



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

TESIS

“Efecto de la proteína recombinante LRG1 (rh_LRG1) sobre la viabilidad y el transcriptoma de células de cáncer de mama.”

Para obtener el grado de:

MAESTRO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Daniela Michel Díaz González

Director:

Elizabeth Bautista Rodríguez

Co-directores:

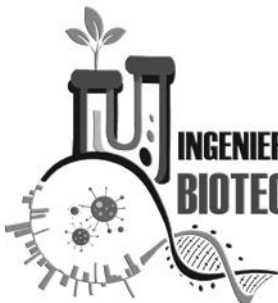
Federico Osorio Antonio

Gabriela Campos Viguri

Asesores:

Paola Maycotte

Paulina Cortes Hernández



**INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

Puebla, Pue.

2023



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	6
1. <i>Antecedentes</i>	6
2. <i>Planteamiento del problema</i>	7
3. <i>Justificación</i>	7
4. <i>Hipótesis</i>	8
5. <i>Objetivos</i>	8
5.1 <i>Objetivo general</i>	8
5.2 <i>Objetivos específicos</i>	8
Capítulo II: Marco teórico	9
1. <i>Cáncer</i>	9
1.1 <i>Cáncer de mama</i>	10
1.2 <i>Epidemiología</i>	11
1.3 <i>Clasificación molecular</i>	12
1.3.1 <i>Cáncer de mama Luminal A</i>	13
1.3.2 <i>Cáncer de mama Luminal B</i>	13
1.3.3 <i>Cáncer de mama basal</i>	14
1.3.3.1 <i>Cáncer de mama triple negativo</i>	14
1.3.4 <i>Cáncer de mama con sobreexpresión de HER2</i>	15
2. <i>Líneas celulares</i>	15
2.1 <i>MDA-MB-231</i>	15
2.2 <i>MDA-MB-468</i>	16
2.3 <i>BT549</i>	16
3. <i>LRG1</i>	17
3.1 <i>Funciones de LRG1</i>	17
3.2 <i>LRG1 y su participación en el cáncer</i>	19
Capítulo III: Metodología	21
1. <i>Cultivo celular</i>	21

2.	<i>Determinación de la viabilidad celular</i>	21
3.	<i>Perfil de expresión génica</i>	21
4.	<i>Formación de redes de interacción</i>	23
5.	<i>Validación de los resultados obtenidos por microarreglos</i>	24
Capítulo IV: Resultados		24
1.	<i>Efecto de rh_LRG1 sobre la viabilidad celular</i>	24
2.	<i>Análisis del perfil de expresión génica</i>	25
3.	<i>Formación de redes de interacción</i>	27
4.	<i>Validación de los genes diferencialmente expresados</i>	30
Capítulo V: Discusión de resultados		31
1.	<i>Conclusión</i>	38
Referencias:		38

Abreviaturas

ADNc	ADN complementario
ADRB2	Receptor adrenergico 2 beta
ALK1	Quinasa 1 similar al receptor de activina
ALK5	Quinasa 5 similar al receptor de activina
APC	Adenomatous polyposis coli
ARNm	ARN mensajero
ARNsh	ARN de horquilla pequeña
ASK	Subunidad beta de la aspartoquinasa
AURKA	Aurora quinasa A
BRD2	Proteína 2 que contiene bromodominio
CA125	Mucina 16
CBLC	Proteína de transducción de señales CBL-C
CD3G	Cadena gamma de la glicoproteína CD3
CD74	Cadena gamma del antígeno de histocompatibilidad HLA clase II
CDH13	Cadherina 13
CLU	Clusterina
CTR	Control
CTTN	Cortactina
CUTL1	Proteína 1 tipo Cut
Cyt c	Citocromo c
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptores del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio mesenquima
ENG	Endoglina
ESCC	Carcinoma de células escamosas de esófago
ET1	Endotelina 1
ETV7	Factor de transcripción variante 7 de ETS
FGF3	Proteína del protooncogén INT-2

FGF8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
GPR19	Receptor acoplado a proteína G 19
GSTA4	Glutación S-transferasa A4
GUK1	Guanilato quinasa
HER2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HSD17B2	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
IFN	Interferón
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
ITGA7	Integrina alfa-7
JAK	Janus quinasa
LRG1	glicoproteína 2 α rica en leucina 1
LRR	Rica en repeticiones de leucina
MAP3K1	MAP 3 cinasa 1
MAP3K7	Proteína 3 cinasa7 activada por mitógeno
MHCII	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MTAP	S-metil-5'-tioadenosina fosforilasa
MYBL1	Protooncogén MYB Like 1
NDP	Norrin
NG2	Antígeno glial neuronal prometastásico 2
NQO1	NADPH deshidrogenasa quinona 1
PART1	transcripción 1 regulada por andrógenos de próstata
PDCD6	Proteína de muerte celular programada 6
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa
PIM1	Serina/treonina-proteína quinasa pim-1
PTTG1IP	Proteína que interactúa con la proteína del gen 1 transformador de tumores hipofisarios
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAB33A	Proteína relacionada con Ras Rab-33A

RE	receptor de estrógeno
rh_LRG1	LRG1 recombinante
RP	receptor de progesterona
RPL22	Proteína ribosomal 60S L22
SAGE	Análisis en serie de la expresión génica
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
SSPN	Sarcospan
STAT	Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
TGFB	factor de crecimiento transformante beta
TPX2	Proteína de orientación para Xklp2
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
XRCC1	Proteína de reparación de ADN XRCC1
ZNF6	Proteína de dedo de zinc 6

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por las células que conforman al tumor son deficientes en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por su siglas en inglés), la deficiencia de estos receptores presenta un desafío en la búsqueda de un tratamiento terapéutico, ya que las opciones con las que se cuenta actualmente son poco efectivas, se genera resistencia farmacológica y hace que la respuesta a la terapia sea baja (Dass et al., 2021). De acuerdo con un estudio realizado por Medina y colaboradores (2020) existen múltiples familias de ligandos y receptores transmembranales que intervienen en la proliferación y diferenciación celular, así como en la expresión elevada de un grupo de moléculas de señalización que se correlaciona con un peor pronóstico para los pacientes. En consecuencia, se han incrementado los esfuerzos por encontrar biomarcadores que coadyuven al diagnóstico temprano y pronóstico de cáncer de mama triple negativo, lo anterior también con el fin de analizar el papel fisiológico de estos biomarcadores y ubicarlos como potenciales blancos terapéuticos. En relación la glicoproteína

2 α rica en leucina 1 (LRG1) se ha puesto en estudio en diferentes tipos de cáncer ya que se encuentra aumenta en suero y en tejido tumoral triple negativo y HER2 positivo.

2. Planteamiento del problema

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células, las cuales han adquirido la capacidad de evadir los mecanismos de muerte celular y el sistema inmune, además pueden desarrollar la capacidad para migrar e invadir otros tejidos.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, específicamente en México, durante 2020 se diagnosticaron más de 195 mil nuevos casos de cáncer incluyendo hombres y mujeres, entre estos casos el 15.3% fueron de cáncer de mama, este porcentaje convierte a este tipo de cáncer como el más común entre la población mexicana. De los subtipos moleculares del cáncer de mama el triple negativo es el menos frecuente en la población sin embargo es el más agresivo, que presenta resistencia farmacológica, recidiva y no existe terapia dirigida. Debido a ello se han sumado esfuerzos por encontrar biomarcadores para realizar diagnósticos tempranos y pronóstico del cáncer de mama triple negativo, lo anterior también con el fin de analizar el papel fisiológico de estos biomarcadores y ubicarlos como potenciales blancos terapéuticos. LRG1 es una glicoproteína que, de acuerdo a The Human Protein Atlas, está presente en varios tipos de cáncer como: carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, carcinoma endometrial, cáncer gástrico, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, de vejiga y cáncer de mama. Se a detectado en suero de pacientes con cancer de mama correlacionando su expresión con un mal pronóstico, la presencia de metástasis y la propagación del cáncer de mama a nódulos linfáticos.

Por lo tanto, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el papel de la proteína LRG1 sobre la viabilidad y el transcriptoma de células de cáncer de mama de tipo triple negativo?

3. Justificación

Se ha demostrado que LRG1 es un potencial biomarcador en cáncer mama y está presente

principalmente en el fenotipo tumoral triple negativo y HER2+(Y. S. Zhang et al., 2021), además de que se ha propuesto como un biomarcador de la respuesta al tratamiento con inhibidores de aromatasa (Ramírez-Ardila et al., 2016). A pesar de estos hallazgos poco se sabe de su papel en la fisiopatología del cáncer de mama, así como de las vías de señalización por las que actúa. Al respecto podríamos hipotetizar que está relacionado con la regulación de la vía de señalización de TGF β ya se ha demostrado que puede interactuar con TGF β 1 y actuar como mitogéno y angiogénico al unirse a ALK1 y al receptor accesorio endoglina o a ALK5 (X. Wang et al., 2013). Si bien estos datos son asociados a funciones fisiológicas, son sumamente relevantes ya que TGF β en etapas tempranas de desarrollo tumoral actúa como molécula supresora de tumores, sin embargo, en estadios avanzados del cáncer de mama es expresado en altas concentraciones promoviendo la transición epitelio mesénquima (EMT) y por lo tanto la inducción de la migración, invasión y metástasis, especialmente de la metástasis ósea ya que el hueso es el principal repositorio de TGF β . Por esta razón, consideramos que el estudio del perfil de expresión diferencial que induce LRG1 podría generar un amplio espectro sobre las vías de señalización en las que participa en el cáncer de mama triple negativo.

4. Hipótesis

El tratamiento con LRG1 humana recombinante (rh_LRG1) aumenta la viabilidad de células de cáncer de mama triple negativo e induce la regulación de genes asociados a la cascada de señalización de TGF β .

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la proteína recombinante LRG1 sobre la viabilidad celular y perfil diferencial de expresión de genes en células de cáncer de mama triple negativo con la finalidad de comprender su efecto y su papel en dicha patología.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la proteína recombinante LRG1 (rh_LRG1) sobre la viabilidad de diferentes líneas celulares de cáncer de mama mediante el ensayo MTT.

- Determinar mediante la tecnología de microarreglos el perfil de expresión de genes relacionados a cáncer de mama en células MDA-MB-231 tratadas con rh_LRG1.
- Realizar análisis de enriquecimiento basados en los datos transcriptómicos obtenidos en el ensayo de microarreglos para establecer su relación con el cáncer de mama.

Capítulo II: Marco teórico

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja que incluye diversos tumores caracterizados por distintas morfologías, comportamiento e implicaciones clínicas. En células normales, el crecimiento está regulado por diversas señalizaciones relacionadas con el control de la proliferación y el mantenimiento de la homeostasis tisular; sin embargo, en células cancerosas, el crecimiento y las vías de señalización proliferativas sufren múltiples mutaciones, por ejemplo, en los factores de crecimiento, sus receptores, en moléculas de señalización o proteínas implicadas en los sistemas de reparación o de inducción de la apoptosis (Dai et al., 2016; Fouad & Aanei, 2017).

Hanahan & Weinberg (2000, 2011) han señalado que las características principales del cáncer son autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis e invasión, metástasis tisulares, reprogramación del metabolismo energético, evasión de la respuesta inmunitaria e inestabilidad genómica (Fouad & Aanei, 2017)

La carcinogenesis se produce en diferentes etapas, en la iniciación involucra la aparición de mutaciones en los genes de manera espontáneamente o son inducidos por la exposición a un agente cancerígeno. En la etapa de promoción se acumulan células preneoplásicas en proliferación activa, esta fase se considera el punto medio entre una lesión premaligna y el desarrollo de cáncer invasivo. En la etapa final, progresión, ocurren cambios genéticos y fenotípicos que aumentan la proliferación celular y por lo tanto el tamaño del tumor, además, las células pueden sufrir más mutaciones para volverse metastásico. La metástasis implica la diseminación de células cancerosas desde el sitio primario a otras partes del cuerpo a través de

los vasos sanguíneo o el sistema linfático (Figura 1) (Siddiqui et al., 2015).

