroblasts modulate transcriptional signatures involved in proliferation, differentiation and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers* 13 2021;13:3361. doi: 10.3390/cancers13133361. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/13/3361>.
174. Jin Y y Qin X. Co-expression network-based identification of biomarkers correlated with the lymph node metastasis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Bioscience Reports* 2 2020;40. doi: 10.1042/BSR20194067. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1042/BSR20194067>.
175. Wang H, Liu J, Li J et al. Identification of gene modules and hub genes in colon adenocarcinoma associated with pathological stage based on WGCNA analysis. *Cancer Genetics* 2020;242:1-7. doi: 10.1016/j.cancergen.2020.01.052.
176. Wu M, Lou W, Lou M, Fu P y Yu XF. Integrated Analysis of Distant Metastasis-Associated Genes and Potential Drugs in Colon Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology* 2020;10:576615. doi: 10.3389/fonc.2020.576615.

177. Dai H, Guo L, Lin M et al. Comprehensive analysis and identification of key genes and signaling pathways in the occurrence and metastasis of cutaneous melanoma. *PeerJ* 2020;8:e10265. doi: 10.7717/peerj.10265. Disponible en: <https://peerj.com/articles/10265>.
178. Lupini L, Bassi C, Ferracin M et al. miR-221 affects multiple cancer pathways by modulating the level of hundreds messenger RNAs. *Frontiers in Genetics* APR 2013;4:45878. doi: 10.3389/fgene.2013.00064.
179. Zhou CF, Ma J, Huang L et al. Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1. *Oncogene* 2018 38:8 8 2018;38:1256-68. doi: 10.1038/s41388-018-0511-x. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41388-018-0511-x>.
180. Liu B, Wu S, Ma J et al. lncRNA GAS5 Reverses EMT and Tumor Stem Cell-Mediated Gemcitabine Resistance and Metastasis by Targeting miR-221/SOCS3 in Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2018;13:472-82. doi: 10.1016/j.omtn.2018.09.026. Disponible en: <https://www.cell.com/article/S2162253118302701/fulltext>.
181. Li Y, Wan B, Liu L, Zhou L y Zeng Q. Circular RNA circMTO1 suppresses bladder cancer metastasis by sponging miR-221 and inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 4 2019;508:991-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.046.
182. Ding J, Xu Z, Zhang Y et al. Exosome-mediated miR-222 transferring: An insight into NF- $\kappa$ B-mediated breast cancer metastasis. *Experimental Cell Research* 1 2018;369:129-38. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.014.
183. Lyu J, Zhu Y y Zhang Q. An increased level of MiR-222-3p is associated with TMP2 suppression, ERK activation and is associated with metastasis and a poor prognosis in renal clear cell carcinoma. *Cancer Biomarkers* 2 2020;28:141-9. doi: 10.3233/CBM-190264.

184. Mattia G, Errico MC, Felicetti F et al. Constitutive activation of the ETS-1-miR-222 circuitry in metastatic melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 5 2011;24:953-65. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00881.x. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-148X.2011.00881.x>.
185. Chen CL, Zhang L, Jiao Y rui et al. miR-134 inhibits osteosarcoma cell invasion and metastasis through targeting MMP1 and MMP3 in vitro and in vivo. *FEBS Letters* 10 2019;593:1089-101. doi: 10.1002/1873-3468.13387. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.13387>.
186. Wei Y, Wang Z, Zong Y, Deng D, Chen P y Lu J. LncRNA MFI2-AS1 promotes HCC progression and metastasis by acting as a competing endogenous RNA of miR-134 to upregulate FOXM1 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020;125:109890. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109890.
187. Chen L, Chiang YC, Chan LS et al. The CBP/ $\beta$ -Catenin Antagonist, ICG-001, Inhibits Tumor Metastasis via Blocking of the miR-134/ITGB1 Axis-Mediated Cell Adhesion in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancers* 13 2022;14:3125. doi: 10.3390/cancers14133125. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/13/3125/htm>.
188. Zhang L, Huang P, Li Q, Wang D y Xu CX. miR-134-5p Promotes Stage I Lung Adenocarcinoma Metastasis and Chemoresistance by Targeting DAB2. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2019;18:627-37. doi: 10.1016/j.omtn.2019.09.025. Disponible en: <https://www.cell.com/article/S2162253119302720/fulltext>.
189. Jiang Z, Pei L, Xie Y et al. Ruyiping formula inhibits metastasis via the microRNA-134-SLUG axis in breast cancer. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 1 2021;21:1-10. doi: 10.1186/s12906-021-03365-4.

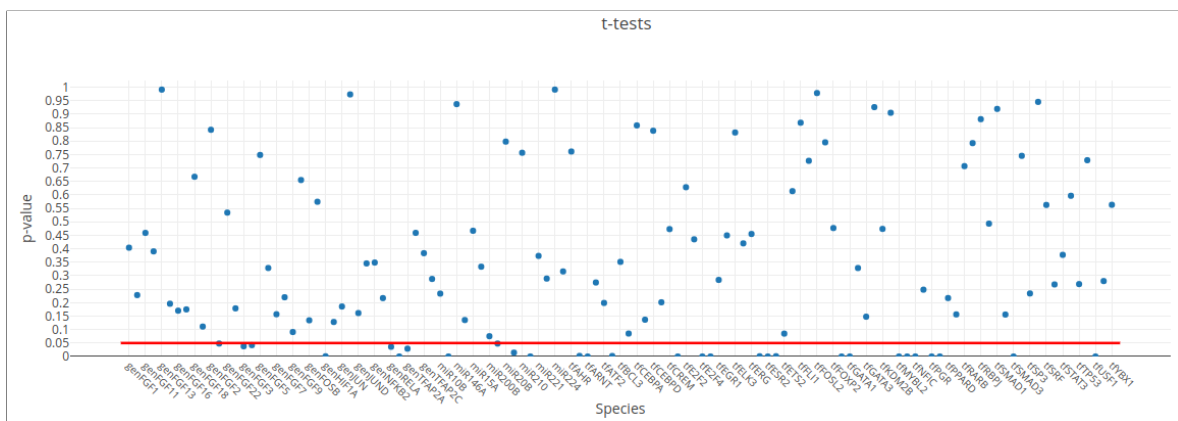
## Anexos

Cuadro 5. Estrategias y resultados de las primeras diez iteraciones. **I** es el número de iteración.

