



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE EZRIN EN EL FENOTIPO RESISTENTE
A CISPLATINO EN LA LINEA CELULAR DE CÁNCER DE
MAMA MCF-7

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARACELI RUIZ SILVESTRE



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ALFREDO GARCÍA VENZOR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Ruiz
Silvestre
Araceli
5530681957
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Ciencias
Biología
311091584

2. Datos del Asesor.
M. en C.
Alfredo
García
Venzor

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Miguel
Santibáñez
Andrade

4. Datos del sinodal 2
Dra.
Edna Ayerim
Mandujano
Tinoco

5. Datos del sinodal 3
Dra.
Floria Josefina
Lizárraga
Sánchez

6. Datos del sinodal 4
Q.
Viviana
Escobar
Sánchez

7. Datos del escrito.
Evaluación de Ezrin en el fenotipo resistente a cisplatino en la línea celular de cáncer de mama MCF-7
112 p
2019



Instituto Nacional de Medicina Genómica MÉXICO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección del M. en C. Alfredo García Venzor.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme todas las herramientas académicas necesarias para formarme como un profesionalista.

A la Facultad de Ciencias por moldearme como bióloga y enseñarme este apasionante camino del continuo descubrimiento y asombro de la vida.

Al instituto Nacional de Medicina Genómica por permitirme obtener la experiencia práctica necesaria en sus instalaciones para realizar este trabajo.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, darme la libertad de proponer un proyecto y confiar en mi. Su apoyo académico, económico, emocional son invaluableles.

A mi tutor, el M. en C. Alfredo García Venzor por sus enseñanzas, paciencia, comprensión y orientación a lo largo de la realización de este proyecto. Quedó totalmente agradecida por aconsejarme en la vida, y brindarme su amistad.

A la Dra. Floria Lizárraga Sánchez y a la Dra. Edna Mandujano Tinoco por su apoyo académico brindado durante la realización de este proyecto.

A mis sinodales por el tiempo e interés mostrado de leer el presente trabajo. Sus observaciones han sido fundamentales para la elaboración de mi tesis.

Dedicatorias

A mis padres

Por darme la fuerza de creer en mí misma en todo momento, por el empeño que pusieron en mi educación y crianza. Mi agradecimiento hacia ustedes es infinito, por lo que las palabras quedan cortas ante los sentimientos, les quiero con todo mi corazón. Quedó fiel a la promesa de ser mejor cada día.

A mis compañeros de laboratorio

Por ayudarme en la adquisición de herramientas para la construcción de este trabajo, por estar ahí en los momentos más frustrantes y difíciles. Su compañía, consejos, y amistad fueron un pilar fundamental para mi crecimiento. Que nuestra amistad perdure a lo largo de nuestras vidas, soy muy feliz de compartir mis días en el laboratorio con ustedes. Gracias Fati, Flo, Manu y Alf.

A Mari y Tulio

Por darme orientación a lo largo de la vida, siempre han sido mis hermanos mayores, una luz y apoyo en todo momento. Les quiero infinitamente.

Gracias Diana, Lucero y Sara

Por ser compañeras de viaje, pilares en altas y bajas y estar conmigo en momentos complicados a pesar de la distancia.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	8
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	11
1 Cáncer	11
2 Cáncer de mama	11
2.1 Clasificación	12
2.2 Cáncer de mama en México	14
2.3 Diagnóstico del cáncer de mama	14
2.4 Tratamientos empleados en cáncer de mama	15
2.4.1 Quimioterapia	17
2.4.2 Antineoplásicos	18
3 Cisplatino	19
3.1 Cisplatino y cáncer de mama	20
3.2 Mecanismo de acción y blancos moleculares	21
4 Quimiorresistencia	24
4.1 Quimiorresistencia a cisplatino	24
4.1.1 Mecanismos de resistencia a cisplatino	25
4.1.2 Quimiorresistencia, cáncer de mama y cisplatino	28
5 Ezrin	29
5.1 Ezrin y el cáncer	36
5.2 Ezrin y cisplatino	37
5.3 Ezrin y quimiorresistencia	38
5.3.1 Ezrin y quimiorresistencia a cisplatino	39
5.3.2 Ezrin, quimiorresistencia y cáncer de mama	40
IV. JUSTIFICACIÓN	42
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	43
VI. HIPÓTESIS	43
VII. OBJETIVOS	43
1 Objetivos generales	43
2 Objetivos particulares	43
VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	44
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	45
1 Cultivo celular	45
2 Generación de una subclona resistente a cisplatino	45
3 Ensayo de MTS	45

4	Diseño de Oligonucleótidos para Ezrin	46
5	Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario.....	46
6	RT-qPCR.....	46
7	Ensayo de Western Blot.....	47
7.1	Extracción y cuantificación de proteínas	47
7.2	Western Blot	47
8	Inmunofluorescencia.....	48
9	Secuenciación del transcriptoma de células MCF-7WT y cpRMCF7	49
10	Análisis integral del transcriptoma de células MCF-7WT y cpRMCF7 por medio de programas bioinformáticos.....	50
10.1	GSEA	50
10.2	Análisis de bases de datos.....	51
11	Pruebas estadísticas	51
X.	RESULTADOS	52
1	Obtención de la subclona MCF-7 resistente a cisplatino (cpRMCF-7).....	52
2	La expresión de RNAm de Ezrin se mantiene sin cambios en células cpRMCF-7 en comparación con su línea parental.....	54
3	Disminución del nivel de expresión a nivel proteína de pEzrinT567 en células cpRMCF-7 en comparación con su línea parental	54
4	Disminución de pEzrinT567 en membrana de células cpRMCF-7 comparadas con su línea parental	55
5	Análisis diferencial de la expresión génica por secuenciación del transcriptoma de células MCF-7WT y cpRMCF7	57
5.1	Muestras de RNA.....	57
5.2	Evaluación de la calidad de las muestras de RNA	57
5.3	Evaluación de la calidad de los reads de cada muestra por FastQC	58
5.4	El fenotipo resistente de la subclona cpRMCF-7 conduce al cambio de la expresión de 1047 genes	59
6	Análisis integral del transcriptoma de células cpRMCF-7.....	62
6.1	Siete genes previamente relacionados con resistencia a cisplatino y la vía de Ezrin presentaron un cambio en su expresión en la subclona cpRMCF-7.....	64
6.2	Análisis de enriquecimiento de procesos celulares en los que podría estar involucrada Ezrin	65
XI.	DISCUSIÓN	67
XII.	CONCLUSIONES	79
XIII.	PERSPECTIVAS.....	80
XIV.	REFERENCIAS.....	81
XV.	FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	91

I. ABREVIATURAS

ABC: Cáncer de mama avanzado

BSA: Albúmina de suero bovino

cDNA: DNA complementario

CSC: Células troncales cancerosas

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DISC: Complejo de señalización que induce la muerte celular

EMT Transición epitelio mesénquima

ER+: Positivo a receptor de estrógenos

ERM: Ezrin-Radixin-Moesin

ES: Puntuación de enriquecimiento

ESMO: Sociedad Europea de Oncología Médica

FC: Valor de cambio

FDR: Tasa de falso descubrimiento

GSEA: Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

LABC: Cáncer de mama localmente avanzado

lncRNAs: RNAs largos no codificantes

MBC: Cáncer de mama metastásico

miRNAs: Micro RNAs

ncRNAs: RNAs no codificantes

NES: Puntuación de enriquecimiento normalizada

pEzrinT567: Fosforilación de Ezrin en la Treonina 567

pEzrinY146: Fosforilación de Ezrin en la Tirosina 146

PR+: Positivo a receptor de progesterona

RIN: Número de integridad del RNA

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

II. RESUMEN

El cáncer de mama representa la principal causa de muerte a nivel mundial en mujeres a consecuencia de una neoplasia. En nuestro país es un problema de salud pública y en la última década del siglo su incidencia y mortalidad han ido al alza. Uno de los elementos que constituyen la estrategia terapéutica habitual para tratar este tipo de cáncer es la quimioterapia. El cisplatino es un antineoplásico utilizado con frecuencia en tratamientos quimioterapéuticos a la hora de tratar cáncer de mama, entre otros cánceres.

En el tratamiento con cisplatino se tiene una buena respuesta inicial a la quimioterapia, sin embargo después de periodos largos de tratamiento a dosis bajas, se desencadena un fenotipo quimiorresistente. Los mecanismos mediante los cuales se adquiere este fenotipo son múltiples y aún no son entendidos por completo. Hoy día es fundamental identificar nuevos blancos moleculares terapéuticos asociados a este mecanismo.

Una molécula que recientemente se ha asociado a resistencia y cisplatino es Ezrin. Esta es una proteína transmembranal relacionada con la configuración del citoesqueleto de actina, morfología celular, adhesión, motilidad y con alta relevancia en señalización celular. Esta proteína también se ha relacionado con anterioridad a fenotipos resistentes a fármacos entre ellos cisplatino. Sin embargo, hasta hora no se tiene un antecedente que relacione a Ezrin con un fenotipo quimiorresistente a cisplatino en células de cáncer de mama.

Con la finalidad de determinar si la resistencia a cisplatino en células de cáncer de mama (MCF-7) causa un cambio en la expresión, regulación postraducciona y localización de Ezrin, se generó una subclona resistente a cisplatino, por exposición a concentraciones subletales crecientes de cisplatino. Posterior a ello se evaluó el nivel de expresión de Ezrin a nivel de RNAm, proteína y su forma fosforilada en T567. Los resultados obtenidos mostraron que en la subclona resistente, no se observaron cambios a nivel mensajero y proteína de Ezrin. Sin embargo, si hubo una disminución en la cantidad de Ezrin fosforilada en T567, lo que podría sugerir cambios en la localización y actividad de esta proteína.

Basado en esto, se evaluó la localización del estado de la fosforilación T567 de Ezrin en células parentales y resistentes, observando que se tiene una disminución en la localización membranal en células resistentes en comparación con su control parental. Esto datos indican que se tiene cambios en la señalización a partir de Ezrin.

Finalmente, para evaluar el cambio en el perfil de expresión génica en las células MCF-7 resistentes, se realizó un análisis de expresión diferencial mediante RNA-seq. Se obtuvieron 1047 genes cuya expresión se modificó en las células resistentes en comparación con la línea parental. Se tuvo enriquecimiento de genes en procesos relacionados con los factores de transición P53, AP1 y CREB los cuales ya se han reportado tienen una relación con el fenotipo resistente a cisplatino. Además, se tuvo enriquecimiento de genes en procesos relacionados con los factores de transcripción: FOXO4, DBP y STAT5a quienes podrían representar un papel emergente de estudio para resistencia a cisplatino.

De igual forma tuvimos enriquecimiento de genes en procesos celulares que comparten al menos 1 de los 7 genes ya reportados que tienen relación con Ezrin y mecanismos de acción de cisplatino, como: secreción, regulación de la exocitosis, exocitosis, vesículas secretoras, endocitosis, y rutas de señalización mediadas por citocinas. Estos resultados indicaron que probablemente se tiene un fenotipo altamente dinámico en la comunicación intercelular por medio de vesículas, donde Ezrin podría estar participando. Por último, podemos concluir que en células resistentes a cisplatino, se tiene un cambio en la señalización de Ezrin; sin embargo, aún falta dilucidar los procesos que resultan afectados del estado de fosforilación o localización de esta proteína, como migración, metástasis, o incluso resistencia a los medicamentos.

III. INTRODUCCIÓN

1 Cáncer

El cáncer es el término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. De acuerdo a GLOBOCAN (2018) el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. Una característica importante de este, es la rápida multiplicación de células anormales que se extienden más allá de los límites establecidos por su tejido y órgano de origen, pudiendo invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, fenómeno nombrado «metástasis». Siendo la metástasis la principal causa de muerte por cáncer (OMS, 2017).

2 Cáncer de mama

El cáncer de mama se desarrolla principalmente a partir de las células epiteliales de los conductos que llevan leche desde los lobulillos hasta el pezón o en las células epiteliales de las glándulas mamarias productoras de leche. Estas células presentan un crecimiento descontrolado y posteriormente forman una masa tumoral (Akram, *et al.*, 2017).

El tumor puede ser de dos tipos: benigno o maligno. Los tumores benignos se conforman de células que no son invasivas hacia otras partes del cuerpo; sin embargo, pueden afectar la salud del paciente e incluso conducir a la muerte en caso de llegar a comprometer la funcionalidad de un órgano esencial para la vida. En cambio, un tumor maligno es aquel conformado por células que pueden invadir tejidos circundantes o realizar metástasis a áreas distantes del cuerpo. A este último tipo de tumores se les llama cancerosos (ACS, 2017).

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo y es el más frecuente entre mujeres, tanto en regiones desarrolladas como subdesarrolladas. Además de ser la principal causa de muerte por cáncer en mujeres provocando aproximadamente 626,679 muertes por año en todo el mundo (GLOBOCAN, 2018).

2.1 Clasificación

El cáncer de mama tiene distintos tipos de clasificación, las clasificaciones más habituales son la molecular y la histológica (Cuadro 1), las cuales se basan en el uso de biomarcadores. Estos se caracterizan por ser objetivamente medibles y evaluados como indicadores de un proceso biológico normal, patológico o respuesta a una intervención terapéutica específica (Vuong *et al.*, 2014).

En este texto nos enfocaremos en la clasificación molecular, donde de acuerdo a los biomarcadores moleculares más empleados (Tabla 1), el cáncer de mama se clasifica en 4 categorías: luminal A, luminal B, cáncer de mama positivo a receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2+), y cáncer de mama triple negativo (TNBC). Este último subtipo se divide en basal y bajo en claudinas (Dias *et al.*, 2017) (Vuong *et al.*, 2014) (Dai *et al.*, 2015) (Masood, 2016).

Los subtipos luminales; A y B, son los más frecuentes; representando un 70 a 80 % del total de casos a nivel mundial. Poseen el mejor pronóstico de supervivencia y se caracterizan por ser positivos al receptor de estrógenos (ER+) y al receptor de progesterona (PR+).

El subtipo luminal A tiene un menor grado de expresión de PR en comparación con luminal B, además de bajos niveles de Ki67, que es una proteína nuclear no histónica y biomarcador de proliferación celular, cuya expresión se asocia con una supervivencia generalmente más corta en pacientes con cáncer de mama (Vuong *et al.*, 2014).

Tabla 1: Clasificación del cáncer de mama.

CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA							
	Subtipos		Características	Datos adicionales	Pronóstico	Referencias	
Clasificación Molecular	Luminal A		<ul style="list-style-type: none"> • ER+ • PR+, • HER2- • KI67- • Claudina 3, 4, 7+ • E-cadherina + 	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta positiva a terapia endocrina. • Alta expresión de genes relacionados con ER • Baja expresión de genes relacionados a proliferación en comparación con luminal B. 	Bueno, mejor que luminal B.	Dai <i>et al.</i> , 2015 Dias <i>et al.</i> , 2017 Masood, 2016	
	Luminal B		<ul style="list-style-type: none"> • ER+ • PR+ • HER2- o HER2+ • KI67+ • KI67+ 	Respuesta positiva a quimioterapia endocrina	Intermedio a malo en comparación con luminal A	Dai <i>et al.</i> , 2015	
	HER2		<ul style="list-style-type: none"> • ER- • PR- • HER2+ 	Se asocia con carcinoma ductal <i>in situ</i> . Respuesta positiva a antraciclina, quimioterapia neoadyuvante basada en taxanos y aún régimen con trastuzumab	Malo	Dai <i>et al.</i> , 2015 Masood, 2016	
	Cáncer de mama triple negativo	Bajo en claudinas		<ul style="list-style-type: none"> • [ER- PR-] HER2- Disminución de al menos dos de los siguientes marcadores: <ul style="list-style-type: none"> • Claudina 3, 4, 7 - • E-cadherina - 	Se asocia con edad temprana de inicio y un grado de tumor más alto. Tiene una baja expresión de genes epiteliales luminales.	Peor pronóstico que Luminal A	Dai <i>et al.</i> , 2015 Dias <i>et al.</i> , 2017
		Basal		<ul style="list-style-type: none"> • ER-, PR-, HER2-, KI67- • Marcadores basales: CK5+, EGFR+ • Mutación en: p53, BRCA1, CK5/6+, CK14+, CK17+, CKIT+, P63+. 	Aún no existe un consenso sobre los biomarcadores que definen a este subtipo. Alta tasa proliferativa. Se presenta más comúnmente en mujeres jóvenes. Generalmente presenta metástasis a cerebro y pulmón.	Malo	Masood, 2016 Dai <i>et al.</i> , 2015 Dias <i>et al.</i> , 2017 Schneider <i>et al.</i> , 2008
Clasificación histológica	Ductal	Tienen su origen de células que revisten los conductos lácteos	<i>In situ</i>	Permanece dentro de los conductos lácteos o lóbulos, no invaden los tejidos normales del seno.	Representan entre el 50 al 80 % del total de cánceres de mama.	Invasivo: El pronóstico depende del tipo de tumor canceroso que se presente.	Cancer Resource Foundation, nd Masood, 2016 Lakhani, 2012 Akram <i>et al.</i> , 2017
	Lobular	Tienen su origen de las glándulas mamarias (lóbulos).		<i>invasivo</i>			

2.2 Cáncer de mama en México

El cáncer de mama es un problema de salud pública en México y representa la principal causa de muerte en mujeres a consecuencia de una neoplasia en nuestro país, de acuerdo a la Secretaría de Salud (2015). En 2018 se registraron 27,287 nuevos casos, de los cuales 6,884 murieron, es decir 25.22 %, representado la neoplasia con mayor número de nuevos casos al año y la segunda principal causa de muerte por cáncer en México (GLOBOCAN, 2018).

Un estudio epidemiológico realizado por Soto y Chavarri (2016) con datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) mostró que la incidencia y la mortalidad del cáncer de mama en México han ido al alza en la primera década del siglo. Entre 2000 y 2011 se presentaron cambios en cuanto a factores de riesgo para cáncer de mama detectados en la población, lo que explica en parte el aumento en el número de casos notificados. Se vio un incremento en el consumo de alcohol en mujeres del 24,3% en 2000 al 41,3% en 2012, reducción en la tasa de fecundidad de un 2.7 de nacimientos por mujer en 2001 al 2.3 en 2011, acompañado de una disminución del número de mujeres que proporcionan lactancia y de la duración media de ésta. En este mismo estudio se resaltó que en México se vive un crecimiento demográfico, y aumento en la esperanza de vida, lo que conduce a un incremento en la incidencia de enfermedades asociadas con el envejecimiento, como lo es el cáncer de mama en mujeres.

El agravamiento en los factores de riesgo poblacionales a consecuencia de modificaciones en el estilo de vida, en el incremento demográfico y en la tasa de la esperanza de vida constituyen elementos clave que explican; en parte, el incremento en la incidencia del cáncer de mama en México.

Es importante destacar que la mejora en los métodos de diagnóstico también es un factor que influye en el incremento de la incidencia. Sin embargo, aún se tienen deficiencias en la detección oportuna integral del cáncer de mama, con hasta un 52 % de detección en etapa tardía de la enfermedad, lo que de igual forma tiene efecto en la tasa de mortalidad (Sánchez *et al.*, 2013).

2.3 Diagnóstico del cáncer de mama

En el momento del diagnóstico del cáncer de mama se busca una confirmación de la enfermedad. Los métodos más comunes que se utilizan son mastografía, ultrasonido e imagen por resonancia magnética, su uso depende de las características propias de cada caso. Para una confirmación

histológica se realiza una biopsia, donde a partir de material tisular se determinan factores de pronóstico. Posterior a ello se lleva a cabo una evaluación patológica donde se incluyen distintas características evaluables para su clasificación: tipo histológico, permanencia vascular y linfática, tamaño del tumor, número de ganglios, permanecía o no de receptores hormonales, estudios de citoqueratinas, factores de crecimiento, etc (Arce *et al.*, 2011).

2.4 Tratamientos empleados en cáncer de mama

La estrategia terapéutica se establece a partir de la valoración de múltiples elementos como: variables histológicas e inmunohistoquímicas del tumor primario, tamaño, multicentricidad, características intrínsecas del individuo con relevancia clínica (edad, género, comorbilidad, antecedentes de radioterapia, estado menstrual, enfermedades concomitantes, estado clínico de la enfermedad, etc.), factores externos como la disponibilidad del material necesario para el tratamiento, además de la preferencia individual del paciente (Arce *et al.*, 2011). Dos factores importantes como indicadores de pronóstico son: el estadio en el que se encuentra el cáncer de mama al momento del diagnóstico y el subtipo molecular de cáncer de mama al que pertenece. El conjunto de estos datos permite seleccionar la estrategia de tratamiento idónea para cada caso en particular (Arce *et al.*, 2011).

La terapia establecida se compone de un grupo de tratamientos que se clasifican de acuerdo al área donde tiene su efecto (tratamientos locales o sistémicos) y el tiempo-espacio en el que se administra a lo largo de la estrategia terapéutica establecida, tomando como referencia el momento de la cirugía, tratamientos neoadyuvantes, antes de someterse a una cirugía, o adyuvantes, posterior a la cirugía (Cuadro 2). Estos dos últimos conceptos se explicarán más adelante.

De acuerdo a las características propias de cada caso clínico, la administración de los elementos terapéuticos se puede llevar a cabo de forma individual, o en conjunto con más fármacos o tratamientos. Se puede prescindir de algún procedimiento, dependiendo las características propias de cada caso clínico.

La estrategia terapéutica debe ser personalizada y se asigna después de la interpretación; realizada por expertos, del conjunto de resultados de la evaluación de cada uno de los factores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Uno de los elementos que constituyen la estrategia terapéutica habitual es la quimioterapia.

Cuadro 2. Características generales de los tratamientos utilizados en cáncer de mama. Se engloban las características principales de los tratamientos empleados habitualmente en clínica para cáncer de mama

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN CÁNCER DE MAMA					
Clasificación de los tratamientos		Tratamientos	Características generales	Subclasificación de los tipos de tratamientos	Tipo de aplicación*
Tratamientos Radicales /locales	Tratamiento con efecto enfocado en el área donde se desarrolla la neoplasia maligna.	Cirugía	Tratamiento quirúrgico del tumor primario que busca un mejor control oncológico y obtener información pronóstica útil para seleccionar el tratamiento complementario (Torres y Vladislavovna, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> • Conservadora • Mastectomía • Cirugía profiláctica (Arce <i>et al.</i>, 2011) 	No aplica
		Radioterapia	Tratamiento a base de la radiación de iones a la mama (Arce <i>et al.</i> , 2011)	Radioterapia: <ul style="list-style-type: none"> • Postmastectomía • En tratamiento multimodal • Paliativa (Sánchez <i>et al.</i>, 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> • Adyuvante • Paliativa
Tratamientos sistémicos	Es un tratamiento que se administra de manera oral o intravenosa y tiene efectos a nivel global en el organismo	Quimioterapia	Tratamiento que consiste en la administración sistémica de antineoplásicos (Benedí y Gómez del Río, 2006)	A base de: <ul style="list-style-type: none"> • Antraciclinas • Taxanos • Cisplatino Ver imagen 1 (Benedí y Gómez del Río 2006)	<ul style="list-style-type: none"> • Adyuvante • Neoadyuvante • Paliativa
		Terapia Endocrina	Terapia que se administrada en casos positivos a receptores hormonales (progesterona y/o estrógeno) cuya finalidad es bloquear el efecto de hormonas para inhibir el crecimiento del tumor.	A base de: <ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifeno • Inhibidores de aromatasa • Ablación o supresión ovárica (Sánchez <i>et al.</i>, 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> • Adyuvante • Neoadyuvante • Paliativa
		Terapia dirigida	Terapia enfocada al bloqueo de la función de un blanco molecular específico en células tumorales. Busca inhibir la progresión de la enfermedad limitando el daño a células cancerosas.	A base de: <ul style="list-style-type: none"> • Trastuzumab • Lapatinib • Bevacizumab (Sánchez <i>et al.</i>, 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> • Adyuvante • Neoadyuvante • Paliativa

*Tipo de aplicación:

- Adyuvante: Se administra después de un método quirúrgico con el objetivo de prevenir una posible recaída.
- Neoadyuvante: Tratamiento que se administra antes de uno radical (cirugía o radioterapia) con el objetivo de disminuir la talla del tumor.
- Paliativo: Tratamiento enfocado en mejorar la calidad de vida sin efectos en la supervivencia (ACS, 2017)

2.4.1 Quimioterapia

La quimioterapia antineoplásica es una técnica de tratamiento para combatir al cáncer y se clasifica como un tipo de terapia sistémica (Cuadro 2). En términos generales la quimioterapia consiste en la administración de una variedad de fármacos que impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas, a los que se les denomina: antineoplásicos (Benedí y Gómez del Río, 2006).

Este tipo de terapia sistémica puede administrarse antes de una cirugía, quimioterapia neoadyuvante o posterior a ella, adyuvante, de igual manera de forma paliativa o al mismo tiempo que otro tratamiento; (Cuadro 2). En la quimioterapia adyuvante se tiene el objetivo de eliminar células cancerígenas que hayan perdurado posterior a la cirugía. En cambio, en la quimioterapia neoadyuvante se aplica con la finalidad de reducir el tamaño del tumor antes de llevar a cabo una cirugía (ACS, 2017).

La aplicación de quimioterapia como primera línea de tratamiento se utiliza en cánceres refractarios a hormonas o en los que se espera sean hormonorresistencia. También puede considerarse útil en casos con múltiples sitios de recidiva o en enfermedad visceral que no se tratan fácilmente con modalidades locales (Egger *et al.*, 2017).

Se considera una buena opción el uso de quimioterapia en cáncer de mama avanzado (ABC), que engloba al cáncer de mama localmente avanzado (LABC) y cáncer de mama metastásico (MBC) (Cardoso *et al.*, 2017). En casos de MBC se recomienda el uso de terapia sistémica; quimioterapia, en cualquier momento durante el curso del tratamiento (Egger *et al.*, 2017). En cambio, en LABC la quimioterapia neoadyuvante es la mejor opción como primera línea de tratamiento (ACS, 2017) (Sánchez *et al.*, 2013) (Arce *et al.*, 2011) (Zhou *et al.*, 2017).

Según las pautas establecidas en 2016 por el tercer consenso internacional del cáncer de mama avanzado los datos recopilados del índice de eficacia del uso de quimioterapia en ABC, son aún deficientes por el bajo índice de sobrevivencia que se presenta en la población (Cardoso *et al.*, 2017).

2.4.2 Antineoplásicos

Los antineoplásicos o citostáticos se utilizan para tratamientos de quimioterapia y son administrados por vía intravenosa, infusión continua, vía oral, de forma tópica, etc. Estos actúan sobre las células tumorales inhibiendo el crecimiento celular, ya sea actuando sobre una o varias fases del ciclo celular (ciclo-específicos o ciclo-inespecífico) o sobre los mecanismos de control de la proliferación. La respuesta al tratamiento con estos fármacos es proporcional a la capacidad proliferativa de las células que a su vez se determina por el tiempo de duplicación del tumor (Benedí y Gómez del Río, 2006).

Existen diferentes clasificaciones de los antineoplásicos, una de las más comunes, es de acuerdo a su blanco farmacológico (Cuadro 3). Entre los antineoplásicos más conocidos y de uso habitual en la clínica se encuentra el cisplatino. El cisplatino es un fármaco citotóxico (Eckstein, 2011) y genotóxico (Shruthi y Shenoy, 2018) clasificado entre los antineoplásicos que actúan sobre el DNA derivados del platino.

Cuadro 3. Clasificación de antineoplásicos de acuerdo a su blanco farmacológico.