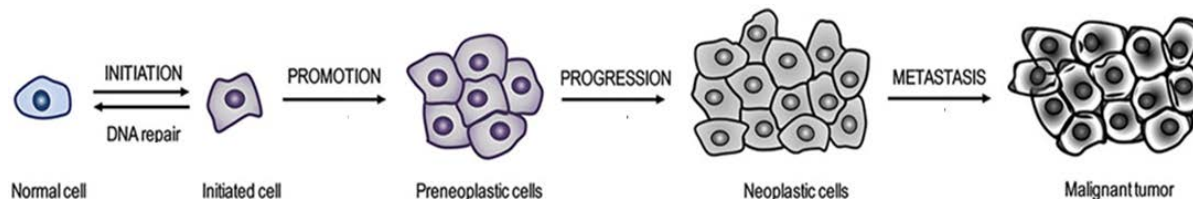


Figura 1. Etapas del desarrollo tumoral. Iniciación: mutaciones en los genes de manera espontáneamente o inducidas por la exposición a un agente cancerígeno. Promoción: se acumulan células preneoplásicas en proliferación activa. Progresión: ocurren cambios genéticos y fenotípicos que aumentan la proliferación. Las células pueden sufrir más mutaciones para volverse metastásico para diseminarse desde el sitio primario a otras partes del cuerpo a través de los vasos sanguíneo o el sistema linfático (Siddiqui et al., 2015).

1.1 Cáncer de mama

Los senos o mamas son órganos glandulares muy sensibles a los cambios hormonales en el cuerpo, están formados por tejido adiposo, tejido glandular, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ganglios linfáticos, tejido conjuntivo fibroso y ligamentos, así como lóbulos y lobulillos que están conectados a través de conductos lácteos (Hassiotou & Geddes, 2013).

El cáncer de mama es una enfermedad que puede producirse en cualquier tejido que compone al seno, al igual que cualquier otro tipo de cáncer, las células afectadas presentan mutaciones relacionadas principalmente con el ciclo celular, sin embargo, según el sitio en que se desarrolla, se puede clasificar en cánceres de mama invasivos y no invasivos (Waks & Winer, 2019).

El cáncer de mama no invasivo o in situ permanece en el lóbulo o los conductos donde se origina, pero pueden progresar y convertirse en cáncer de mama invasivo. Estos tipos de cáncer se pueden subdividir como carcinoma lobulillar in situ que se desarrolla en lóbulos mamarios y carcinoma ductal in situ que se limita al conducto mamario (Akram et al., 2017).

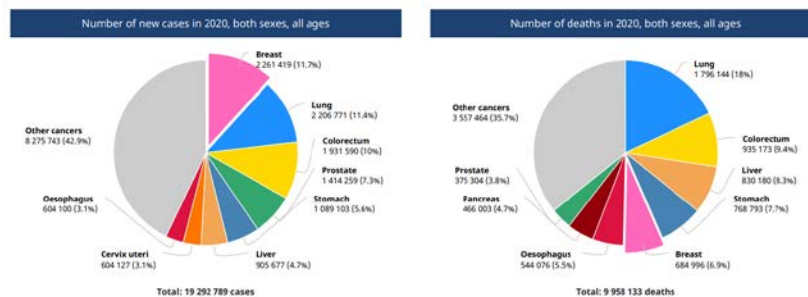
En el cáncer de mama invasivo las células anormales de los lobulillos o los conductos lácteos se separan en las proximidades del tejido mamario permitiendo que las células cancerosas puedan pasar a través del seno a diferentes partes del cuerpo a través del sistema linfático o

circulatorio (West et al., 2017). Ocurre con mayor frecuencia en las mujeres y suele propagarse especialmente al cerebro, los huesos, los pulmones y el hígado. en este caso la subdivisión incluye el carcinoma lobulillar infiltrante que se origina en las glándulas mamarias (lóbulos) de la mama, carcinoma ductal infiltrante que se origina en los conductos lactíferos de la mama y se extiende a la pared del conducto, invadiendo los tejidos grasos de la mama y otras partes del cuerpo, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloide que se genera por las células cancerosas formadoras de moco, carcinoma tubular (Inoue et al., 2017).

1.2 Epidemiologia

En los últimos datos registrados por el International Agency for Research on Cancer (2020) se reportaron casi 9.958 millones de muertes a causa del cáncer a nivel mundial en el 2020, 6.9% fue a causa especialmente del cáncer de mama. Además, se detectaron 2.261 millones de nuevos casos de cáncer de mama a nivel mundial representando el 11.7% de todos los casos de cáncer diagnosticados (Figura 2A). En América latina y el Caribe durante 2020 casi 200 mil personas fueron diagnosticadas con cáncer de mama y más de 52 mil murieron a causa de esta enfermedad (Global Observatory of cancer (Globocan) et al., 2021) (Figura 2B).

A)



B)

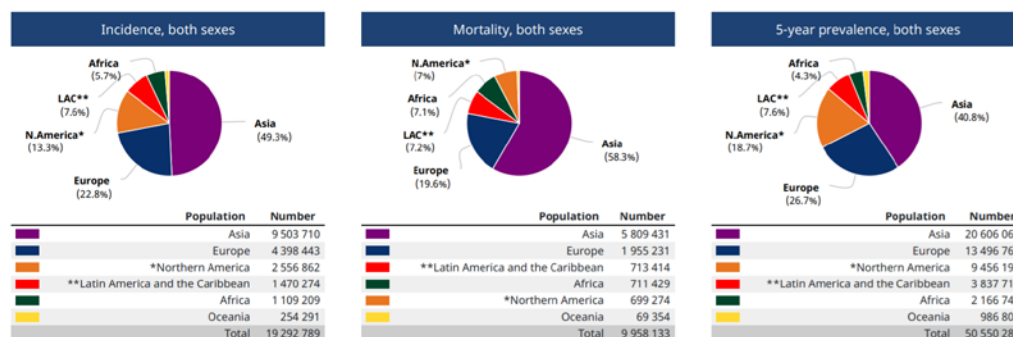


Figura 2. Estadísticas de cáncer. a) Número de nuevos casos y muertes a nivel mundial durante 2020 en hombres y mujeres de todas las edades. b) Incidencia, mortalidad y prevalencia en 5 años por cada continente, imagen tomada de Globocan Observatory et al., 2020.

En México el último registro de casos y muertes se realizó para el año 2016, donde se reportó la defunción del 6 693 personas a causa del cáncer de mama (Navarrete-Valero & Navarrete-Vázquez, 2018), además, el Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (2016), reportó que la edad promedio de presentación de los casos de cáncer de mama es de 54.9 años, con mayor incidencia en las personas de entre 50 y 59 años con el 45% de todos los casos. En el grupo específico de mujeres de 25 años y más, en el año 2015, se registraron 3,994 defunciones en mujeres con una tasa cruda de 11.5 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de mama son: Colima (17.7%), Chiapas (17.6%), Guerrero (15.6%), Veracruz (15.4%) y Oaxaca (15.2%). En el Estado de Puebla del año 2000 hasta el año 2015 se registraron al menos 2,793 muertes, cifra que sigue en aumento (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2016).

1.3 Clasificación molecular

En apartados anteriores se comentó que el cáncer de mama se podía clasificar según el sitio en que se desarrolla, sin embargo, también existe una clasificación molecular basada en marcadores inmunohistoquímicos como el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP), receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y Ki67 (un marcador de índice de proliferación) y microarreglos de ADN complementario (ADNc), mediante los cuales se han definido cuatro subtipos distintos de cáncer de mama, que difieren en el pronóstico y en los objetivos terapéuticos que expresan, estos son: luminal A, luminal B, con sobreexpresión de HER2 y triple negativo que incluye el similar a la basal y bajo en claudina (Sørli et al., 2001; Voduc et al., 2010).

Clasificación	inmunoperfil	Otras características	Líneas celulares
---------------	--------------	-----------------------	------------------

Luminal A		RE ⁺ , RP ^{+/-} , HER2 ⁻	Ki67 <14%, 70% de los casos, mejor pronostico.	MCF-7, T47D, SUMA185
Luminal B		RE ⁺ , RP ^{+/-} , HER2 ⁺	Ki67 ≥14%, mayor expresión de genes o proteínas relacionados con la proliferación/ciclo celular como MKI67 y AURKA.	BT474, ZR-75
Sobreexpresa HER2		RE-, RP-, HER2+	Ki67 alto, gran cantidad de mutaciones en TP53 y PIK3CA	SKBR3, MDA-MB-453
Triple negativo	Basal	RE-, RP-, HER2-	EGFR+ y/o citoqueratina 5/6/17, intergrina-B4 y laminina, Ki67 alto. Recurrencia local y a distancia	MDA-MB-468, SUM190
	Bajo en claudinas	RE-, RP-, HER2-	Ki67 alto, E-cadherina, claudina-3, claudinina-4 y claudinina-7 bajos.	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUMA1315

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama. Tomado y modificado de (Holliday & Speirs, 2011)

1.3.1 Cáncer de mama Luminal A

El subtipo de cáncer de mama luminal A tiene el mejor pronóstico de entre todos los subtipos de cáncer de mama debido a sus características particulares como alta expresión de receptores hormonales, una expresión negativa de HER2 y una baja tasa de proliferación, estas características se han definido a partir de casos clínicos en los que fueron >1% positivos para RE, ≥20% para RP, HER2 negativo y <14% positivo para Ki-67 (Y. Li & Ma, 2020).

Los subtipos de cáncer de mama luminales, tanto A como B comprenden casi el 70 % de todos los casos de cáncer de mama en las poblaciones occidentales (Stanislawek, 2021).

1.3.2 Cáncer de mama Luminal B

Los tumores luminales tipo B se consideran con riesgo de recurrencia "alto " y comportamiento clínico agresivo basado en su característica de una baja expresión del RE, HER2 negativos, Ki67 ≥14% y RP negativo o <20% (Z. H. Li et al., 2016). En comparación con los tumores luminales A, este tipo de tumores tienen una mayor expresión de genes o proteínas relacionados con la proliferación/ciclo celular como MKI67 y AURKA, muestran

mayor número de mutaciones en todo el genoma, más mutaciones en TP53 y menos mutaciones en PIK3CA y MAP3K1 (Prat et al., 2015).

1.3.3 Cáncer de mama basal

Los cánceres de mama de tipo basal comprenden aproximadamente el 15 % de todos los cánceres de mama invasivos y en su mayoría con un mal pronóstico, ya que tienen una alta tasa de recurrencia local y a distancia (Tang & Tse, 2016).

Se ha reportado que el cáncer de mama puede ser producido por células basales o luminales que conforman el tejido mamario, así que el subtipo de cáncer de mama basal cuenta con las características de expresión génica de las células epiteliales basales como la alta expresión de genes relacionados con la proliferación y la expresión de queratina 5, queratina 17, intergrina-B4 y laminina (Johnson et al., 2021; Prat et al., 2015).

A nivel de molecular, estos tumores presentan alto número de mutaciones en todo el genoma, en su mayoría está hipometilados, mutados en TP53 y PIK3CA. Estos tumores no expresan ER ni RP y tienen expresión baja o nula de los genes relacionados con HER2 (Johnson et al., 2021; Prat et al., 2015).

1.3.3.1 Cáncer de mama triple negativo

El subtipo de cáncer de mama basal pertenece al grupo de los llamados cánceres de mama triple negativos y representan entre 70%-80% de todos los cánceres de mamá triple negativo, lo que lo hace el grupo que más predomina. Este subtipo de cáncer se considera triple negativo debido a que < 1% de los núcleos expresan RE y RP y carece de expresión de HER2, además, desde el punto de vista morfológico, la mayoría de los cánceres de mama triple negativo son carcinomas ductales. Es importante recalcar que el cáncer de mama triple negativo no es sinónimo del genotipo molecular de cáncer de mama basal ya que cada uno cuenta con sus características particulares (Johnson et al., 2021).

Los casos de cáncer de mama triple negativo representan entre el 15% y 20% de los casos totales de cáncer de mama y ocurren principalmente en mujeres jóvenes premenopáusicas menores de 40 años, En comparación con otros subtipos de cáncer de mama, el tiempo de supervivencia de los pacientes es más corto y la tasa de mortalidad es del 40 % dentro de los

primeros 5 años después del diagnóstico (Yin et al., 2020).

1.3.4 Cáncer de mama con sobreexpresión de HER2

El subtipo enriquecido en HER2 constituye del 10 al 15 % de los cánceres de mama, se caracteriza por la alta expresión de genes y proteínas relacionados con HER2 y relacionados con la proliferación, así como por los bajos o nulos niveles de expresión de RE. De entre todos los subtipos moleculares, estos tumores muestran el mayor número de mutaciones en todo el genoma, y el 72 % y el 39 % están mutados en TP53 y PIK3CA, respectivamente (Prat et al., 2015; Stanisławek, 2021).