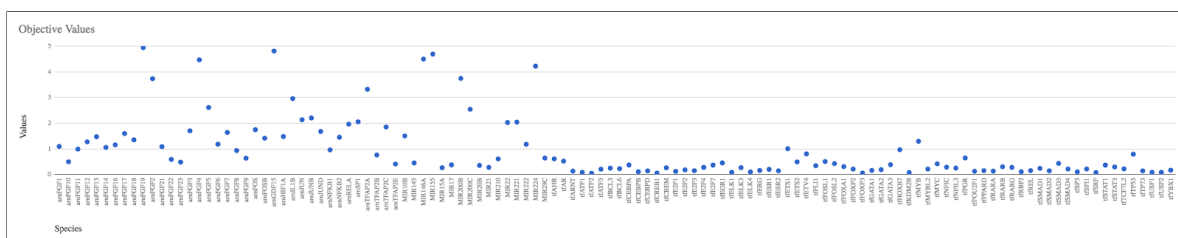
<b>I</b>	<b>Estrategias</b>	<b>Resultados</b>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se removió el Experimento Número 8.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 116.521.</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del Peso de arnPLAUR a 1.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 179.526.</li> <li>• Candidato para ser suprimido: arnFGF19.</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del CGH de arnFGF19 a 0.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 177.754.</li> <li>• Candidato para ser suprimido: arnGDF15.</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del CGH de arnGDF15 a 0.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 177.016.</li> <li>• Candidato para ser suprimido: miR146A.</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del CGH de miR146A a 0.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 176.546.</li> <li>• Candidato para ser suprimido: miR155.</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del CGH de miR155 a 0.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 176.545.</li> <li>• Candidato para ser suprimido: arnFGF4.</li> </ul>

Cuadro 5. Estrategias y resultados de las primeras diez iteraciones. **I** es el número de iteración (continuación).

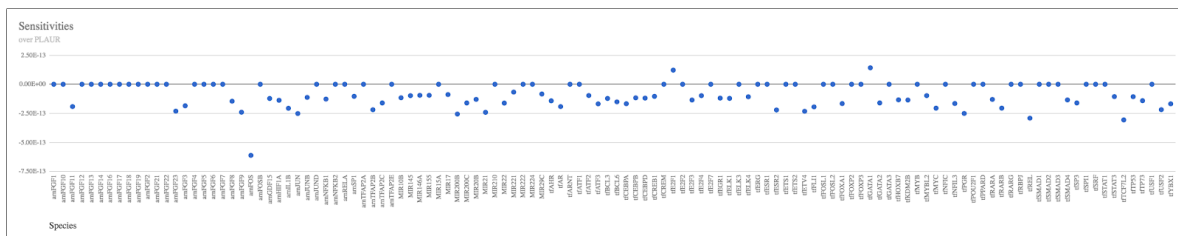
<b>I</b>	<b>Estrategias</b>	<b>Resultados</b>
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del CGH de arnFGF4 a 0.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 176.492.</li> <li>• Candidato para ser suprimido: arnFGF2.</li> </ul>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ajustó el valor del CGH de arnFGF2 a 0.</li> <li>• Se ejecutó la Estimación de Parámetros.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis de Sensibilidad.</li> <li>• Se ejecutó el Análisis Estadístico de ‘t-test’.</li> <li>• Se ejecutaron simulaciones de Estado Estable y Curso del Tiempo de miR22 y miR20B sobre arnPLAUR, amplificando ambas especies independiente y simultáneamente, mediante el ajuste de los valores de sus parámetros ks (síntesis) multiplicados por 100.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor de la Función Objetivo: 176.49.</li> <li>• Simulación de Estado Estable mostró posible influencia de miR22 y miR20B sobre arnPLAUR.</li> <li>• Simulaciones de Curso del Tiempo mostraron influencia no significativa por parte de miR22 y miR20B sobre arnPLAUR.</li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se retornó el modelo a la Iteración 2.</li> <li>• Se ejecutó una simulación de Curso del Tiempo suprimiendo todas las especies, mediante el ajuste de los valores de CGH a 0.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simulaciones de Curso del Tiempo mostraron influencia no significativa por parte de ninguna supresión de alguna especie sobre arnPLAUR.</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ejecutó una simulación de Curso del Tiempo amplificando todas las especies independientemente, mediante el ajuste de los valores de sus parámetros ks multiplicados por 10.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simulaciones de Curso del Tiempo mostraron influencia no significativa por parte de ninguna amplificación de alguna especie sobre arnPLAUR.</li> </ul>



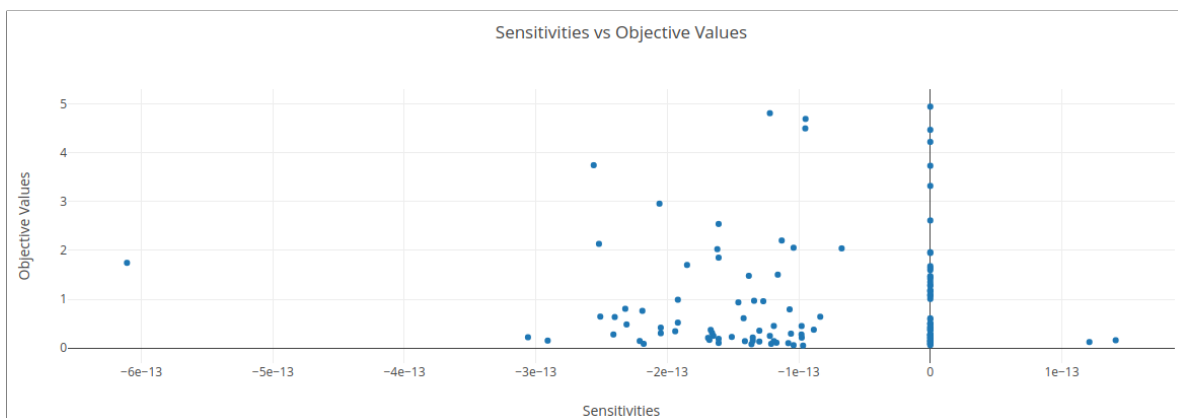
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