CLASIFICACIÓN DE ANTINEOPLÁSICOS DE ACUERDO A SU BLANCO FARMACOLÓGICO
<ul style="list-style-type: none">● Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis sin afectar al DNA:<ul style="list-style-type: none">○ Antineoplásicos de origen vegetal ● Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular:<ul style="list-style-type: none">○ Antagonistas de estrógenos○ Antagonistas de andrógenos○ Progestágenos○ Interferones○ Análogos LHRH ● Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario:<ul style="list-style-type: none">○ Factor de necrosis tumoral, interleucinas, anticuerpos monoclonales, vacunas BCG ● Antineoplásicos que actúan sobre el DNA:<ul style="list-style-type: none">○ Agentes alquilantes○ Antibióticos: antraciclinas y análogos○ Antimetabolitos○ Derivados de camptotecinas○ <u>Derivados del platino</u>
(Benedí y Gómez del Río, 2006)

3 Cisplatino

El cisplatino está compuesto por un átomo de platino, dos de cloro en posición cis y dos grupos NH_3 (Figura 1A). Fue descubierto por Barnett Rosenberg en los 60's, quien observó que el cisplatino detenía el crecimiento bacteriano, mientras experimentaba sobre los efectos del campo eléctrico (Wiltshaw, 1979).

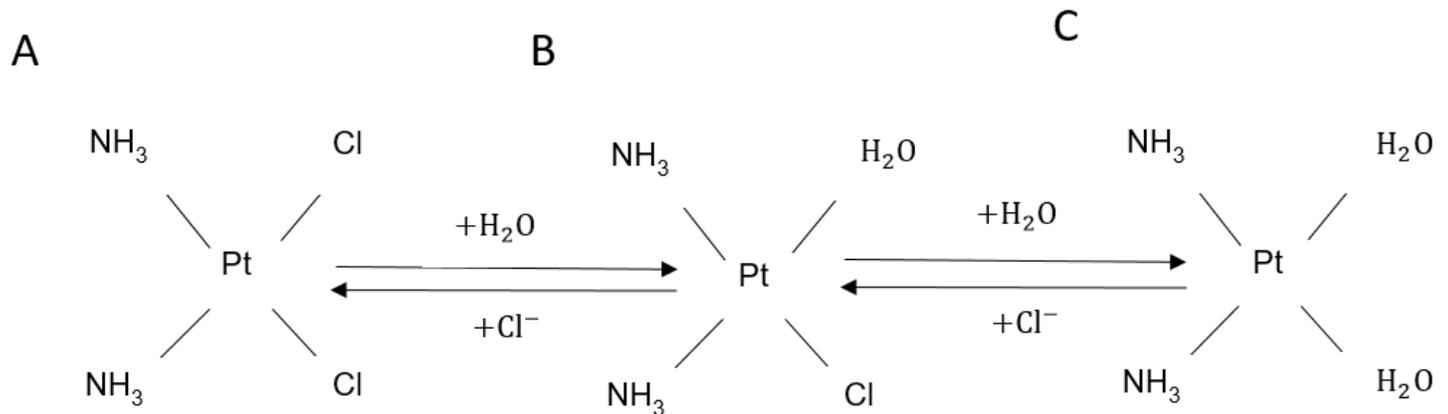


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del cisplatino. A) Cisplatino B) Aqua complejo de platino con una hidrólisis C) Aqua complejo de platino con dos hidrólisis

Después de que el cisplatino se introdujo al área clínica a finales de los setentas, se convirtió rápidamente en uno de los compuestos más efectivos en el tratamiento de las neoplasias y formó parte de los tratamientos con mejores resultados y más utilizados en quimioterapia en las últimas décadas del siglo anterior (Eckstein, 2011).

A pesar de que el uso de cisplatino conduce generalmente a una remisión completa de la enfermedad, la respuesta parcial o la estabilización de la neoplasia (Dilruba y Kalayda, 2016), este medicamento presenta una alta toxicidad, como: nefrotoxicidad (Peres y Júnior, 2013), neuropatía sensorial periférica acumulativa, ototoxicidad, náuseas, vómito (Dilruba y Kalayda 2016), alopecia y leucemia (Egger *et al.*, 2017). Por esta razón se buscó en sus inicios encontrar un análogo con igual actividad anticancerígena y menos número de efectos secundarios, surgiendo así distintos derivados de platino y por tanto la primera línea de drogas anticancerígenas dedicada a tratar un amplio tipo de cánceres (Eckstein, 2011). Los antineoplásicos derivados del platino son, además del cisplatino: carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, loboplatino y hetaplatino, (Dilruba y Kalayda, 2016).

El cisplatino es uno de los fármacos más utilizados en el área clínica al momento de tratar neoplasias malignas sólidas como cáncer testicular, ovárico (Kelland, 2007) vejiga, colorrectal, pulmonar, cáncer

de cabeza y cuello (Dilruba y Kalayda, 2016) (Egger *et al.*, 2017) (Galluzzi *et al.*, 2012) (Galluzzi *et al.*, 2014) y mama. En este último también es utilizado en casos metastásicos avanzados en combinación con otros fármacos (Eckstein, 2011) (Kelland, 2007).

3.1 Cisplatino y cáncer de mama

El cisplatino es administrado por vía intravenosa (Lu *et al.*, 2011) (Jung y Lippard, 2007) en soluciones salinas por un lapso de tiempo corto (Galluzzi *et al.*, 2014). La dosis puede variar de acuerdo a la combinación del fármaco; así como el estadio en el que se encuentra el cáncer y el tipo de tumor. En ABC se administra desde 25 mg (Zhou *et al.*, 2017) hasta 100 mg de cisplatino una vez por semana, hasta por 8 ciclos (Egger *et al.*, 2017) (Asociación de Oncólogos Clínicos de Córdoba [AOCC], 2013).

En TNBC, la quimioterapia a base de platino ha mostrado una marcada eficacia, y se sugiere usar como terapia neoadyuvante en casos con mutaciones del gen BRCA1 / 2 (Sæther *et al.*, 2018). Sin embargo, aún no se considera en casos clínicos como primera opción de tratamiento (Zaharia y Gómez, 2015).

Es frecuente el uso de cisplatino en ABC (Egger *et al.*, 2017), (ACS, 2017). La Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) en 2016 recomendó que en ABC (MBC y LABC) de cualquier subtipo molecular, se debe hacer una evaluación del estado del gen BRCA antes de sugerir quimioterapia a base de platino. Si el caso es TNBC, sin importar el estado de BRCA, se aconseja su aplicación (Cardoso *et al.*, 2017).

En MBC con BRCA asociado a resistencia endocrina, se recomienda el uso de quimioterapia a base de platino, si no se ha administrado antes (Cardoso *et al.*, 2017). Si se habla de TNBC específicamente en MBC, el uso de quimioterapia bajo este fármaco deberá ser considerada como primera línea de tratamiento (Egger *et al.*, 2017) y normalmente en clínica la dosis de uso para MBC puede ir desde 30 a $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ (Egger *et al.*, 2017).

En LABC la quimioterapia neoadyuvante a base de cisplatino es frecuente como primera línea de tratamiento (Arce *et al.*, 2011) (Zhou *et al.*, 2017) (ACS, 2017) con una dosis de uso clínico de 25 (Zhou *et al.*, 2017) a $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ (Lu *et al.*, 2011).

También se sugiere aplicar quimioterapia a base de platino para casos ABC luminales ya tratados previamente con terapia adyuvante a base de antraciclinas y taxanos, y en uso concomitante con trastuzumab para el tratamiento de ABC (Cardoso *et al.*, 2017).

3.2 Mecanismo de acción y blancos moleculares

Una vez que el cisplatino es administrado por vía intravenosa (Lu *et al.*, 2011) (Jung y Lippard, 2007) se ha reportado que del 65 % al 98 % de este, se une a proteínas en plasma sanguíneo (DeConti *et al.*, 1973), tales como: albúmina (Neault y Tajmir, 1998), transferrina (Allardyce, Dyson, Coffey y Johnson, 2002), o mioglobulina. En el caso de esta última, la reacción con el fármaco modifica su estructura, desplegando la cadena de residuos de aminoácido y haciendo que aumente su susceptibilidad a la degradación por proteasas (Liu *et al.*, 2016).

El cisplatino puede ingresar a la célula por difusión pasiva (Kelland, 2000) o por difusión facilitada mediante transportadores de cobre (Galluzzi *et al.*, 2014). Al ingresar al ambiente celular el fármaco cambia de un entorno extracelular con una concentración de cloro más alta (~ 100 mM) que la que se tienen al interior de la célula (~ 2-30 mM) lo que provoca que se de la sustitución de uno o de los dos átomos de cloro que componen al fármaco, por una o dos moléculas de agua (Kelland, 2000) (Eckstein, 2011). La especie resultante de esta hidrólisis se le llama “aqua complejo de platino”, y es el complejo activo del fármaco (Figura 1A-C).

Si el aqua complejo de platino, tiene solo una sustitución del cloro por una molécula de agua (Figura 1B); se tiene, preferentemente, una reacción molecular de reticulación covalente con nitrógenos de nucleófilos del DNA (Wang y Lippard, 2005) (Peres y Júnior 2013).

La doble hidrólisis del cisplatino (Figura 1C), lo convierte en un compuesto altamente electrofílico con carga positiva afín a grupos nucleofílicos que contienen oxígeno, nitrógeno o azufre (Kelland, 2007) (Wang *et al.*, 1996); éstos se encuentran en aminoácidos y en purinas (Jordan y Carmo, 2000), con quienes forma enlaces covalentes (Peres y Júnior, 2013).

En el caso de los aminoácidos, la reacción se lleva a cabo entre un grupo R nucleofílico; comúnmente el grupo tiol, (DeConti *et al.*, 1973) (Eckstein, 2011) (Chekhun *et al.*, 2007) y el complejo activo del fármaco. Un ejemplo, es la reacción platino-cisteína que se da específicamente en su grupo tiol (Timerbaev *et al.*, 2006). Esta reacción afecta la formación de puentes disulfuro entre los grupos tiol

de las cisteínas, tipo de enlace relevante en el ensamblaje y la estabilidad de la estructura funcional proteica.

Se han reportado diferentes uniones entre el aqua complejo de platino y otros residuos de aminoácido como el enlace que se da entre el azufre (Paciotti *et al.*, 2017) de la metionina (Zimmermann y Burda 2010), la formación del complejo platino-triptófano (Liu *et al.*, 2016), o la unión entre el nitrógeno del grupo funcional imidazol de la histidina y el complejo activo del cisplatino (Tanley y Helliwell, 2014). Otro posible efecto biológico que se debe tomar en cuenta como resultado del enlace covalente platino-histidina es una posible modificación de la capacidad catalítica de ciertas enzimas, ya que este aminoácido comúnmente participa en ello.

Los enlaces covalentes entre el aqua complejo de platino y los residuos de aminoácidos anteriormente mencionados tienen consecuencias en la estructura (Wang *et al.*, 2013), funcionalidad, localización o nivel de expresión de las proteínas, lo que podría tener efectos en distintas vías de transducción de señales (Hato *et al.*, 2014) y por tanto originar cambios en el contexto celular y la biología del tumor de forma notable.

El complejo cisplatino-proteína actúa como buffer citoprotector al disminuir la disponibilidad del fármaco para la formación de aductos con el material genético (Köberle *et al.*, 2010). Algunas proteínas reportadas que reaccionan con el cisplatino son: ubiquitina (Shulman *et al.*, 2002), Hsp 60 (Kimura *et al.*, 1993), G-actina (Zou *et al.*, 1995), metalotioneínas (Galluzzi *et al.*, 2014) (Köberle *et al.*, 2010), entre otras, además del tripéptido glutatión (Köberle *et al.*, 2010). La unión cisplatino-GSH disminuye su disponibilidad (Galluzzi *et al.*, 2014), lo que promueve el estrés oxidativo (Jordan y Carmona, 2000).

Se calcula que alrededor del 6 al 11 % del total del antineoplásico administrado reacciona con proteínas citoplasmáticas (De Conti *et al.*, 1973). Sin embargo, muchas de estas reacciones aún no se han descrito del todo, por lo que se especula que el elevado número de efectos secundarios que conlleva el uso del cisplatino es consecuencia de la reacción no específica del complejo activo con blancos moleculares citoplasmáticos aún desconocidos o no caracterizados por completo (Bischin *et al.*, 2011).

El DNA es el principal blanco molecular del cisplatino (Jung y Lippard, 2007) (Sorenson y Eastman, 1988) (Podratz *et al.*, 2011). A pesar de que exista una correlación positiva entre los niveles totales de platino en DNA y la respuesta al tratamiento (Welters *et al.*, 1999) solo 5 al 10 % del total del fármaco administrado llega a formar enlaces con éste (Fuertes *et al.*, 2003).

El complejo activo del cisplatino reacciona con el N-7 (Eckstein, 2011) de las purinas (Welters *et al.*, 1999). Dos purinas pueden reaccionar con el aqua complejo de platino; si esta unión se lleva a cabo con purinas de la misma cadena del DNA, se le denomina aducto intracatenario; en cambio, si se lleva a cabo entre purinas de distintas cadenas se le denomina aducto intercatenarios, los primeros representan más del 90 % del total (Eckstein, 2011).

Los aductos platino-DNA deforman la estructura de la doble cadena (Fong, 2016), lo que es detectado como daño al material genético, por lo que se activan rutas de señalización que generan un arresto del ciclo celular en fase G0/G1 (Xie *et al.*, 2014) (Un, 2007) (Qu *et al.*, 2013) o G2/M (Sorenson y Eastman, 1988) (Lu y Chao, 2012). Al mismo tiempo, se activan mecanismos de reparación de daño (Jordan y Carmo, 2000) (Kazak *et al.*, 2012). Si la reparación al material genético contrarresta el nivel del daño, se continúa con el ciclo celular normal, en cambio si la reparación al material genético es insuficiente con respecto a la cantidad de daño, la célula entra en senescencia (Qu *et al.*, 2013) o posteriormente a muerte por apoptosis (Fong, 2016) (Wang y Lippard, 2005) (Galluzzi *et al.*, 2012) (Galluzzi *et al.*, 2014) (Hato *et al.*, 2014).

Se sabe que la eficacia de los mecanismos de reparación a daño en DNA está inversamente relacionada con el índice de supervivencia celular por efectos del cisplatino (Zhen *et al.*, 1992). La evidencia que apoya al DNA como principal blanco molecular es amplia y no es la finalidad del presente trabajo profundizar al respecto.

El aqua complejo de platino también forma aductos platino-RNA, bajo el mismo principio que con el DNA (Melnikov *et al.*, 2016). Esta reacción afecta la traducción (Rosenberg y Sato, 1988), interviniendo en la formación del complejo ribosomal por lo que se bloquea la síntesis de la cadena polipeptídica (Rosenberg y Sato, 1993).

Por otro lado, también se ha visto que RNAs no codificantes (ncRNAs), tales como: RNAs largos no codificantes (lncRNAs) (Hu *et al.*, 2018) y micro RNAs (miRNAs) (Pogribny *et al.*, 2010) reaccionan con cisplatino. Sin embargo, el papel preciso que juega cada una de estas moléculas y el RNA en general en el mecanismo de acción del fármaco aún no está completamente dilucidado (Chen *et al.*, 2015) (Melnikov *et al.*, 2016).

La quimiorresistencia es uno de los mayores obstáculos a vencer para tener una respuesta exitosa a la terapia (Dilruba y Kalayda 2016) (Galluzzi *et al.*, 2014) (Lehnert, 1996) (Kaye, 1988). En este sentido una más amplia comprensión de los mecanismo de acción del cisplatino ayudaría a dilucidar nuevos

blancos moleculares para evitar la resistencia que se presenta en clínica después de lapsos prolongados de uso (Alonso, 2009).

4 Quimiorresistencia

La quimiorresistencia es un fenotipo caracterizado por que células tumorales de una población particular pierden la sensibilidad a un antineoplásico y por consecuencia disminuye la eficacia del tratamiento (Cook y Clarke, 2015). La quimiorresistencia puede ser de dos tipos: intrínseca o adquirida (Lehnert, 1996).

La quimiorresistencia intrínseca se caracteriza por que los tumores dejan de responder a la quimioterapia y el tratamiento no tiene ningún efecto sobre el curso de la enfermedad gracias a las características propias del individuo (Cook y Clarke, 2015); en cambio, la resistencia adquirida se da debido a modificaciones genéticas y epigenéticas (Galluzzi *et al.*, 2014) concretas que le brindan a las células tumorales la capacidad de eludir la muerte. La quimiorresistencia adquirida surge como consecuencia de un tratamiento previo a un determinado fármaco a dosis bajas por un largo periodo de tiempo (Foo y Michor, 2014). En ambos tipos de quimiorresistencia es frecuente encontrar que los tumores sean refractarios a una amplia variedad de drogas; es decir, presentan multirresistencia (Lehnert, 1996).

4.1 Quimiorresistencia a cisplatino

En tratamientos con cisplatino se una buena respuesta inicial a la quimioterapia. Sin embargo, es frecuente que se desencadene un fenotipo de quimiorresistencia adquirida (Eckstein, 2011); una respuesta adaptativa que tiene como consecuencia disminuir la susceptibilidad a los efectos citotóxicos y antiproliferativos del cisplatino (Galluzzi *et al.*, 2014), o en menor grado pueden presentarse casos de resistencia intrínseca (Dilruba y Kalayda, 2016) (Galluzzi *et al.*, 2012).

4.1.1 Mecanismos de resistencia a cisplatino

A lo largo de las últimas décadas, se han dedicado grandes esfuerzos a la caracterización de los mecanismos moleculares mediante los cuales las células neoplásicas pierden progresivamente su sensibilidad al cisplatino (Galluzzi *et al.*, 2014). El estudio de la quimiorresistencia adquirida a este fármaco, es un tema constante y del cual se tiene un extenso registro de datos como para una amplia revisión.

En este trabajo, con la finalidad de sintetizar la información, se clasificó a las moléculas y vías de señalización que más se han reportado relacionadas con este fenotipo en 4 categorías considerando como eje a su principal blanco molecular (Cuadro 4):

- 1) Resistencia previa a su molécula blanco: Aquí se modifican procesos relacionados con sus blancos citoplasmáticos o la actividad de bombas de expulsión de cisplatino.
- 2) Resistencia en su molécula blanco: Se modifican procesos directamente relacionados con daño al DNA provocado por cisplatino.
- 3) Resistencia posterior a su molécula blanco: Se incluyen elementos de rutas de señalización que desencadenan muerte celular como consecuencia del daño al DNA.
- 4) Resistencia fuera de su molécula blanco: Aquí se enlistan elementos que no están claramente relacionados todavía con cambios ya conocidas provocadas por cisplatino (Galluzzi *et al.*, 2014) (Galluzzi *et al.*, 2012).

En el cuadro 4 se hace una descripción más detallada de algunos ejemplos para cada una de las categorías de clasificación.

Cuadro 4. Mecanismos de resistencia a cisplatino

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CISPLATINO				
Resistencia previa a su molécula blanco				
Molécula /Gen	Regulación			Respuesta celular favorecida
	Sobreexpresión	Regulación a la baja	Inhibición	
CTR1		X	X	Reducción de la acumulación intrínseca del fármaco (Ishida, <i>et al.</i> , 2002)
Atox1			X	Inducción positiva de metalotioneínas, insensibilidad al cisplatino (Hua <i>et al.</i> , 2011)
ATP7 A/B	X			Disminución de la acumulación intracelular del fármaco (Safaei <i>et al.</i> , 2004)
MRP2 (ABCC2)	X			Disminución en la acumulación intracelular de cisplatino en distintas líneas celulares de cáncer (Taniguchi, 1996)
GSH	X			Desintoxicación por la unión a cisplatino lo que inactiva al fármaco Se busca una reducción del estrés oxidativo (Jansen <i>et al.</i> , 2002)
Resistencia en su molécula blanco				
Molécula /Gen	Regulación			Respuesta celular favorecida
	Sobreexpresión	Regulación a la baja	Inhibición	
ERCC1	X			Aumento en la reparación de aductos intercatenarios (Stewart, 2007). Disminución de la genotoxicidad.
MSH2 MLH1		X		Deficiencia de reparación por mismatch por sus siglas en inglés: MMR se asocia con la resistencia a la quimioterapia (Köberle <i>et al.</i> , 2010).
BRCA1 BRCA2	mutación			Mutaciones intragénicas que rescatan la función de BRCA2 en cánceres tratados inicialmente con cisplatino por deficiencias en esta proteína (Sakai <i>et al.</i> , 2008). Aumento en el índice de reparación de daño al DNA a consecuencia del cisplatino.
POLH	X			Esta DNA polimerasa sustituye a las polimerasas replicativas bloqueadas, lo que tiene como consecuencia replicación del DNA a pesar de presentar daño (Alt <i>et al.</i> , 2007)
REV3	X			Subunidad de pol ζ caracterizada por extenderse de cebadores con desajustes. Se da la replicación con mutaciones y existe una disminución en apoptosis (Wang <i>et al.</i> , 2009)
XPA	X			Aumento en la eficiencia de reparación por escisión de nucleótidos, lo que facilita la reparación de daño al DNA por cisplatino. Mejora la actividad de PARP 1, lo que prueba la autofagia. La autofagia protege a las células tumorales del estrés causado por la quimioterapia al proporcionar energía y los materiales celulares necesarios además de disminuir la susceptibilidad a antineoplásicos (Ge <i>et al.</i> , 2016)

Resistencia posterior a su molécula blanco				
Molécula /Gen	Regulación			Respuesta celular favorecida
	Sobreexpresión	Regulación a la baja	Inhibición	
ATM / Chk2/ Mus81	X			ATM detecta el daño en el DNA causado por el cisplatino, que se transmite a Chk2 y luego aumenta la expresión de Mus81 para reparar roturas de doble cadena y enlaces cruzados en DNA (Lv <i>et al.</i> , 2017)
P53	X			Disminución en la detención del ciclo celular G2/M y apoptosis (Sarin <i>et al.</i> , 2017)
		X		Conferir resistencia por la sobreexpresión de MDM2, con o sin regulación a la baja de p14ARF (Stewart, 2007)
TNFAIP8	X			Promovió la resistencia al cisplatino por medio la vía MDM2/p53, aumento de MDM2, aumento de degradación de p53 (Xing <i>et al.</i> , 2018)
ARF	en núcleo			Disminución a la respuesta al fármaco (Owczarek <i>et al.</i> , 2017)
			X	Regulación negativa de p14ARF hace que no exista la represión de MDM2, por lo que se Inhibe la activación de p53 (Siddik, 2003)
Fas	X			Alta expresión de Fas que conduce a apoptosis, pero se adquiere una insensibilidad a esta con la adquisición de un fenotipo resistente (Spierings <i>et al.</i> , 2003) Otros estudios indican que tiene una relación con resistencia a cisplatino (Brozovic <i>et al.</i> , 2004)
Subfamilia Bcl-2	X			Alta expresión de proteínas de esta familia se relaciona con una deficiente respuesta a la quimioterapia a base de platino en pacientes (Michaud <i>et al.</i> , 2009)
Subfamilia Bax Subfamilia BH3		X	X	Deficiencias en la capacidad de permeabilización de la membrana mitocondrial, aumento en la supervivencia de las células y menos susceptibilidad a cisplatino (Castedo <i>et al.</i> , 2006)
Cripto-1	X			Promueve la resistencia por la vía de TAK-1/NF-κB/survivin lo que inhibe la activación de la caspasa, e induce una regulación negativa de la apoptosis (Zhang <i>et al.</i> , 2018)
MAPKs (MEK, JNK, ERK y SAPK)			X	Niveles disminuidos de SAPK, JNK, MAPK11 se correlaciona con menor sensibilidad a cisplatino, por la atenuación de apoptosis y daño al DNA (Brozovic <i>et al.</i> , 2004) Supresión de la vía MEK/ERK, tiene como efecto mayor resistencia a cisplatino, por la activación de NF kappa B (Yeh <i>et al.</i> , 2002)
Caspasas				Activación de caspasa-3/7 inducida por cisplatino ocurre antes de la activación de las caspasa-8 o 9 (Janson <i>et al.</i> , 2010)
ΔNp63α	X			Sobreexpresión de ΔNp63α protege a las células de cisplatino. c-Abl fosforila a ΔNp63α lo que induce su unión a YAP, proteína relacionada con crecimiento celular e inhibición de la apoptosis (Yuan <i>et al.</i> , 2011)
XAF1			X	Baja expresión de este inhibidor de proteínas inhibidoras de la apoptosis, desencadena la evasión de la apoptosis (Wang <i>et al.</i> , 2012) Plenchette, Cheung <i>et al.</i> , 2007)

Resistencia fuera de su molécula blanco				
Molécula /Gen	Regulación			Respuesta celular favorecida
	Sobreexpresión	Regulación a la baja	Inhibición	
DYRK1B		X		Regulada a la alza en diferentes tumores sólidos, aumenta la expresión de enzimas antioxidantes como la ferroxidasa, superóxido dismutasa. Disminución de su expresión aumenta el estrés oxidativo bajo efectos del cisplatino (Galluzzi <i>et al.</i> , 2012)
ERBB2 (HER2)	X			Potenciamiento de la actividad de PI3K / AKT /CDKN1A (Mitsuuchi <i>et al.</i> , 2000). Su alta expresión en citoplasma se relaciona con resistencia a cisplatino (Koster <i>et al.</i> , 2010). CDKN1A inhibe a la caspasa 3 y conduce a una falla en la apoptosis, a su vez AKT fosforila a Bad lo desencadena disminución de apoptosis (KEEG, 2016) Promueve la transición epitelio mesénquima, un ejemplo es la promoción de la expresión del factor de transcripción Snail (Huang <i>et al.</i> , 2016)
HSP	X	X		Modificaciones en la expresión de estas proteínas, a la alza o a la baja, desencadena un fenotipo resistente a cisplatino (Krawczyk <i>et al.</i> , 2018)
RAB8 y TMEM 205	X			TMEM205 y RAB8 podrían estar relacionado con el secuestro del cisplatino en vesículas (platinosomas) y facilitar su exocitosis que conduciría a una acumulación reducida del fármaco lo que resulta en una resistencia celular. Aunque esto necesita aún más investigación (Shen y Gottesman, 2012).

4.1.2 Quimiorresistencia, cáncer de mama y cisplatino

Hoy día la quimiorresistencia es un gran obstáculo para que los tratamientos contra el cáncer de mama sean exitosos (Eckstein, 2011). En casos de ABC; tipo de cáncer de mama donde se aplica cisplatino, frecuentemente se presenta resistencia a terapia hormonal o quimiorresistencia ya sea en MBC (Cardoso *et al.*, 2017) o LABC (Chuthapisith *et al.*, 2006).

Más del 60% de los individuos que padecen LABC no tienen una respuesta favorable a la quimioterapia neoadyuvante; primera línea de tratamiento en donde se aplica cisplatino (Iqbal *et al.*, 2014), y desarrollan quimiorresistencia (Chuthapisith *et al.*, 2006) lo que complica su esperanza de vida.

Mujeres con cáncer de tipo luminal metastásico con mutaciones en BRCA son tratadas con antraciclinas y cuando presentan resistencia endocrina reciben terapia adyuvante a base de platino. El tratamiento tardío complica el obtener una respuesta favorable al fármaco, ya que la neoplasia es más avanzada y con frecuencia el tumor adquiere mecanismos de evasión a la muerte celular a consecuencia de la falla de tratamientos anteriores (Cardoso *et al.*, 2017) (Finn *et al.*, 2016).

A pesar de las amplias investigaciones que se desarrollan respecto a cuáles son los mecanismos de resistencia a cisplatino, el conocimiento recopilado hasta ahora todavía no ha conducido a estrategias aplicables en clínica para superar la resistencia celular (Eckstein, 2011). Por lo anterior, es fundamental la identificación de blancos moleculares, rutas de señalización, y biomarcadores involucrados con el desarrollo de un fenotipo de quimiorresistencia al cisplatino. Una molécula que recientemente se ha asociado a resistencia a cisplatino es Ezrin (Liu *et al.*, 2018).