2. Líneas celulares

La mayoría de los estudios realizados en el área de los carcinomas de mama para descifrar los mecanismos que subyacen a la iniciación y evolución del tumor se han realizado en líneas celulares de cáncer de mama, ya que cuentan con múltiples ventajas como: fácil manejo, fuente ilimitada de autorreplicación que se puede cultivar en cantidades casi infinitas, alto grado de homogeneidad y se reemplazan fácilmente a partir de existencias congeladas si se pierden por contaminación (Burdall et al., 2003; Yin et al., 2020). A continuación, se mencionan algunas líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano que expresa el fenotipo característico del cáncer de mama triple negativo.

2.1 *MDA-MB-231*

La línea celular MDA-MB-231 (tipo mesenchymal stem-like) es una línea celular epitelial de adenocarcinoma de mama humano que se estableció a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma de mama metastásica. Es una línea celular con regulación autócrina por factores de crecimiento y se utiliza de forma regular in-vivo para el desarrollo de modelos de metástasis (Holliday & Speirs, 2011). Las células MDA-MB-231 tienen la capacidad de producir inmunosupresores como IL-4, factor de crecimiento transformante (TGF)- β e IL-10 (Kathryn et al., 2012). Además, presentan una abundante tasa de proliferación aproximadamente de 21 horas (Kremmer et al., 1991). Por otro lado, es una

línea que expresa bajo niveles de claudina 3 y 4, alta expresión de proteínas consideradas marcadoras asociadas con la transición epitelial-mesenquimatosa y con la expresión de proteínas de células madre de cáncer de mama, como el CD44+CD24-/low. En modelos in vivo es de tipo invasiva y es considerada como una línea útil para estudio de la metástasis ósea (Harrell et al., 2014).

2.2 MDA-MB-468

La línea celular MDA-MB-468 (basal like 1) fue aislada en 1977 por R. Cailleau, et al., el tejido fue proveniente de un derrame pleural de una paciente negra de 51 años con adenocarcinoma metastásico de mama basal, esta línea celular carece de receptores de estrógeno, sobreexpresa los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su crecimiento es inhibido por el EGF. Normalmente, en investigación es utilizada para el estudios de aspectos de inmuno-oncología (Armstrong et al., 1994; *MDA-MB-468 - HTB-132 / ATCC*, n.d.).

2.3 BT549

La línea celular BT549 (mesenchymal) es un modelo de carcinoma ductal de mama, fue obtenida de una mujer blanca de 73 años, el tejido recuperado consistía en un tumor ductal invasivo papilar que había hecho metástasis en 3 de los 7 ganglios linfáticos regionales (*BT-549 - HTB-122 / ATCC*, n.d.).

Las líneas mencionadas anteriormente han sido útiles en la búsqueda de tratamiento para el cáncer de mama triple negativo que si bien el porcentaje de caso es bajo es el más agresivo de todos los tipos de mama. La falta de expresión en receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2 representa un desafío en la búsqueda de un tratamiento terapéutico, ya que las opciones con las que se cuenta actualmente son poco efectivas, se genera resistencia farmacológica y hace que la respuesta a la terapia sea baja (Dass et al., 2021). En consecuencia, se han incrementado los esfuerzos por encontrar biomarcadores que coadyuven

al diagnóstico temprano y pronóstico de cáncer de mama triple negativo, lo anterior también con el fin de analizar el papel fisiológico de estos biomarcadores y ubicarlos como potenciales blancos terapéuticos. En relación la glicoproteína 2 α rica en leucina 1 (LRG1) se ha puesto en estudio ya que se encuentra aumentada en suero y en tejido tumoral triple negativo y HER2 positivo (Y. S. Zhang et al., 2021).

3. LRG1

La glicoproteína 1 rica en leucina (LRG1) pertenece a la familia de proteínas ricas en repeticiones de leucina (LRR), está formado por una sola cadena polipeptídica de 347 residuos de aminoácidos y contiene 8 LRR que se componen de 19 a 29 aminoácidos, con un tramo N-terminal de 9 a 12 aminoácidos hidrofóbicos leucina, y un dominio C-terminal que varía en longitud, secuencia y estructura (Figura 3A). Los extremos N-terminales están cargados negativamente y las repeticiones de leucina forman cadenas β ubicadas hacia el interior del dominio en forma de herradura dando sitios de unión ideales para proteínas catiónicas (Figura 3B) (Dolan et al., 2007; Javaid et al., 2021).

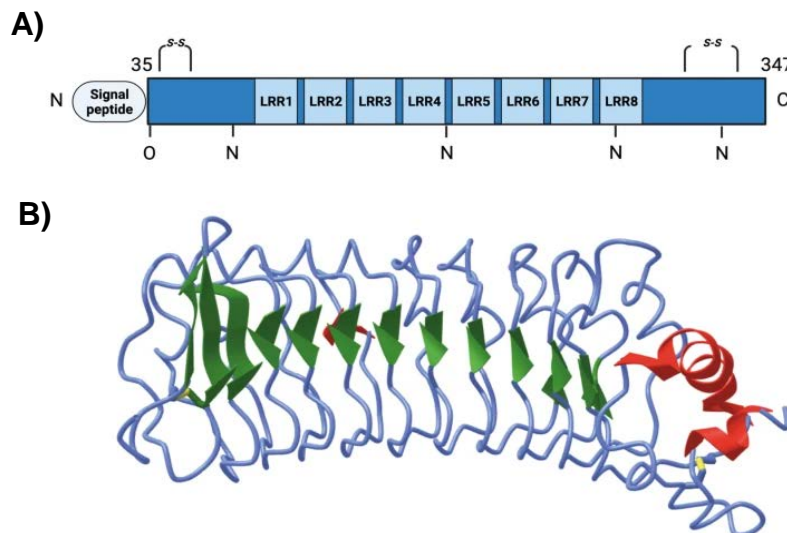


Figura 3. Estructura de la proteína LRG1. A) Representación esquemática de la secuencia de LRG1 con sus 8 repeticiones ricas en leucina (LRR), 4 sitios de glicosilación enlazados a N y 2 enlaces disulfuro. B) Predicción de la estructura 3D de LRG1, hoja β en verde, hélice α en rojo. Imagen tomada de (Camilli et al., 2022).

3.1 Funciones de LRG1

En 1977, Haupt y Baudner identificaron por primera vez LRG1 presente en el suero humano y hasta 2014 en un estudio realizado por Wang y colaboradores (2014) informó que LRG1 fue capaz de promover la angiogénesis mediante la modulación de la señalización de TGF β , esto debido a que LRG1 interactúa con TGF β 1 y esto aumenta su afinidad por la quinasa 1 similar al receptor de activina (ALK1) en presencia del receptor auxiliar endoglina (ENG) promoviendo la angiogénesis y evitando la unión con ALK5 angiostático. La formación del complejo LRG1-ALK1-TR β I-ENG conduce a una fosforilación de Smad y por lo tanto a la proliferación y al crecimiento de vasos sanguíneos. (X. Wang et al., 2014).

A partir de eso se han realizado varios estudios más, para reconocer otras funciones de LRG1, sin embargo, la mayoría de sus funciones se han asociado con diversas patologías. En la hipertrofia y fibrosis del miocardio se reportó que ET1 inhibe la expresión de LRG1 en fibroblastos dérmicos (Vallender y Lahn 2006). Además, de acuerdo con otros autores se sugiere que LRG1 puede ser un marcador útil de apendicitis pediátrica ya que se encuentra elevado en la orina y el plasma de niños con apendicitis aguda (Kentsis et al., 2012; Kharbanda et al., 2012). En estudios realizados por Serada y colaboradores (2010) se detectaron altas concentraciones séricas de LRG1 en pacientes con colitis ulcerosa y con artritis reumatoide, esto indica que LRG1 podría convertirse en un biomarcador prometedor que puede sustituir a la proteína C reactiva y de esta forma monitorear la progresión de la enfermedad (Serada et al., 2010, 2012). En relación a esto Hao y colaboradores (2016) realizó otra investigación donde correlacionó LRG1 con la alergia, dado que esta también es una enfermedad inflamatoria e inmunológica, para su sorpresa, encontró que a diferencia de la colitis y la artritis los pacientes con trastornos alérgicos de las vías respiratorias poseen una característica de disminución de la concentración de LRG1 en su plasma, pero esto puede ser útil para diferenciar la enfermedad alérgica de la enfermedad autoinmune (Hao et al., 2016).

Aunque las funciones atribuidas a LRG1 se han centrado principalmente en situaciones patológicas, también se considera una molécula de señalización multifuncional que en condiciones fisiológicas, está presente en el suero sanguíneo siendo sintetizada principalmente por hepatocitos y neutrófilos (Camilli et al., 2022).

De acuerdo al reporte realizado por Birsoy y colaboradores (2011) LRG1 pertenece a un grupo de genes regulados positivamente en el tejido adiposo durante el desarrollo embrionario tardío

y posnatal temprano cuando se comienzan a acumular lípidos.

Por otro lado, tal y como se ha mencionado al inicio del apartado LRG1 se considera multifuncional, se ha postulado como una proteína de fase aguda, ya que sus niveles aumentan rápidamente en el suero después de infecciones microbianas y otros estímulos inflamatorios, además, se sabe que este tipo de proteínas son sintetizadas por el hígado en respuesta a varias citocinas proinflamatorias (Codina et al., 2010). También se considera una adipocina ya que se une con alta selectividad al hígado y media la diafonía entre adipocitos y hepatocitos para promover la hepatoesteatosis al aumentar la lipogénesis de novo y suprimir la β -oxidación de ácidos grasos (S. He et al., 2021).

3.2 LRG1 y su participación en el cáncer

Una gran cantidad de estudios proteómicos han reportado a LRG1 como un biomarcador importante para el diagnóstico y la evaluación clínica de diversos tipos de cáncer relacionándose con la progresión de la enfermedad, la carga y el pronóstico (Camilli et al., 2022).

En el cáncer de endometrio LRG1 se ha comprobado como un factor pronóstico independiente para la supervivencia global y al ser combinado con otros factores de riesgo clinicopatológicos se convierte en un modelo de pronóstico más fuerte que cuando están solos o se combinan (Wen et al., 2014). Una situación similar se ha reportado para el cáncer de próstata donde un nivel alto de LRG1 se asocia con un riesgo promedio dos veces mayor de progresión de la enfermedad y mortalidad en pacientes de alto riesgo y metastásicos (Guldvik et al., 2020), en el carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC) LRG1 se sobreexpresó significativamente por lo que se relacionó con una mayor profundidad de invasión y metástasis al indicarse por análisis estadísticos que la regulación positiva de LRG1 en ESCC estaba estrechamente relacionada con una peor supervivencia clínica (Y. Wang et al., 2019). En el caso del cáncer hepatocelular la alta expresión de LRG1 se asoció con el tamaño del tumor, la diferenciación tumoral, el estadio y la invasión vascular por lo que también se considera un marcador pronóstico en este tipo de cáncer (C. H. Wang et al., 2015). En los tumores de páncreas LRG1 está altamente implicado en la proliferación y migración de sus

células ya que sus niveles aumentan tanto en el suero de los pacientes como en el tejido, por lo que en este tipo de carcinomas también se ha considerado un marcador pronóstico (Hua et al., 2020).

Como biomarcador diagnóstico LRG1 se ha tomado en cuenta en el cáncer de ovario ya que en casos de pacientes con la enfermedad las concentraciones séricas están afectadas, esta característica de biomarcador para la detección se mejora aún más cuando se combina con CA125 ayudando a distinguir entre cáncer de ovario en etapa temprana de los que no son casos de este tipo de cáncer (Wu et al., 2015).

En pacientes con cáncer colorrectal se ha encontrado que la expresión de ARNm de LRG1 es aproximadamente 2 veces más alta en el tumor que en los tejidos normales, LRG1 promueve la capacidad migratoria y de crecimiento de las células por lo que se ha deducido que una expresión más alta de LRG1 tiene un tiempo de supervivencia más corto en comparación con los pacientes con una expresión más baja de LRG1 lo que hace que esta proteína pueda proponerse como un marcador pronóstico (Wu et al., 2015).