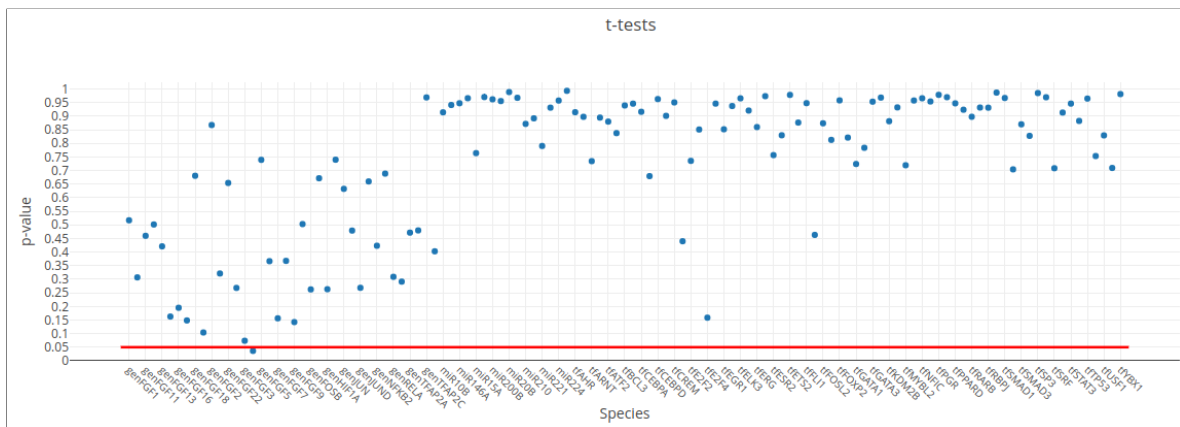


(c) Sensibilidad

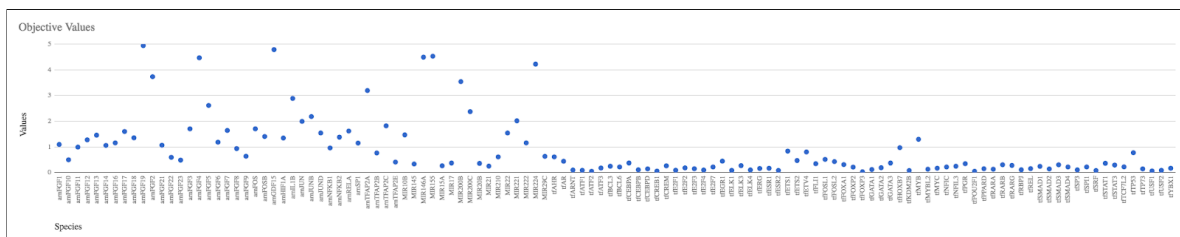


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

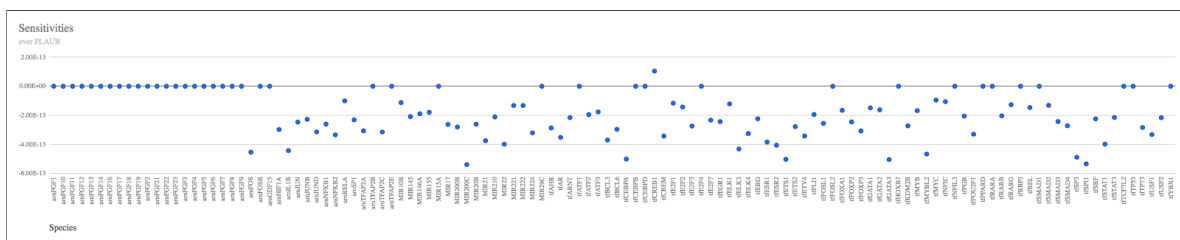
Figura 40. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 1.



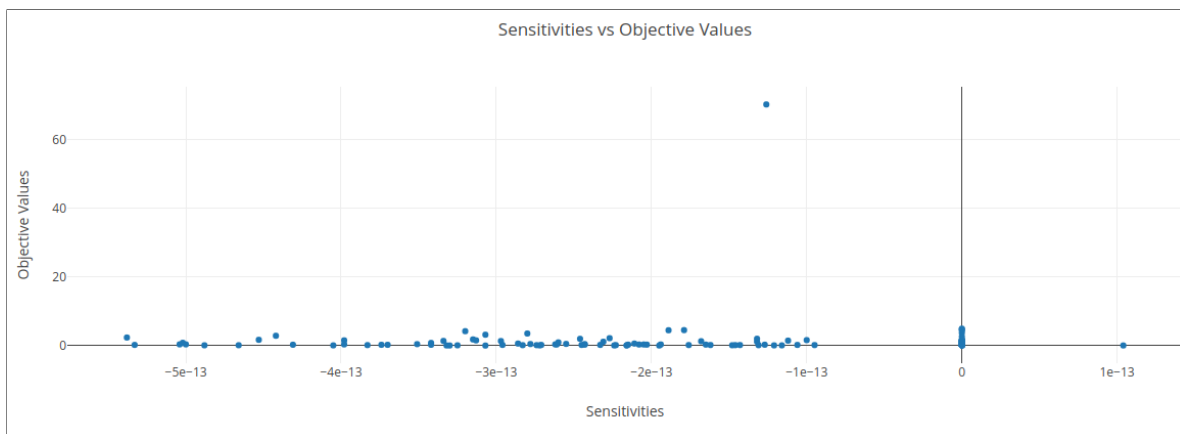
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

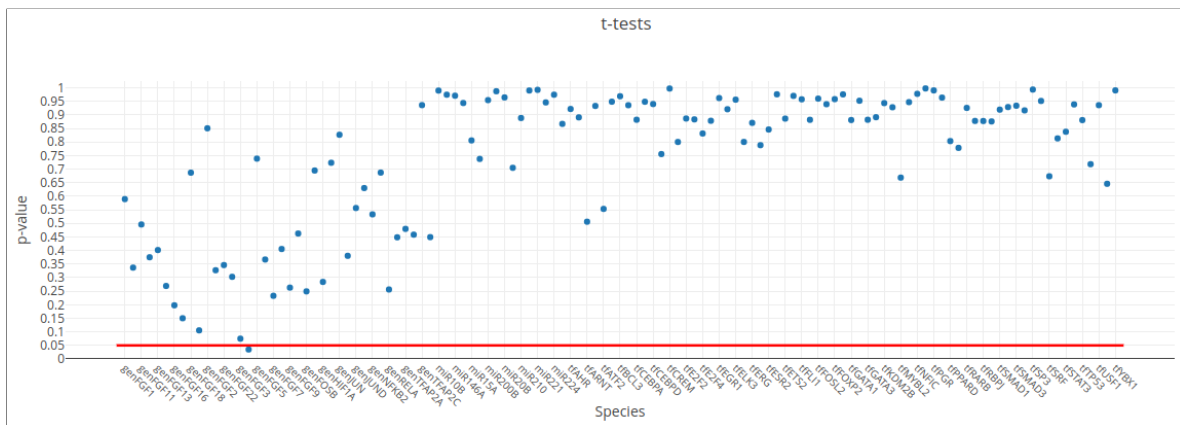


(c) Sensibilidad

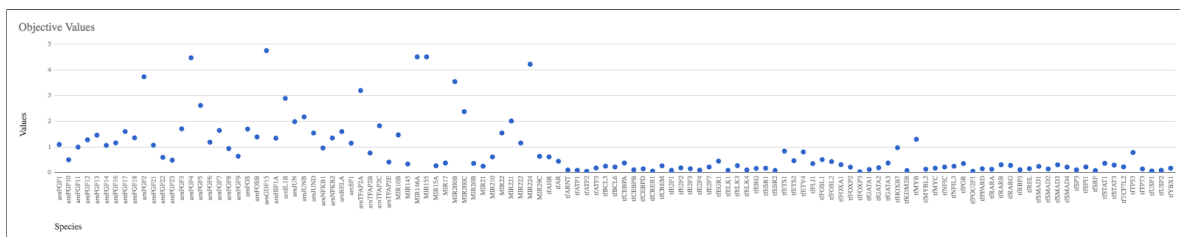


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

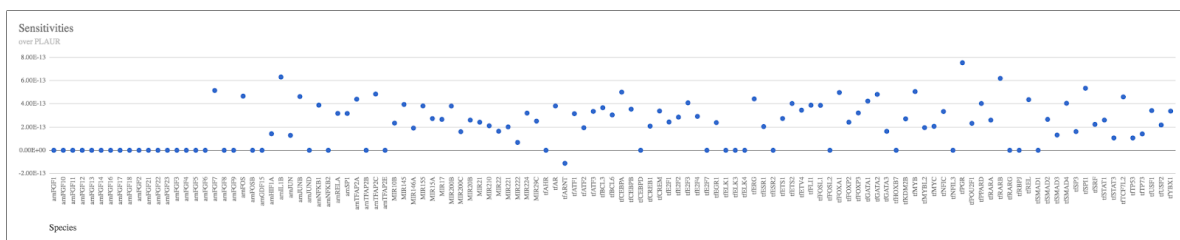
Figura 41. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 2.