5 Ezrin

Ezrin es una proteína transmembranal codificada por el gen EZR (Huang *et al.*, 2018) que codifica para 586 aminoácidos (Pelaseyed *et al.*, 2017). Es llamada también vilin-2 o citovilina. Tiene un peso molecular de 80 KDa (Bretscher, 1983) y pertenece a la familia ERM (Ezrin-Radixin-Moesin), una familia de proteínas asociadas a citoesqueleto de actina (Li *et al.*, 2015). Entre las proteínas ERM, Ezrin es la única que exhibe un patrón de expresión particular en células epiteliales polarizadas normales (Ingraffea *et al.*, 2002) (Crepaldi *et al.*, 1997).

Ezrin es una proteína de andamiaje (Fehon *et al.*, 2010) que gracias a su capacidad para interactuar con diferentes moléculas y asociarlas al citoesqueleto de actina (Turunen *et al.*, 1994) (Berryman *et al.*, 1993) desarrolla un papel clave en la modificación de dominios de membrana (Fehon *et al.*, 2010) y la transducción de señales (Srivastava *et al.*, 2005) (Fehon *et al.*, 2010).

Ezrin puede participar en diferentes respuestas celulares y se ha visto que el fenotipo desencadenante puede variar dependiendo de la cinasa que la fosforile, el aminoácido donde ocurra ésta modificación, y la molécula que asocie al citoesqueleto de actina. Se ha reportado ampliamente que tiene un papel importante en la morfogénesis epitelial (Ingraffea *et al.*, 2002), migración (Li *et al.*, 2018) y metástasis (Cuadro 5) (Li *et al.*, 2017).

Esta proteína facilita la remodelación de las uniones entre célula-célula en situaciones dinámicas (Li, *et al.*, 2018), como en la división celular al formar parte del anillo contráctil en la citocinesis (Hiruma *et al.*, 2017) o cuando la célula está en movimiento, ya que participa en la formación de estructuras con el citoesqueleto de actina, como microvellosidades (Viswanatha *et al.*, 2012), o membrana de ruffling (D'Angelo *et al.*, 2007).

Ezrin también juega un papel clave en la polarización, proceso que determina las propiedades funcionales de las células (Saotome *et al.*, 2004). Un ejemplo es su participación en la formación de

dominios apicales y basales de células epiteliales (Pelaseyed *et al.*, 2017), o en la formación de túbulos, proceso fundamental para la morfogénesis de los organismos (Fehon *et al.*, 2010).

A lo largo del desarrollo del intestino, Ezrin cambia su localización conforme se da la diferenciación celular, de una localización en límites célula-célula hacia donde surgirá el centro apoptótico para la formación de la cavidad tubular (Fehon *et al.*, 2010). Se ha visto que los ratones knock-out de Ezrin, mueren tiempo después de su nacimiento a consecuencia de tener malformaciones en las microvellosidades del epitelio intestinal (Saotome *et al.*, 2004).

En cuanto a su estructura; ésta se compone de un dominio FERM que se localiza en su extremo N-terminal, seguido de una región central alfa hélice y un dominio ERM en el carboxilo terminal (Pelaseyed y Bretscher, 2018) (Figura 2A). El dominio FERM se subdivide en 3 subunidades (F1, F2, F3) que tienen homología estructural con diferentes proteínas. F1 es estructuralmente similar a la ubiquitina, F2 a la proteína de unión a Acil-CoA (ACBP) y F3 a un dominio PTB (Fehon *et al.*, 2010). Las características propias de cada subdominio del dominio FERM permiten que Ezrin pueda interactuar con distintos tipos de proteínas en la región citoplasmática (Bretsche *et al.*, 1995).

El dominio FERM tiene un sitio de unión a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), fosfolípido que constituye aproximadamente el 1 % del total de ellos en la membrana apical de células epiteliales (Pelaseyed y Bretscher, 2018) (Niggli *et al.*, 1995). Este sitio de unión se localiza entre F2 y F3 (Fehon *et al.*, 2010) y permite que Ezrin se una a la membrana plasmática.

En cuanto al dominio ERM, en el extremo carboxilo terminal, presenta la Treonina 567 (T567) y un sitio de unión a los filamentos de actina (Algrain *et al.*, 1993) (Gary y Bretscher, 1995) (Fehon *et al.*, 2010). La T567 de Ezrin es un aminoácido susceptible a ser fosforilado. La fosforilación de Ezrin en la Treonina 567 (pEzrinT567) señala a una localización y función en membrana, conformación activa más reportada de esta proteína (Viswanatha *et al.*, 2012).

En una conformación inactiva Ezrin se encuentra en el citoplasma, donde el dominio FERM se une con alta afinidad al dominio ERM, y enmascara el sitio de unión a F-Actina y T567, localizados en el dominio ERM (Figura 2B) (Fehon *et al.*, 2010) (Gary y Bretscher, 1995).

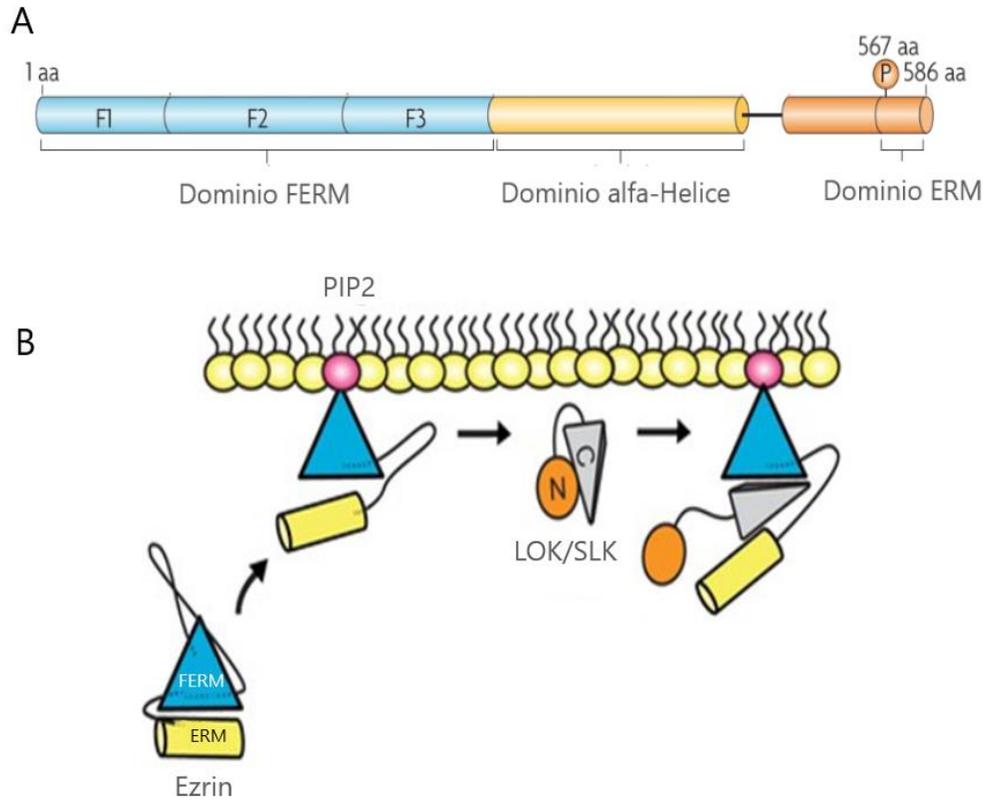


Figura 2. Estructura molecular de Ezrin. A) Organización de los dominios de Ezrin. B) Plegamiento y función de los dominios de Ezrin en la membrana citoplásmica. Modificaciones de Fehon *et al.*, 2010 y Pelaseyed *et al.*, 2017

Pelaseyed y colaboradores (2017) plantearon que la unión de Ezrin a PIP2 origina un cambio conformacional que disminuye la afinidad entre ambos dominios proteicos, FERM y ERM, esto hace que Ezrin adopta una configuración más abierta (Pelaseyed *et al.*, 2017) y se desenmascare T567. La disminución de la afinidad entre ambos dominios proteicos, ocasiona que se acumulen cinasas entre ellos, lo que conlleva a una posterior fosforilación de Ezrin en T567.

LOK y SLK son cinasas altamente específicas para las proteínas ERM, porque muestran una fuerte preferencia por los sustratos con una tirosina dos posiciones antes que T567, un residuo conservado en todas las proteínas ERM (Pelaseyed y Bretscher, 2018). Ambas cinasas son las que principalmente fosforilan a Ezrin en T567 en células epiteliales (Figura 2B) (Viswanatha *et al.*, 2012) (Pelaseyed *et al.*, 2017). En el caso de LOK se encuentra enriquecida en la zona apical de las células (Pelaseyed *et al.*, 2017).

La activación e inactivación de Ezrin; por consiguiente su localización, está mediada por ciclos de fosforilación-desfosforilación en T567 de aproximadamente 2 minutos, lo que coincide con la vida útil

de las microvellosidades. Si se desacopla este ciclo por intervenir con el estado de fosforilación, se pierde la distribución polarizada en la membrana apical (Viswanatha *et al.*, 2012).

La fosforilación en T567 es la más estudiada de esta proteína, sin embargo, se han reportado distintos sitios susceptibles a fosforilaciones y demás marcas, cuya señalización podría estar involucrada con funciones aún no completamente entendidas para Ezrin. Algunos de los sitios fosforilables que se han identificado son: Y353 (Singh, *et al.*, 2008) (Gautreau *et al.*, 1999), Y146 (Saygideğer-Kont *et al.*, 2016) Y145 (Krieg y Hunter, 1992) (Srivastava *et al.*, 2005), Y477 (Li *et al.*, 2016), S66 (Zhou *et al.*, 2003) y T235 (Yang y Hinds, 2003) (Cuadro 5).

La dinámica de la asociación y disociación de proteínas es un tema importante a investigar, ya que los defectos de la formación de complejos entre proteínas se relacionan con distintas patologías, entre ellas el cáncer (Morales *et al.*, 2007).

Cuadro 5: Función biológica y molecular de Ezrin.

FUNCIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE EZRIN					
Fosforilación		Unión a dominio FERM	Ruta de señalización	Respuesta biológica (Fenotipo)	Modelo biológico
Amino-ácido	Cinasa				
T567	ROCK1	No reportado	Aumento de la expresión de ARHGEF10L (miembro de la familia RhoGEF, que promueve el estado de GTPasas unidas a GTP) activa la vía RhoA-ROCK 1/ERM	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la expresión de ROCK 1 • Disminución de E-cadherina, • Aumento de la expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima (EMT) • Proliferación y migración • Metástasis y angiogénesis 	Línea celular de carcinoma hepatocelular (Tang <i>et al.</i> , 2018)
NO reportado	SYK	CD44	Ruta de señalización no descrita	<ul style="list-style-type: none"> • Adhesión célula-célula • Migración y proliferación de células tumorales 	Células de cáncer no especificadas (Li <i>et al.</i> , 2018)
	Relación con RhoA	CD44	Ruta de señalización no descrita pero se tiene documentada que la alta expresión de RhoA, CD44 y Ezrin están relacionadas	<ul style="list-style-type: none"> • Metástasis a ganglios linfáticos. • Estadío clínico más avanzado de la enfermedad. 	pacientes con carcinoma de laringe (Xie <i>et al.</i> , 2017)
	No reportado	CD44	Ruta de señalización no descrita, pero se sabe que CD44 se co-expresa con Ezrin en células madre del cáncer	En pacientes se asocia con: <ul style="list-style-type: none"> • Peor pronóstico • Resistencia a la quimioterapia 	Células madre del cáncer (CSC) y Casos clínicos de cáncer de mama (Ma y Jiang, 2013)
T567	Relación con RhoA	CD44	Rho /Ezrin y demás proteínas ERM/reticulación de CD44 a Actina	<ul style="list-style-type: none"> • Protuberancias apicales de membrana • Reorganización del citoesqueleto de actina 	Células de fibroblastos de embrión de ratón (Henry <i>et al.</i> , 1998)
	No reportado	Gem	Gem ya unido a Ezrin, interactúa con Gmip que interactúa con ROCK I, que regula a la baja RhoA-ROCK	Regulación a la baja de RhoA <ul style="list-style-type: none"> • Desaparición de la mayoría de adhesiones focales • Desaparición de fibras de estrés • Elongación Celular • Reducción de la fosforilación de la familia ERM 	Línea celular HeLa (Hatzoglou <i>et al.</i> , 2007)
T567	No reportado	PLEKHG6	RhoG es reclutado por PLEKHG6 cuando se asocia con Ezrin,	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de microvellosidades • Formación de pliegues de la membrana • pérdida de las fibras de estrés • Macropinocitosis 	Línea celular de carcinoma epidérmico (D'Angelo <i>et al.</i> , 2007)

Fosforilación		Unión a dominio FERM	Ruta de señalización	Respuesta biológica (Fenotipo)	Modelo biológico
Amino-ácido	Cinasa				
T567	PKA	Epac1	E2 promueve la fosforilación de Ezrin por medio de PKA. Ezrin se une a Epac1 y permite a su vez que esta se asocie a B-catenina y se localiza en núcleo	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la expresión de E-cadherina • B-catenina en núcleo • Expresión de genes relacionados con metástasis y supervivencia • Fenotipo EMT • Aumento en migración 	Células de cáncer de pulmón (Jansen <i>et al.</i> , 2016)
Y353	Relación con EGF (EGFR)	No reportado	EGF/Ezrin / NF-kB	<ul style="list-style-type: none"> • Metastásico • Fenotipo EMT • Mal pronóstico en pacientes • Motilidad celular • Capacidad de invadir y migrar 	Cáncer colorrectal (Li <i>et al.</i> , 2017)
T567	LOK o SLK	PIP2	Unión de Ezrin a PIP2 y posterior fosforilación por LOK o SLK lo que hace que Ezrin se pueda unir a EBP50 (Morales <i>et al.</i> , 2007) (Ingraffea, Reczek y Bretscher, 2002)	Localización restringida de Ezrin en membrana apical de células epiteliales: <ul style="list-style-type: none"> • Polaridad celular • Microvellosidades apicales • Rearreglos del citoesqueleto 	Línea celular epitelial de placenta humana (Pelaseyed <i>et al.</i> , 2017)(Viswanatha <i>et al.</i> , 2012) Células epiteliales de tejidos murinos (Ingraffea <i>et al.</i> , 2002) Células T de riñón embrionario humano (Morales <i>et al.</i> , 2007)
				EBP50 media la asociación con proteínas integrales de membrana como: PTEN, β -catenina, PDGFR (Morales <i>et al.</i> , 2007), por lo que se desencadena distintas respuestas celulares.	Células epiteliales de tejidos murinos (Ingraffea <i>et al.</i> , 2002) Células T de riñón embrionario humano (Morales <i>et al.</i> , 2007)
T235	CDK5	No reportado	pRb/CDK5/Ezrin en membrana	Senescencia <ul style="list-style-type: none"> • Área celular aumentada • Apariencia aplanada • Expresión de β-galactosidasa 	Línea celular de osteosarcoma (Yang y Hinds, 2003)
No reportado	Src ROCK PKC	PI3K	ICAM-2 induce la fosforilación de Ezrin y posterior reclutamiento de PI3K y se activa la ruta de AKT (Src /PCK/ Rho/ Ezrin / PI3K / PDK-1 / AKT)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la apoptosis inducida por Fas 	Línea celular de leucemia (linfocitos T) (Pérez <i>et al.</i> , 2002)

Fosforilación		Unión a dominio FERM	Ruta de señalización	Respuesta biológica (Fenotipo)	Modelo biológico
Amino-ácido	Cinasa				
Y353	No reportado	PI3K	Al unirse LFA-1 a CAM-2 activa a Ezrin que recluta PI3K a la membrana plasmática, iniciando así la activación de la vía PI3K / Akt	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento en proliferación y supervivencia celular • Producción de citocinas autocrinas por ICAM-2 	Co-cultivo de células T y línea celular de sinoviocitos de tipo fibroblasto. (Singh <i>et al.</i> , 2008)
Y353	No reportado pero fosforila aquí EGFR	PI3K	PI3K se une a Ezrin y se da la activación de la ruta PI3K/AKT	<ul style="list-style-type: none"> • Ruta de señalización involucrada en motilidad e invasión de células epiteliales, fenotipo antiapoptótico • Defectos en fosforilación en T353, tiene un fenotipo apoptótico 	Línea celular epitelial derivada de riñón (Gautreau <i>et al.</i> , 1999)
No reportado	No reportado	Fak	LncRNA KCNQ1OT1 funciona como esponja y modula directamente la expresión de miR-211-5p que albergaba sitios de unión para el 3'-UTR Ezrin. La baja expresión de este miRNA permite que se desencadene la vía: Ezrin / Fak / Src	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a cisplatino • Proliferación 	Células de cáncer de lengua (Zhang <i>et al.</i> , 2018)
Y145	Src Bajo un estímulo con EGF	PIP2 luego Src	EGF conduce a la activación de Src que se une a Ezrin; ya en conformación activa con fosforilación en T567, posterior a esta unión se puede dar la fosforilación de Ezrin en Y145 por Src EGF/Src/Ezrin/Src/	<p>Src están implicadas en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento en la extensiones de superficie celular • Proliferación • Adhesión a la matriz extracelular <p>Células con Y145F en Ezrin carecen de lamelipodios, son redondeadas, pérdida de fibras de estrés, no hay defectos en su reclutamiento a membrana plasmática Sin cambios en capacidad de adhesión al sustrato, retraso de propagación</p>	Línea celular de epitelio de riñón de cerdo (Srivastava <i>et al.</i> , 2005)
S66	PKA	No reportado	Aplicación de histamina /PKA/Ezrin Ser66p/remodelación del citoesqueleto de actina.	Remodelación del citoesqueleto de membrana apical asociado con la secreción de ácido	Células parietales gástricas (Zhou <i>et al.</i> , 2003)

Fosforilación		Unión a dominio FERM	Ruta de señalización	Respuesta biológica (Fenotipo)	Modelo biológico
Amino-ácido	Cinasa				
No reportado	No reportado	No reportado	No reportado pero se tienen una alta expresión de PAK5 y Ezrin en células resistentes, se plantea que pueden actuar en sinergia	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a cisplatino • Aumento de la capacidad invasiva 	Línea celular de osteosarcoma Cortes histológicos de osteosarcoma (Liu <i>et al.</i> , 2018)
Y146		EGFR	EGF/EGFR que interactúa con pEzrin ya fosforilado en Y146 y se desencadena la vía ERK/STAT3	<p>La Expresión de pEzrin es necesaria para:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Expresión de RNAm genes blanco de EGFR (AURKA, COX-2, ciclina D1 e iNOS) • Aumento en proliferación y formación de colonias • Resistencia a fármacos 	Línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Saygideğer-Kont <i>et al.</i> , 2016)

5.1 Ezrin y el cáncer

Ezrin es un elemento clave en la progresión y la metástasis tumoral (Fehon *et al.*, 2010) de diferentes neoplasias malignas como: cáncer de pulmón (Chen *et al.*, 2013), pancreático (Piao *et al.*, 2015), cáncer de mama (Ma y Jiang, 2013) (Li *et al.*, 2008), osteosarcoma (Huang *et al.*, 2018), cáncer de vejiga (Andersson *et al.*, 2014), cáncer de cabeza y cuello (Schlecht *et al.*, 2012), gástrico (Jin, Jin, Quan, Piao y Lin, 2012), ovárico (Li, Liang y Lu, 2010), entre otros.

Li y colaboradores (2015) sugirieron tomar la alta expresión de Ezrin como biomarcador de un peor pronóstico clínico en tumores sólidos después de corroborar que presenta una correlación estadísticamente significativa entre un alto nivel de expresión de esta proteína y un mal pronóstico clínico. En diferentes cánceres epiteliales como: cáncer de mama (Sarrió *et al.*, 2006), cáncer pancreático (Piao *et al.*, 2015) y osteosarcoma (Boldrini *et al.*, 2010), se ha visto que a lo largo del desarrollo de la enfermedad, Ezrin cambia de una distribución apical a una localización más homogénea en la membrana (Sarrió *et al.*, 2006). En casos de tumores metastásicos, toma una localización preferencialmente más citoplasmática en comparación a muestras de tumor primario (Li *et al.*, 2008) (Jais *et al.*, 2017).

Sin embargo, se sabe que la sobreexpresión o cambios en la localización de Ezrin no es suficiente para inducir metástasis (Sarrió *et al.*, 2006) debido a que es un proceso multifactorial e involucra la desregulación de muchas señales celulares (Boldrini *et al.*, 2010)

Las bases moleculares de la pérdida de la localización apical de Ezrin a una distribución más homogénea o incluso preferencial en citoplasma aún no están descritas. La modificación de la localización de Ezrin tiene como consecuencia la pérdida de un fenotipo polarizado y diferenciado, adquisición de una morfogénesis aberrante (Pelaseyed y Bretscher, 2018), aumento en proliferación (Piao *et al.*, 2015), deficiencias del anclaje normal a la membrana de una variedad de moléculas de adhesión (Jansen *et al.*, 2016), además de la modificación de diversas rutas de señalización que podrían estar involucradas en la adquisición de un fenotipo agresivo y metastásico o incluso quimiorresistente a la terapia (Ma y Jiang, 2013). Por otro lado, se puede especular que la localización citosólica de Ezrin puede estar relacionado con funciones aún no del todo descritas para esta proteína.

Un antecedente que apoya esto, es la investigación de Ma y Jiang (2013), quienes observaron que Ezrin en cáncer de mama tiene un nivel más alto de expresión en células troncales cancerosas (CSC), en comparación con el resto de las células en el cultivo. Además, se ha observado que la expresión de Ezrin se asocia con la de CD44. Este fenotipo se relaciona con un peor pronóstico y resistencia a la quimioterapia en pacientes. La expresión de Ezrin y CD44 mostraron ser factores de pronóstico para evaluar la progresión y la sensibilidad a la quimioterapia independientes del subtipo de cáncer de mama.

5.2 Ezrin y cisplatino

Se tiene evidencia de que Ezrin es un elemento clave en el mecanismo de apoptosis, fenotipo migratorio e invasivo y con cambios en ciclo celular por efectos del cisplatino. Las rutas moleculares que desencadenan este fenotipo no han sido del todo descritas, pero a continuación se mencionan algunos estudios en diferentes tipos de cáncer donde se menciona esto.

Ezrin por medio de la reorganización del citoesqueleto de actina; además de participar en la regulación de un fenotipo migratorio, se relaciona con la inducción de la apoptosis a consecuencia del cisplatino. Rebillard y colaboradores (2010) reportan que la vía cisplatino/RhoA/ROCK/Ezrin/Fas conduce a apoptosis en células de cáncer de colon después de la aplicación de cisplatino.

La alta expresión del receptor Fas está reportado con un fenotipo de quimiorresistencia a cisplatino (Spierings *et al.*, 2003). El cisplatino, de alguna forma activa a RhoA que lleva a la activación de la cinasa ROCK que fosforila a Ezrin en T567. Ezrin una vez activa, se asocia al receptor Fas y lo localiza en dominios de membrana enriquecidos con ceramidas y al citoesqueleto de actina. Esta unión al citoesqueleto de actina es indispensable para la internalización del receptor Fas en balsas lipídicas, un paso previo para la formación intracelular del complejo de señalización que induce la muerte (DISC), esto conlleva a un fenotipo apoptótico. La expresión del receptor Fas es indispensable para que se lleve a cabo la fosforilación de Ezrin por la vía RhoA/ROCK y a su vez la activación de Ezrin por ROCK es necesaria para la correcta translocación de Fas y la posterior inducción de la apoptosis bajo un estímulo con cisplatino (Rebillard *et al.*, 2010).

Zeidan y colaboradores (2007) reportaron que en células de cáncer de mama tratadas con 5 µg/ml de cisplatino se activa PKC δ, que fosforila a ASMase, lo que conduce a la activación de la vía ASMase/Ceramidas. En particular la expresión de la Ceramida 16, que regula negativamente la unión de PP2A (proteína con actividad serina / treonina fosfatasa) a la membrana, esto conlleva a que PP2A desfosfore a Ezrin en T526 lo que trae como consecuencia que se pierda su localización en la membrana así como la fosforilación en T567. En resumen, la aplicación de cisplatino activa la vía ASMase/Cerinas/PP2A/Ezrin que desencadena cambios morfológicos, como la disminución de la formación de filopodios y lamelipodios por medio de la reorganización del citoesqueleto de actina.

Zeidan y colaboradores (2007) no profundizaron sobre alguna otra respuesta celular en la que se sepa se relaciona Ezrin, mucho menos se profundizo sí la desregulación de la via ASMase/Ceramidas/PP2A/Ezrin podría ser un mecanismo de resistencia al cisplatino. Además, Zeidan y colaboradores (2008) informaron que células transfectadas con Ezrin T567D (Ezrin constitutivamente fosforilado) presentaron mayor eficacia en el cierre de herida bajo un estímulo con cisplatino en comparación con su control. Este dato es relevante para indicar que probablemente se necesita de la desfosforilación en T567 para que se lleve a cabo la pérdida de la fosforilación en T526 por PP2A y, por ende, disminución de su actividad en membrana, sin embargo tampoco se profundizó en ello.

5.3 Ezrin y quimiorresistencia

Ya se ha reportado una relación entre Ezrin y un fenotipo de quimiorresistencia a antineoplásicos en diferentes tipos de cáncer como: osteosarcoma (Liu *et al.*, 2018), lengua (Zhang *et al.*, 2018), pulmón

(Saygideğer-Kont *et al.*, 2016) (Chen *et al.*, 2013), y cáncer de mama (Pokharel *et al.*, 2014) (Pokharel *et al.*, 2016) (Ma y Jiang 2013).

En células epiteliales de colon se tiene una correlación en el nivel de expresión de proteínas ERM y MDR1 (ABCB1) y MDR2 (ABCB4) (Jin *et al.*, 2016), lo que es concordante con lo reportado por Nakano y colaboradores (2013) en tracto digestivo de ratones, ellos vieron que pEzrinT567, es fundamental para la correcta expresión de las proteínas: MDR1, además de MRP2 (ABCC2 o P-gp).

Se sabe que la inhibición de la expresión de Ezrin podría sensibilizar a las células tumorales a diferentes antineoplásicos como Erlotinib fármaco cuyo blanco es EGFR (Saygideğer-Kont *et al.*, 2016) y cisplatino (Chen *et al.*, 2013).

Saygideğer-Kont y colaboradores (2016), reportaron que en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, EGFR fosforila a Ezrin en Y146 bajo un estímulo con EGF, lo que desencadena la vía ERK/STAT3. Ellos reportan que la expresión de la fosforilación de Ezrin en la Tirosina 146 (pEzrinY146) es necesaria para la expresión de RNAm de genes blanco de EGFR, como: AURKA, COX-2, ciclina D1 e iNOS, aumento en proliferación y formación de colonias además de resistencia a Erlotinib. Su inhibición conlleva el fenotipo opuesto.

5.3.1 Ezrin y quimiorresistencia a cisplatino

Aún se tienen pocos antecedentes de la participación de Ezrin en resistencia a cisplatino, y las rutas moleculares relacionadas con este fenotipo apenas están comenzando a ser descritas. A continuación se mencionan los estudios que se tiene en esta área.

Chen y colaboradores (2013), observaron que la sobreexpresión de Ezrin se relaciona con resistencia a la apoptosis mediada por cisplatino, y que al suprimir la expresión de Ezrin en células de pulmón se tiene mayor sensibilidad al cisplatino, incremento en la apoptosis, inhibición de la proliferación, arresto del ciclo celular en G0/G1, disminución de la capacidad migratoria; por rearrreglo del citoesqueleto de actina, y pérdida de la capacidad invasiva a consecuencia de la disminución de la señal de CD44 y aumento de E-cadherina.