LRG1 también se ha reportado con un papel clave en el acondicionamiento del lecho vascular para la colonización metastásica ya que en pruebas realizadas por Singhal y colaboradores (2021) se observó que el aumento de la expresión de LRG1 promovió la metástasis en ratones al aumentar la cantidad de antígeno glial neuronal prometastásico 2 (NG2)+ en células perivasculares, también comprobaron que la eliminación genética de LRG1 obstaculizó el crecimiento de la metástasis pulmonar y que al administrar un anticuerpo neutralizante de LRG1 posterior a la cirugía produce un retraso del crecimiento metastásico y aumentó la supervivencia general.

En el cáncer de mama se ha observado que los pacientes que expresan LRG1 tienen menor probabilidad de supervivencia libre de enfermedad así como menor probabilidad de supervivencia promedio y que los niveles de expresión de LRG1 influyen directamente en el estadio del tumor y la metástasis (Y. S. Zhang et al., 2021). Otro estudio informó que LRG1 se expresa en los tumores de cáncer de mama independientemente del subtipo molecular y está relacionada con la supervivencia libre de enfermedad después del tratamiento con inhibidores de aromatasa (Ramirez-Ardila et al., 2016). También se ha reportado que las células de mama tumorales que expresan niveles más altos de LRG1 son más resistentes a la apoptosis, esto

debido a que LRG1 intracelular eleva el umbral de citocromo c (Cyt c) citoplásmico requerido para inducir la apoptosis (Jemmerson et al., 2021)

Capítulo III: Metodología

1. Cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y BT49, manteniéndose con un 5% de CO₂ y a 37°C en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 1% y antibiotico-antimicótico 1%.

2. Determinación de la viabilidad celular

Debido a que la intención de este proyecto es determinar cómo rh_LRG1 (Cat: 1311371-HCCH) afecta la viabilidad celular se empleó el ensayo MTT el cual permite determinar el porcentaje de viabilidad celular a partir de la transformación del color amarillo a morado, este cambio de color sucede debido a que las células vivas tienen la capacidad de transformar con las enzimas reductasas mitocondriales las sales de tetrazolio 3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazolio bromuro a formazan.

Para desarrollar el experimento se sembraron 5×10^3 células por pozo de las 3 líneas celulares en placas de 96 pocillos y se mantuvieron hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia, posteriormente se aplicaron tratamientos de 10 y 100 ng/mL de rh_LRG1 (Cat: 1311371-HCCH). En los pocillos correspondientes al control las células se mantuvieron solo con su medio RPMI 1640 suplementado. Todos los tratamientos se aplicaron por triplicado y se mantuvieron por 24 horas para posteriormente ser analizadas por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Estos datos fueron procesados y analizados con el software GraphPad Prism 8.0.2

3. Perfil de expresión génica

El perfil de expresión génica, como su nombre lo indica, implica la detección del nivel de

expresión de múltiples genes a la vez, para proporcionar una imagen global de lo que sucede dentro de la célula según la situación en la que se encuentra. Para obtener los datos necesarios para el análisis se pueden utilizar varias tecnologías de transcriptómica pero en la mayoría de los casos es necesario medir la cantidad relativa de ARNm expresado en dos o más condiciones experimentales, ya que, cualquiera alteración en los niveles de una secuencia específica de ARNm pueden deberse a un cambio en la necesidad de la proteína codificada a la que codifican, lo que podría estar relacionado con una respuesta homeostática o una condición patológica (*Hoja de Datos de Tecnología de Microarrays de ADN*, n.d.; Knudsen, 2004).

Las micromatrices o microarreglos de expresión génica son las principales herramientas que se utilizan para realizar las mediciones del estado de la expresión génica en diversas células y tejidos de todas las especies. Los avances tecnológicos permiten la integración de miles de conjuntos de sondas en un solo chip, lo que permite medir los niveles de ARNm para casi todos los genes codificadores de proteínas conocidos en el genoma (Seita et al., 2012).

Un microarreglo está comprendido por una superficie sólida de vidrio, silicona o nylon denominada matriz o micromatriz con varios puntos de ADN unidos a ella, cada punto contiene un pequeño fragmento de ADN correspondiente a un gen de interés. La micromatriz reacciona con dos series de ARNm, el control y el tratamiento, cada muestra se une a un marcador de fluorescencia de distintos colores, la secuencia unida al marcador se denomina sonda (Hoheisel, 2006). Con las muestras preparadas se realiza la hibridación en la matriz y posteriormente se lava, dejando en los puntos solo las sondas hibridación. Se realiza la lectura del microarreglo mediante un rayo láser que genera una imagen basada en la intensidad de cada punto, los colores de la imagen generalmente son rojo y verde y además, se genera una imagen sobrepuesta de las dos y si se obtienen puntos amarillos indica que ambas muestras tienen señal en cantidad similar, los puntos rojos o verdes indican que la expresión de ese gen predomina en una de las muestras (*Uso de Chips de ADN (Microarrays) En Medicina: Fundamentos Técnicos y Procedimientos Básicos Para El Análisis Estadístico de Resultados / Medicina Clínica*, n.d.).

La intensidad de señal corresponde a los niveles del ARNm asociado con la secuencia

hibridada específica en ese punto y se puede analizar con un software especializado capaz de convertir el valor de intensidad en cada punto en datos numéricos, lo que hace posible estimar el nivel de expresión génica y detectar incluso polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a través de la traducción del genotipo, posteriormente con estos datos se elabora una base de datos que será analizada con técnicas estadísticas (Agapito & Arbitrio, 2022).

Se aisló el ARNm de las células MDA-MB-231 mediante el reactivo TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante, para esto previamente fue necesario cultivar las células en placas de 60 mm hasta una confluencia de 80%, se cultivaron 3 placas tratadas con 100 ng/mL de rh_LRG1 (Cat: 1311371-HCCH) y 3 placas control solo con el medio de cultivo correspondiente. Después de 24 horas de la aplicación del tratamiento, se realizó la extracción de ARNm.

Una vez extraído el ARNm de las muestras de interés se procedió a realizar el microarreglo de ADN con apoyo de la Unidad de Microarreglos de ADN del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las muestras se marcaron como Control (CTR) para muestra solo mantenidas con medio y LRG1 para las muestras tratadas con 100 ng/mL de rh_LRG1, posteriormente se seleccionaron 2000 sondas para cáncer humano por librería SAGE (Análisis en serie de la expresión génica) y fabricadas por MWG-BIOTECH. La hibridación se realizó con sonda ALEXA555 para CTR y la sonda ALEXA647 para LRG1. Los datos obtenidos de la cuantificación de las imágenes fueron analizados con el software Genarise obteniendo las listas de genes regulados al alta y a la baja (UP & DOWN) para dos cortes de Z-Score (mayores que 1.5 y mayores que 2.0) en la muestra LRG1 con respecto a su CTR. Estos mismos datos fueron procesados por el software R para obtener el mapa de calor (Heatmap).

4. Formación de redes de interacción

El análisis de interactoma, tal y como su nombre lo indica analiza las interacciones entre las moléculas biológicas a escala global (Ito et al., 2001). Para fines de este proyecto se espera relacionar los datos obtenidos a través de los microarreglos sobre los genes con expresión

diferencial.

Para ello utilizaremos la base de datos STRING (<https://string-db.org/>), que proporciona información sobre las interacciones proteína-proteína conocidas y previstas. Las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales); se derivan de la predicción computacional, de la transferencia de conocimiento entre organismos y de interacciones agregadas de otras bases de datos (primarias). Estos datos se evaluarán también mediante la base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) para definir sus anotaciones funcionales y correlacionarlas con los datos obtenidos en el resto del experimento.

5. Validación de los resultados obtenidos por microarreglos

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos a partir de los chips de microarreglos, se seleccionarán los genes sobreexpresados e inhibidos para que mediante la técnica de qPCR se pueda verificar su expresión. Para esto será necesario realizar el diseño de primers para cada gen de interés y establecer las condiciones para la reacción. Los primers se diseñaron mediante el software Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Capítulo IV: Resultados

1. Efecto de rh_LRG1 sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por un ensayo MTT en tres líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-468 y BT49) y los tratamientos se aplicaron por 24 horas. En células MDA-MB-231 se observó un aumento en la viabilidad que fue significativo tanto para la concentración de 10 ng/mL y 100 ng/mL. Para las células MDA-MB-468 no se observó ningún efecto significativo sobre la viabilidad y en células BT549 hubo una disminución significativa en la viabilidad celular cuando las células se trataron con 10 ng/mL de rh_LRG1 (Figura 5).

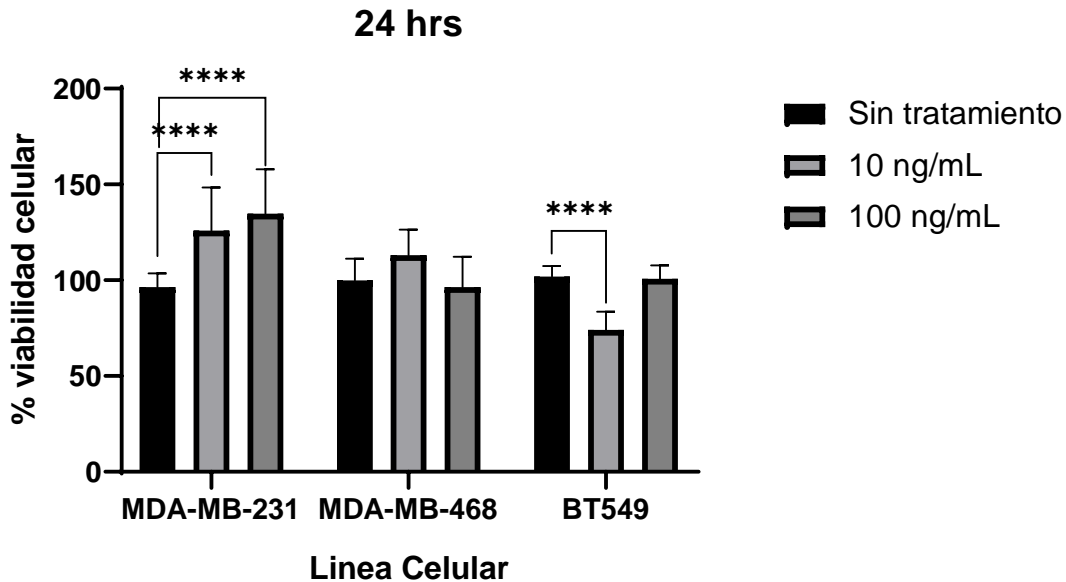


Figura 5. Efecto de rh_LRG1 sobre la viabilidad celular. Las células se trataron durante 24 horas con 10 y 100 ng/mL de rh_LRG1 en células MDA-MB-23, MDA-MB-468 y BT49. Cada grafica muestra 3 barras sin tratamiento (control), tratamiento con 10 ng/mL de rh_LRG1 y tratamiento de 100 ng/mL de rh_LRG1. ANOVA de dos vias post hoc Dunnett , las barras simbolizan \pm SEM (n=3): ****p \leq 0.0001

los resultados muestran un efecto dual como en MDA-MB-231 y BT549 a 10ng/mL. Debido a que los antecedentes en pacientes asocian la presencia de altos niveles de LRG1 en plasma con la con un mal pronóstico la presencia de metástasis y la propagación del cáncer de mama a nódulos linfáticos se decidió continuar con el análisis del transcriptoma en la línea células MDA-MB-231 a las 24 horas siendo que entre el tratamiento de LRG1 con el 10 y 100ng/mL en MDA-MB-231 no presenta diferencia significativa. Planteamos como perspectiva que continuar con el análisis del transcriptoma en BT549 y MDA-MB-468 a fin de comprender las diferencias que marcan el efecto dual y la falta de efecto, ya que, que podrían dar pie a una subclasificación basadas en la respuesta a LRG1.

2. Análisis del perfil de expresión génica

Para realizar el análisis de expresión se obtuvo el ARNm de la línea celular MDA-MB-231

control (sin tratamiento) y tratada con 100 ng/mL de rh_LRG1, la extracción integra del material genético se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, logrando visualizar las tres bandas correspondientes al RNA ribosomal 28s, 18s y 5s (Figura 6). Además, se obtuvieron lecturas de absorbancia A260/280 siendo las lecturas mayores a 1.8 y menores a 2.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de RNA total en células MDA-MB-231. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, el segundo al material genético de las células sin tratamiento y el tercer carril a las células con tratamiento de rh_LRG1 a 100 ng/m

Una vez realizado el microarreglo y procesar los datos obtenidos mediante diversos softwares bioinformáticos se obtuvo un mapa de calor (Heatmap) para los principales genes diferencialmente expresados, con esto se visualizaron los niveles de expresión tomando en cuenta que entre más oscuro es el azul la expresión es menor y entre más oscuro es el rojo la expresión es más alta (Figura 7).