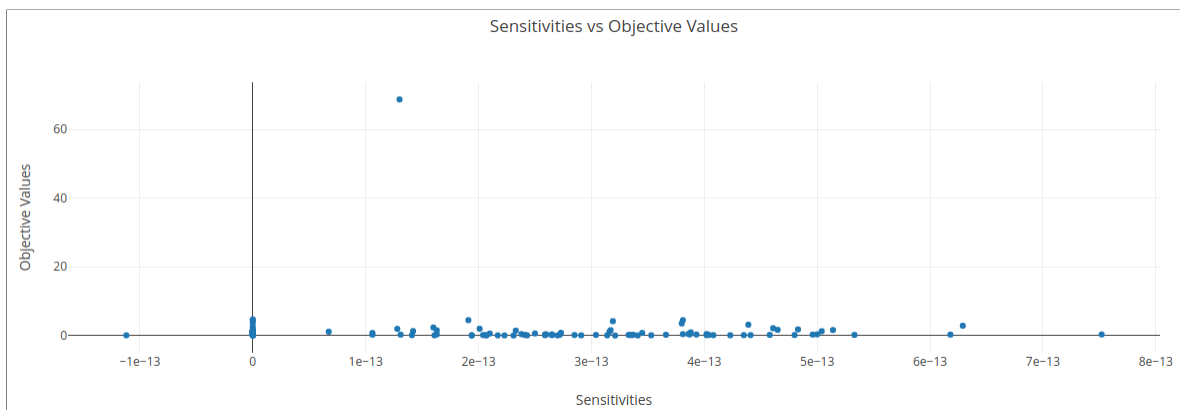
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

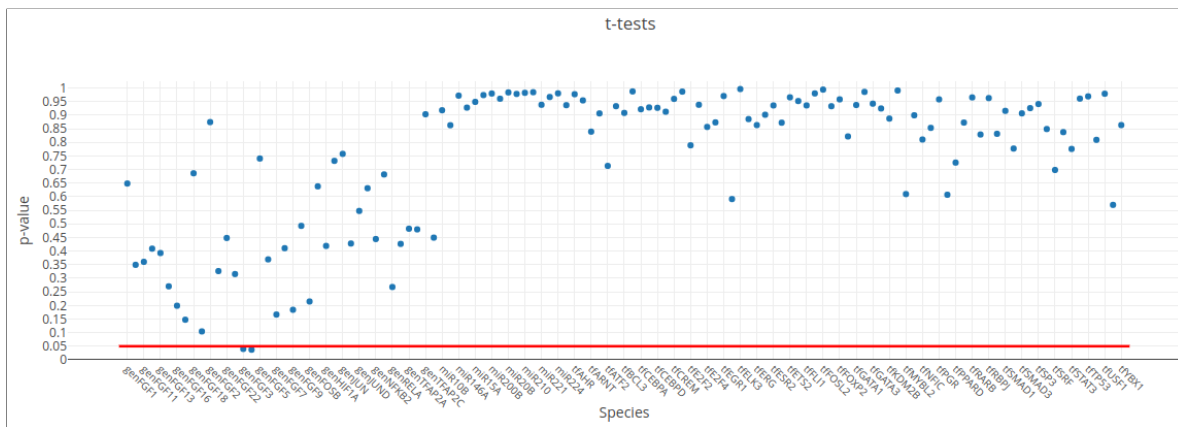


(c) Sensibilidad

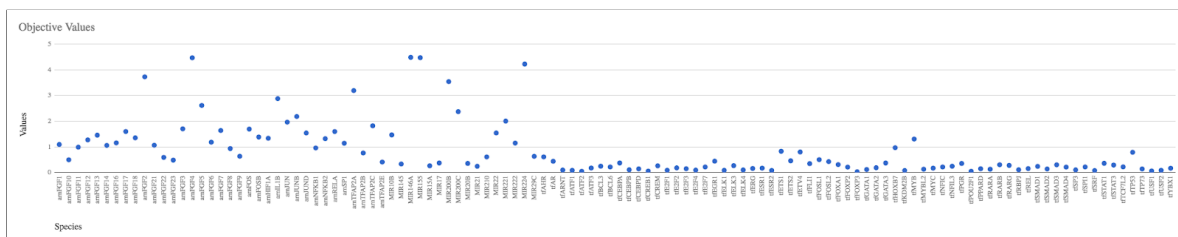


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

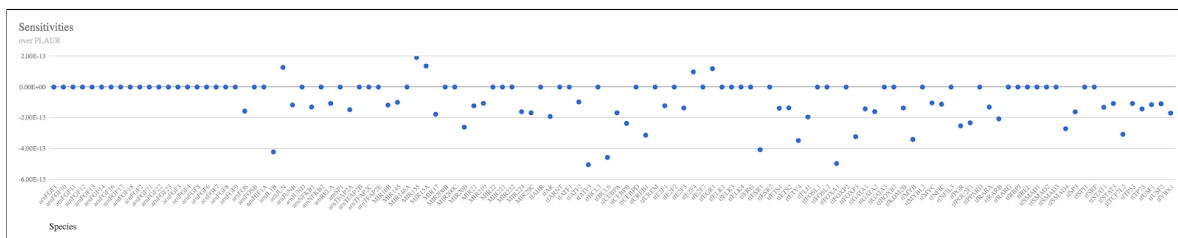
Figura 42. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 3.



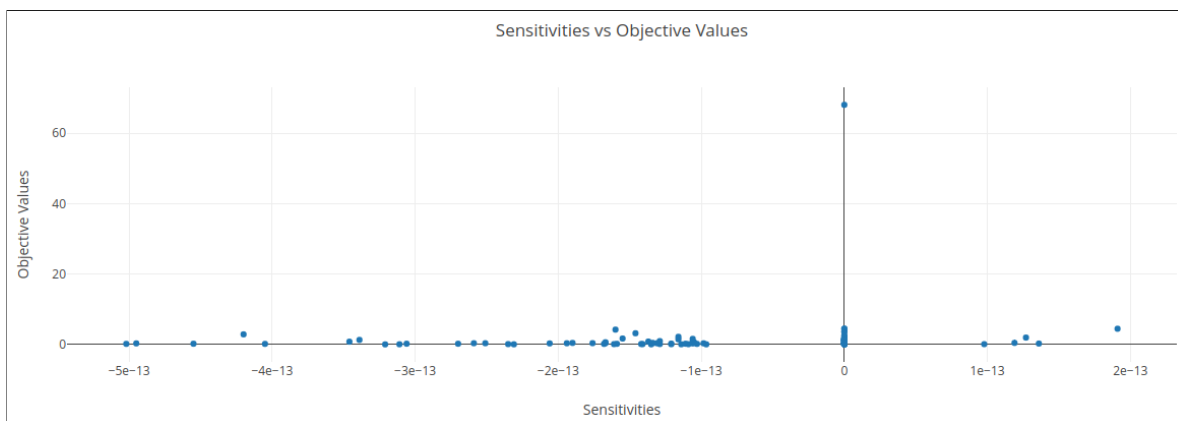
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