En el caso de osteosarcoma, se sabe que la resistencia a cisplatino se relaciona con Ezrin, ya que células resistentes a este fármaco tienen un incremento a nivel proteína y mensajero de Ezrin, lo que se correlaciona con un aumento en la capacidad de migración (Liu *et al.*, 2018), sin embargo no se

hicieron estudios acerca de la localización o posibles rutas de señalización involucradas con su aumento de expresión por lo que se necesita mayor investigación.

Por otro lado, en células de cáncer de lengua se describió que el lncRNA KCNQ1OT1 funciona como esponja y modula directamente la expresión de miR-211-5p que alberga sitios de unión para el sitio 3'-UTR del RNAm de Ezrin. La baja expresión de este miRNA permite que Ezrin se exprese y se active la vía Ezrin/Fak/Src. Esta vía confiere un fenotipo quimiorresistente a cisplatino y un incremento en la proliferación (Zhang *et al.*, 2018).

La fosforilación de Ezrin en T567 por ROCK es necesaria para la correcta translocación de Fas y la posterior inducción de la apoptosis bajo un estímulo con cisplatino (Rebillard *et al.*, 2010). Sin embargo, en células de cáncer de mama se ve disminución de pEzrinT567 y pérdida de su señal en membrana bajo un estímulo corto a una dosis baja de este fármaco (Zeidan *et al.*, 2008), lo que nos lleva a pensar que probablemente el mecanismo que se lleva a cabo en cáncer de mama es distinto a lo observado en cáncer de colon por Rebillard y colaboradores (2010), y en pulmón por Chen y colaboradores (2013). Se necesita una mayor profundización en este tema.

La vía Ezrin/Fak/Src en cáncer de lengua, es la única descrita que relaciona a Ezrin y resistencia a cisplatino (Zhang *et al.*, 2018), sin embargo aún falta ardua investigación en esta área para poder dilucidar si estos resultados son extrapolables en cáncer de mama.

5.3.2 Ezrin, quimiorresistencia y cáncer de mama

Pokharel y colaboradores (2014) (2016) reportaron la participación de Ezrin en resistencia a múltiples fármacos en células MCF-7Dx (línea celular MCF-7 resistente a doxorubicina), ya antes validadas como modelos apropiados para el estudio de este fenotipo. Ellos vieron que Ezrin y MDR1 en conjunto con CD44, y el resto de los miembros de la familia ERM se transfieren por micropartículas a otras células de cáncer de mama para conferirles resistencia. Además de que observaron que Ezrin modifica la estructura celular y la conformación del citoesqueleto al momento de la fusión de membranas y es fundamental para la correcta integración de MDR1 en la membrana de las células que reciben estas micropartículas.

Por otro lado, Goler-Baron y colaboradores (2012) vieron que en células de cáncer de mama con resistencia a múltiples fármacos es indispensable la expresión de proteínas de la familia ERM para el correcto andamiaje de ABCG2 (proteína transportadora asociada a la membrana miembro de la familia

ABC relacionada a resistencia a drogas) en la membrana de vesículas extracelulares encargadas del secuestro de los fármacos. En este mismo estudio se vio que la inhibición de la ruta AKT regula a la baja la expresión de proteínas ERM, lo que tiene como consecuencia la disminución de la expresión de ABCG2 en la membrana vesicular, reducción del tamaño de estas, reversión del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y disminución de B-catenina (Goler-Baron y Assaraf, 2011).

Ezrin regula positivamente la activación de AKT a través del correcto andamiaje de PI3K en la membrana (Gautreau *et al.*, 1999). La vía de AKT resulta desregulada en diferentes tipos de cáncer, y su activación tiene como respuesta biológica un fenotipo proliferativo y de supervivencia (Singh *et al.*, 2008) por la inhibición de la apoptosis (Perez *et al.*, 2002). En quimiorresistencia esta vía con frecuencia resulta desregulada, como en el caso de resistencia al cisplatino, donde la alta expresión de la actividad de la vía PI3K/AKT desencadena la transición epitelio mesénquima (Huang *et al.*, 2016) y fallas en la apoptosis por efectos del cisplatino (Koster *et al.*, 2010).

Estos antecedentes, indican que Ezrin podría participar en un fenotipo de quimiorresistencia a múltiples fármacos al permitir el correcto andamiaje de ABCG2 en vesículas extracelulares, bajo la regulación de la vía de AKT (Goler-Baron *et al.*, 2012). De igual manera se puede considerar la posibilidad de que ezrin se secrete para conferir resistencia a cisplatino, ya que la participación de MDR1 es ampliamente reportada en un fenotipo quimiorresistente a este fármaco. Sin embargo, se necesita mayor investigación en esta área.

Hoy día a pesar de la evidencia, aún no se cuenta con estudios que relacionen con datos experimentales la participación de Ezrin (nivel de expresión, localización, estado de fosforilación y ruta molecular) en un fenotipo de quimiorresistencia a cisplatino en cáncer de mama.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cisplatino es de uso habitual en clínica para el tratamiento de diferentes tumores, como el cáncer de mama avanzado; sin embargo, hoy día el principal obstáculo a vencer para el éxito del tratamiento sigue siendo la quimiorresistencia adquirida.

A pesar de las amplias investigaciones que se han estado desarrollando acerca de los mecanismos de resistencia a cisplatino, el conocimiento recopilado hasta ahora, todavía no ha conducido a estrategias aplicables en clínica para superar la resistencia celular, por lo que es fundamental la identificación de nuevos blancos moleculares, rutas de señalización, y biomarcadores involucrados con el desarrollo de un fenotipo de quimiorresistencia al cisplatino. Ésto, con la finalidad de que la información generada contribuya al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas

Ezrin es una proteína que es capaz de interactuar y modular distintas rutas de señalización vinculadas con mecanismos de resistencia a cisplatino y recientemente ha sido asociada a quimiorresistencia a cisplatino en diferentes tumores. Sin embargo, aún no se tiene reportada su participación en un fenotipo de quimiorresistencia a cisplatino en cáncer de mama.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La resistencia adquirida a cisplatino en células MCF-7 causa cambios en la expresión, actividad y localización de Ezrin?

VI. HIPÓTESIS

El fenotipo resistente a cisplatino causa un cambio en la expresión, actividad y localización de Ezrin en células MCF-7.

VII. OBJETIVOS

1 Objetivos generales

Determinar si la resistencia a cisplatino en células MCF-7 causa un cambio en la expresión, actividad y localización de Ezrin.

2 Objetivos particulares

- 1) Obtener subclonas MCF-7 resistentes a cisplatino (cpRMCF-7).
- 2) Comprobar si la subclona cpRMCF-7 es más resistente que la línea parental (MCF-7WT).
- 3) Evaluar los niveles de RNAm y proteína de Ezrin en células MCF-7WT y cpRMCF-7.
- 4) Evaluar el estado de fosforilación en T567 de Ezrin en células MCF-7WT y cpRMCF-7.
- 5) Determinar la localización de Ezrin y Ezrin T567 en células MCF-7WT y cpRMCF-7.
- 6) Realizar un análisis bioinformático de posibles vías de señalización alteradas en células cpMCF-7 comparadas con MCF-7WT.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

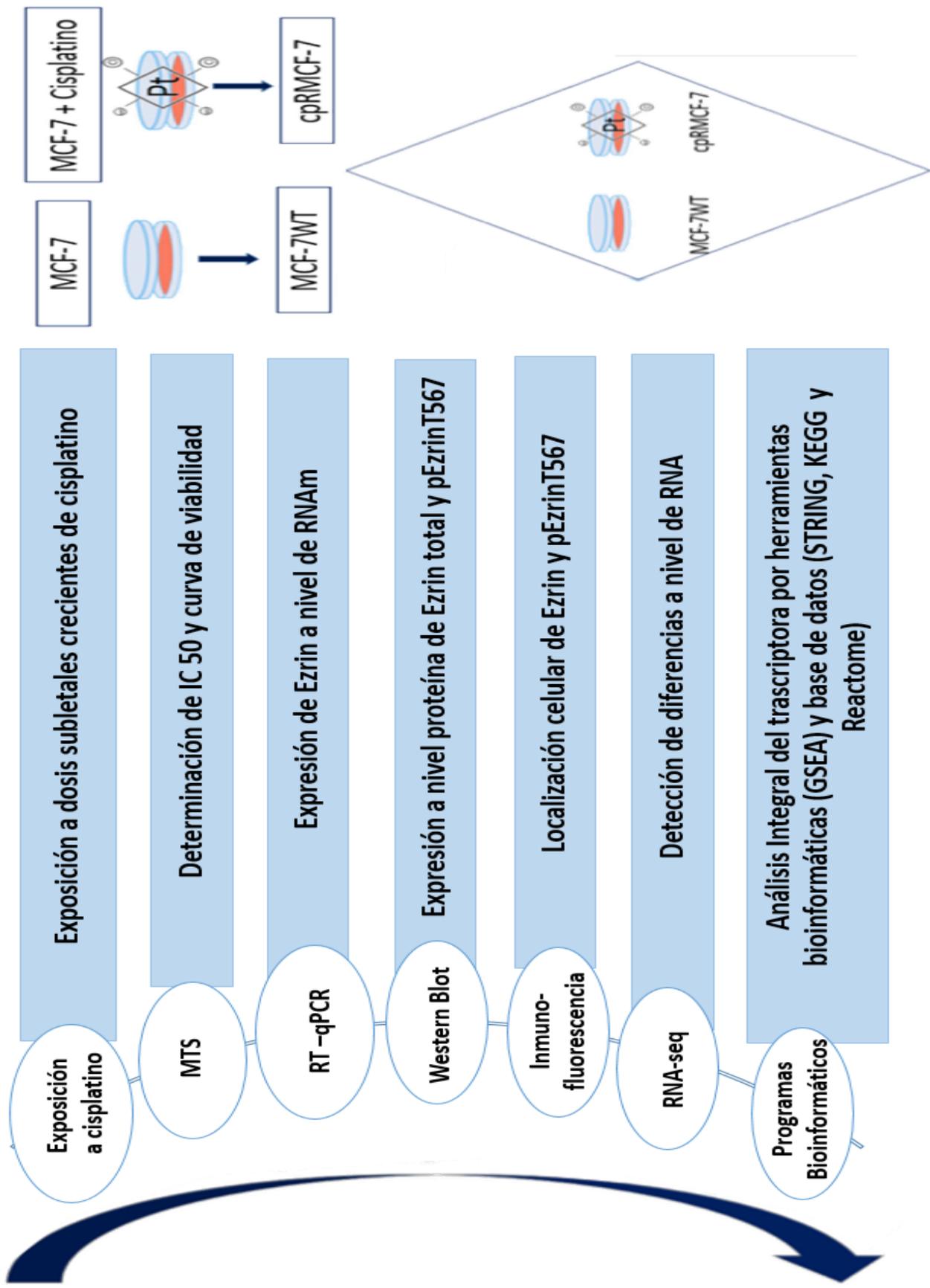


Figura 3. Metodología del proyecto de evaluación de Ezrin en el fenotipo resistente a cisplatino en línea celular de cáncer de mama MCF-7. Se muestran los pasos a seguir a lo largo del presente trabajo de acuerdo a los objetivos planteados.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Cultivo celular

Células MCF-7 compradas de la ATCC se cultivaron en RPMI 1640 con L-glutamina (Corning, NY, USA, cat. 10.040CMR) al 5 % de SFB (Gibco life technologies, USA, cat. 26140-079), cambiando el medio 3 ocasiones por semana haciendo lavados constantes con PBS 1X.

2 Generación de una subclona resistente a cisplatino

Células MCF-7 por un periodo de alrededor de 6 meses se mantuvieron creciendo en cajas Petri tratadas para cultivo celular de 100mm x 20 mm (Corning, NY, USA, cat. 430167) y se les aplicó de forma constante dosis subletales crecientes de cisplatino (Zuridry, Zurich Pharma, QT, MEX, cat. 04-02002 versión 03) partiendo de 20 pM hasta llegar a 1.9 μ M. Posterior a ello y para los demás experimentos se mantuvo de forma intermitente a la subclona MCF.7 expuesta a 1.9 μ M de cisplatino. Antes de que se realizara cualquier experimento, se quitó la presión selectiva 6 días antes.

3 Ensayo de MTS

En placas de 96 pozos tratados para cultivo celular (Ultra cruz, TX, USA, cat. sc-204447) se sembraron 100,000 células por pozo de ambas condiciones experimentales: células control (MCF-7WT) y subclona MCF-7 expuesta intermitentemente a 1.9 μ M de cisplatino (cpRMCF-7).

24 hrs después de sembrar, se aplicaron 3 concentraciones distintas de cisplatino (30 μ M , 60 μ M y 90 μ M) por 39 hrs. Posterior a esto, se realizó el ensayo de MTS con el kit y el protocolo de Celltiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, WI, USA, cat. G5430).

Este experimento se realizó con 3 réplicas experimentales por cada réplica biológica; 3, de ambas condiciones; cpRMCF-7 y MCF-7WT.

4 Diseño de Oligonucleótidos para Ezrin

De acuerdo a datos obtenidos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para Ezrin (ID: 7430) se diseñó un par de oligonucleótidos con ayuda del software bioinformático Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y la plataforma de IDT para el análisis de oligonucleótidos (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). El par de oligonucleótidos se diseñó entre 681 pb a 3146 pb de la secuencia de Ezrin isoforma X1 (transcrito XM_011536110.1), sección compartida con las dos isoformas reportadas hasta el momento del diseño: Ezrin isoforma 2 (transcrito NM_001111077.1) y Ezrin isoforma 1 (transcrito NM_003379.4).

Oligonucleótidos utilizados::

- Fw: GACTTCCATCTGTGCCATACTTG
- Rv: GTGCGAGAGTGCTTCAGACT

5 Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario

A MCF-7WT y a la subclona cpRMCF-7 se les extrajo RNA por el método de trizol de Chomczynski y Sacchi (1987) con trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA, cat. 15596018). Se verificó su integridad con electroforesis para RNA mediante un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes de acuerdo al protocolo de Maniatis y Sambrook (1982).

Una parte de las muestras extraídas se utilizó para secuenciación, procedimiento explicado más adelante y otra fracción para la síntesis de DNA complementario (cDNA) con los kits y el protocolo de High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied biosystems, MA, USA, cat. 4368813, 4368814, 4374966 y 4374967). Con este cDNA se realizó PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real (RT-qPCR).

6 RT-qPCR

A partir del cDNA de ambas condiciones experimentales se realizó RT-qPCR con SYBR® Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA, cat. 4472897) en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems MA, USA) a 40 ciclos con una temperatura de hibridación de 60 °C,

determinada previamente en condiciones experimentales.

El nivel de expresión relativa del RNAm de Ezrin; con respecto al nivel de expresión SDHA (RNAm de housekeeping que se utilizó) fue determinado usando el método de $\Delta\Delta Ct$. Este experimento se realizó con 3 réplicas experimentales por cada réplica biológica; 3, de ambas condiciones experimentales; cpRMCF-7 y MCF-7WT.

7 Ensayo de Western Blot

7.1 Extracción y cuantificación de proteínas

A células cpRMCF-7 y MCF-7WT sembradas en cajas Petri tratada para cultivo celular de 60 mm x 10 mm (Corning, NY, USA, cat. 450196) a una confluencia de al menos el 60 % se les realizaron dos lavados suaves con PBS, seguido de un lisado celular con buffer RIPA al 1 X (150 mM NaCl, 1 % de Triton x-100, 0.5 % de deoxicolato de sodio, 0.1 % de SDS, 50 mM Tris base pH 8) y suplementado con Mini Protease Inhibitor Cocktail (Complete, IN, USA, cat. 11836153001) y Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (Sigma-Aldrich, MO, USA, cat: P0044-1 ML).

Se determinó la concentración proteica de las muestras por la prueba colorimétrica de Bradford de acuerdo al protocolo y al kit Protein Assay (Bio-Rad DC, CA, USA cat. #500-0114 y #500-0113). La curva de concentración de proteína se hizo con albúmina de suero bovino (BSA) (Cell Signaling technology, MA, USA, cat. 07/2016) a las siguientes concentraciones: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

7.2 Western Blot

En un gel SDS-PAGE al 10 % se cargó un volumen equivalente a 25 μg de proteína total de cada muestra; de acuerdo a la cuantificación que se realizó con anterioridad. El gel se corrió a 20 mA por 90 minutos y posteriormente se transfirieron las proteínas en cámara semi húmeda a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) por 15 minutos a 15 volts. La membrana se bloqueó al 5 % de leche o al 3 % de BSA por 1 hr en movimiento a temperatura ambiente. Se empleó BSA para el bloqueo al trabajar con el anticuerpo específico que detecta fosforilación.

Se incubó con el anticuerpo primario por una noche a 4 °C y con su respectivo anticuerpo secundario por 1 hr en movimiento a temperatura ambiente. De acuerdo al kit y al protocolo de Chemiluminescent

HRP Substrate (Millipore Corporation, MA, USA, cat. WBKLS0500) se detectó quimioluminiscencia en Universal Hood III (Bio-Rad, CA, USA) y se tomaron imágenes cada 3 segundos a partir del segundo 1. Este experimento se realizó con 3 réplicas experimentales por cada réplica biológica; 3, de ambas condiciones: cpRMCF-7 y MCF-7WT.

Anticuerpos primarios utilizados:

- Ezrin Antibody (3C12) (Santa cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC-58758) monoclonal mouse anti Ezrin, conjugado con Alexa Fluor® 488, 1:500
- Anti-Ezrin (phospho T567) antibody (Abcam, LDN, UK, cat. ab47293) polyclonal rabbit, 1:2000
- α Tubulin Antibody (10D8) (Santa cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC-53646) monoclonal mouse, 1:2000

Anticuerpos secundarios utilizados

- Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega, WI, USA, cat. W402B), 1:3000
- Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega, WI, USA, cat. W401B), 1:3000

8 Inmunofluorescencia

Se sembraron 10, 000 de células de ambas condiciones experimentales (cpRMCF-7 y MCF-7WT) sobre cubreobjetos estériles en placa para cultivo de 24 pozos. 24 hrs después de sembrar, se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 20 minutos seguido de una permeabilización con tritón X-100 al 0.35 % por 3 minutos. A continuación se bloqueó con PBS 1X suplementado con 0.1 % tween, 0.29 M de glicina y 1 % de BSA por 30 minutos, seguido de 1 hr de conjugación con el anticuerpo primario en cámara húmeda en oscuridad, posterior a esto se incubó 30 minutos en oscuridad con Alexa Fluor Phalloidin (Life Technologies, OR, USA, cat. A 12380) a una concentración de 1:500 y DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Molecular probes, OR, USA, cat. D1306) a una concentración de 1 ng/ μ l. En casos donde se requería un anticuerpo secundario, se añadió junto con la Alexa Fluor Phalloidin y el DAPI. Las fotos se tomaron con Axio Scope.A1 (Zeiss, Jena, DE).

Este experimento se realizó con 2 réplicas experimentales por cada réplica biológica; 3, de ambas condiciones experimentales; cpRMCF-7 y MCF-7WT.

Anticuerpos primarios utilizados:

- Ezrin Antibody (3C12) (Santa cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC-58758) monoclonal mouse anti Ezrin, conjugado con Alexa Fluor® 488, 1:25
- Anti-Ezrin (phospho T567) antibody (Abcam, LDN, UK, cat. ab47293) polyclonal rabbit, 1:200

Anticuerpos secundarios utilizados:

- Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), fluorescein conjugate QTY (Millipore, CA, USA, cat. DAM1564583) 1:100

9 Secuenciación del transcriptoma de células MCF-7WT y cpRMCF7

Se extrajo RNA de 3 réplicas biológicas de ambas condiciones experimentales (cpRMCF-7 y MCF-7WT) por el método de trizol de Chomczynski y Sacchi (1987) con trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA, cat, 15596018). Después de verificar su integridad mediante un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes de acuerdo al protocolo de Maniatis y Sambrook (1982), se enviaron de entre 550 a 900 µg/µl de RNA de cada muestra a la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

En la unidad de secuenciación se realizó un análisis integral de las 3 réplicas biológicas de ambas condiciones experimentales por medio de la tecnología de electroforesis capilar para evaluar las proporciones de las subunidades ribosomales 18 S y 28 S de cada muestra.

Una vez verificado que se tenían muestras de RNA que cumplían con los parámetros de integridad superiores a 8.5, se prosiguió a la depleción de rRNA por sondas de captura biotinadas del kit Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat) (Illumina, San Diego, CA) y posterior fragmentación del RNA a una talla uniforme de alrededor de 50 a 300 pb, luego de ello se seleccionaron fragmentos con una talla promedio de 140 pb. A partir de este material se realizó la construcción de la librería de cDNA utilizando el Kit TruSeq RNA All Stranded (Illumina, San Diego, CA). La librería obtenida se secuenció en un secuenciador NextSeq 550 System (Illumina, San Diego, CA) obteniendo lecturas Paired-End (extremos pareados) con promedio de 44 millones de lecturas por muestra.

Se evaluó la calidad de lecturas (Reads) por FastQC (versión 0.11.7) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) herramienta bioinformática que evalúa la calidad de los datos de secuencia antes de que se haga un análisis adicional.

El alineamiento se realizó en STAR (Dobin, *et al.*, 2013) utilizando como referencia al genoma de Homo sapiens Versión GRCh 38 y la cuantificación de abundancia y normalización se obtuvo por Dseq (Simon y Wolfgang, 2010). El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el paquete de R EdgeR (Robinson *et al.*, 2009).

Se diseñó un mapa de calor, por sus siglas en inglés, HeatMap en Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/expression/>) con los resultados de la expresión diferencial genética a partir de lecturas esperadas por kilobase de transcrito y millón de lecturas mapeadas, por sus siglas en inglés: RPKMs, de las 3 réplicas biológicas de ambas condiciones experimentales. Estas muestras fueron filtradas por una tasa de falso descubrimiento (FDR) menor a 0.05 y un valor de cambio (FC) mayor o igual a 2. Se utilizó una correlación de Pearson como método de medición de distancias y una agrupación por centroides.

10 Análisis integral del transcriptoma de células MCF-7WT y cpRMCF7 por medio de programas bioinformáticos

10.1 GSEA

Se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes, por sus siglas en inglés: GSEA (Subramanian *et al.*, 2005) a partir de los: RPKMs de cada muestra filtrados por una FDR <0.05. Estos datos se cargaron en la aplicación de GSEA 3.0 (versión JAVA) previamente descargado del sitio web Gene Set Enrichment Analysis (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). La base de datos de firmas moleculares por sus siglas en inglés MSigDB, (MSigDB v6.2 file set) se descargó del sitio web Gene Set Enrichment Analysis (<http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp>), y se empleó como conjuntos de genes de referencia, específicamente ENSEMBL_human_gene.chip. El número de permutaciones fue de 1,000 veces para cada análisis de acuerdo con el método estadístico de enriquecimiento ponderado predeterminado. Se realizó el análisis utilizando la base de datos de Ontología de genes, por si siglas en inglés: GO y del KEGG. El análisis GSEA incluye cuatro estadísticas clave: puntuación de enriquecimiento, cuyas siglas en inglés es: ES, puntuación de

enriquecimiento normalizada, por sus siglas en inglés: NES, FDR y valor de p. Se tomaron en cuenta solo aquellos resultados con una $p < 0.5$ y una $FDR < 0.05$.

10.2 Análisis de bases de datos

Se realizó una búsqueda de moléculas que se ha reportado tienen relación con Ezrin, ya sea unión, activación, co-expresión o relacionadas a no más de dos nodos de distancia de moléculas con las que se una Ezrin y otra búsqueda de moléculas relacionadas con el mecanismo de acción del cisplatino, o con relación directa en un fenotipo resistente al fármaco. Estas búsquedas se hicieron en KEGG (<https://www.kegg.jp/>), STRING (<https://string-db.org/>) y Reactome (<https://reactome.org/>) además de una búsqueda en PudMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Se construyó una tabla en Excel para cada búsqueda donde se añadieron los genes que codifican para cada molécula encontrada. Por medio de la herramienta interactiva para comparar listas y visualizar elementos compartidos entre listas por medio de diagramas de Venn, Venny 2.1.0 (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny_old/index.html), se compararon los genes de moléculas relacionadas con Ezrin, moléculas relacionadas con cisplatino y la lista de genes con expresión diferencial resultantes del RNA-seq.

11 Pruebas estadísticas

Se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes para cada tipo de datos con ayuda de GraphPad Prism 5.

X. RESULTADOS

1 Obtención de la subclona MCF-7 resistente a cisplatino (cpRMCF-7)

A células MCF-7 se les aplicó de forma constante y ascendente distintas concentraciones de cisplatino por alrededor de 6 meses hasta llegar a una concentración de $1.9 \mu\text{M}$ de cisplatino de acuerdo a la metodología antes descrita (Figura 4). Posterior a ello, mediante un ensayo de MTS, se comprobó que la subclona tratada con cisplatino hasta $1.9 \mu\text{M}$ (cpRMCF-7) tiene una mayor viabilidad celular en comparación con su línea parental (MCF-7WT). Se midió la viabilidad celular 39 hrs después de la aplicación de $30 \mu\text{M}$, $60 \mu\text{M}$ y $90 \mu\text{M}$ de cisplatino. Los parámetros de exposición y concentraciones de cisplatino, se establecieron experimentalmente. Observamos diferencias estadísticamente significativas con respecto a la viabilidad celular entre células cpRMCF-7 y MCF-7WT (Figura 5). Posterior a esto, y con los mismos datos experimentales se determinó la concentración máxima a la que se inhibe la viabilidad celular a un 50 % y 75 %, (IC 50, e IC 75) de las células cpRMCF-7 y MCF-7WT, (Figura 6). Se observó que la subclona cpRMCF-7 presentó un incremento aproximadamente tres veces mayor en la concentración de cisplatino necesario para inhibir la viabilidad celular en un 50 y 75 %, en comparación con la línea parental.