Los 31 de los 35 genes incluidos en el heatmap presentan aumento en su expresión y los otros 4 correspondientes a CLU, FGF3, GSTA4 y MTAP disminuyeron su expresión.

Heatmap Transcriptoma

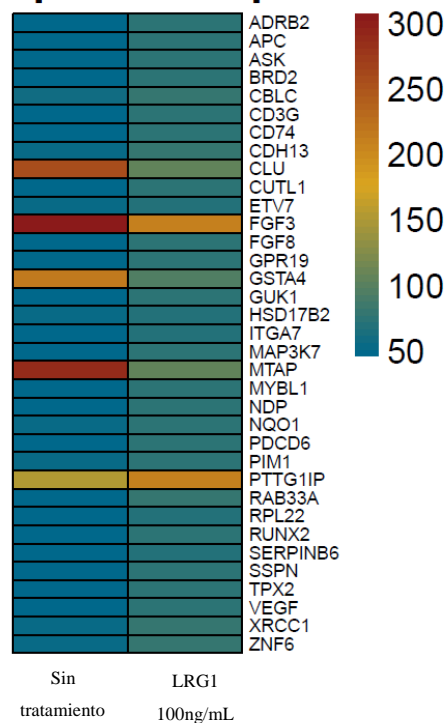


Figura 7. Heatmap de los genes con expresión diferencial más significativa. El heatmap o mapa de calor fue obtenido mediante el software R, los valores más cercanos a 50 correspondientes al color azul se relacionan con una baja expresión, los valores cercanos a 300 con tonalidades rojas oscuras corresponde a un alto nivel de expresión.

3. Formación de redes de interacción

A partir de los genes incluidos en el heatmap y sabiendo que los genes incluidos en este eran los que presentaban una expresión diferencial más significativa se procesó la lista de genes en el software STRING (<https://string-db.org/>). Este software permite visualizar la interacción entre las proteínas enlistadas, las asociaciones que muestra son específicas y significativas, es decir, las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida pero no necesariamente físicamente vinculadas. En la red de interacción obtenida se pudo observar que no todas las proteínas incluidas en el análisis interaccionan entre si, de hecho, poco menos de la mitad de los genes incluidos no presenta ninguna interacción (Figura 8). Específicamente

los genes que no muestran ninguna interacción son PTTG1IP, ETV7, RAB33A, MAP3K7, HSD17B2, GUK1, PDCD6, CD74, TPX2, CBLC, CD3G, MYBL1, RPL22, PIM1, ADRB2, DBF4 y NDP.

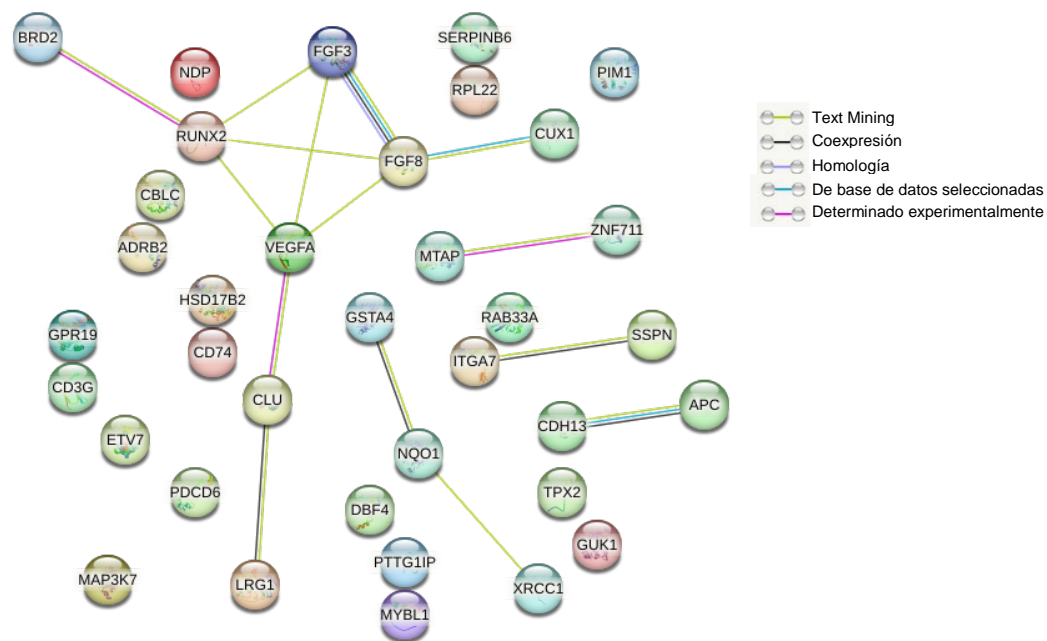


Figura 8. Red de interacción de genes diferencialmente expresados. Red obtenida mediante el software STRING cada círculo corresponde a un nodo que a su vez corresponde a cada uno de los genes introducidos para la consulta. Las interacciones están marcadas por líneas de diferentes colores que indican interacción hallada por Text Mining (verde): Búsqueda de diversos textos en múltiples bases de datos donde las proteínas han sido mencionadas juntas, por coexpresión (negro): su expresión esta correlacionada, por homología (azul): Secuencias con similitudes entre si por un mismo origen evolutivo, por búsqueda en bases de datos (aqua): Las bases de datos son Biocarta, BioCyc, Gene Ontology, KEGG y Reactome, donde se reportan vías metabólicas, complejos proteicos, vías de traducción de señales, entre otros y por experimentación (rosa) reportados en DIP, BioGRID, HPRD, IntAct, MINT y PDB. Se muestran nodos que no presentan ninguna interacción.

Al modificar el análisis para solo observar los genes que si presentaban interacción (Figura 9), determinamos que la mayor parte de las interacciones que se presenta es por Tex Mining o también definido como minería de textos, que se refiere a la búsqueda de diversos textos en múltiples bases de datos donde las proteínas han sido mencionadas juntas, si estos textos

En el mismo software es posible observar solo las proteínas que tienen una interacción física entre ellas, en este caso se encontró interacción física entre CDH13 con APC y entre FGF3 con FGF8.

Al ver que si se presentaban interacciones entre los genes de interés, consideramos importante revisar las anotaciones funcionales para estos mismos genes y así tener una idea de los procesos en los que intervienen, para esto utilizamos la base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) donde se introdujo la lista de genes y se analizó para las anotaciones, curiosamente las anotaciones funcionales más destacadas correspondieron a vías metabólicas de cáncer, regulación del citoesqueleto de actina, cáncer de mama, cáncer gástrico y enfermedades (Figura 10).

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 1.3			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	RT		6	7.7E-3	5.5E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Regulation of actin cytoskeleton	RT		4	1.7E-2	5.5E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Breast cancer	RT		3	4.9E-2	8.0E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Gastric cancer	RT		3	5.0E-2	8.0E-1
<input type="checkbox"/> UP_KW_DISEASE	Disease variant	RT		6	9.8E-1	1.0E0

Figura 10. Anotaciones funcionales de los genes diferencialmente expresados. Los datos de la imagen se obtuvieron a partir de la base de datos DAVID, se reporta la base de datos consultada, las funciones en las que intervienen, la asociación de los genes con la función indicada y valores estadísticos que determinan estas relaciones.

4. Validación de los genes diferencialmente expresados.

Mediante Primer BLAST se diseñaron los pares de primers necesarios para detectar la expresión de cada gen diferencialmente expresado, los parámetros que se siguieron para un diseño adecuado fueron (Ye et al., 2012):

- Tamaño del producto PCR: 70 a 200 pares de bases.
- Longitud de 18 a 22 nucleótidos.
- Contenido de GC% entre 50% y 60%.
- Temperatura de desnaturalización (Tm) entre 59°C y 65°C. Entre cada par de primers puede haber una diferencia de Tm máxima de 3°C.
- Evitar repeticiones de 4 o más repeticiones adyacentes y repeticiones de dinucleótidos.
- Puntuación baja de autocomplementariedad, para disminuir la probabilidad de que el

cebador se una a sí mismo y al otro cebador del par.

Las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

GEN	PRIMERS		TM	TAMAÑO DEL PRIMER	PRODUCTO DE PCR	% GC
APC	FW	GAGCACAGCGAAGAATAGCC	59.07	20	234	55
	RV	CACTGGCTGTTTCATGGTCC	59.12	20		55
CD74	Fw	GGAGCTGTCCGGAAGATCAG	59.90	20	200	60
	RV	CTGGTACAGGAAGTAGGCGG	59.54	20		60
CDH13	Fw	TGCAGAAGATTTGGACTGCA	57.72	20	274	45
	Rv	GACAATCACGAGTTCTGCCA	58.20	20		50
CLU	Fw	TACCTACCACTACCTGCCCT	58.99	20	234	55
	Rv	TCGTGCGCTTCTCGTATGAA	58.91	20		50
ETV7	Fw	CCCGATATGAGCCCTACATCA	58.82	21	200	52.38
	Rv	TCTGAACAGGAGTTTCTGCCC	59.93	21		52.38
FGF8	Fw	GTCTTCACGGAGATTGTGCT	57.91	20	209	50
	Rv	GGGTAGTTGAGGAACTCGAAG	57.77	21		52.38
HSD17B2	Fw	AGGCTGGCATCTTATGGCTC	59.89	20	207	55
	Rv	GCCGTAGCTTTCCTGTACCT	58.53	20		55
ITGA7	Fw	ATGGATGGGAACCAATACCCT	58.49	21	171	47.62
	Rv	TAGGTCCACACAGACCGAGT	59.89	20		55
MAP3K7	Fw	AGATGATCGAAGCCCCTTCC	59.24	20	207	55
	Rv	GGTTCACACGGGATAACTGC	58.92	20		55
VEGF	Fw	ATCCAATCGAGACCCTGGTG	59.17	20	185	55
	Rv	GCCTTGGTGAGGTTTGATCC	58.82	20		55

Por las limitaciones temporales del proyecto, no fue posible establecer las condiciones para realizar las pruebas PCR y tampoco para realizar las reacciones. Sin embargo, se decidió continuar con el análisis *in silico* para aprovechar los datos obtenidos y ver si existe relación directa con los procesos de la carcinogénesis.

Capítulo V: Discusión de resultados

El cáncer mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial, su clasificación molecular ha permitido entender los diferentes procesos que suceden durante la carcinogénesis, sin embargo, aún quedan muchas áreas por estudiar (Tang & Tse, 2016; Voduc et al., 2010). En los últimos años los estudios referentes al cáncer de mama triple negativo han aumentado, ya que, aunque sus casos solo representan entre el 15% y 20% de los casos totales de cáncer de mama la mayoría sucede en mujeres jóvenes premenopáusicas menores de 40 años y en comparación con otros subtipos de cáncer de mama, el tiempo de supervivencia de los pacientes es más corto lo que indica que es el de peor pronóstico (Yin et al., 2020). Por esta razón, se decidió enfocar este estudio en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo para poder dilucidar otras de sus características, especialmente su relación con LRG1 que es una proteína que se ha propuesto como biomarcador para múltiples tipos de cáncer (Camilli et al., 2022).

En el estudio realizado nos enfocamos en primer lugar en el efecto de LRG1 recombinante sobre la viabilidad celular, para este caso se observó un aumento en la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231, mientras que en la línea celular BT549 se observó una disminución en la viabilidad. En la mayoría de los reportes realizados para analizar la relación entre distintos tipos de cáncer y LRG1 se ha reportado que esta proteína aumenta la viabilidad de las células tumorales como de neuroblastoma, leucemia, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer gástrico y glioblastoma (Camilli et al., 2022). Aunado a esto, múltiples estudios han reportado que la expresión de LRG1 está directamente relacionada con la viabilidad o proliferación de células tumorales, L. He y colaboradores (2022) reportaron que la regulación a la baja de LRG1 redujo la capacidad migratoria y la proliferación células de cáncer gástrico, mientras que la sobreexpresión de LRG1 promovió la viabilidad celular y la migración, en células de glioblastoma se observó que el silenciamiento de LRG1 inhibió significativamente la proliferación celular (Zhong, He, et al., 2015). Además, mediante pruebas in vitro se mostró que en el cáncer colorrectal la eliminación de LRG1 podría inhibir significativamente la proliferación celular, inducir la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y promover la apoptosis de las células tumorales (Lou et al., 2020). En células de cáncer de páncreas se utilizó un ARNsh específico para atenuar LRG1 mostrando que la viabilidad de las células BxPc-3 y SW1990 se inhibió significativamente (Xie et al., 2019).En

las líneas celulares BxPC-3 y Capan-2 silenciar la expresión de LRG1 reprimió significativamente su viabilidad (Cai et al., 2022), lo mismo sucedió con células KASUMI-1 que su viabilidad disminuyó cuando se silenció LRG1 (Xiao & Zhu, 2018). Toda esta información respalda el hecho de que al tratar las células MDA-MB-231 se haya registrado un aumento en la viabilidad, sin embargo, no explica el hecho de que en las demás líneas celulares disminuyeran su viabilidad.