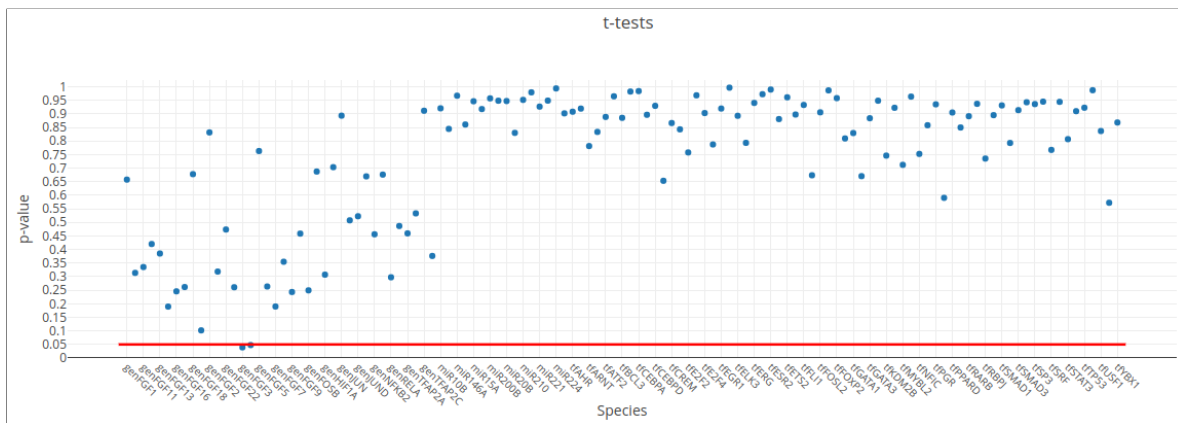


(c) Sensibilidad

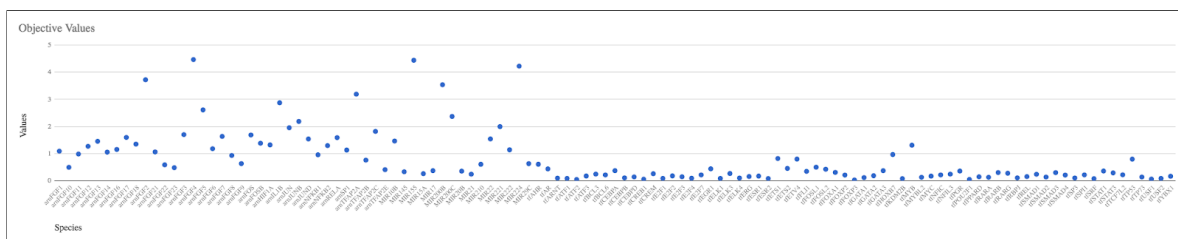


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

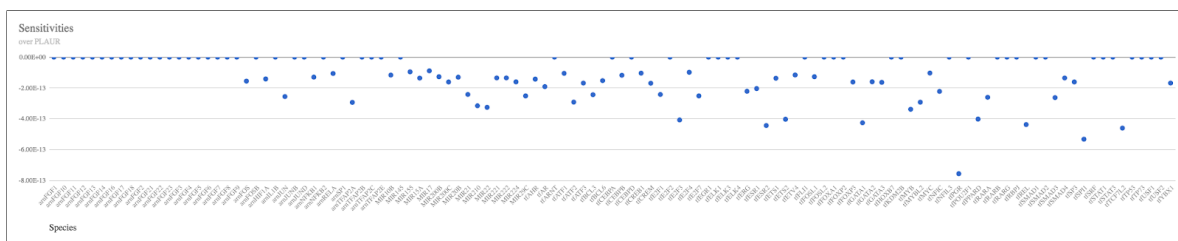
Figura 43. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 4.



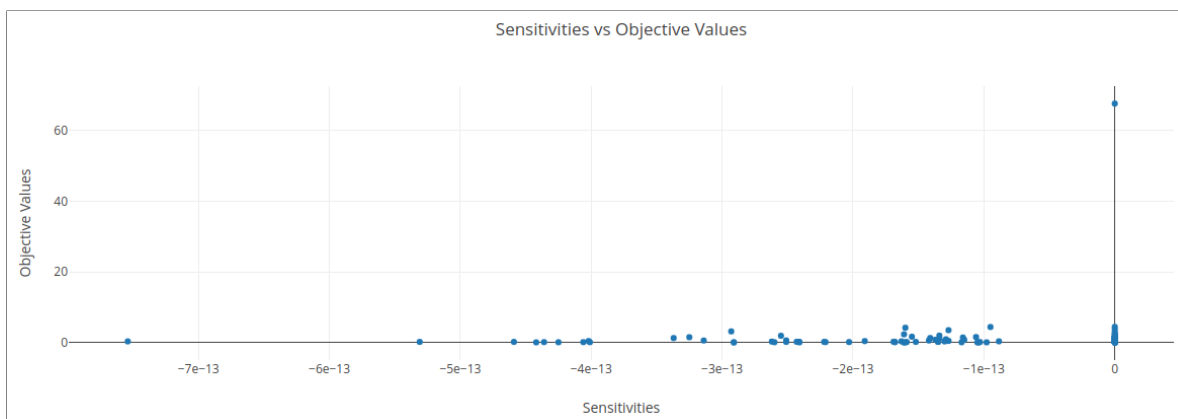
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