Exposición a células MCF-7 a concentraciones subletales crecientes de cisplatino con RPMI 5% SFB

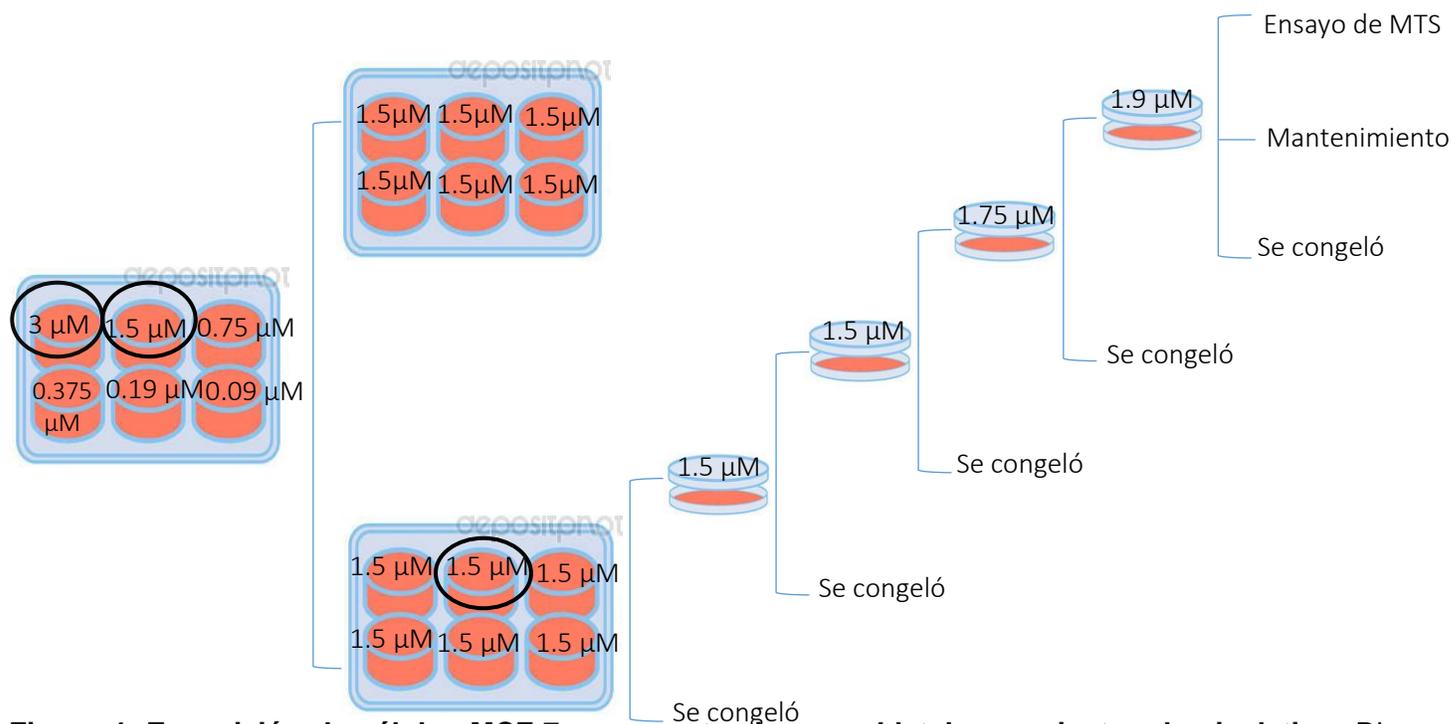


Figura 4. Exposición de células MCF-7 a concentraciones subletales crecientes de cisplatino. Diagrama donde se ejemplifica cómo se obtuvo una subclona MCF-7 resistente a cisplatino

39 HRS POS TRATAMIENTO

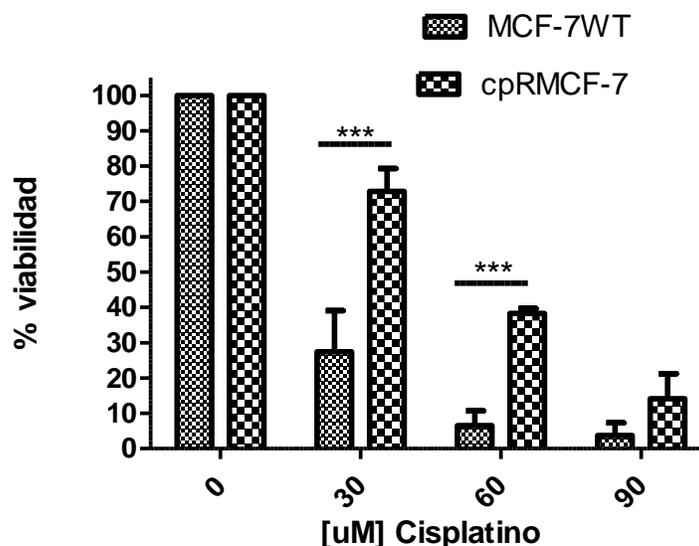
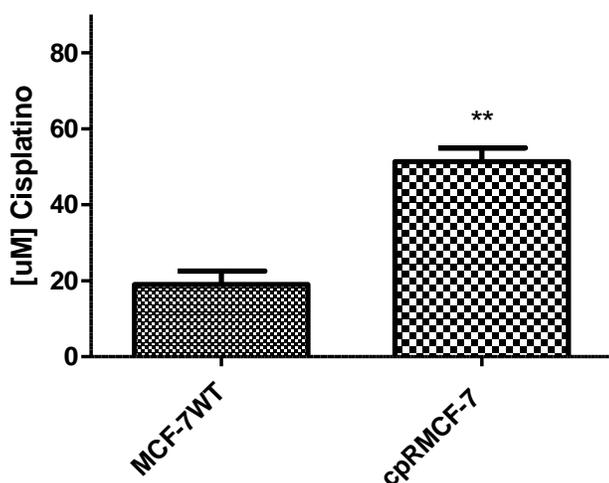


Figura 5. Viabilidad celular de MCF-7 WT y cpRMCF-7. Ensayo de MTS para medir la viabilidad celular de la subclona cpRMCF-7 y MCF-7WT, bajo una exposición de 0 μM , 30 μM , 60 μM y 90 μM de cisplatino por 39 hrs. Se hizo un análisis estadístico con una ANOVA de dos vías. Nomenclatura utilizada: triple asterisco (***) para una *p-value* < 0.001, cada dato está normalizado con su respectivo control.

IC 50 39 HRS POS TRATAMIENTO



IC 75 39 HRS POS TRATAMIENTO

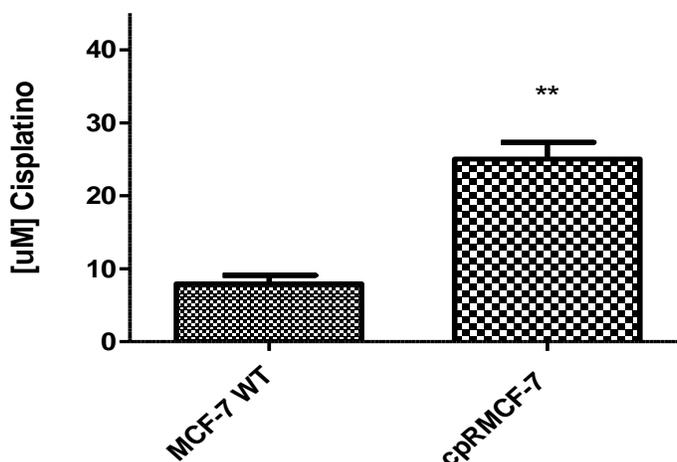


Figura 6. IC 50 e IC 75 de la subclona cpRMCF-7 y MCF-7 WT. Ensayo de MTS para la determinación de la concentración inhibitoria máxima a la que se inhibe la viabilidad celular a un 50 % y 75 % (IC 50 e IC 75) de las células cpRMCF-7 y MCF-7WT bajo una exposición de 0 μM , 30 μM , 60 μM y 90 μM de cisplatino por 39 hrs. Los datos se analizaron por T de Student paramétrica pareada de dos vías. Nomenclatura utilizada: doble asterisco (**) para *p-value* < 0.01.

2 La expresión de RNAm de Ezrin se mantiene sin cambios en células cpRMCF-7 en comparación con su línea parental.

Después de verificar que obtuvimos una subclona de MCF-7 resistente a cisplatino, evaluamos el nivel relativo de expresión de RNAm de Ezrin en células cpRMCF-7. Se empleó como housekeeping el nivel relativo de expresión de la subunidad A del complejo de la proteína succinato deshidrogenasa (SDHA). No se observaron cambios estadísticamente significativos en el nivel relativo de expresión de RNAm de Ezrin entre la subclona cpRMCF-7 y su línea parental, MCF-7 WT, (Figura 7).

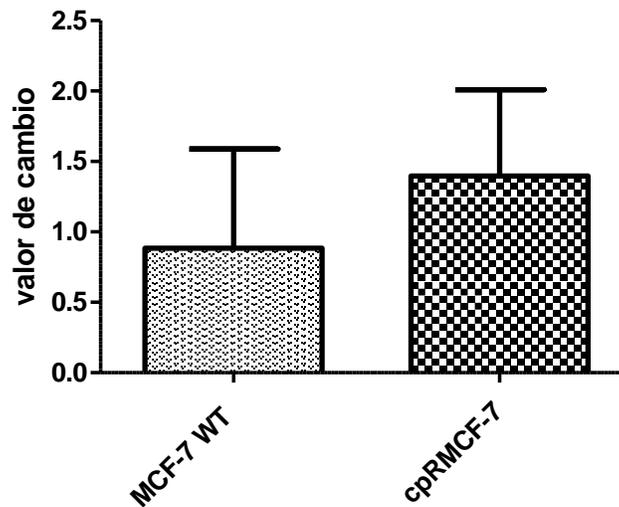


Figura 7. Expresión relativa de los niveles de RNAm de Ezrin en células cpRMCF-7 y MCF-7 WT. Determinación de los niveles de expresión de RNAm de Ezrin en células cpRMCF-7 y MCF-7WT por medio de RTq-PCR. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 5 por medio de una T de Student paramétrica pareada de dos vías. Se obtuvo una p -value = 0.0992, valor estadísticamente no significativo.

3 Disminución del nivel de expresión a nivel proteína de pEzrinT567 en células cpRMCF-7 en comparación con su línea parental

Después de corroborar que no se tienen cambios en el nivel de expresión relativa del RNAm de Ezrin entre la subclona cpRMCF-7 y MCF-7WT, se prosiguió a hacer Western Blot para evaluar si existe cambios en el nivel de proteína de Ezrin y en la fosforilación de la treonina 567 (pT567) entre células MCF-7WT y cpRMCF-7. No se ven cambios estadísticamente significativos en la expresión a nivel proteína de Ezrin entre la subclona cpRMCF-7, y su línea parental (Figura 8A). Este dato concuerda con los resultados de RTq-PCR (Figura 7). Sin embargo, se tuvo una disminución estadísticamente

significativa de la proporción de Ezrin fosforilada en T567 en la subclona cpRMCF-7 en comparación con su línea parental, MCF-7WT (Figura 8B).

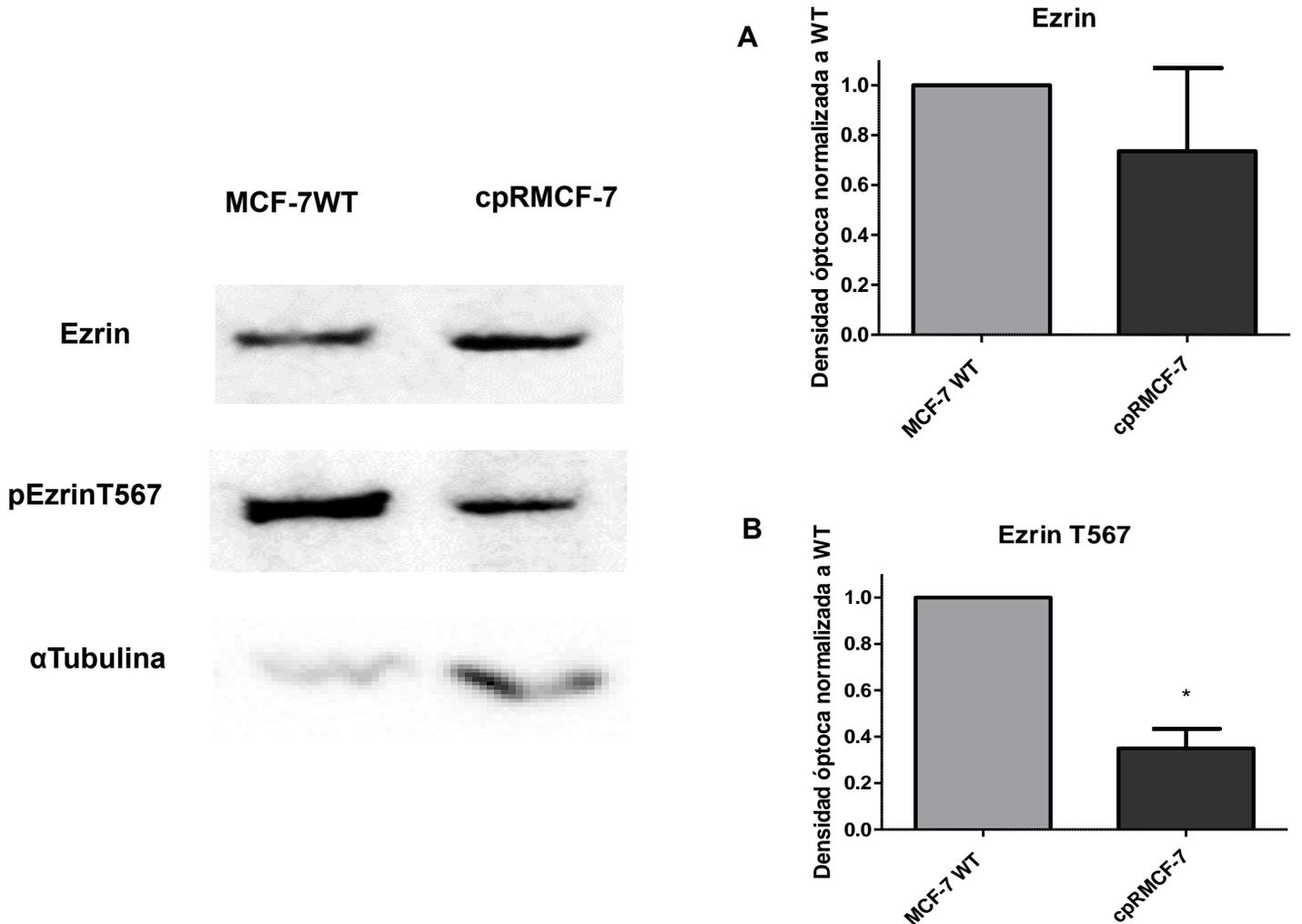


Figura 8. Expresión de Ezrin a nivel proteína y proteína fosforilada en T567 de células cpRMCF-7. Evaluación de Ezrin a nivel proteína y proteína fosforilada en T567 en células cpRMCF-7 por medio de Western Blot. Los datos se analizaron por T de Student paramétrica pareada de dos vías. Nomenclatura utilizada: un asterisco simple (*) para p -value < 0.05.

4 Disminución de pEzrinT567 en membrana de células cpRMCF-7 comparadas con su línea parental

A continuación proseguimos a evaluar si existía un cambio en la localización celular de Ezrin y pEzrinT567 en células cpRMCF-7 en comparación con su línea parental, por medio de inmunofluorescencia. Se observó que la localización de pEzrinT567 disminuye en la fracción membranal de células cpRMCF-7 en comparación con células MCF-7 WT (Figura 9). En cuanto a la localización de Ezrin, los datos obtenidos de este experimento no fueron incluidos en el presente

trabajo, porque se presentó una grave deficiencia en el anticuerpo anti-Ezrin (Santa cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC-58758).

Además, se observó que las células de la subclona cpRMCF-7 eran más grandes, con prolongaciones de actina más pronunciadas y sin la formación de colonias tan compactas como las que se presentan en MCF-7WT, sin embargo, se necesitan ensayos más específicos para corroborar esto.

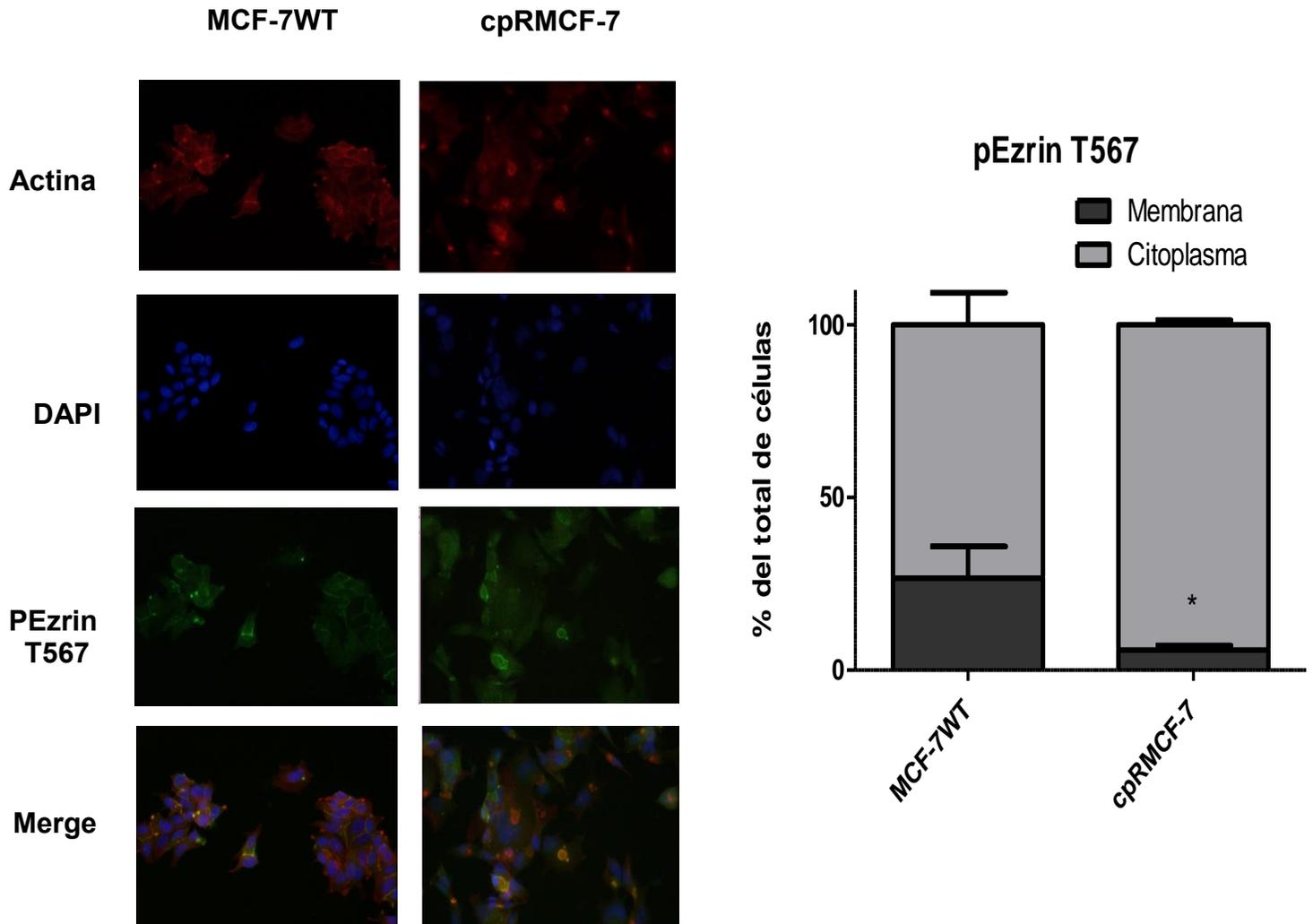


Figura 9. Localización de pEzrinT567 en células MCF-7 WT y cpRMCF-7. (A) Imágenes de Inmunofluorescencia de actina, DAPI, pEzrinT567 y merge, en células MCF-7 WT y cpRMCF-7. (B) Localización celular de pEzrinT567 en células MCF-7 WT y cpRMCF-7 por medio de inmunofluorescencia. Los datos se analizaron por T de Student paramétrica no pareada de dos vías. Nomenclatura utilizada: un asterisco simple (*) para $p\text{-value} < 0.05$.

5 Análisis diferencial de la expresión génica por secuenciación del transcriptoma de células MCF-7WT y cpRMCF7

5.1 Muestras de RNA

Una vez después de verificar que se contaba con la integridad adecuada de las 3 réplicas biológicas de muestras de RNA extraídas de células MCF-7WT y cpRMCF-7 mediante un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes (dato no mostrado), se enviaron 550 a 900 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA de cada réplica biológica a la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y fue con éstas que se realizó la secuenciación del transcriptoma por RNA-seq.

5.2 Evaluación de la calidad de las muestras de RNA

Se analizó la integridad del RNA en la unidad de secuenciación del INMEGEN, con la finalidad de detectar si cumplía con los estándares necesarios para realizar RNA-seq. Se estableció el número de integridad del RNA (RIN), por medio de la evaluación de la corrida electroforética de cada muestra con el bioanalizador Agilent RNA 6000 Nano.

Las 6 muestras presentaron una proporción superior o igual a 1.5:1 de la subunidades 28 S y 18 S. Es importante mencionar que por fallas en el programa no se tienen los valores del RIN de dos de las muestras de cpRMCF-7 (N1-R y N3-R), pero; sin embargo, el gel de electroforesis capilar y su electroferograma muestran que tienen la integridad necesaria para hacer en análisis de secuenciación (Figura 10).

5.3 Evaluación de la calidad de los reads de cada muestra por FastQC

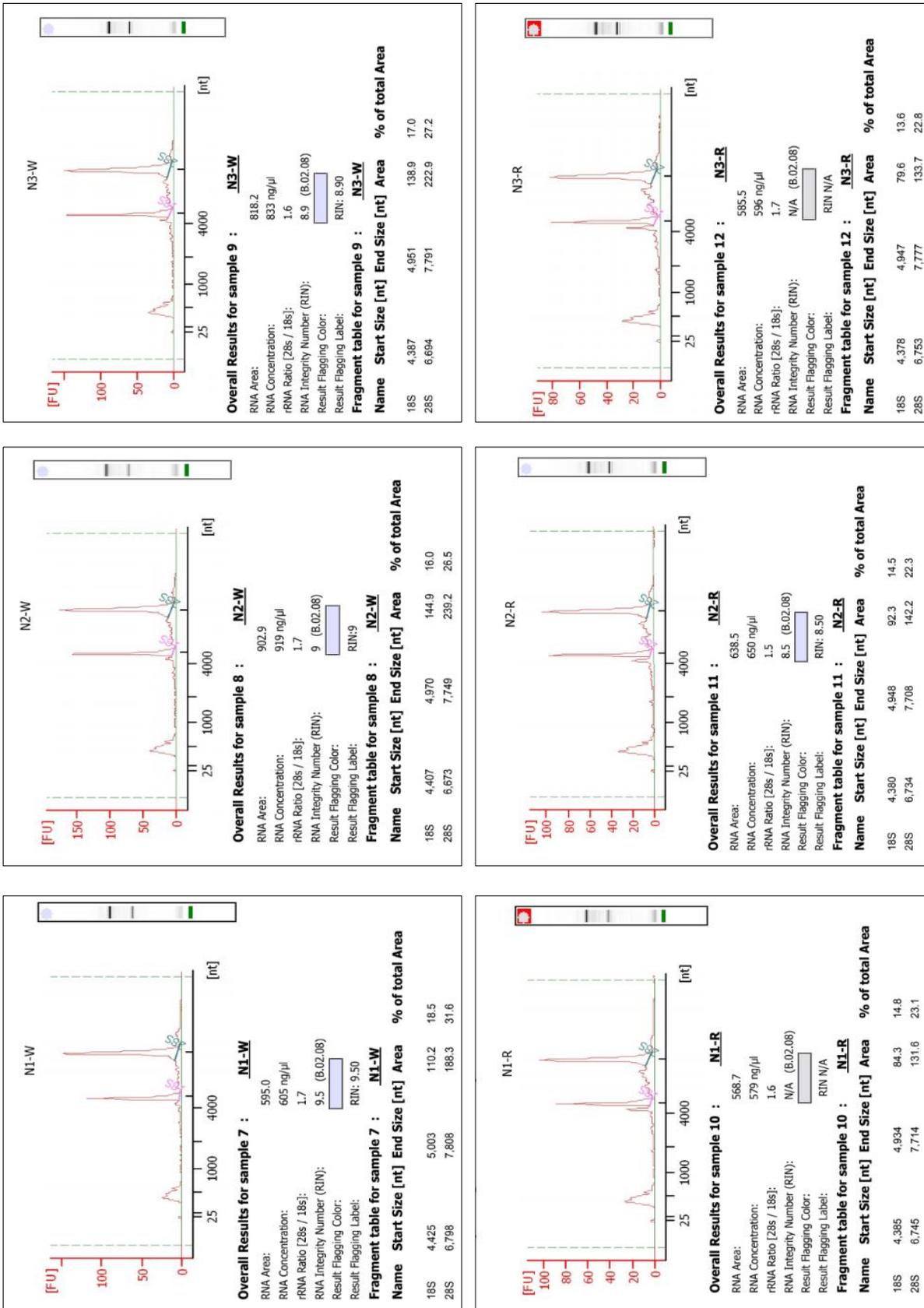


Figura 10. Control de calidad de las muestras de RNA por medio de electroforesis capilar. Cada panel contiene la información de los resultados por muestra de la evaluación del RNA: Bandas del gel de electroforesis capilar correspondiente a las subunidades 18 S y 28 S, electroferograma del gel, área total de corrida del RNA, concentración, proporción entre las bandas 28 S y 18 S, RIN, y área de las bandas 18S y 28 S en porcentaje proporcional al área total de corrida. Los RNAs correspondientes a cada réplica biológica de muestras control, se etiquetaron como N1-W, N2-W y N3-W y son los tres paneles superiores. Los RNAs correspondientes a cada réplica biológica de cPRMCF-7 se etiquetaron como N1-R, N2-R y N3-R y son los tres paneles inferiores.

Después de comprobar que se tenía una calidad aceptable de cada muestra de RNA, se realizó la secuenciación como se indica en la sección de metodología, posterior a esto se prosiguió a la evaluación de la calidad de las lecturas (reads) de cada muestra secuenciada.

Los reads obtenidos de todas las muestras (N1-R, N2-R, N3-R, N1-W, N2-W y N3-W) tienen una talla de entre 35 a 76 pb. Las muestras N1-R, N2-R, N3-R tienen en promedio 45,294,834 reads y las muestras N1-W, N2-W y N3-W tienen en promedio 43,824,518 reads y la media de la distribución de la talla de los reads de todas las muestras se encuentra en 76 pb.

En general no se observan problemas importantes de calidad en la secuenciación. Se tienen una buena calidad por base a lo largo de la secuencia, buena puntuación de calidad por read, nula detección de bases desconocidas y las 6 muestras tienen un porcentaje aceptable de GCs.

Se tiene una calidad inferior en las posiciones de inicio; 12-13 pb, además de una alta cantidad de GCs en esta posición, y leve contaminación por agentes desconocidos y micoplasma. Todos estos datos se pueden consultar en las ligas de información suplementaria, S1, S2, S3, S4, S5 y S6.

5.4 El fenotipo resistente de la subclona cpRMCF-7 conduce al cambio de la expresión de 1047 genes

Después de verificar que se tenía una calidad aceptable de los reads, se realizó el alineamiento, cuantificación de abundancia y la expresión diferencial genética de acuerdo a la metodología antes descrita. Se obtuvieron un total de 1047 transcritos con expresión diferencial medida con un FC ≥ 2 y una probabilidad estadística menor a 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$), en muestras de la subclona cpRMCF-7 en comparación con su línea parental. Estos datos se pueden consultar en la tabla 1 de información suplementaria.

En la figura 11 se muestra el número total de transcritos cuya expresión incrementa o disminuye en muestras de RNA cpRMCF-7 en comparación con muestras de su línea parental. Se tuvo un total de 1047 genes con expresión diferencial, de los cuales 527 aumentaron su expresión y 520 fueron inhibidos.

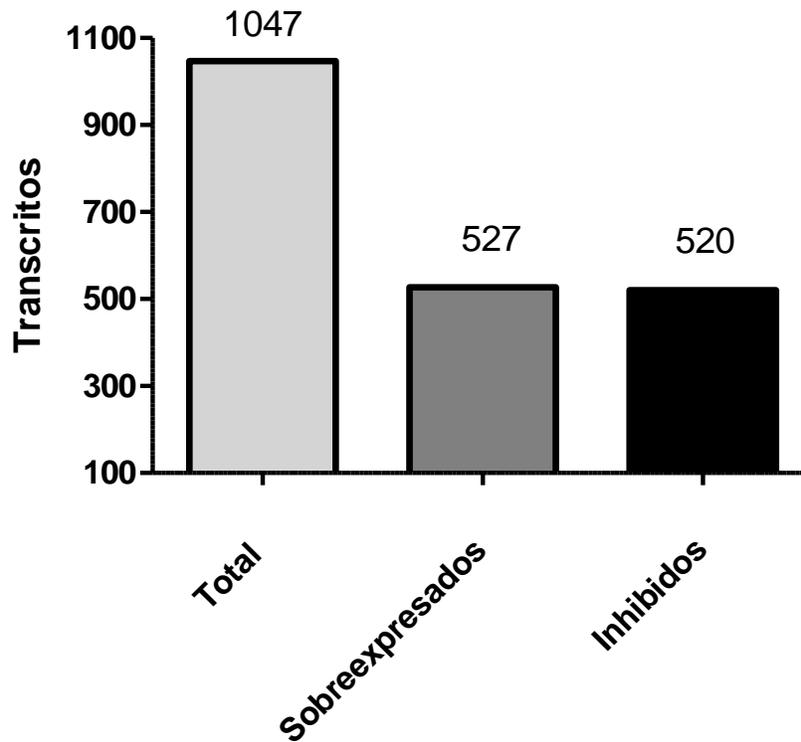


Figura 11. Representación del total de transcritos diferencialmente expresados. El número total de transcritos cuya expresión se modifica en cpRMCF-7 con un valor de cambio mayor o igual a 2. Se tuvo un total de 1047, de los cuales 527 aumentaron su expresión y 520 fueron inhibidos.