Aunque en menos estudios, también se ha reportado que LRG1 puede disminuir la viabilidad celular, en carcinoma hepatocelular, glioma, glioblastoma y cáncer colorrectal suprime la migración y la invasión de células (Y. Zhang et al., 2020; Zhong, He, et al., 2015; Zhong, Zhao, et al., 2015), esto nos hace pensar que los efectos de LRG1 no son específicos y pueden variar de acuerdo a los tipos celulares, además, se ha reconocido que los efectos sobre la proliferación están relacionados también con proteínas de otras vías, se reportó que cuando se disminuyen los niveles de LRG1 se disminuye el nivel de fosforilación de JAK y por lo tanto de STAT lo que indica que actúa sobre la transducción de señales de la vía JAK-STAT y de esta manera inhibe la expresión génica y la proliferación celular (Xiao & Zhu, 2018), en el cáncer de mama compete con el factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), para unirse al citocromo c y así proteger las células de la apoptosis (Jemmerson et al., 2021). Además, cuando la transcripción 1 regulada por andrógenos de próstata (PART1) se regula a la baja, LRG1 lo reemplaza para poder ejercer los efectos promotores sobre el cáncer colorrectal (Lou et al., 2020), esta información nos permite pensar que el papel de LRG1 varía según las interacciones disponibles con otras vías metabólicas. Además, surgen más variables de acuerdo con el comportamiento de las células, ya que puede modificarse por la organización espacial de los receptores de superficie, la transducción de señales mediada por receptores y los estados químicos que pueden influir en los estados físicos y viceversa. Y. L. Liu y colaboradores (2019) realizaron un estudio en el que estudiaron el comportamiento de EGFR en siete diferentes líneas de cáncer de mama con la finalidad de relacionarlo con su capacidad invasiva. Notaron que las células de cáncer de mama positivas para HER2, BT474 y SKBR3, tenían las difusividades de EGFR más bajas por lo que se relaciona con el hecho de que la sobreexpresión de HER2 estabiliza los homodímeros de HER2 y los heterodímeros de HER2-EGFR, entonces los dímeros activados reclutan aún más proteínas de unión para

mejorar la señalización, lo que da como resultado un complejo EGFR más grande con una difusividad reducida. En este mismo estudio se reportó que MDA-MB-231 y BT549 tenían las difusividades de EGFR más altas lo que permite inferir esto como una razón de su capacidad invasiva (Y. L. Liu et al., 2019). Esta dinámica de los receptores puede afectarse por LRG1 haciendo que pueda presentarse tanto aumento como disminución de la viabilidad.

Con el material genético de las celular MDA-MB-231 se realizó un microarreglo y se detectaron 35 genes con expresión diferencial significativa, se sobreexpresó ADRB2, APC, ASK, BRD2, CBLC, CD3G, CD74, CDH13, CUTL1, ETV7, FGF8, GPR19, GUK1, HSD17B2, ITGA7, MAP3K7, MYBL1, NDP, NQO1 PDCD6, PIM1, PTTG1IP, AB33A, RPL22, RUNX2, SERPINB6, SSPN, TPX2, VEGF, XRCC1 y ZNF6, se subexpresó CLU, FGF3, GSTA4 y MTAP. En condiciones fisiológicas la mayoría de estos genes está involucrado en procesos de desarrollo celular, factores de transcripción, modificaciones postraduccionales, respuestas inmunes, reparación de ADN, vías de desintoxicación, transporte vesicular del retículo endoplasmático y comunicación extracelular (Szklarczyk et al., 2015), sin embargo, la mayoría de ellas también se ha estudiado por tener un papel relevante en el cáncer de mama.

Cuando se habla de ellos en un contexto de cáncer de mama también se han encontrado múltiples reportes de sus papeles es esta enfermedad, en el caso de ZNF711, su expresión está significativamente relacionada con la expresión de RE o HER2, así que se ha propuesto como biomarcador para predecir un mal pronóstico y puede servir como un objetivo terapéutico (X. Li et al., 2020), MYBL1 por el contrario, se ha descrito como un gen inversamente relacionado con RE y HER2 y se ha correlacionado con la vía Wnt/ β -catenina y con el gen CD44, lo que indica su participación en el crecimiento de tumores de cáncer de mama triple negativo (Ikeda et al., n.d.). ETV7 regula las características de las células madre del cáncer de mama al reprimir los genes de respuesta a IFN (Pezzè et al., 2021), CBLC inhibe la proliferación y metástasis de células de cáncer de mama a través de la ubiquitinación y degradación de CTTN (W. Li et al., 2022), para el caso de CDH13 se ha reportado que su metilación está relacionada con el riesgo de cáncer de mama (J. Yang et al., 2016). La expresión de CD74 junto a un complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII)

está asociada con la supervivencia del paciente en el cáncer de mama de tipo basal y a respuestas inmunitaria intratumorales más eficaz (Z. Q. Wang et al., 2017). El gen ITGA7, NQO1, CUX1 y DBF4 regulan la migración y la invasión en el cáncer de mama (Bhandari et al., 2018; Mansouri et al., 2014; Yang Yang et al., 2014). Cuando HSD17B2, XRCC1 y PDCD6 presentan polimorfismos en sus secuencias que les impiden cumplir con sus funciones normales como deshidrogenasa y reparador de ADN respectivamente aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama (Hashemi et al., 2018; Jansson et al., 2007; Sultana et al., 2013). El estudio realizado por Yong Yang y colaboradores (2015) reportado que cáncer de mama se presentan altos niveles de TPX2 por lo que promueve la proliferación, invasión y migración de sus células mediante la inhibición de las expresiones de MMP2 y MMP9. Por otro lado, los genes RAB33A, SSPN, APC y PIM1 han cobrado mayor importancia en el cáncer de mama por dar a los tumores la característica de ser quimioresistentes a terapias con cisplatino (Jerez et al., 2020; G. Li et al., 2018; VanKlompberg et al., 2015; Zhao et al., 2017). RUNX2 en carcinoma de mama está asociado con el estadio clínico ya que se considera un factor de mal pronóstico, además por su papel en el desarrollo esquelético se a asociado con la metástasis en el hueso que suele ser el sitio más común donde sucede (Onodera et al., 2010). Con respecto a VEGFA ya se a caracterizado por su papel en la modulación de la angiogénesis y el crecimiento metastásico esto hace que también este asociado con un mal pronóstico en el cáncer de mama (Obermair et al., 1997) similar a lo que sucede con FGF8 que con sus altos niveles de expresión induce un aumento de la angiogénesis, el crecimiento y la metástasis tumorales (F. Liu et al., 2014). Por su parte, PTTG1IP sola y en conjunto a otras proteínas se asocia con un mayor riesgo de muerte por cáncer de mama (Repo et al., 2017). Al reconocer el papel que juega cada uno de estos genes en el cáncer de mama podemos entender un poco más por qué se encuentran sobreexpresados en la línea celular MDA-MB-231, además de que podemos inferir que LRG1 interacciona con estos genes promoviendo la carcinogénesis, sin embargo, para confirmarlo es necesario ampliar el estudio para explorar la interacción de LRG1 con cada gen, ya que hasta ahora no hay ningún reporte donde se relacione esta proteína con los genes que se encontraron sobreexpresados.

CLU, FGF3, GSTA4 y MTAP disminuyeron su expresión. CLU expresada en cáncer de mama está relacionada con un grado de estadio tumoral clínico más alto, metástasis en los ganglios

linfáticos y supervivencia general más corta, también se reportado que protege a las células tumorales de la apoptosis por lo que se sobreexpresa cuando se aplican tratamientos como por tratamientos como 1,25-dihidroxitamina D 3, factor de crecimiento transformante beta-1, radiación ultravioleta e IR (Chen et al., 2021; Shannan et al., 2006). Normalmente MTAP se expresa significativamente menos en cáncer de mama triple negativo que en el resto de los subtipos moleculares de cáncer, además, este gen disminuye la sensibilidad de a diversos tratamientos anticancerígenos (De Oliveira et al., 2016). La expresión de FGF3 se ha correlacionado con tumores en etapa avanzada y de alto grado, así como con un menor tiempo de supervivencia del paciente, sin embargo, estos resultados no son uniformes ya que la desregulación de este gen depende también de su fusión con otras proteínas como TACC3 (W. Wang et al., 2015). Para GSTA4 no se reportado ninguna relación directa con cáncer de mama, sin embargo, si se ha asociado con otros tipos de cáncer, en carcinoma hepatocelular suprime el crecimiento tumoral y la metástasis del carcinoma hepatocelular humano al dirigirse a la vía AKT (C. J. Liu et al., 2017). De acuerdo a todos estos reportes la expresión de estas proteínas es variable constantemente y no se puede delimitar una característica específica del cáncer de mama ya que su expresión también depende de otros factores del paciente e interacción con otras proteínas, en este caso para entender estas interacciones y estos niveles de expresión también vale la pena centrar otros estudios en la relación directa de estos genes con LRG1, ya que hasta ahora solo se ha relacionado con CLU pero en cáncer de ovario, donde se reportó que la combinación de CLU y LRG1 permite distinguir el estadio III de cancer de ovario de un cancer benigno (Wu et al., 2013). Estos niveles de expresión debieron ser confirmados por qPCR y por esta razón se diseñaron los primers para APC, CD74, CDH13, CLU, ETV7, FGF8, HSD17B2, ITGA7, MAP3K7 y VEGF fueron específicamente para estos genes porque son los que han tenido más reportes relacionados a cáncer de mama, sin embargo, por las limitaciones temporales del estudio no fue posible realizar las reacciones.

Mediante el software SPRING se relacionaron estos genes y con esa información podemos inferir que varios de ellos si están relacionados entre sí, sin embargo, al explorar más a fondo los resultados de la base de datos, los reportes por los que se sugiere la relación no están relacionados con cáncer, aunque sabiendo que puede haber relación entre ellos y que pueden

intervenir en procesos de carcinogénesis con LRG1 como mediador , en un futuro el estudio podría profundizarse para establecer una relación clara. Afortunadamente, este análisis pudo ser más completo mediante la base de datos DAVID que informo específicamente seis genes que participan en vías de cáncer, APC interactúa en las vías de uniones adherentes de celular cancerígenas al interactuar con Axin y B-catenina para evadir la apoptosis, al igual que NQO1 y GST que evaden las señales de apoptosis inducidas por el estrés oxidativo. FGF participa la vía de señalización de MAPK cuando se unen a su receptor FGFR y su cascada de activación llega hasta VEGF para promover la angiogénesis y también puede promover la proliferación, en cancer de páncreas se ha estudiado la activación de los mediadores aguas abajo de la vía de señalización de MAPK y se detectó que la sobreexpresión de LRG-1 significativamente aumenta significativamente la fosforilación de p38, este aumento en la activación podría estar relacionada con la interacción de LRG1 con FGF8 o FGF3 (Xie et al., 2019), también se reportado que el aumento en la expresión de LRG1 disminuye la expresión de FGF, lo que corresponde a efecto que observamos con FGF3 en tejidos de miocardio (Su et al., 2019). En la vía de señalización JAK/STAT la proteína PIM1 interactúa con STAT5 para promover la proliferación (Huang et al., 2008, 2009), en células de leucemia se reporto que la interferencia de la expresión de LRG1 causo la reducción de la fosforilación de JAK2 y STAT3 lo que indica que la regulación a la baja del gen LRG1 inhibe la transducción de señales de la vía JAK-STAT (Xiao & Zhu, 2018), sin embargo no se explica el mecanismo por el que esto sucede, tomando los resultados de nuestro estudio podríamos decir que esta relacionado con los niveles de expresión de PIM1.