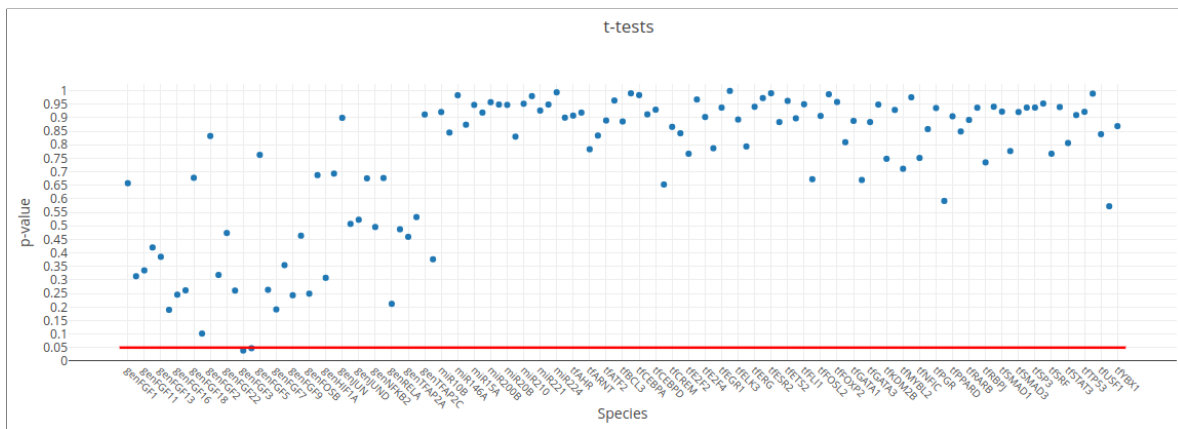


(c) Sensibilidad

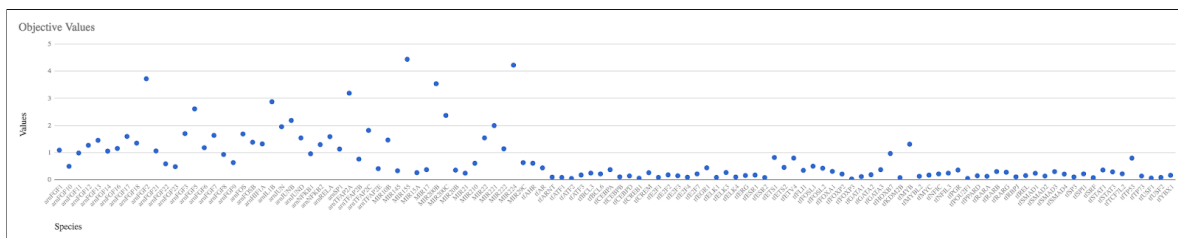


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

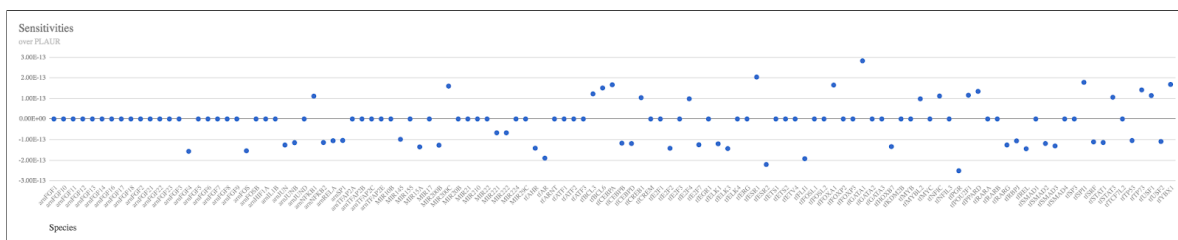
Figura 44. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 5.



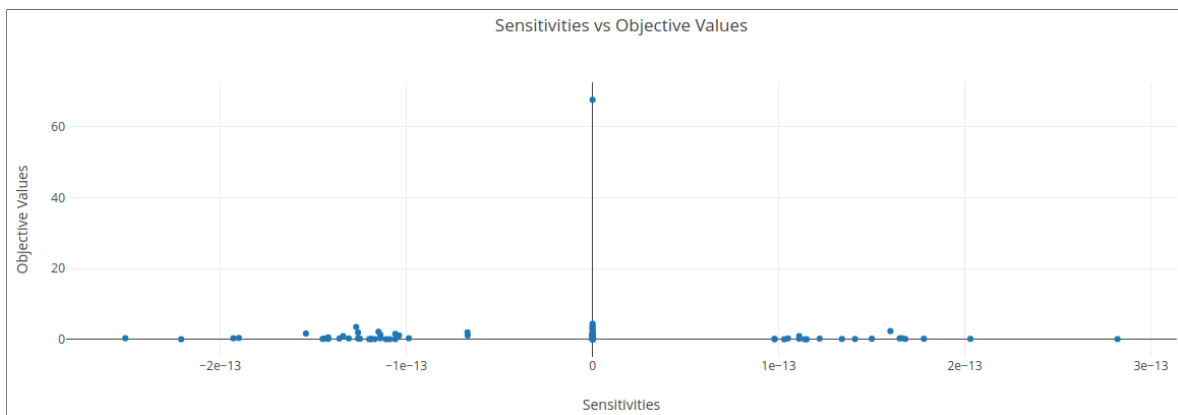
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

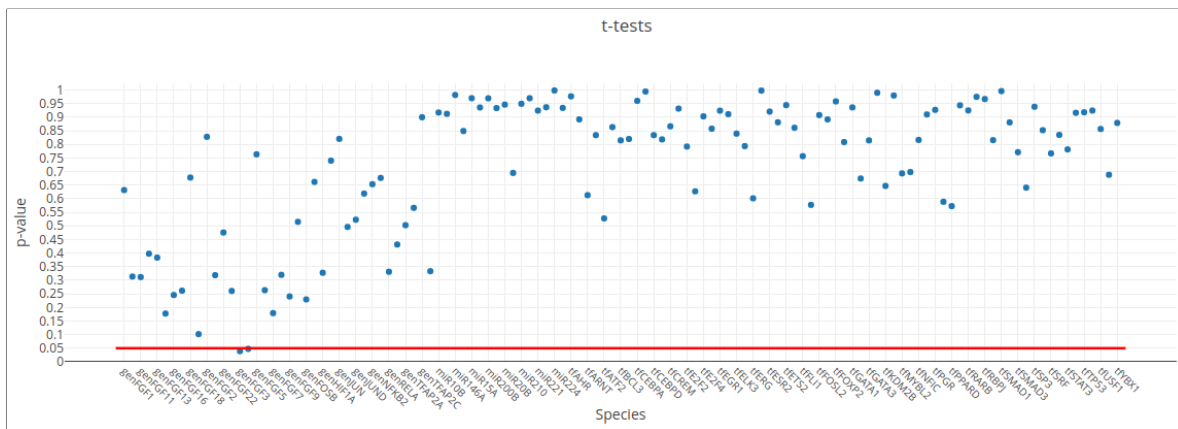


(c) Sensibilidad

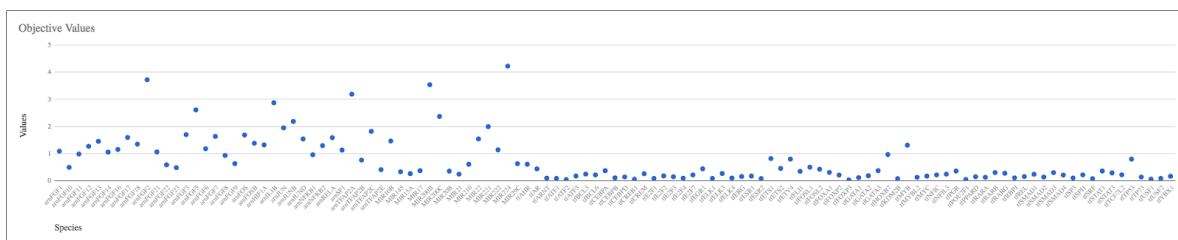


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

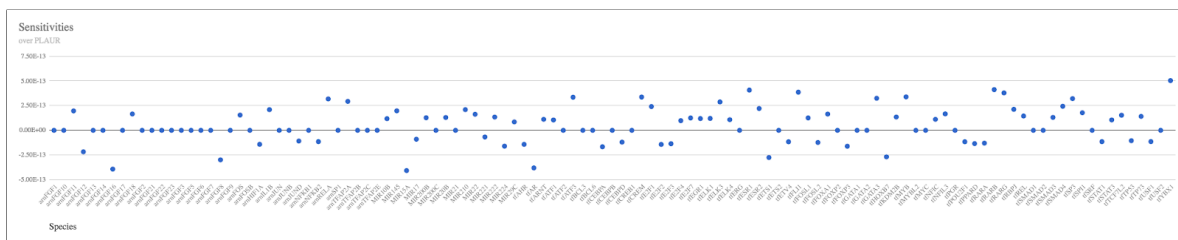
Figura 45. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 6.