El mapa de calor (heatmap) de los resultados de la secuenciación muestra por representación gráfica que se tiene una clara agrupación de las 3 réplicas biológicas de cpRMCF-7 y MCF7WT, en 2 grandes secciones, una de inhibición y otra de sobreexpresión génica (Figura 12).

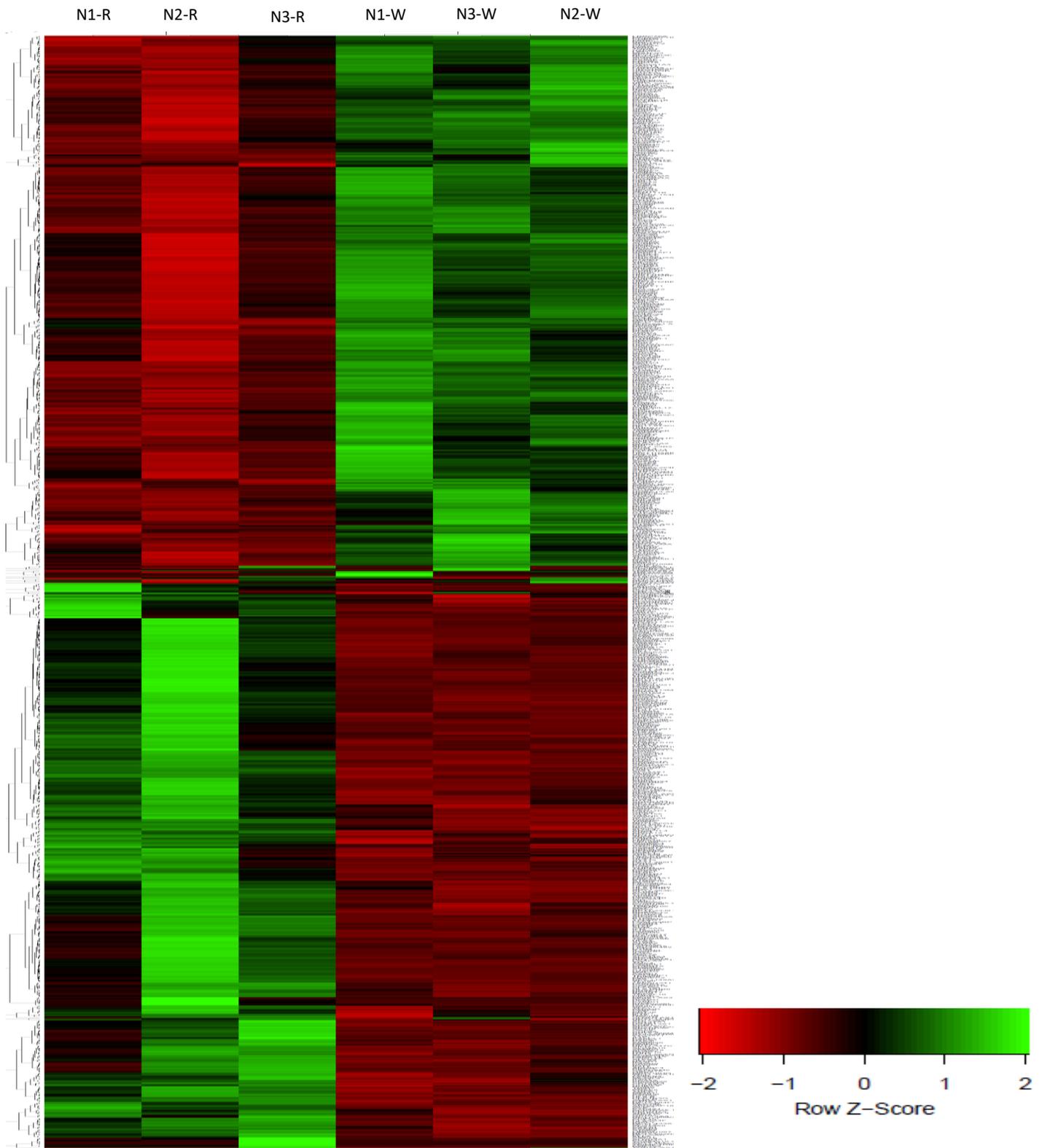


Figura 12. Mapa de calor de los resultados de la secuenciación. El “heatmap” se hizo mediante una correlación de Pearson con los RPKMs de las 3 réplicas biológicas de ambas condiciones experimentales filtrados por $p\text{-value} < 0.05$ y $FC \geq 2$. Los colores simbolizan la expresión relativa de cada gen, el color verde representa una baja expresión y el color rojo un aumento de la misma. Las primeras 3 columnas de la izquierda son las réplicas biológicas de cpRMCF-7 y las siguientes 3 columnas son las réplicas del control. Se tiene una clara agrupación entre réplicas biológicas de la misma condición experimental en dos grandes grupos, uno de inhibición y otro de sobreexpresión génica.

6 Análisis integral del transcriptoma de células cpRMCF-7

Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes a partir de los RPKMs de todas las muestras de acuerdo a la metodología ya descrita. Esto con el fin de determinar qué posibles eventos moleculares podrían ser responsables de los cambios en la expresión génica. Los procesos celulares enriquecidos con una *p-value* <0.05 y una FDR <0.05 considerados los más representativos se muestran en la figura 12. Tuvimos enriquecimiento de genes en factores de transcripción como: P53, AP-1, CREB, FOXO4, DBP y STAT5a (Figura 13). Estos resultados son interesantes en el sentido de que la activación de factores de transcripción como p53, CREB, AP-1 se han reportado ampliamente en la respuesta celular a agentes genotóxicos.

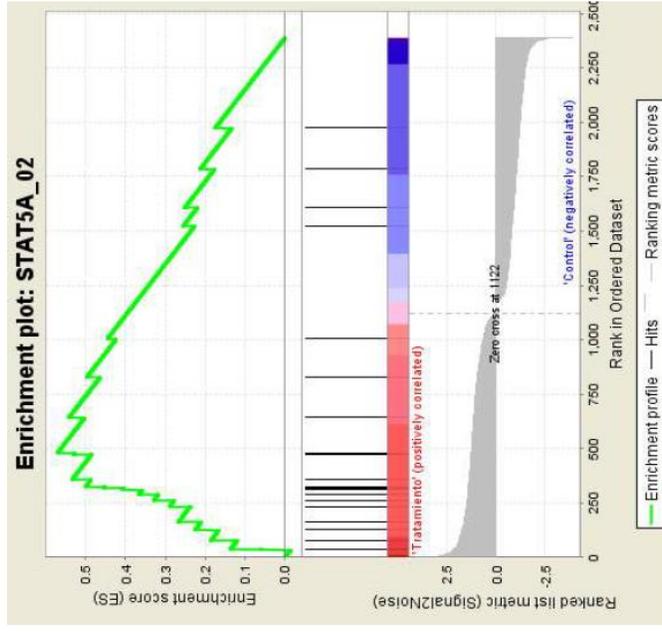
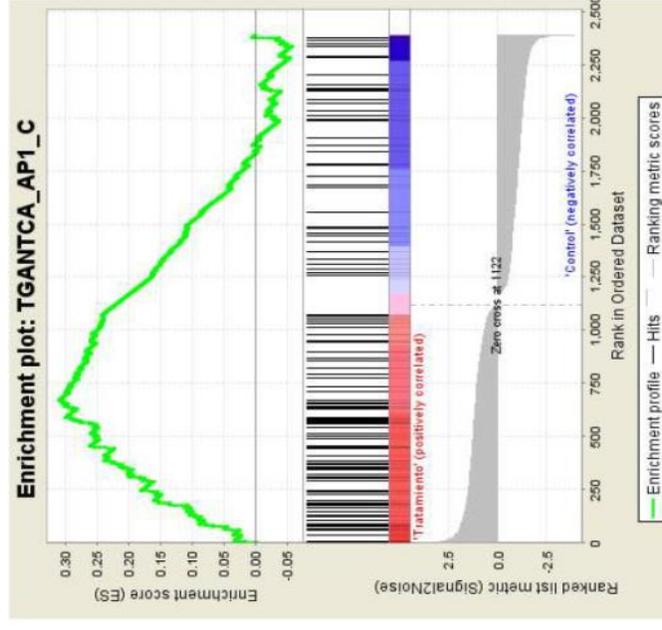
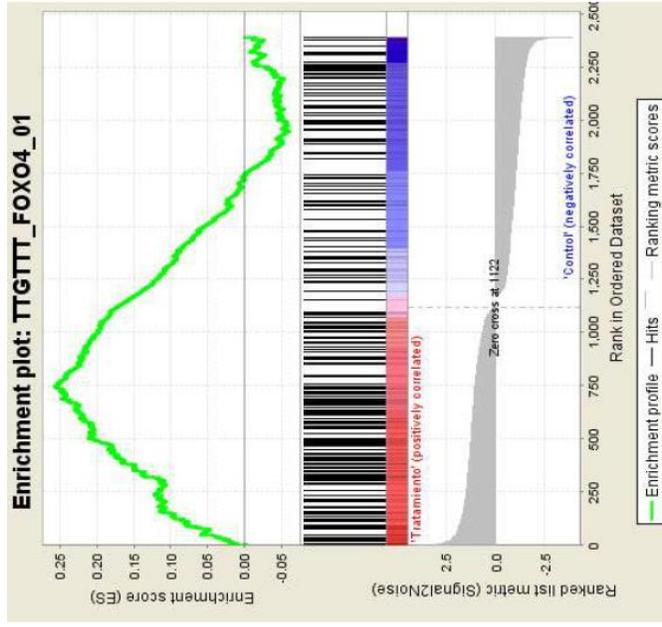
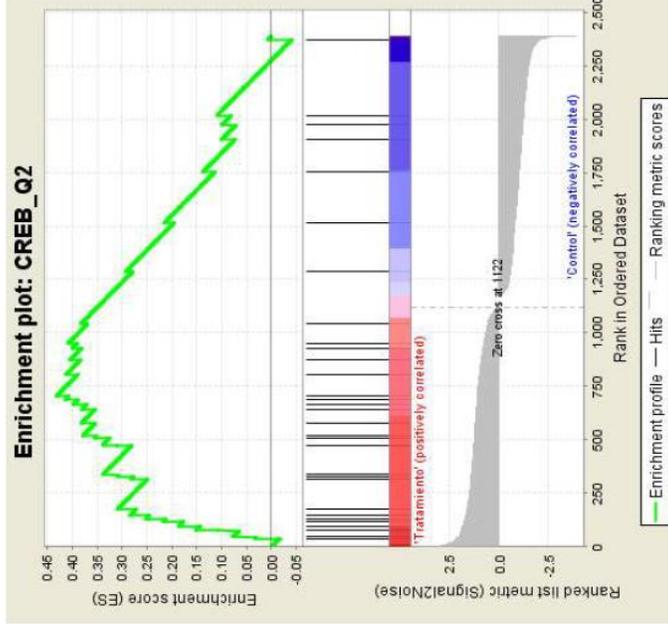
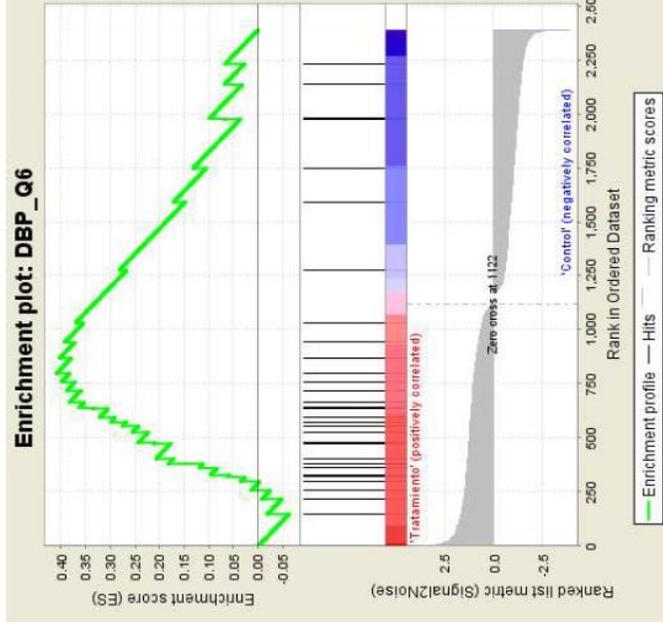
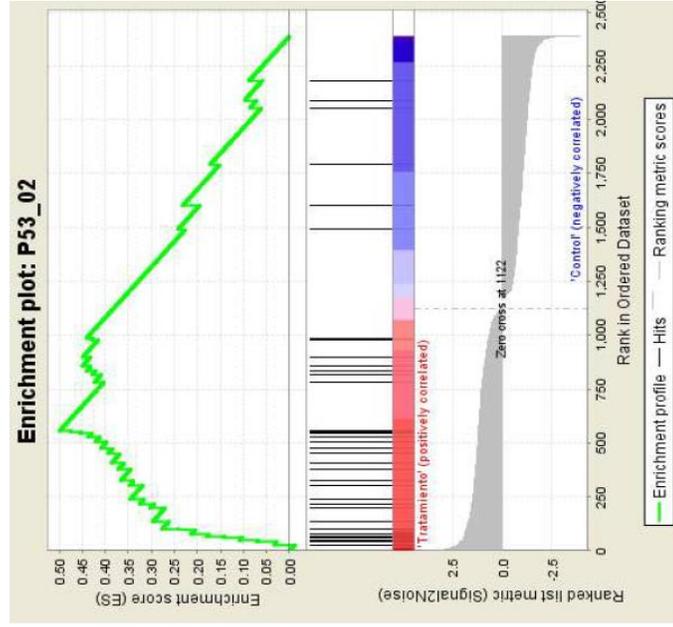


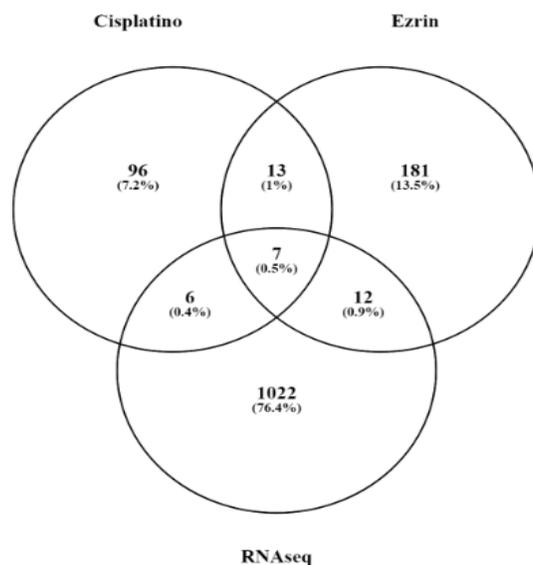
Figura 13. GSEAs de cpRMCF-7. GSEAs factores de transcripción más representativos en muestras de células cpRMCF-7, con una *p-value* <0.05 y una FDR <0.05, bajo el uso de la base de datos GO

6.1 Siete genes previamente relacionados con resistencia a cisplatino y la vía de Ezrin presentaron un cambio en su expresión en la subclona cpRMCF-7

Se realizó una lista de un total de 213 genes relacionados en expresión, activación o unión a Ezrin de acuerdo a la metodología descrita, estos datos se presentan en la tabla 2 de información suplementaria. También se hizo otra lista de 122 genes ya antes reportados con un fenotipo de resistencia a cisplatino o con su mecanismo de acción bajo la misma metodología que para los relacionados con Ezrin, datos presentados en la tabla 3 de información suplementaria.

Con los resultados del RNA-seq, y la lista de genes relacionados a Ezrin y cisplatino se hizo un diagrama de Venn con la finalidad de saber qué moléculas se relacionaban entre los 3 grupos (Figura 14). Se obtuvieron 7 moléculas compartidas entre los 3 grupos: BIRC5, FAS, TNFSF10, GSN, EGF, CASP10, CXCL12. Interesantemente, FAS, TNFSF10, CASP10 y BIRC5 son genes estrechamente relacionados con apoptosis.

EGF es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico y actúa como un potente factor mitogénico. GSN, codifica para una proteína que funciona tanto en el ensamblaje como en el desmontaje de los filamentos de actina y el gen CXCL12 codifica para una quimiocina que tiene papel en funciones como: respuesta inflamatoria, vigilancia inmunitaria, metástasis, y crecimiento.



Intersección cisplatino y Ezrin	ABCG2, ABCC2, NFKB1, MAPK1, AKT1, CASP8, FADD, MAP2K7, FASLG, CTNNB1, WNT1, ICAM1 y XIAP.
Intersección Ezrin y RNA-seq	ITGA5, CLIC3, EIF5A2, TMEM8B, FERMT2, S100P, FABP5, SELL, RCC1, AURKA, SLC12A7, SEPT3.
Intersección cisplatino y RNA-seq	MT2A, MAD2L2, TOP2A, CDKN1A, MAPK11.
Intersección cisplatino, Ezrin y RNA-seq	BIRC5, FAS, TNFSF10, GSN, EGF, CASP10, CXCL12.

Figura 14. Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados en cpRMCF-7 y que se relacionan con la vía de Ezrin y resistencia a cisplatino. En la sección izquierda se muestra de forma esquemática el número de genes compartidos entre genes con expresión diferencial resultado del RNA-seq, genes de moléculas relacionadas con cisplatino y genes de moléculas relacionadas con Ezrin por medio de un diagrama de Venn. En la sección derecha se enlistan los genes compartidos de cada intersección de los 3 grupos antes mencionados.

6.2 Análisis de enriquecimiento de procesos celulares en los que podría estar involucrada Ezrin

Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes a partir de los RPKMs de todas las muestras de acuerdo a la metodología ya descrita. En la figura 15 se encuentran los procesos celulares enriquecidos con una $p < 0.05$ y una $FDR < 0.05$ que comparten en su heatmap, al menos 1 de las 7 moléculas de la intersección cisplatino, Ezrin y RNA-seq (BIRC5, FAS, TNFSF10, GSN, EGF, CASP10, CXCL12) que se muestran en la figura 14. Los procesos de secreción, regulación de la exocitosis, exocitosis, endocitosis incluyen solo a EGF, el proceso de vesículas secretoras comparte FAS y EGF y el proceso de rutas de señalización mediadas por citocinas contiene también FAS y CXCL12.

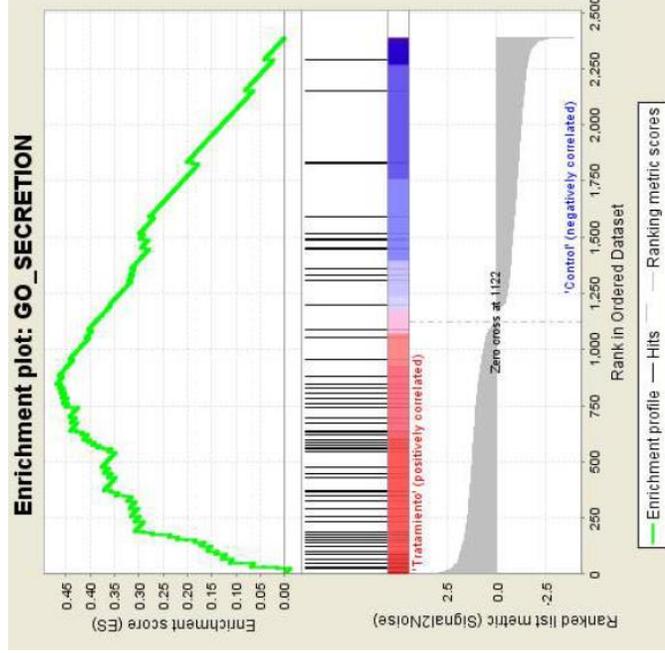
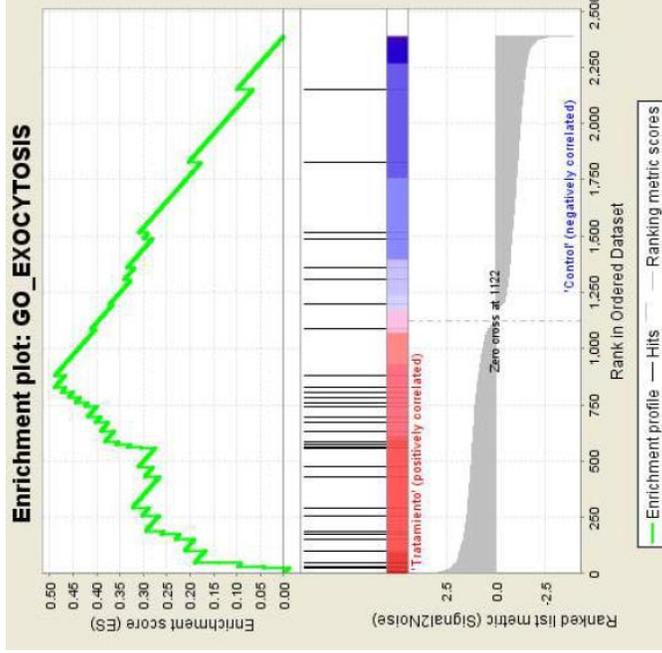
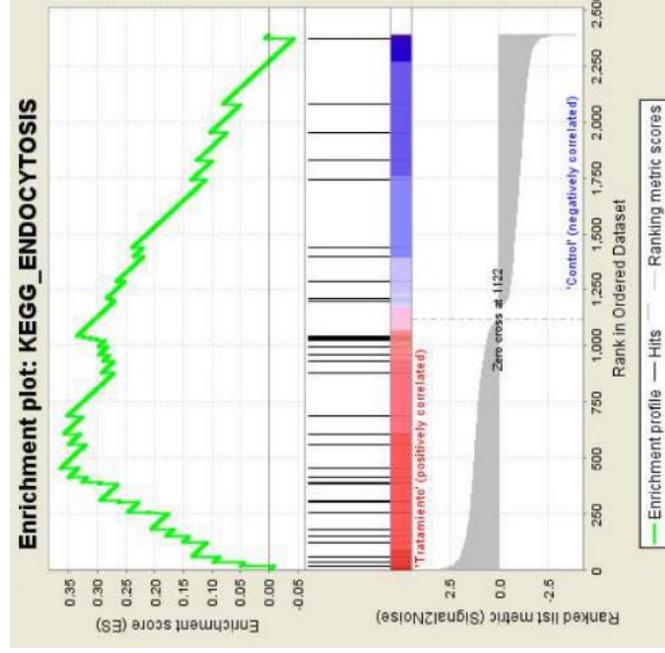
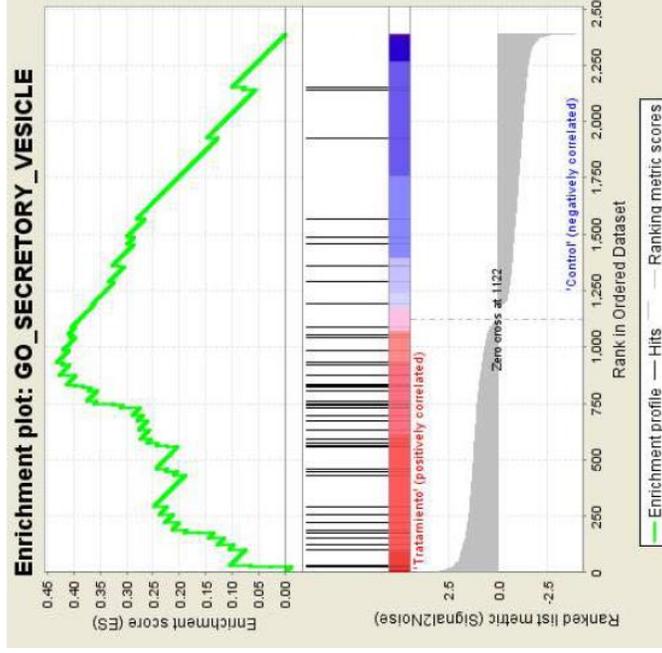
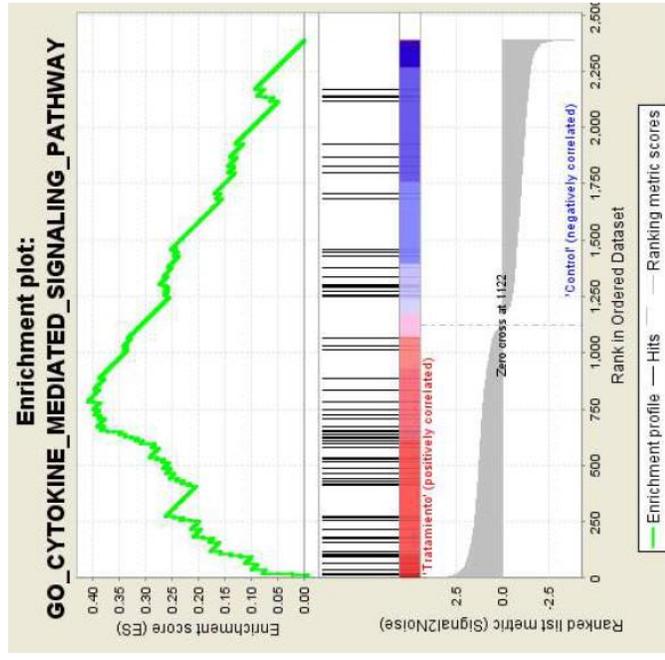
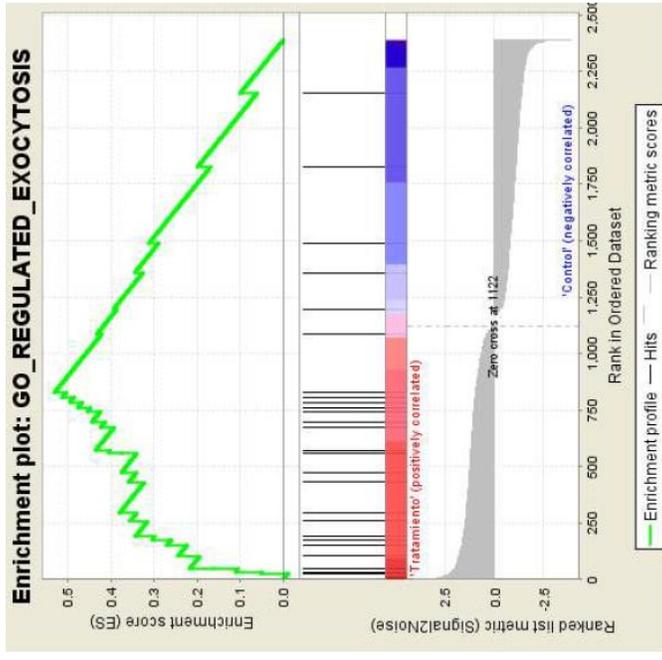


Figura 15. GSEA de cpRMCF-7 relacionados con Ezrin. GSEAs más representativos en muestras de células cpRMCF-7, con una $p < 0.05$ y una $FDR < 0.05$, y que comparten en su heatmap, al menos 1 de las 7 moléculas relacionadas previamente en literatura con Ezrin, cisplatino y con expresión diferencial en RNA-seq. Se usó la base de datos GO y KEGG.