Para los genes que participan específicamente en cáncer de mama se reporto que FGF se expresa en el subtipo luminal B participando en la ruta de señalización MAPK que promueve la proliferación, APC se expresa en cáncer de mama triple negativo interactuando con Axin y B-catenina en la vía de señalización Wnt que estimula la progresión del ciclo celular (Huang et al., 2008, 2009) la sobreexpresión de LRG1 resulta en la activación de la vía de señalización Wnt debido al aumento de la expresión de Wnt y β -catenina (Su et al., 2019), el gran aumento en la concentración de β -catenina cambia el equilibrio de unión entre APC y β -catenina, por lo que es posible que como defensa se aumente la expresión de APC para intentar reducir el nivel de β -catenina, ya que con la degradación de axina mediada por APC, la degradación de β -

catenina se ve muy poco afectada por los cambios en la concentración de APC (Lee et al., 2003)

1. Conclusión

Los resultados muestran un efecto dual por parte de LRG1 en las líneas celular de cáncer de mama mientras que en la línea MDA-MB-231 disminuye la viabilidad en las líneas BT549 y MDA-MB-468 la aumenta. Al analizar el efecto de LRG1 sobre perfil de expresión diferencial génica solo en la línea MDA-MB-231, obtuvimos una lista de 35 genes en los 4 estaban subexpresados (CLU, FGF3, GSTA4 y MTAP) y el resto sobreexpresados (ADRB2, APC, ASK, BRD2, CBLC, CD3G, CD74, CDH13, CUTL1, ETV7, FGF8, GPR19, GUK1, HSD17B2, ITGA7, MAP3K7, MYBL1, NDP, NQO1, PDCD6, PIM1, PTTG1IP, AB33A, RPL22, RUNX2, SERPINB6, SSPN, TPX2, VEGF, XRCC1 y ZNF6), estos genes juegan papeles importantes en vías de cáncer induciendo la proliferación, metástasis y quimiorresistencia, sin embargo no se ha encontrado evidencia previa de su interacción con LRG1, por lo que se espera en un futuro establecer la relación entre cada gen con LRG1 y comparar el perfil transcriptómico en otra línea celular de cáncer de mama donde el efecto fue contrario al disminuir la viabilidad celular adicionalmente analizar si esto puede estar relacionado con la respuesta a estrógenos.

Referencias:

- Agapito, G., & Arbitrio, M. (2022). Microarray Data Analysis Protocol. *Methods in Molecular Biology*, 2401, 263–271. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1839-4_17/FIGURES/1
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research* 2017 50:1, 50(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40659-017-0140-9>
- Armstrong, D. K., Kaufmann, S. H., Ottaviano, Y. L., Furuya, Y., Buckley, J. A., Isaacs, J. T., & Davidson, N. E. (1994). Epidermal Growth Factor-mediated Apoptosis of MDA-MB-468 Human Breast Cancer Cells. *CANCERRESEARCH*, 54, 5280–5283.
- Bhandari, A., Xia, E., Zhou, Y., Guan, Y., Xiang, J., Kong, L., Wang, Y., Yang, F., Wang, O., & Zhang, X. (2018). ITGA7 functions as a tumor suppressor and regulates migration and

- invasion in breast cancer. *Cancer Management and Research*, 10, 969–976. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S160379>
- Birsoy, K., Berry, R., Wang, T., Ceyhan, O., Tavazoie, S., Friedman, J. M., & Rodeheffer, M. S. (2011). Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 138(21), 4709–4719. <https://doi.org/10.1242/DEV.067710>
- BT-549 - HTB-122 | ATCC. (n.d.). Retrieved January 10, 2023, from <https://www.atcc.org/products/htb-122>
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., & Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5(2), 89–95. <https://doi.org/10.1186/bcr577>
- Cai, D., Chen, C., Su, Y., Tan, Y., Lin, X., & Xing, R. (2022). LRG1 in pancreatic cancer cells promotes inflammatory factor synthesis and the angiogenesis of HUVECs by activating VEGFR signaling. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(1), 400–412. <https://doi.org/10.21037/jgo-21-910>
- Camilli, C., Hoeh, A. E., De Rossi, G., Moss, S. E., & Greenwood, J. (2022). LRG1: an emerging player in disease pathogenesis. *Journal of Biomedical Science*, 29(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/S12929-022-00790-6/TABLES/1>
- Centro Nacional de Equidad de Genero y Salud Reproductiva. (2016). *Información Estadística Cáncer de Mama*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/cnegsr/acciones-y-programas/informacion-estadistica-cancer-de-mama>
- Chen, Q. F., Chang, L., Su, Q., Zhao, Y., & Kong, B. (2021). Clinical importance of serum secreted clusterin in predicting invasive breast cancer and treatment responses. *Bioengineered*, 12(1), 278–285. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1868732>
- Codina, R., Vanasse, A., Kelekar, A., Vezys, V., & Jemmerson, R. (2010). Cytochrome c-induced lymphocyte death from the outside in: inhibition by serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 15(2), 139–152. <https://doi.org/10.1007/S10495-009-0412-0>
- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281. <https://doi.org/10.7150/JCA.13141>
- Dass, S. A., Tan, K. L., Rajan, R. S., Mokhtar, N. F., Adzmi, E. R. M., Rahman, W. F. W. A.,

- Din, T. A. D. A. A. T., & Balakrishnan, V. (2021). Triple negative breast cancer: A review of present and future diagnostic modalities. *Medicina (Lithuania)*, *57*(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>
- De Oliveira, S. F. V., Ganzinelli, M., Chilà, R., Serino, L., Maciel, M. E., De Andrade Urban, C., De Lima, R. S., Cavalli, I. J., Generali, D., Brogгинi, M., Damia, G., & De Souza Fonseca Ribeiro, E. M. (2016). Characterization of MTAP gene expression in breast cancer patients and cell lines. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145647>
- Dolan, J., Walshe, K., Alsbury, S., Hokamp, K., O’Keeffe, S., Okafuji, T., Miller, S. F. C., Tear, G., & Mitchell, K. J. (2007). The extracellular Leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. *BMC Genomics*, *8*, 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-320>
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer Yousef. *Am J Cancer Res*, *7*(5), 1016–1035.
- Global Observatory of cancer (Globocan), International Agency for Research on Cancer 2018, (IARC), & World Health Organization (WHO). (2019). Breast Cancer. Source: Globocan 2018. In *International Agency for Research on Cancer* (Vol. 876). <http://gco.iarc.fr/today%0Ahttps://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Guldvik, I. J., Zuber, V., Braadland, P. R., Grytli, H. H., Ramberg, H., Lilleby, W., Thiede, B., Zucknick, M., Saatcioglu, F., Gislefoss, R., Kvåle, R., George, A., Grönberg, H., Wiklund, F., Neal, D. E., Gnanapragasam, V. J., Taskén, K. A., & Mills, I. G. (2020). Identification and Validation of Leucine-rich α -2-glycoprotein 1 as a Noninvasive Biomarker for Improved Precision in Prostate Cancer Risk Stratification. *European Urology Open Science*, *21*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.EUROS.2020.08.007>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*, 57–70. <https://doi.org/10.1107/S2059798322003928>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harrell, J. C., Pfefferle, A. D., Zalles, N., Prat, A., Fan, C., Khramtsov, A., Olopade, O. I.,

- Troester, M. A., Dudley, A. C., & Perou, C. M. (2014). Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, *31*(1), 33–45. <https://doi.org/10.1007/s10585-013-9607-4>
- Hashemi, M., Bahari, G., Markowski, J., Małeckki, A., Łos, M. J., & Ghavami, S. (2018). Association of PDCD6 polymorphisms with the risk of cancer: Evidence from a meta-analysis. *Oncotarget*, *9*(37), 24857–24868. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25324>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*, *26*(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- He, L., Feng, A., Guo, H., Huang, H., Deng, Q., Zhao, E., & Yang, M. (2022). LRG1 mediated by ATF3 promotes growth and angiogenesis of gastric cancer by regulating the SRC/STAT3/VEGFA pathway. *Gastric Cancer*, *25*(3), 527–541. <https://doi.org/10.1007/s10120-022-01279-9>
- He, S., Ryu, J., Liu, J., Luo, H., Lv, Y., Langlais, P. R., Wen, J., Dong, F., Sun, Z., Xia, W., Lynch, J. L., Duggirala, R., Nicholson, B. J., Zang, M., Shi, Y., Zhang, F., Liu, F., Bai, J., & Dong, L. Q. (2021). LRG1 is an adipokine that mediates obesity-induced hepatosteatosis and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(24). <https://doi.org/10.1172/JCI148545>
- Hoja de datos de tecnología de microarrays de ADN.* (n.d.). Retrieved January 10, 2023, from <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Microarray-Technology>
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing correct breast cancer cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, *13*(4), 1–7. <http://download.springer.com/static/pdf/110/art%253A10.1186%252Fbcr2889.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbreast-cancer-research.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fbcr2889&token2=exp=1494268443~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F110%2Fart%25253A10.1186%25252Fbcr2889.pdf>
- Hua, J., Liang, C., Zhang, B., Wang, W., & Shi, S. (2020). Role of LRG1 in the Cell Proliferation , Migration , and Prognosis of Pancreatic Cancer. *Researc Square*, 1–20.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2008). *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* 2.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). *Bioinformatics enrichment tools : paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. *37*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
- Ikeda, M., Kumon, K., Omoto, K., Sugii, Y., Mizutani, A., Vaidyanath, A., Kudoh, T., Kasai, T., Masuda, S., & Seno, M. (n.d.). *Spherical Self-Organizing Map Detects MYBL 1 As Candidate Gene for Triple-Negative Breast Cancer*.
- Inoue, M., Nakagomi, H., Nakada, H., Furuya, K., Ikegame, K., Watanabe, H., Omata, M., & Oyama, T. (2017). Specific sites of metastases in invasive lobular carcinoma: a retrospective cohort study of metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, *24*(5), 667–672. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0753-4>
- Jansson, A., Carlsson, J., Olsson, A., Storm, P., Margolin, S., Gunnarsson, C., Stenmark-Askmal, M., Lindblom, A., Persson, B., & Stål, O. (2007). A new polymorphism in the coding region of exon four in HSD17B2 in relation to risk of sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *106*(1), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9477-4>
- Javid, F., Pilotti, C., Camilli, C., Kallenberg, D., Bahou, C., Blackburn, J., R. Baker, J., Greenwood, J., Moss, S. E., & Chudasama, V. (2021). Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1) as a novel ADC target. *RSC Chemical Biology*, *2*(4), 1206–1220. <https://doi.org/10.1039/d1cb00104c>
- Jemmerson, R., Staskus, K., Higgins, L. A., Conklin, K., & Kelekar, A. (2021). Intracellular leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 competes with Apaf-1 for binding cytochrome c in protecting MCF-7 breast cancer cells from apoptosis. *Apoptosis*, *26*(1–2), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01647-9>
- Jerez, Y., Herrero, B., Arregui, M., Morón, B., Martín, M., & Echavarría, I. (2020). Neratinib for the treatment of early-stage, hormone receptor-positive, HER2-overexpressed breast cancer. *Future Oncology*, *16*(17), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0046>
- Johnson, K. S., Conant, E. F., & Soo, M. S. (2021). Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. *Journal of Breast Imaging*, *3*(1), 12–24. <https://doi.org/10.1093/jbi/wbaa110>

- Kathryn, J. C., Sireesha V, G., & Stanley, L. (2012). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*, 32, 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>.Triple
- Knudsen, S. (2004). *Guide to Analysis of DNA Microarray Data: John Wiley & amp.*
- Lee, E., Salic, A., Krüger, R., Heinrich, R., & Kirschner, M. W. (2003). The roles of APC and axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biology*, 1(1), 116–132. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000010>
- Li, G., Guo, J., Shen, B. Q., Yadav, D. B., Sliwkowski, M. X., Crocker, L. M., Lacap, J. A., & Phillips, G. D. L. (2018). Mechanisms of acquired resistance to trastuzumab emtansine in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(7), 1441–1453. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0296>
- Li, W., Lei, T., Song, X., Deng, C., Lu, J., Zhang, W., Kuang, Z., He, Y., Zhou, Q., Luo, Z., Mo, F., Yang, H., Hang, J., Xiao, B., & Li, L. (2022). CBLC inhibits the proliferation and metastasis of breast cancer cells via ubiquitination and degradation of CTTN. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 42(6), 588–598. <https://doi.org/10.1080/10799893.2022.2116049>
- Li, X., Tian, L., Zhang, L., Xu, B., Zhang, Y., & Li, Q. (2020). Clinical significance of ZNF711 in human breast cancer. *Oncotargets and Therapy*, 13, 6593–6601. <https://doi.org/10.2147/OTT.S251702>
- Li, Y., & Ma, L. (2020). Efficacy of chemotherapy for lymph node-positive luminal A subtype breast cancer patients: an updated meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12957-020-02089-y>
- Li, Z. H., Hu, P. H., Tu, J. H., & Yu, N. S. (2016). Luminal B breast cancer: Patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget*, 7(40), 65024–65033. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11344>
- Liu, C. J., Yang, J. H., Huang, F. Z., Nie, W. P., Liu, C. P., Mao, X. H., & Yin, X. M. (2017). *suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting AKT pathway*. 9(2), 301–315.
- Liu, F., You, X., Wang, Y., Liu, Q., Liu, Y., Zhang, S., Chen, L., Zhang, X., & Ye, L. (2014). The oncoprotein HBXIP enhances angiogenesis and growth of breast cancer through