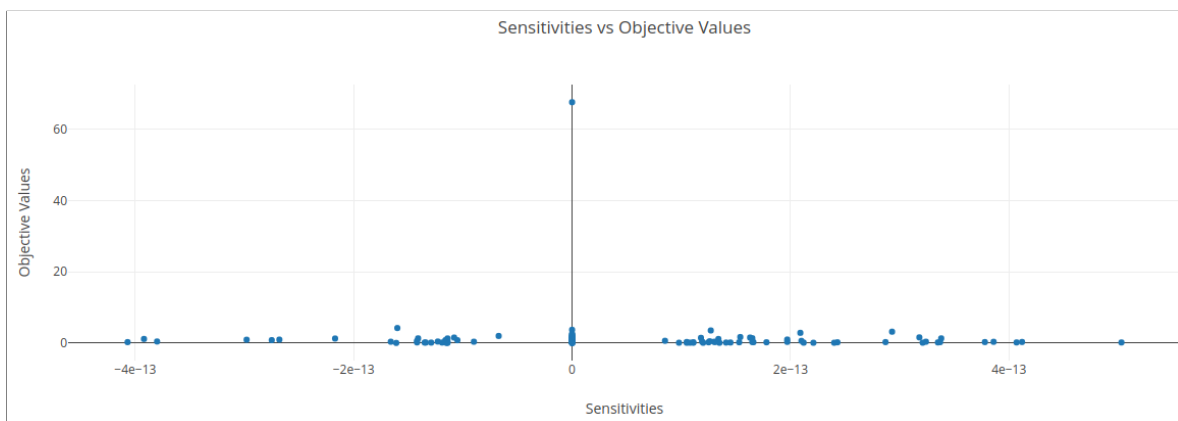
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

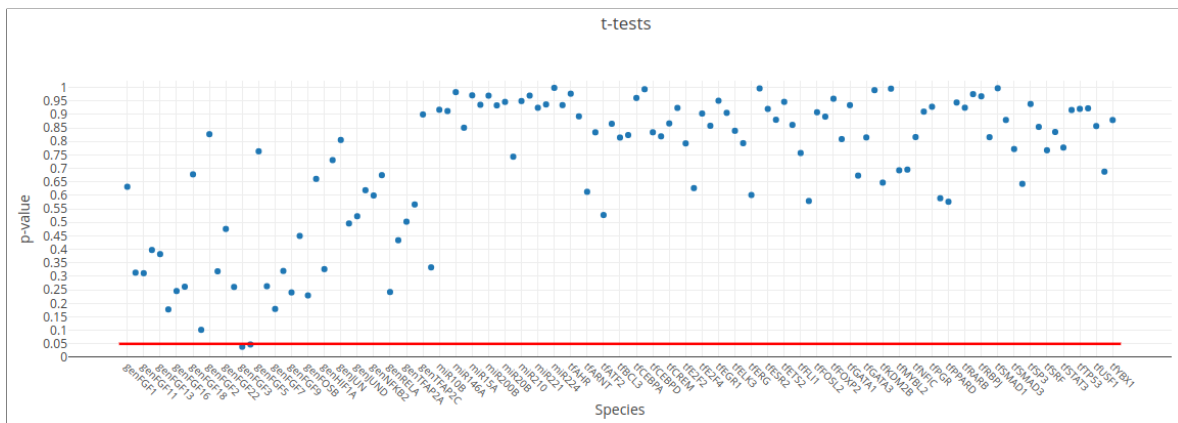


(c) Sensibilidad

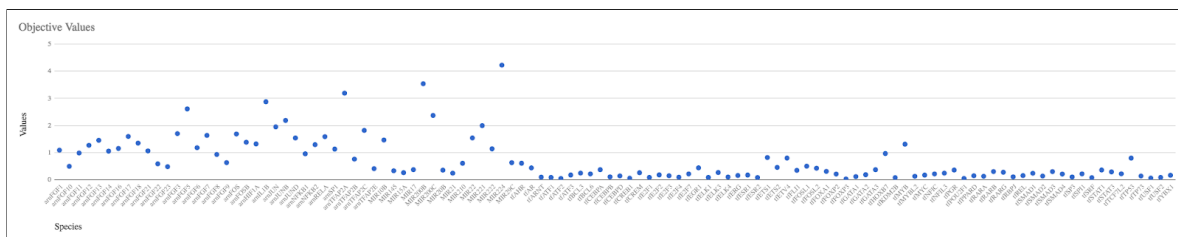


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

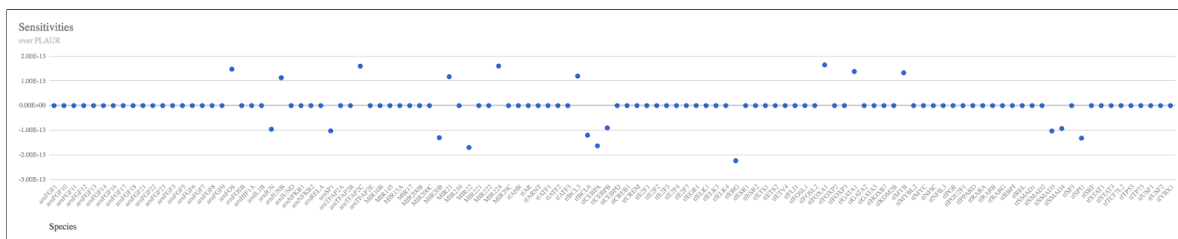
Figura 46. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 7.