XI. DISCUSIÓN

En este estudio se presenta evidencia de que el fenotipo resistente a cisplatino causa un cambio en la actividad de Ezrin en células de cáncer de mama de la línea celular MCF-7 resistentes a este fármaco. MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama metastásica de tipo luminal A, (ATCC, 2016). Esta línea celular ha marcado un parteaguas en lo que se refiere a la investigación del cáncer de mama ER+ por lo que se le ha llegado a denominar “el caballo de batalla” para el estudio del cáncer de mama de tipo luminal. Algunas de las vías de señalización que caracterizan a la línea celular MCF-7 (expresión de estrógenos, progesterona, receptores de glucocorticoides) están activadas en algunos pacientes con cáncer de mama metastásico, lo que la ha ubicado como un modelo clave para dilucidar vías de resistencia a drogas en cáncer de mama metastásico de tipo luminal A (Lee *et al.*, 2015). Se tiene amplios reportes del uso de MCF-7 y cisplatino en el área de la investigación (Zeidan *et al.*, 2008) (Avato *et al.*, 2017). Y en el caso de Ezrin y MCF-7, se tienen antecedentes de su participación en mecanismos de resistencia (Pokharel *et al.*, 2016) (Pokharel *et al.*, 2014) (Goler-Baron *et al.*, 2012).

A pesar de que el cisplatino no es utilizado como primera línea de tratamiento en cáncer de mama de tipo luminal, la ESMO avala su uso en cáncer de mama avanzada ya sea metastásico o localmente avanzado independientemente del subtipo molecular (Cardoso *et al.*, 2017). De acuerdo a los antecedentes mencionados con anterioridad, y tomando $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ de cisplatino (8.69 mM) como dosis que en promedio se administra en cáncer de mama y restando el 80 % que se calcula que se une a proteínas en plasma sanguíneo (DeConti *et al.*, 1973), se estima una concentración molar que llega al tumor de aproximadamente $1.738 \text{ }\mu\text{M}$. Esta es una dosis muy próxima a la dosis de resistencia máxima de las células con las que se trabajó en este estudio ($1.9 \text{ }\mu\text{M}$).

DeConti y colaboradores (1973), reportaron que entre el 65 al 98 % de cisplatino administrado entra a las células cancerígenas y no cancerígenas, por lo que al trabajar con células *in vitro*, donde el fármaco se aplica directamente a su blanco, se requieren mucho menores cantidades que en uso clínico. Se tienen antecedentes de trabajos *in vitro* realizados con células MCF-7 resistentes a cisplatino desde $1 \text{ }\mu\text{M}$ (Al-Taweel *et al.*, 2014), a $16 \text{ }\mu\text{M}$ (Zhong *et al.*, 2017).

Después de comprobar que trabajábamos con una subclona resistente a cisplatino iniciamos con la caracterización del estado de Ezrin. No obtuvimos datos concluyentes que indiquen que se tiene modificación a nivel de regulación transcripcional de Ezrin por efectos de la resistencia al cisplatino, lo que es concordante con los resultados del RNA-seq, donde la expresión de Ezrin no se modificó en

las células cpRMCF-7. Aunado a esto tampoco observamos cambios en el nivel de expresión de proteína entre ambas condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos indican que probablemente no se tiene una relación entre la adquisición de un fenotipo metastásico o peor pronóstico de la enfermedad y el nivel de expresión de Ezrin (en RNA y proteína), por efectos de la resistencia a cisplatino en el modelo biológico utilizado en este trabajo, ya que se sabe que el nivel de expresión de Ezrin a nivel mensajero o proteína está relacionado con un fenotipo más metastásico (Li *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2013), peor pronóstico de la enfermedad (Li *et al.*, 2015) y resistencia a fármacos (Saygideğer-Kont *et al.*, 2016) como cisplatino en osteosarcoma (Liu *et al.*, 2018).

La falta de concordancia con el aumento a nivel proteína y mensajero de Ezrin reportado por efectos de resistencia a cisplatino en osteosarcoma (Liu *et al.*, 2018) y ausencia en cambio de Ezrin a nivel mensajero y proteína, en células cpRMCF-7, se puede deber a que se trabajó con tipos de cáncer muy distintos y por ende con diferente respuesta celular bajo el mismo estímulo.

Es claro que el nivel de expresión de Ezrin a nivel proteína no es un resultado contundente para establecer si existe una relación entre resistencia a cisplatino y Ezrin en cáncer de mama, ya que puede haber cambios en su actividad o funcionalidad por lo que a continuación decidimos evaluar el estado de fosforilación de Ezrin en T567. La fosforilación en T567 es de alta relevancia biológica para la adquisición de la conformación activa más reportada de esta proteína que conduce a su localización membranal, donde cumple la función de asociar distintos elementos al citoesqueleto de actina (Viswanatha *et al.*, 2012). Nosotros observamos una disminución en la cantidad de pEzrinT567 en células resistentes a cisplatino en comparación con su línea parental, lo que nos conduciría a pensar que se tiene una pérdida de la señalización molecular en vías relacionadas con pEzrinT567, como: transición EMT, metástasis, angiogénesis (Tang *et al.*, 2018), migración (Jansen *et al.*, 2016) organización del citoesqueleto de actina (Henry *et al.*, 1998), (Zeidan *et al.*, 2008), formación de microvellosidades, macropinocitosis (D'Angelo *et al.*, 2007) y polaridad celular (Pelaseyed *et al.*, 2017)(Viswanatha *et al.*, 2012) (Ingraffea *et al.*, 2002). En el RNA-seq no se tiene expresión diferencial de genes que se sabe están relacionados con estos procesos, como SNAI1, TGFB1, TWIST1, ZEB1, RHOA, VEGFA, HGF, APOH, ITGAV, VEGFA, pero si de AP-1, factor de transcripción relacionado con la expresión de genes de motilidad celular, FGF13, relacionado con invasión, y EGF que está involucrado con un fenotipo EMT y metástasis. (Ray y Jablons, 2009). Es indudable que se requiere mayor profundidad en estudios posteriores, para la evaluación del fenotipo que se relaciona con una disminución de pEzrinT567.

En general la disminución de esta fosforilación en cáncer se asocia con características positivas, como: incremento en supervivencia libre de enfermedad, reducción en invasión, pérdida de un fenotipo metastásico (Kikuchi *et al.*, 2019), regulación a la baja de genes relacionados con replicación del DNA, ciclo celular, y enriquecimiento de genes en procesos como: metabolismo de carbohidratos, aumento del consumo de oxígeno dependiente de ATP, disminución de la producción de lactato, aumento en apoptosis (Ren *et al.*, 2011), y permeabilidad celular (Castellani *et al.*, 2012).

Ninguno de los procesos antes mencionados resultaron desregulados por el análisis de enriquecimiento de genes del RNA-seq de células cpRMCF-7. Lo que se puede deber a que el estado de fosforilación de Ezrin no es la condición experimental determinante en la secuenciación del presente trabajo, si no la variable a evaluar como un posible efecto de la resistencia a cisplatino en células de cáncer de mama. Aunado a esto, en este trabajo, no se tiene una delección total de pEzrinT567, como en lo reportado por Ren y colaboradores (2011) y Castellani y colaboradores (2012), y quizá los efectos de la disminución de pEzrinT567 no son tan evidentes en el modelo experimental utilizado, además de que puede que se tenga una respuesta celular en distinta en cpRMCF-7 a la ya reportada en otros modelos experimentales.

La disminución de pEzrinT567, también se relaciona con incremento en apoptosis celular (Ren *et al.*, 2011) sin embargo, se sabe que bajo la administración de cisplatino, pEzrinT567 es fundamental para que se desencadena la apoptosis bajo la vía de FAS por efecto del cisplatino (Fais *et al.*, 2005) en células de cáncer de colon mediante la señalización RhoA/ROCK/pEzrinT567, además de que la expresión del receptor Fas es indispensable para que se lleve a cabo la fosforilación de Ezrin bajo esta misma vía (Rebillard *et al.*, 2010).

La alta expresión del receptor Fas se relaciona con un fenotipo quimiorresistente a cisplatino (Spierings *et al.*, 2003). En la secuenciación observamos una expresión diferencial de Fas en cpRMCF-7 con un FC de 4.229. Lo que, en conjunto con los antecedentes antes planteados, nos lleva a proponer que Ezrin podría participar en un fenotipo de resistencia a cisplatino por medio de deficiencias en su mecanismo de fosforilación, lo que conduciría a cambios en la señalización apoptótica mediada por Fas. Sin embargo, esto nunca antes se ha reportado y aún no contamos con suficiente evidencia experimental para sustentar esta idea, además de no tener expresión diferencial de RHOA, ROCK1, o CASP8 en el RNA-seq.

Por otro lado, Zeidan y colaboradores (2008) vieron una disminución de pEzrinT567 después de la aplicación de cisplatino en células de cáncer de mama, bajo la activación de la vía ASMase/Ceramidas/PP2A/Ezrin, es importante destacar que esta observación no concuerda con la

respuesta celular esperada por Rebillard y colaboradores (2010). Esto se puede justificar porque los experimentos se realizaron en modelos biológicos distintos y bajo distintas concentraciones de cisplatino. Sin embargo, sería interesante evaluar si la disminución de pEzrinT567 en cpRMCF-7 se relaciona con resistencia a cisplatino por medio de Fas o por la activación de la vía ASMase/Ceramidas/PP2A/Ezrin, a pesar de que elementos de esta última vía no tuvieron expresión diferencial en los resultados de la secuenciación, puede que estén relacionados con cambios en pEzrinT567.

Por otro lado, Pelaseyed y colaboradores (2017) plantearon que la unión de Ezrin a PIP2 en membrana origina un cambio conformacional que disminuye la afinidad entre sus dominios proteicos: FERM y ERM. Esto hace que Ezrin adopte una conformación más abierta (Pelaseyed *et al.*, 2017) y se desenmascare T567 para que pueda ser fosforilada por cinasas que se acumulan entre ambos dominios proteicos a consecuencia de la pérdida de afinidad entre ellos. De acuerdo con este antecedente sugerimos que pueden existir deficiencias en la unión Ezrin-PIP2 que le anclen a membrana. O incluso, puede existir otra señalización que conduzca a la pérdida de la unión entre PIP2 y Ezrin o mutaciones en cualquiera de estas dos moléculas. La pérdida de la unión entre PIP2 y Ezrin conduciría a que no se lleve a cabo la fosforilación en T567 por cinasas, lo que puede explicar la disminución de pEzrinT567 por efectos de la resistencia a cisplatino.

El establecimiento de una relación entre cualquiera de los mecanismos celulares planteados con anterioridad y la disminución de pEzrinT567 en la subclona cpRMCF-7 necesita mayor evidencia experimental.

A continuación, nos cuestionamos si la disminución de la fosforilación T567 por efecto de la resistencia a cisplatino está acompañada de cambios en la localización celular de Ezrin y pEzrinT567. Por medio de inmunofluorescencia se verificó que pEzrinT567 pierde su localización membranal en células resistentes al fármaco en comparación con su línea parental. Sin embargo, por fallas técnicas en el anticuerpo utilizado para Ezrin total (Santa cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC-58758) no se pudo establecer su localización celular con total precisión. A pesar de no tener este dato, saber que pEzrinT567 se encuentra preferentemente en citoplasma por efecto de resistencia a cisplatino en cáncer de mama es algo que no había sido reportado hasta el momento.

Sabemos que en una conformación inactiva Ezrin se encuentra en el citoplasma con una alta afinidad de unión entre los dominios ERM y FERM que enmascara el sitio de unión a F-actina (Fehon *et al.*, 2010) (Gary y Bretscher, 1995) y T567. Si se desacopla el ciclo basal de fosforilación y desfosforilación de Ezrin en T567 en células epiteliales normales, se da la pérdida de un fenotipo polarizado

(Viswanatha *et al.*, 2012), diferenciado, además de la adquisición de una morfogénesis aberrante (Pelaseyed y Bretscher, 2018), aumento en proliferación (Piao *et al.*, 2015) y deficiencias del anclaje normal a la membrana de una variedad de moléculas de adhesión (Jansen *et al.*, 2016). Las bases moleculares de la pérdida de la localización apical de Ezrin a una distribución más homogénea o incluso preferencialmente citoplasmática aún no se han descrito en su totalidad.

Se ha visto que en diferentes cánceres (Boldrini *et al.*, 2010) epiteliales (Piao *et al.*, 2015), entre ellos mama, la localización de Ezrin cambia de una distribución apical a una localización más homogénea en membrana conforme evoluciona la enfermedad (Sarrió *et al.*, 2006). En casos de tumores metastásicos, o clínicamente más agresivos; como TNBC, se localiza preferencialmente en el citoplasma (Li *et al.*, 2008) (Jais *et al.*, 2017). Además, de correlacionarse con un incremento en Ki-67 y un peor pronóstico (Kikuchi *et al.*, 2019).

La pérdida de la localización en membrana de Ezrin y el incremento de ésta en citoplasma concuerdan con lo esperado para un fenotipo más agresivo (Sarrió *et al.*, 2006) (Li *et al.*, 2008) (Jais *et al.*, 2017) (Kikuchi *et al.*, 2019), lo que se puede atribuir como efecto de la resistencia a cisplatino. Esto sugiere que la regulación de la agresividad del tumor puede depender de la localización intracelular de Ezrin (Kikuchi *et al.*, 2019) y no solamente del estado de expresión a nivel proteico o mensajero, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, se necesita la validación de la adquisición de características propias de un tumor más agresivo (incremento en migración, invasión y proliferación), para aseverar esto en el modelo experimental resistente a cisplatino utilizado en el presente trabajo.

La disminución de pEzrinT567 y el cambio en su localización de membrana al citoplasma por efectos de la resistencia a cisplatino nos permiten inferir que se tienen modificaciones de expresión en vías de transducción relacionadas con esta proteína. En primera instancia, sugerimos que quizá se da la unión entre PIP2-Ezrin seguido de su fosforilación, tal cual se plantea por Pelaseyed y colaboradores (2017). A continuación, puede que se esté dando la pérdida de la unión PIP2-pEzrinT567 en membrana lo que puede explicar el aumento de la localización de pEzrinT567 en citoplasma, sin embargo, aún no se ha demostrado este fenómeno.

Podemos sugerir que seguramente existe cambio en mecanismos relacionados con el estado de fosforilación de Ezrin en T567 que induzcan, posiblemente, a la internalización de Ezrin, lo que puede estar relacionado o no con una posible pérdida de la unión entre PIP2 y pEzrinT567 e incluso con la adquisición de alguna otra marca postraduccional.

Algunas moléculas que se sabe que están relacionadas con el estado de fosforilación de Ezrin son: PP2A (Zeidan et al., 2008) PPP1CB, SYTL2 (Yasuda et al., 2015), ROCK1 (Tang et al., 2018), SYK (Li et al., 2018), PKA (Jansen et al., 2016) (Zhou et al., 2003), EGFR (Li et al., 2017), EGF (Srivastava et al., 2005) LOK, SLK (Pelaseyed et al., 2017), CDK5 (Yang y Hinds, 2003), PKC (Perez et al., 2002), Src (Srivastava et al., 2005), ROCK (Rebillard et al., 2010).

La fosforilación en T567 es la más estudiada para Ezrin, sin embargo, se han reportado distintos sitios susceptibles a fosforilaciones y demás marcas, cuya señalización podría estar involucrada con funciones aún no completamente entendidas para Ezrin. Algunos de los sitios fosforilables que se han identificado son: Y353 (Singh *et al.*, 2008) (Gautreau *et al.*, 1999), Y145 (Krieg y Hunter, 1992) (Srivastava *et al.*, 2005), 146 (Saygideğer-Kont *et al.*, 2016), Y477 (Li *et al.*, 2016), S66 (Zhou *et al.*, 2003) y T235 (Yang y Hinds, 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos, EGF es el único elemento que participa en la fosforilación de Ezrin que se ha reportado con una expresión diferencial en cpRMCF-7. El EGF es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico y actúa como un potente factor mitogénico. Su desregulación se ha asociado con el crecimiento y la progresión de ciertos cánceres, e incremento con resistencia a cisplatino en cáncer (Xie *et al.*, 2017), entre ellos mama (Dixit *et al.*, 1997). El EGF está involucrado en el estado de fosforilación de Ezrin en Y145 (Srivastava et al., 2005), Y353 (Gautreau et al., 1999) y Y146 (Saygideğer-Kont et al., 2016).

Aún no se sabe del todo, si es necesario que se dé y se mantenga el marcaje de pEzrinT567 para que se lleve a cabo cualquiera de las fosforilaciones antes mencionadas, a excepción de Y145. Donde, es necesario que se dé la fosforilación en T567 en Ezrin por Src para que se pueda dar la fosforilación en Y145 por Src bajo un estímulo de EGF (Srivastava *et al.*, 2005). El fenotipo resultante no se describió, pero se sabe que células con mutación en Y145F de Ezrin, carecen de lamelipodios, fibras de estrés y son redondeadas. Es importante mencionar que Srivastava y colaboradores (2005) no reportan si existían cambios en la localización de Ezrin antes y después de la fosforilación en Y145.

En el RNA-seq el EGF tuvo un FC de 3.5. Sin embargo, se requiere dilucidar si la alta expresión de EGF podría llevar a una disminución de pEzrinT567 y pérdida de esta en membrana por efecto de la señalización que induzca otra fosforilación como Y145 (Srivastava et al., 2005), Y146 (Saygideğer-Kont et al., 2016), o Y353 (Gautreau et al., 1999).

Se requiere la evaluación del estado de estas fosforilaciones y determinar si existe una relación inversa en cuanto al estado de pEzrinT567 y alguna de estas marcas postraduccionales, objetivos que quedan lejanos al alcance de este estudio.

Por otro lado, como se mencionó antes, cabe la posibilidad de que se esté llevando a cabo alguna señal de internalización que induzca a la localización en vesículas intracelulares de Ezrin acompañada o no de otra fosforilación, lo cual puede ser posible ya que se ha reportado con anterioridad que Ezrin con el resto de la familia ERM, CD44 y MDR1 se secretan de células con resistencia a múltiples fármacos por medio de micropartículas para conferir este fenotipo a otras células de cáncer de mama (Pokharel *et al.*, 2016) (Pokharel *et al.*, 2014). Además, de que se sabe que la familia ERM es indispensable para el correcto andamiaje de ABCG2 en la membrana de vesículas extracelulares encargadas del secuestro de los fármacos en células de cáncer de mama con resistencia a múltiples fármacos (Goler-Baron *et al.*, 2012).

La hipótesis de tener un fenotipo con modificaciones en la expresión de genes relacionados con el tráfico vesicular por efectos de la resistencia a cisplatino es apoyada por el enriquecimiento de genes en vías que comparten al menos uno de los 7 genes relacionados previamente en la literatura con Ezrin, mecanismos de acción de cisplatino y con una expresión diferencial en el RNA-seq. Estos GSEAs son: secreción, regulación de la exocitosis, exocitosis, vesículas secretoras y endocitosis (Figura 14). Además, tuvimos enriquecimiento de genes en procesos como: retículo endoplásmico, aparato de Golgi, transporte vesicular por Golgi, transporte vesicular a la membrana, secreción celular, membrana de vesicular endocíticas, vesículas intracelulares, vesículas citoplasmáticas, transporte vesicular, membrana vesicular y cobertura vesicular (datos no mostrados).

El conjunto de estos datos nos indican que probablemente el tráfico vesicular se relaciona con la resistencia a cisplatino en el modelo experimental utilizado en el presente trabajo, lo que podría explicar el cambio de la localización de Ezrin a citoplasma, para su posterior secreción de acuerdo a lo ya reportado por Pokharel y colaboradores (2014) (2016) o para la integración a la membrana de vesículas extracelulares encargadas del secuestro de los fármacos (Goler-Baron *et al.*, 2012).

Los resultados con los que se cuenta hasta el momento no son evidencia suficiente para aseverar la participación de Ezrin en la conferencia de resistencia por micropartículas de acuerdo a lo reportado por Pokharel y colaboradores (2014) (2016), ya que tampoco tenemos la expresión diferencial de MDR1, la familia ERM y CD44, en los resultados de el RNA-seq, sin embargo, no significa necesariamente que se descarte esta posibilidad.

En cuanto a la posible participación de Ezrin en la membrana de vesículas extracelulares encargadas del secuestro de los fármacos para conferir resistencia, Goler-Baron y colaboradores (2012) vieron que la inhibición de la ruta AKT regula a la baja la expresión de proteínas ERM, lo que conlleva a la disminución de la expresión de ABCG2 en la membrana de vesículas extracelulares, reducción del tamaño y número de estas vesículas, reversión del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, y disminución de B-catenina, promotor de un fenotipo transición epitelio mesénquima (EMT). Por otro lado, se sabe que la fosforilación de Ezrin en T567 y su localización membranal es necesaria para el andamiaje de PI3K y para desencadenar la activación de la ruta PI3K/AKT (Gautreau *et al.*, 1999). El EGF (gen con expresión diferencial en la secuenciación) mediante la activación de la vía PI3K/AKT fosforila a Ezrin en Y353 (Wang *et al.*, 2014), misma fosforilación que está relacionada con la adquisición de resistencia a la apoptosis (Monni *et al.*, 2008).

No se ha reportado que sea necesario el mantenimiento de pEzrinT567 para que se dé la fosforilación en Y353, lo que nos permite especular que quizá en el modelo de estudio del presente trabajo puede que por efecto del EGF se active la vía PI3K/AKT, que requiere de pEzrinT567. Nos permitimos proponer, que a consecuencia de la activación de esta ruta, se fosforila a Ezrin en Y353, lo que ocasiona el cambio de localización de membrana a citoplasma y quizá también se relacione con la disminución de pEzrinT567.

La desregulación de PI3K/AKT en diferentes tipos de cáncer, y su activación tiene como respuesta biológica un fenotipo proliferativo y de supervivencia (Singh *et al.*, 2008) por la inhibición de la apoptosis (Perez *et al.*, 2002). En quimiorresistencia a cisplatino una alta expresión de la actividad de la vía PI3K/AKT desencadena la transición epitelio mesénquima (Huang *et al.*, 2016) y disminución de apoptosis inducida por cisplatino (Koster *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, solo tuvimos expresión diferencial de EGF, como ya se mencionó antes, además de la subunidad reguladora de PI3K Clase I, IA y IB, PIK3R y PIK3R5 con un FC de 2.25 y 2.78 respectivamente, sin embargo se necesita profundizar en estas investigaciones para la evaluación de la participación de la vía EGF/ PI3K/AKT/ Ezrin/ y quizá ABCG2 en el modelo de estudio utilizado en este trabajo.

Por otro lado, de los resultados de la secuenciación del transcriptoma de cpRMCF-7 por RNA-seq tuvimos un total de 1047 genes con expresión diferencial, de los cuales 527 tuvieron una expresión al alza y 520 resultaron con un nivel de expresión disminuida en muestras de cpRMCF-7. El alto número de resultados generados abren la posibilidad de profundizar en diversos mecanismos desregulados bajo el efecto del cisplatino. Con estos datos, se hizo un análisis del enriquecimiento de genes con la finalidad de obtener una visión más global acerca del fenotipo adquirido por efectos de la resistencia

a cisplatino. A parte de los GSEAs ya mencionados anteriormente, se obtuvo el enriquecimiento de genes blanco de los factores de transcripción: P53, AP-1, CREB, FOXO4, DBP y STAT5a.

P53 es un factor transcripcional que regula la expresión de genes relacionados con la detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del DNA o cambios en el metabolismo. Se sabe que es activado por efectos de cisplatino como respuesta de daño al DNA (Sarin *et al.*, 2017). Por lo que es de esperar que se tenga un incremento en la respuesta de P53 por efecto de la resistencia a cisplatino. Además, de que pueden ser explicado porque probablemente tenemos detección de daño al DNA por cisplatino, lo que lleva a un arresto en el ciclo celular posterior, y a la reparación por efectos de la transcripción de genes blanco de P53.

El factor de transcripción AP-1 es un factor de transcripción que se ha vinculado con el aumento de la tumorigénesis, la metástasis y la invasión, así como con la resistencia a los fármacos, como cisplatino (Che, *et al.*, 2017) (Johnson *et al.*, 2000). Además, AP-1 podría participar en la transición epitelio mesénquima inducida por vimentina en células de cáncer de mama con resistencia a múltiples fármacos (Deng *et al.*, 2014). Actúa como factor de transcripción de ERCC1, enzimas clave involucradas en la reparación de la escisión de nucleótidos (Youn *et al.*, 2004) que está relacionada a mecanismos de resistencia a cisplatino por incremento en reparación de daño a DNA y disminución de la genotoxicidad (Stewart, 2007), lo que apoya la adquisición de un fenotipo resistente a cisplatino y es concordante con lo esperado de células resistentes a este fármaco.

CREB es un factor de transcripción de elementos de respuesta a AMPc, y se sabe está relacionado con resistencia a cisplatino. Zhang colaboradores (2017) reportaron que la vía miR-132/ SIRT1/CREB/ ABCG2 contribuye a la resistencia a cisplatino en células de cáncer gástrico, lo que podría tener relación con la posible participación de ABCG2 antes mencionada. Por otro lado, CREB también lleva al aumento de la transcripción de Bcl-2, molécula relacionada con la resistencia a cisplatino en células de pulmón no pequeñas (Wu *et al.*, 2014). Además de ser fosforilado bajo la vía de E6/EGFR / PI3K / AKT/CREB/ BIRC3 (proteína inhibidora de la apoptosis) en células de cáncer de pulmón resistentes a cisplatino (Wu *et al.*, 2010). La activación de CREB en MCF-7 se lleva a cabo por la vía FAK / PI3K / AKT, si se da la reducción de la integrina B1, la activación de CREB, se lleva a cabo por la vía de las MAPKs y la inhibición CREB sensibiliza a estas células al tratamiento con cisplatino (Jakubzig *et al.*, 2018). Estos antecedentes nos indican que el enriquecimiento de genes relacionados con este factor de transcripción es algo que podría ser esperado por efecto de la resistencia a cisplatino en el modelo de estudio con el que se realizó este trabajo, sin embargo la evaluación de las vías mediante las cuales se relaciona con resistencia a cisplatino, requieren de mayor investigación.

FOXO4 es un factor de transcripción relacionado con crecimiento y diferenciación, pertenece a la familia de factores de transcripción FOXO integrada por FOXO1, FOXO3a, FOXO4 y FOXO6, cada uno de los miembros de esta familia puede desencadenar diferentes funciones, incluso opuestas (Farhan *et al.*, 2017). FOXO4 mediante la señalización de Akt se relaciona con el crecimiento celular y la supervivencia (Beretta *et al.*, 2019), vía ampliamente reportada en resistencia a cisplatino (Koster *et al.*, 2010). Además, FOXO4 puede mediar el arresto del ciclo celular por medio de daño a DNA (Farhan *et al.*, 2017), lo que concuerda con lo esperado en el modelo de estudio utilizado en este trabajo. De igual forma, la activación de FOXO4 se ha visto relacionada con reducción de los niveles de estrés oxidativo, lo que podría ser una respuesta para evitar el daño a DNA (Essers *et al.*, 2004) por efectos del cisplatino, ya que se sabe que este fármaco desencadena aumento en ROS (Jansen *et al.*, 2002). Sin duda, la activación de FOXO4 concuerda con lo esperado para un fenotipo resistente a cisplatino. Sin embargo aún no se tienen antecedentes de la participación de FOXO4 en la resistencia a este fármaco.

La proteína de unión al promotor del sitio D de la albúmina; por sus siglas en inglés; DBP, es un factor de transcripción involucrado en la detoxificación, y el metabolismo de drogas. Se sabe que el cisplatino inhibe la expresión de esta proteína en hígado, corazón, y riñón de ratones (Cao *et al.*, 2018). Esto nos lleva a pensar que la alta regulación de este factor de transcripción de alguna forma puede favorecer el fenotipo de quimiorresistencia en el modelo de estudio utilizado en este trabajo, por mecanismos aún no descritos.