- smodulating FGF8 and VEGF. *Carcinogenesis*, 35(5), 1144–1153. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu021>
- Liu, Y. L., Chou, C. K., Kim, M., Vasisht, R., Kuo, Y. A., Ang, P., Liu, C., Perillo, E. P., Chen, Y. A., Blocher, K., Horng, H., Chen, Y. I., Nguyen, D. T., Yankeelov, T. E., Hung, M. C., Dunn, A. K., & Yeh, H. C. (2019). Assessing metastatic potential of breast cancer cells based on EGFR dynamics. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37625-0>
- Lou, T., Ke, K., Zhang, L., Miao, C., & Liu, Y. (2020). LncRNA PART1 facilitates the malignant progression of colorectal cancer via miR-150-5p/LRG1 axis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(10), 4271–4281. <https://doi.org/10.1002/jcb.29635>
- Mansouri, M., Mirzaei, S. A., Lage, H., Mousavi, S. S., & Elahian, F. (2014). The cell cycle arrest and the anti-invasive effects of nitrogen-containing bisphosphonates are not mediated by DBF4 in breast cancer cells. *Biochimie*, 99(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.010>
- MDA-MB-468 - HTB-132 | ATCC. (n.d.). Retrieved January 10, 2023, from <https://www.atcc.org/products/htb-132>
- Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hernández, J. M. H., Rotello, V. M., & Ramirez, J. T. (2020). Triple-negative breast cancer: A review of conventional and advanced therapeutic strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>
- Navarrete-Valero, C., & Navarrete-Vázquez, C. (2018). Mortalidad por cáncer mamario, prostático y cervicouterino, años perdidos y costos de los programas. México, 2013 a 2016. *Gaceta Medica de Mexico*, 154(6), 665–670. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004369>
- Obermair, A., Kucera, E., Mayerhofer, K., Speiser, P., Seifert, M., Czerwenka, K., Kaider, A., Leodolter, S., Kainz, C., & Zeillinger, R. (1997). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: Correlation with disease-free survival. *International Journal of Cancer*, 74(4), 455–458. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970822\)74:4<455::AID-IJC17>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970822)74:4<455::AID-IJC17>3.0.CO;2-8)
- Onodera, Y., Miki, Y., Suzuki, T., Takagi, K., Akahira, J. I., Sakyu, T., Watanabe, M., Inoue,

- S., Ishida, T., Ohuchi, N., & Sasano, H. (2010). Runx2 in human breast carcinoma: Its potential roles in cancer progression. *Cancer Science*, *101*(12), 2670–2675. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01742.x>
- Pezzè, L., Meškytė, E. M., Forcato, M., Pontalti, S., Badowska, K. A., Rizzotto, D., Skvortsova, I. I., Bicciato, S., & Ciribilli, Y. (2021). ETV7 regulates breast cancer stem-like cell features by repressing IFN-response genes. *Cell Death and Disease*, *12*(8), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04005-y>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, *24*, S26–S35. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>
- Ramirez-Ardila, D. E., Ruigrok-Ritstier, K., Helmijr, J. C., Look, M. P., van Laere, S., Dirix, L., Berns, E. M. J. J., & Jansen, M. P. H. M. (2016). LRG1 mRNA expression in breast cancer associates with PIK3CA genotype and with aromatase inhibitor therapy outcome. *Molecular Oncology*, *10*(8), 1363–1373. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.07.004>
- Repo, H., Gurvits, N., Löyttyniemi, E., Nykänen, M., Lintunen, M., Karra, H., Kurki, S., Kuopio, T., Talvinen, K., Söderström, M., & Kronqvist, P. (2017). PTTG1-interacting protein (PTTG1IP/PBF) predicts breast cancer survival. *BMC Cancer*, *17*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3694-6>
- Seita, J., Sahoo, D., Rossi, D. J., Bhattacharya, D., Serwold, T., Inlay, M. A., Ehrlich, L. I. R., Fathman, J. W., Dill, D. L., & Weissman, I. L. (2012). Gene Expression Commons: An Open Platform for Absolute Gene Expression Profiling. *PLOS ONE*, *7*(7), e40321. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040321>
- Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W., & Reichrath, J. (2006). Challenge and promise: Roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death and Differentiation*, *13*(1), 12–19. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401779>
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1348*(1), 20–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>

- Singhal, M., Gengenbacher, N., Pari, A. A. A., Kamiyama, M., Hai, L., Kuhn, B. J., Kallenberg, D. M., Kulkarni, S. R., Camilli, C., Preuß, S. F., Leuchs, B., Mogler, C., Espinet, E., Besemfelder, E., Heide, D., Heikenwalder, M., Sprick, M. R., Trumpp, A., Krijgsveld, J., ... Augustin, H. G. (2021). Temporal multi-omics identifies LRG1 as a vascular niche instructor of metastasis. *Science Translational Medicine*, 13(609). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABE6805/SUPPL_FILE/SCITRANSLMED.ABE6805_DATA_FILE_S1.ZIP
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Stanisławek, A. (2021). *Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review*. 1–30.
- Su, Q., Lv, X. W., Sun, Y. H., Ye, Z. L., Kong, B. H., & Qin, Z. B. (2019). MicroRNA-494 Inhibits the LRG1 Expression to Induce Proliferation and Migration of VECs in Rats following Myocardial Infarction. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 18(15), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.08.007>
- Sultana, R., Abdel-Fatah, T., Abbotts, R., Hawkes, C., Albarakati, N., Seedhouse, C., Ball, G., Chan, S., Rakha, E. A., Ellis, I. O., & Madhusudan, S. (2013). Targeting XRCC1 deficiency in breast cancer for personalized therapy. *Cancer Research*, 73(5), 1621–1634. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2929>
- Szkarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. Von. (2015). *STRING v10: protein – protein interaction networks, integrated over the tree of life*. 43(October 2014), 447–452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Tang, P., & Tse, G. M. (2016). Immunohistochemical surrogates for molecular classification of breast carcinoma: A 2015 update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 140(8), 806–814. <https://doi.org/10.5858/arpa.2015-0133-RA>

- Uso de chips de ADN (microarrays) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados / Medicina Clínica.* (n.d.). Retrieved January 10, 2023, from <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-articulo-uso-chips-adn-microarrays-medicina-13057538>
- VanKlombenberg, M. K., Bedalov, C. O., Soto, K. F., & Prospero, J. R. (2015). APC selectively mediates response to chemotherapeutic agents in breast cancer. *BMC Cancer*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1456-x>
- Voduc, K. D., Cheang, M. C. U., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T. O., & Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(10), 1684–1691. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.9284>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *321*(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, C. H., Li, M., Liu, L. L., Zhou, R. Y., Fu, J., Zhang, C. Z., & Yun, J. P. (2015). LRG1 expression indicates unfavorable clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *6*(39), 42118. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5967>
- Wang, W., Chen, T., Li, H., Chen, Y., Wu, Z., Feng, T., Zhang, X., Zhong, Q., Zhong, Q., Li, G., Guo, L., Zhou, L., & Zhou, J. (2015). Screening a novel FGF3 antagonist peptide with anti-tumor effects on breast cancer from a phage display library. *Molecular Medicine Reports*, *12*(5), 7051–7058. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4248>
- Wang, Y., Xing, Q., Chen, X., Wang, J., Guan, S., Chen, X., Sun, P., Wang, M., & Cheng, Y. (2019). The Clinical Prognostic Value of LRG1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, *19*(9), 756–763. <https://doi.org/10.2174/1568009619666190204095942>
- Wang, Z. Q., Milne, K., Webb, J. R., & Watson, P. H. (2017). CD74 and intratumoral immune response in breast cancer. *Oncotarget*, *8*(8), 12664–12674. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8610>
- Wen, S. Y., Zhang, L. N., Yang, X. M., Zhang, Y. L., Ma, L., Ge, Q. L., Jiang, S. H., Zhu, X. L., Xu, W., Ding, W. J., Yang, B. Q., Zhang, Z. G., & Teng, Y. C. (2014). LRG1 is an independent prognostic factor for endometrial carcinoma. *Tumor Biology*, *35*(7), 7125–

7133. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1953-6>

- West, A. K. V., Wullkopf, L., Christensen, A., Leijnse, N., Tarp, J. M., Mathiesen, J., Erler, J. T., & Oddershede, L. B. (2017). Dynamics of cancerous tissue correlates with invasiveness. *Scientific Reports*, 7(March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep43800>
- Wu, J., Xie, X., Nie, S., Buckanovich, R. J., & Lubman, D. M. (2013). *Altered Expression of Sialylated Glycoproteins in Ovarian Cancer Sera Using Lectin-based ELISA Assay and Quantitative Glycoproteomics Analysis*.
- Wu, J., Yin, H., Zhu, J., Buckanovich, R. J., Thorpe, J. D., Dai, J., Urban, N., & Lubman, D. M. (2015). Validation of LRG1 as a Potential Biomarker for Detection of Epithelial Ovarian Cancer by a Blinded Study. *PLOS ONE*, 10(3), e0121112. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121112>
- Xiao, S., & Zhu, H. (2018). Leucine-rich alpha-2-glycoprotein1 gene interferes with regulation of apoptosis in leukemia KASUMI-1 cells. *Medical Science Monitor*, 24, 8348–8356. <https://doi.org/10.12659/MSM.911249>
- Xie, Z. B., Zhang, Y. F., Jin, C., Mao, Y. S., & Fu, D. L. (2019). LRG-1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis via modulation of the EGFR/p38 signaling. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1088-0>
- Yang, J., Niu, H., Huang, Y., & Yang, K. (2016). A systematic analysis of the relationship of CDH13 promoter methylation and breast cancer risk and prognosis. *PLoS ONE*, 11(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149185>
- Yang, Yang, Zhang, Y., Wu, Q., Cui, X., Lin, Z., Liu, S., & Chen, L. (2014). Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 33(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-14>
- Yang, Yong, Li, D. P., Shen, N., Yu, X. C., Li, J. B., Song, Q., & Zhang, J. H. (2015). TPX2 promotes migration and invasion of human breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(12), 1064–1070. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.11.007>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Zhang, Y. S., Han, L., Yang, C., Liu, Y. J., & Zhang, X. M. (2021). Prognostic Value of LRG1 in Breast Cancer: A Retrospective Study. *Oncology Research and Treatment*, 44(1–2), 36–41. <https://doi.org/10.1159/000510945>
- Zhang, Y., Zhang, Z., Huang, W., & Zeng, J. (2020). MiR-4282 inhibits tumor progression through down-regulation of ZBTB2 by targeting LIN28B in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/jcp.29458>
- Zhao, W., Qiu, R. Y., Li, P., & Yang, J. (2017). PIM1: a promising target in patients with triple-negative breast cancer. *Medical Oncology*, 34(8), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0998-y>
- Zhong, D., He, G., Zhao, S., Li, J., Lang, Y., Ye, W., Li, Y., Jiang, C., & Li, X. (2015). LRG1 modulates invasion and migration of glioma cell lines through TGF- β signaling pathway. *Acta Histochemica*, 117(6), 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.05.001>
- Zhong, D., Zhao, S., He, G., Li, J., Lang, Y., Ye, W., Li, Y., Jiang, C., & Li, X. (2015). Stable knockdown of LRG1 by RNA interference inhibits growth and promotes apoptosis of glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Tumor Biology*, 36(6), 4271–4278. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3065-3>