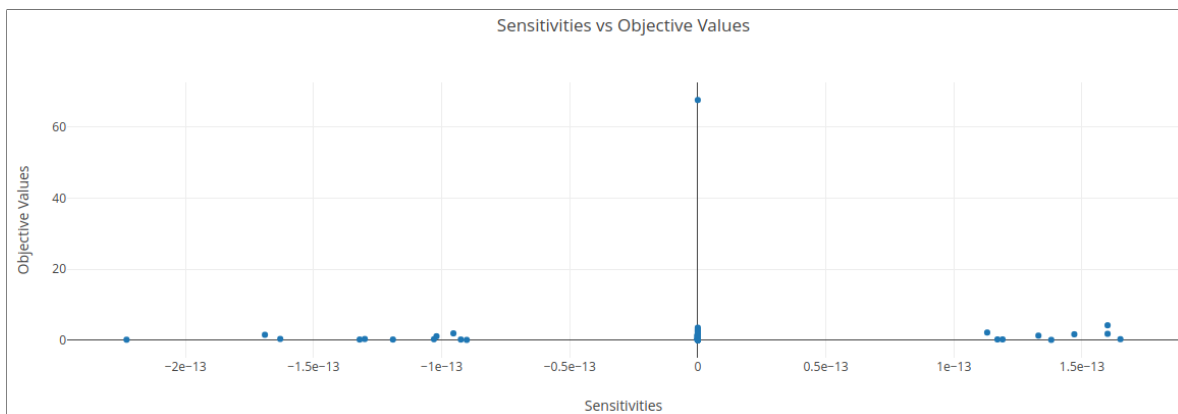
(a) Prueba estadística



(b) Valores Objetivo

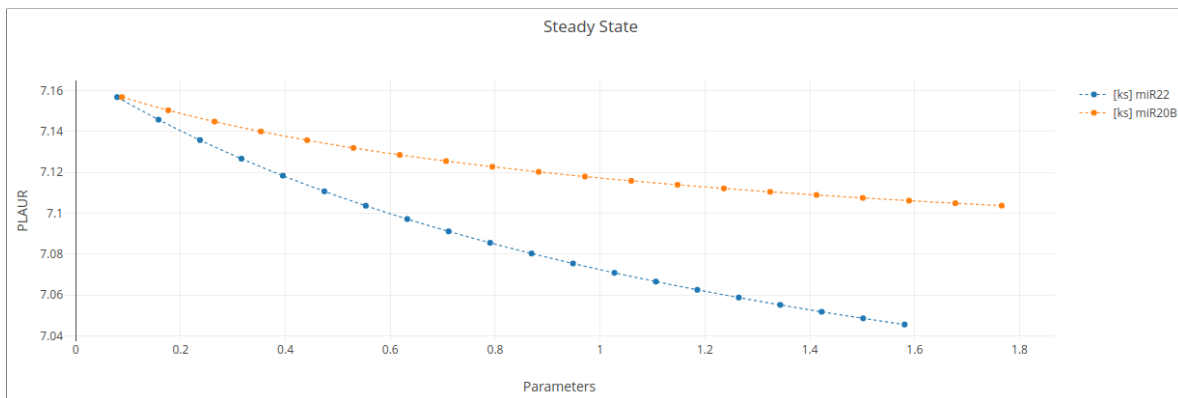


(c) Sensibilidad

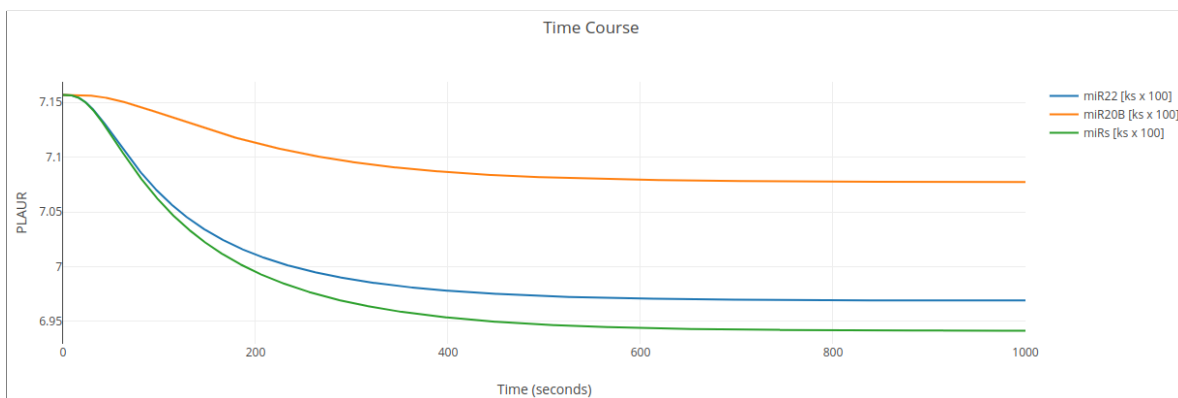


(d) Sensibilidad vs Valores Objetivo

Figura 47. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 8.



(e) Simulación de Estado Estable de la síntesis (aumentando al doble el valor de los parámetros “ks” y comenzando desde 0) de miR22 y mirR20B.



(f) Simulación de Curso del Tiempo, de 0 a 1000 segundos, de la síntesis (aumentando 100 veces el valor de los parámetros “ks”) de miR22 y mirR20B, tanto independiente como simultáneamente.

Figura 47. Gráficos con los resultados de los análisis de la iteración 8 (continuación).

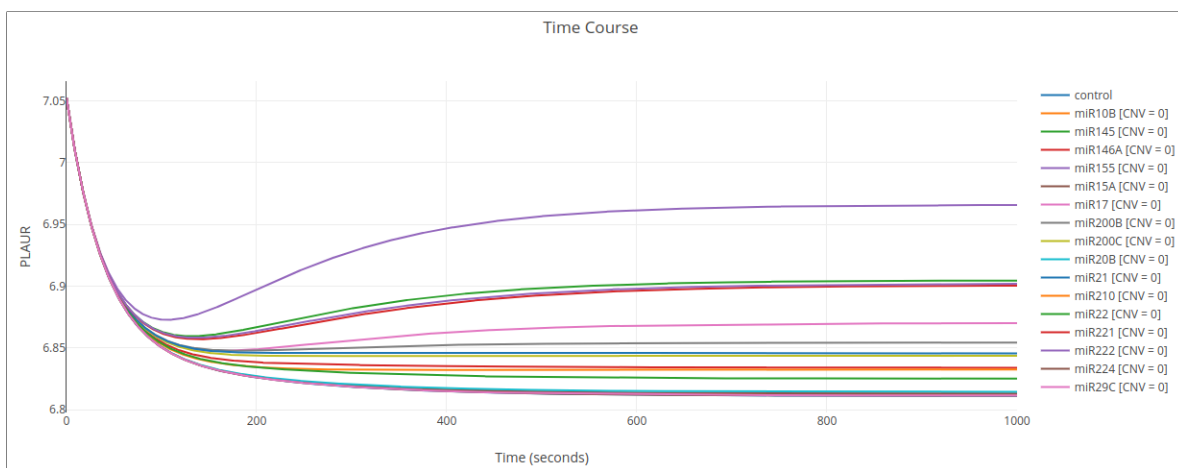


Figura 48. Simulación de Curso del Tiempo, de 0 a 1000 segundos, del descarte (ajustando los valores de CGH a 0) de todos los microARNs independiente, de la iteración 9.

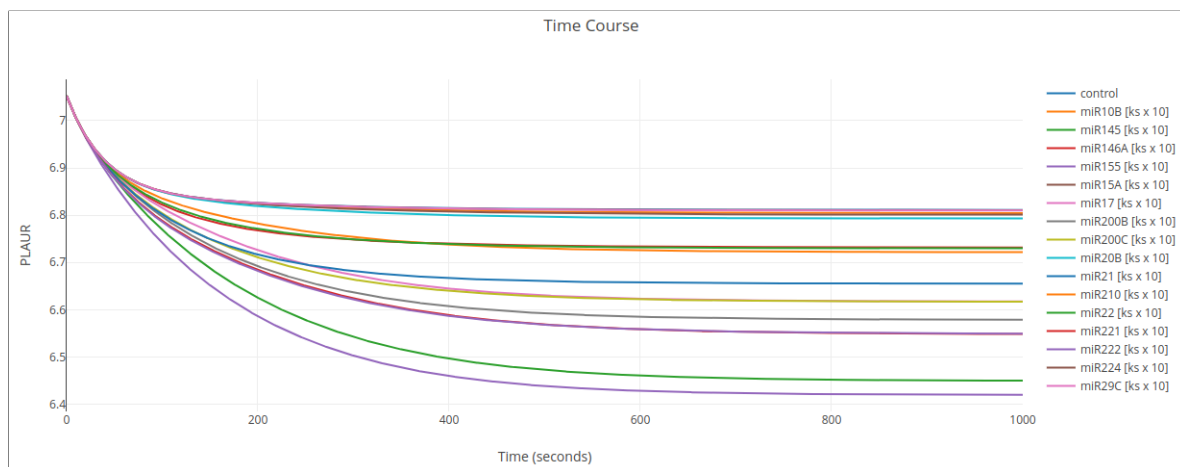


Figura 49. Simulación de Curso del Tiempo, de 0 a 1000 segundos, de la síntesis (aumentando 10 veces el valor de los parámetros “ks”) de todos los microARNs independiente, de la iteración 10.