STAT5a pertenece a la familia de factores de transcripción de las STATs. La activación de las STATs se da por medio de la respuesta a ligandos como interleucinas, y diferentes hormonas de crecimiento. Seguido de su fosforilación, se transloca al núcleo en homo o heterodímeros donde actúan como activadores transcripcionales de genes antiapoptóticos. Hong y colaboradores (2012) vieron un aumento de la apoptosis inducida por cisplatino bajo la inhibición de STAT5a. Por otro lado, se sabe que se tiene mayor sensibilidad a cisplatino en células de cáncer de mama por la regulación negativa de la vía JAK2/STAT5a/Ciclina D1 mediante la inhibición de la prolactina (Sinha *et al.*, 2018). Esto en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo, nos conduciría a pensar que la activación de este factor de transcripción de alguna forma tenga que ver con resistencia a cisplatino por algún mecanismo relacionado con la evasión de la apoptosis y control del ciclo celular.

Además, se sabe que, en macrófagos asociados al tumor en cáncer de mama en ratones, miR-100 por medio de la ruta mTOR/STAT5a promueve una mayor secreción de IL-1ra lo que promueve la metástasis tumoral y se asocia con resistencia a cisplatino (Wang *et al.*, 2018). La evaluación de estas

rutas en el modelo experimental utilizado en el presente trabajo, requiere de mayor profundidad en los estudios. El papel de STAT5a en resistencia a cisplatino aún se sigue describiendo.

A continuación, y con la finalidad de tener una aproximación de qué moléculas podrían estar relacionadas con el cambio en la regulación de Ezrin por efectos de la resistencia a cisplatino en el modelo experimental utilizado en este estudio. Se determinaron los elementos compartidos entre los genes con expresión diferencial resultado de la secuenciación, y los genes relacionados con Ezrin y cisplatino por medio de un diagrama de Venn (Lista 1, 2 y 3 respectivamente de figuras suplementarias).

Obtuvimos un total de siete genes (BIRC5, FAS, TNFSF10, GSN, EGF, CASP10, CXCL12) que se comparten entre los tres grupos antes mencionados. Cinco de los GSEAs reportados en este trabajo que incluyen al menos una de las siete moléculas de la intersección Ezrin, cisplatino, RNA-seq (Figura 14) incluyen en su heatmap al EGF. El GSEA de rutas de señalización por citocinas incluye a FAS y CXCL12. Fas se comparte entre este último GSEA mencionado y vesículas de secreción.

El posible papel de FAS y EGF en el modelo de estudio ocupado en este trabajo ya fue discutido con anterioridad, sin embargo, su relación con secreción, regulación de la exocitosis, exocitosis, vesículas secretoras, y endocitosis, y su relación con Ezrin queda pendiente aún de dilucidar. En cuanto al enriquecimiento de genes de rutas de señalización mediadas por citocinas, se sabe que la señalización por citocinas puede inducir distintos fenotipos dependiendo del tipo de citocina y el tipo de célula del que se hable. Es ampliamente reportada la participación de citocinas en un fenotipo resistente a cisplatino. En cuanto a Ezrin CXCL13 se relaciona con la desfosforilación de Ezrin en T567 lo que lleva a cambios morfológicos y citoesqueléticos esenciales para la migración de células B (Parameswaran *et al.*, 2011).

En cuanto a CXCL12, (cuyo gen tuvo un FC de de -2.01 en la RNA-seq) quimiocina alfa derivado de células estromales, relevante en embriogénesis, vigilancia inmunitaria, respuesta inflamatoria, homeostasis tisular, crecimiento, metástasis tumoral y progresión maligna (Lecavalier-Barsoum *et al.*, 2018). Se sabe que esta quimiocina disminuye pEzrinT567 y promueve su liberación de la membrana plasmática en linfocitos (Hao *et al.*, 2009). Aún su papel en la resistencia a cisplatino se sigue describiendo (Li *et al.*, 2016) (Nakamura *et al.*, 2015).

Lo visto por Parameswaran y colaboradores (2011) concuerda con la disminución de pEzrinT567 en el modelo de estudio empleado en este trabajo, pero reducción de la expresión de CXCL12 y pérdida de pEzrinT567 no concuerda con lo reportado por Hao y colaboradores (2009), además de que se

requiere mayor evidencia que justifique cambios de la localización de esta fosforilación de la membrana al citoplasma.

La caracterización de la función y ruta de señalización con la que se relaciona cada una de las moléculas anteriormente mencionadas en resistencia y cisplatino, y cada una de las moléculas compartidas entre los 3 grupos (RNA-seq, Ezrin y cisplatino) y su relevancia en los GSEAs, necesitan en primera instancia una amplia investigación partiendo de la validación de los resultados de la secuenciación.

Es evidente que se necesitan estudios más a fondo para la validación de cualquiera de las posibles explicaciones que se plantean a lo largo de este texto para explicar cambios en pEzrinT567 por efecto de la resistencia a cisplatino, y son objetivos que quedan lejos de los alcances del presente trabajo.

XII. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se obtuvo una subclona de células MCF-7 resistentes a cisplatino, cpRMCF-7.
- El nivel de expresión de RNAm de Ezrin y a nivel proteína en cpRMCF-7 en comparación con su línea parental no cambió.
- La fosforilación en T567 de Ezrin disminuyó en células cpRMCF-7 en comparación con su línea parental.
- Ezrin fosforilada en la T567 disminuyó su localización en membrana en cpRMCF-7 en comparación con su línea parental.
- Los resultados de RNA-seq nos permiten plantear diferentes hipótesis sobre la regulación de Ezrin por efectos de la resistencia a cisplatino. Sin embargo, se requiere de estudios más detallados para la validación de cada propuesta planteada.

XIII. PERSPECTIVAS

Quedan pendiente la evaluación de qué mecanismos de señalización están relacionados con el cambio de localización y la disminución de pEzrinT567 en el modelo de estudio utilizado en este trabajo. Cabe la posibilidad de que se esté señalizando con otras marcas postraduccionales que induzcan a una pérdida de la localización membranal por lo que la posible evaluación de este planteamiento queda abierta como una perspectiva.

Sería interesante la evaluación de la participación de Ezrin en un fenotipo antiapoptótico. Quizá, mediante algún mecanismo relacionado con Fas, según lo descrito en los antecedentes. Además, seis de las siete moléculas con expresión diferencial en el RNA-seq se sabe están relacionadas con este proceso, cisplatino y Ezrin, por lo que la evaluación de la participación de estas moléculas con la evaluación de la apoptosis en el modelo de estudio resistente a cisplatino y cambios en la regulación de Ezrin se plantea como una posible perspectiva de este trabajo.

Por otro lado, los datos de GSEAs nos dan evidencia de que probablemente poseemos un fenotipo secretor por efecto de la resistencia a cisplatino, por lo que, de acuerdo a los antecedentes descritos, Ezrin podría participar en estos mecanismos para la conferencia de resistencia, quizá mediante la ruta PI3K/AKT. De acuerdo a los antecedentes anteriormente descritos, esto nos permite sugerir una posible evaluación de esta hipótesis en un futuro.

La mayoría de los GSEAs relacionados con un fenotipo secretor y que comparten genes con expresión diferencial en el RNA-seq y relacionados a cisplatino y Ezrin integran al EGF. La posible relación de este factor de crecimiento con los cambios de la regulación de la actividad de Ezrin y su relación con secreción queda pendiente de ser evaluada.

En cuanto a la caracterización de que otros posibles mecanismos que resultan desregulados por efectos de la resistencia a cisplatino, sin tener relación necesariamente con la proteína de estudio del presente trabajo, consideramos que sería muy interesante la evaluación del papel que desarrollan FOXO4, DBP y STAT5A en un fenotipo resistente a cisplatino, ya que muy probablemente se relacionen con mecanismos aún no dilucidados de resistencia a este fármaco.

De manera general la aseveración de la relación entre cualquier mecanismo celular antes planteado y los cambios de la regulación de Ezrin vistos por efecto de la resistencia a cisplatino en células MCF-7 necesita mayor evidencia experimental. El siguiente paso para la posible evaluación de cada hipótesis planteada con anterioridad, requiere en primera instancia la validación de la RNA-seq que se realizó.

XIV. REFERENCIAS

1. ACS (2017). American Cancer Society. Recuperado de. <https://www.cancer.org>
2. Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1), 33.
3. Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D., & Arpin, M. (1993). Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *The Journal of cell biology*, 120(1), 129-139.
4. Allardyce, C. S., Dyson, P. J., Coffey, J., & Johnson, N. (2002). Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionisation mass spectrometry: The interaction of cisplatin with transferrin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(10), 933–935. <https://doi.org/10.1002/rcm.662>
5. Alonso, C. (2009). Mecanismos de quimiorresistencia en terapia de primera línea de cáncer de ovario epitelial. *Medwave*, 9(10).
6. Alt, A., Lammens, K., Chiocchini, C., Lammens, A., Pieck, J. C., Kuch, D., ... & Carell, T. (2007). Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase η . *Science*, 318(5852), 967-970.
7. Al-Taweel, N., Varghese, E., Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2014). Cisplatin (CDDP) triggers cell death of MCF-7 cells following disruption of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) homeostasis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(5), 765–774. <https://doi.org/10.2131/jts.39.765>
8. Andersson, G., Wennersten, C., Gaber, A., Boman, K., Nodin, B., Uhlén, M., ... & Jirstrom, K. (2014). Reduced expression of ezrin in urothelial bladder cancer signifies more advanced tumours and an impaired survival: validatory study of two independent patient cohorts. *BMC urology*, 14(1), 36
9. AOCC (2013). Protocolos oncológicos. Córdoba. España
10. Arce, C., Bargalló, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F., Pérez, V., ... Salinas, C. A. (2011). Cáncer de Mama. *Cancerología*, 6(11), 77–86.
11. ATCC (2016). American Type Culture Collection Recuperado de. <https://www.atcc.org/>
12. Avato, P., Migoni, D., Argentieri, M., P Fanizzi, F., & Tava, A. (2017). Activity of saponins from medicago species against Hela and MCF-7 cell lines and their capacity to potentiate cisplatin effect. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 17(11), 1508-1518.
13. Benedí, J., & Gómez del Río, M. Á. (2006). Fármacos antineoplásicos (I): revisión. *Farmacia Profesional*, 20(2), 60-64.
14. Beretta, G. L., Corno, C., Zaffaroni, N., & Perego, P. (2019). Role of FoxO Proteins in Cellular Response to Antitumor Agents. *Cancers*, 11(1), 90.
15. Berryman, M., Franck, Z., & Bretscher, A. (1993). Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *Journal of cell science*, 105(4), 1025-1043.
16. Boldrini, E., Peres, S. V., Morini, S., & de Camargo, B. (2010). Immunoexpression of Ezrin and CD44 in patients with osteosarcoma. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 32(6), e213-e217.
17. Bretscher, A. (1983). Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), 425-432
18. Bretscher, A., Gary, R., & Berryman, M. (1995). Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry*, 34(51), 16830-16837.
19. Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak, M., & Kaina, B. (2004). Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *International journal of cancer*, 112(6), 974-985.
20. Cao, B. B., Li, D., Xing, X., Zhao, Y., Wu, K., Jiang, F., ... & Li, J. D. (2018). Effect of cisplatin on the clock genes expression in the liver, heart and kidney. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(2), 593-597.
21. Cardoso, F., Costa, A., Senkus, E., Aapro, M., André, F., Barrios, C. H., ... Winer, E. (2017). 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Annals of Oncology*, 28(1), 16–33. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw544>

22. Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., ... & Schmitt, E. (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *The EMBO journal*, 25(11), 2584-2595
23. Castellani, S., Guerra, L., Favia, M., Di Gioia, S., Casavola, V., & Conese, M. (2012). NHERF1 and CFTR restore tight junction organisation and function in cystic fibrosis airway epithelial cells: role of ezrin and the RhoA/ROCK pathway. *Laboratory investigation*, 92(11), 1527.
24. Cataldo, A., Cheung, D. G., Balsari, A., Tagliabue, E., Coppola, V., Iorio, M. V., ... & Croce, C. M. (2016). miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response. *Oncotarget*, 7(1), 786.
25. Chekhun, V. F., Lukyanova, N. Y., Kovalchuk, O., Tryndyak, V. P., & Pogribny, I. P. (2007). Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(3), 1089–1098. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0663>
26. Chen, D., Wu, M., Li, Y., Chang, I., Yuan, Q., Ekimyan-Salvo, M., ... & Szymanski, J. M. (2017). Targeting BMI1+ cancer stem cells overcomes chemoresistance and inhibits metastases in squamous cell carcinoma. *Cell stem cell*, 20(5), 621-634.
27. Chen, Q. Y., Xu, W., Jiao, D. M., Wu, L. J., Song, J., Yan, J., & Shi, J. G. (2013). Silence of ezrin modifies migration and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity of lung cancer cells in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 377(1–2), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1586-x>
28. Chen, Y., Gao, Y., Zhang, K., Li, C., Pan, Y., Chen, J., ... Chen, L. (2015). MicroRNAs as Regulators of Cisplatin Resistance in Lung Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(5), 1869–1880. <https://doi.org/10.1159/000438548>
29. Chomczynski, P. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction, 159, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
30. Chuthapisith, S., Eremin, J. M., El-Sheemy, M., & Eremin, O. (2006). Neoadjuvant chemotherapy in women with large and locally advanced breast cancer: chemoresistance and prediction of response to drug therapy. *The Surgeon*, 4(4), 211-219.
31. Cook, K. L., & Clarke, R. (2015). Overcoming cancer resistance. *Future medicinal chemistry*, 7(12), 1471-1471. <http://www.future-science.com/doi/full/10.4155/fmc.15.113>
32. Crepaldi, T., Gautreau, A., Comoglio, P. M., Louvard, D., & Arpin, M. (1997). Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 138(2), 423-434
33. Cristina Bischin, Alexandru Lupan, Vicentiu Taciuc y Radu Silaghi-Dumitrescu. Mini-Revisiões en Medicinal Chemistry (2011) 11: 214. <https://doi.org/10.2174/138955711795049844>
34. Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929.
35. D'Angelo, R., Aresta, S., Blangy, A., Del Maestro, L., Louvard, D., & Arpin, M. (2007). Interaction of ezrin with the novel guanine nucleotide exchange factor PLEKHG6 promotes RhoG-dependent apical cytoskeleton rearrangements in epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 18(12), 4780-4793.
36. DeConti, R. C., Toftness, B. R., Lange, R. C., & Creasey, W. A. (1973). Clinical and Pharmacological Studies with cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Research*, 33(6), 1310–1315.
37. Deng, X., Kohanfars, M., Hsu, H. M., Souda, P., Capri, J., Whitelegge, J. P., & Chang, H. R. (2014). Combined phosphoproteomics and bioinformatics strategy in deciphering drug resistant related pathways in triple negative breast cancer. *International journal of proteomics*, 2014.
38. Dias, K., Dvorkin-Gheva, A., Hallett, R. M., Wu, Y., Hassell, J., Pond, G. R., Levine, M., Whelan, T., ... Bane, A. L. (2017). Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PloS one*, 12(1), e0168669. [doi:10.1371/journal.pone.0168669](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168669)
39. Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103–1124. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>
40. Dixit, M., Yang, J. L., Poirier, M. C., Price, J. O., Andrews, P. A., & Arteaga, C. L. (1997). Abrogation of cisplatin-induced programmed cell death in human breast cancer cells by epidermal growth factor antisense RNA. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(5), 365-372.
41. Dobin, A., & others. (2013). {STAR}: ultrafast universal {RNA-seq} aligner. *Bioinformatics*, 29, 15–21. <https://doi.org/10.1088/0004-637X/782/2/75>

42. Eckstein, N. (2011). Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 91.
43. Egger, S. J., Willson, M. L., Morgan, J., Walker, H. S., Carrick, S., Ghersi, D., & Wilcken, N. (2017). Platinum-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane*
44. Essers, M. A., Weijzen, S., de Vries-Smits, A. M., Saarloos, I., de Rooter, N. D., Bos, J. L., & Burgering, B. M. (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO journal*, 23(24), 4802-4812.
45. Fais, S., De Milito, A., & Lozupone, F. (2005). The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis. *Apoptosis*, 10(5), 941-947.
46. Farhan, M., Wang, H., Gaur, U., Little, P. J., Xu, J., & Zheng, W. (2017). FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *International journal of biological sciences*, 13(7), 815.
47. Fehon, R. G., McClatchey, A. I., & Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 276–287. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>
48. Finn, R. S., Martin, M., Rugo, H. S., Jones, S. E., Im, S. A., Gelmon, K. A., ... & Gauthier, E. R. (2016). PALOMA-2: Primary results from a phase III trial of palbociclib (P) with letrozole (L) compared with letrozole alone in postmenopausal women with ER+/HER2–advanced breast cancer (ABC).
49. Fong, C. W. (2016). Platinum anti-cancer drugs: Free radical mechanism of Pt-DNA adduct formation and anti-neoplastic effect. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 216–229. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.006>
50. Foo, J., & Michor, F. (2014). Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy. *Journal of theoretical biology*, 355, 10-20. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519314001003>
51. Fuertes, M. A., Alonso, C., & Pérez, J. M. (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*, 103(3), 645–662. <https://doi.org/10.1021/cr020010d>
52. Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., ... Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
53. Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., ... Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death and Disease*, 5(5), e1257-18. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.428>
54. Gary, R., & Bretscher, A. (1995). Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Molecular biology of the cell*, 6(8), 1061-1075.
55. Gautreau, A., Pouillet, P., Louvard, D., & Arpin, M. (1999). Ezrin, a plasma membrane–microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7300-7305.
56. Ge, R., Liu, L., Dai, W., Zhang, W., Yang, Y., Wang, H., ... & Gao, T. (2016). Xeroderma pigmentosum group A promotes autophagy to facilitate cisplatin resistance in melanoma cells through the activation of PARP1. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1219-1228.
57. GLOBOCAN (2018). Recuperado de. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
58. Goler-Baron, V., & Assaraf, Y. G. (2011). Structure and function of ABCG2-rich extracellular vesicles mediating multidrug resistance. *PloS one*, 6(1), e16007.
59. Goler-Baron, V., Sladkevich, I., & Assaraf, Y. G. (2012). Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 83(10), 1340-1348.
60. Hao, J. J., Liu, Y., Kruhlak, M., Debell, K. E., Rellahan, B. L., & Shaw, S. (2009). Phospholipase C–mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. *The Journal of cell biology*, 184(3), 451-462.
61. Hato, S. V., Khong, A., de Vries, I. J. M., & Lesterhuis, W. J. (2014). Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2831-2837.
62. Hatzoglou, A., Ader, I., Splingard, A., Flanders, J., Saade, E., Leroy, I., ... & De Gunzburg, J. (2007). Gem associates with Ezrin and acts via the Rho-GAP protein Gmp1 to down-regulate the Rho pathway. *Molecular biology of the cell*, 18(4), 1242-1252.

63. Hébert, M., Potin, S., Sebbagh, M., Bertoglio, J., Bréard, J., & Hamelin, J. (2008). Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *The Journal of Immunology*, 181(9), 5963-5973.
64. Hiruma, S., Kamasaki, T., Otomo, K., Nemoto, T., & Uehara, R. (2017). Dynamics and function of ERM proteins during cytokinesis in human cells. *FEBS letters*, 591(20), 3296-3309.
65. Hong, X., Chen, G., Wang, M., Lou, C., Mao, Y., Li, Z., & Zhang, Y. (2012). STAT5a-targeting miRNA enhances chemosensitivity to cisplatin and 5-fluorouracil in human colorectal cancer cells. *Molecular medicine reports*, 5(5), 1215-1219.
66. Hu, Y., Zhu, Q.-N., Deng, J.-L., Li, Z.-X., Wang, G., & Zhu, Y.-S. (2018). Emerging role of long non-coding RNAs in cisplatin resistance. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 3185–3194. <https://doi.org/10.2147/OTT.S158104>
67. Hua, H., Günther, V., Georgiev, O., & Schaffner, W. (2011). Distorted copper homeostasis with decreased sensitivity to cisplatin upon chaperone Atox1 deletion in *Drosophila*. *Biometals*, 24(3), 445-453.
68. Huang, D., Duan, H., Huang, H., Tong, X., Han, Y., Ru, G., ... & Zhao, Z. (2016). Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. *Scientific reports*, 6, 20502.
69. Huang, L., Qin, Y., Zuo, Q., Bhatnagar, K., Xiong, J., Merlino, G., & Yu, Y. (2018). Ezrin mediates both HGF/Met autocrine and non-autocrine signaling-induced metastasis in melanoma. *International Journal of Cancer*, 142(8), 1652–1663. <https://doi.org/10.1002/ijc.31196>
70. Ingraffea, J., Reczek, D., & Bretscher, A. (2002). Distinct cell type-specific expression of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP: EBP50 is generally expressed with ezrin in specific epithelia, whereas E3KARP is not. *European journal of cell biology*, 81(2), 61-68.
71. Iqbal, J., Shafi, A. A., & Alharthi, B. N. (2014). Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *J Coll Phys Surg Pak*, 24(11), 845-848.
72. Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14298-14302.
73. Jais, M. H., Md Zin, R. R., Muhd Hanapi, N. A., & Md Ali, S. A. (2017). Ezrin is significantly overexpressed in Luminal A, Luminal B, and HER2 subtype breast cancer. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 25(1), 44–48. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000258>
74. Jakubzig, B., Baltés, F., Henze, S., Schlesinger, M., & Bendas, G. (2018). Mechanisms of Matrix-Induced Chemoresistance of Breast Cancer Cells—Deciphering Novel Potential Targets for a Cell Sensitization. *Cancers*, 10(12), 495.
75. Jansen, B. A., Brouwer, J., & Reedijk, J. (2002). Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *Journal of inorganic biochemistry*, 89(3-4), 197-202.
76. Jansen, S. R., Poppinga, W. J., de Jager, W., Lezoualc'h, F., Cheng, X., Wieland, T., ... & Schmidt, M. (2016). Epac1 links prostaglandin E2 to β -catenin-dependent transcription during epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(29), 46354.
77. Janson, V., Johansson, A., & Grankvist, K. (2010). Resistance to caspase-8 and-9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. *Cell death & disease*, 1(9), e78.
78. Jin, G., Li, Y., Zhu, Y., Du, L., Yan, J., & Yang, Q. (2016). SMS regulates the expression and function of P-gp and MRP2 in Caco-2 cells. *Cell biology and toxicology*, 32(6), 483-497.
79. Jin, J., Jin, T., Quan, M., Piao, Y., & Lin, Z. (2012). Ezrin overexpression predicts the poor prognosis of gastric adenocarcinoma. *Diagnostic pathology*, 7(1), 135.
80. Johnson, A. C., Murphy, B. A., Matelis, C. M., Rubinstein, Y., Piebenga, E. C., Akers, L. M., ... & Birrer, M. (2000). Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Molecular Medicine*, 6(1), 17-27.
81. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1229–1235
82. Jung, Y., & Lippard, S. J. (2007). Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chemical Reviews*, 107(5), 1387–1407. <https://doi.org/10.1021/cr068207j>
83. Kaye, S. B. (1988). The multidrug resistance phenotype. *Br. J. Cancer*, 58(6), 691–694. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3066393

84. Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. J. (2012). Minimizing the damage: Repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm3439>
85. KEGG. (2016). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Recuperado de. <https://www.genome.jp/kegg/>
86. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584.
87. Kelland, L. R. (2000). Preclinical Perspectives on Platinum Resistance. *Drugs*, 59(Supplement 4), 1–8. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059004-00001>
88. Kikuchi, K., McNamara, K. M., Miki, Y., Iwabuchi, E., Kanai, A., Miyashita, M., ... & Sasano, H. (2018). S100P and Ezrin promote trans-endothelial migration of triple negative breast cancer cells. *Cellular Oncology*, 1-14.
89. Kimura, E., Enns, R. E., Thiebaut, F., & Howell, S. B. (1993). Regulation of HSP60 RNAm expression in a human ovarian carcinoma cell line. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 32(0344–5704), 279–285.
90. Köberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S., & Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1806(2), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.004>
91. Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J. H., van den Berg, A., Suurmeijer, A. J., ... & de Jong, S. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *The Journal of clinical investigation*, 120(10), 3594-3605.
92. Krawczyk, Z., Gogler-Piłowska, A., Sojka, D. R., & Scieglinska, D. (2018). The Role of Heat Shock Proteins in Cisplatin Resistance. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*.
93. Krieg, J., & Hunter, T. (1992). Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), 19258-19265.
94. Lecavalier-Barsoum, M., Chaudary, N., Han, K., Koritzinsky, M., Hill, R., & Milosevic, M. (2018). Targeting the CXCL12/CXCR4 pathway and myeloid cells to improve radiation treatment of locally advanced cervical cancer. *International journal of cancer*, 143(5), 1017-1028.
95. Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073.
96. Lehnert, M. (1996). Clinical multidrug resistance in cancer: A multifactorial problem. *European Journal of Cancer*, 32(6), 912–920. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00069-X](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00069-X)
97. Li, F. X., Shao, W. F., Tang, R., Yu, X. R., Wen, Q. S., Yu, Y. L., & Xiong, J. B. (2016). Phosphorylation of ezrin Tyr477 is critical in invasion of breast cancer cells stimulated by precursor of nerve growth factor. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 36(7), 898-903.
98. Li, J., Guan, J., Long, X., Wang, Y., & Xiang, X. (2016). mir-1-mediated paracrine effect of cancer-associated fibroblasts on lung cancer cell proliferation and chemoresistance. *Oncology reports*, 35(6), 3523-3531.
99. Li, J., Liang, S. H., & Lu, X. (2010). Potential role of ezrin and its related microRNA in ovarian cancer invasion and metastasis. *Zhonghua fu chan ke za zhi*, 45(10), 787-792.
100. Li, J., Wei, K., Yu, H., Jin, D., Wang, G., & Yu, B. (2015). Prognostic Value of Ezrin in Various Cancers: A Systematic Review and Updated Meta-analysis. *Scientific Reports*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep17903>
101. Li, Q., Wu, M., Wang, H., Xu, G., Zhu, T., Zhang, Y., ... Zhou, J. (2008). Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells, 261, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.11.018>
102. Li, Y., Fang, Y., & Wu, J. (2018). Investigation of the influence of mechanical signals on the structure of CD44/FERM complex via molecular dynamics simulation. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi= Journal of biomedical engineering= Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 35(4), 501-508.
103. Li, Y., Lin, Z., Chen, B., Chen, S., Jiang, Z., Zhou, T., ... & Wang, Y. (2017). Ezrin/NF-kB activation regulates epithelial-mesenchymal transition induced by EGF and promotes metastasis of colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 140-148.
104. Liu, H., Zhang, N., Cui, M., Liu, Z., & Liu, S. (2016). Mass spectrometry based strategy for studies of binding sites and structural changes of cisplatin binding to myoglobin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 30(22), 2433–2441. <https://doi.org/10.1002/rcm.7729>
105. Liu, Q., Xu, B., & Zhou, W. (2018). Correlation between chemotherapy resistance in osteosarcoma patients and PAK5 and Ezrin gene expression. *Oncology Letters*, 15(1), 871–878. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7355>

106. Lu, H.-P., & Chao, C. C. K. (2012). Cancer cells acquire resistance to anticancer drugs: an update. *Biomedical Journal*, 35(6), 464–72. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.104411>
107. Lu, Y.-S., Chen, D.-R., Tseng, L.-M., Yeh, D.-C., Chen, S.-T., Hsieh, C.-M., ... Huang, C.-S. (2011). Phase II study of docetaxel, capecitabine, and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(6), 1257–1263. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1401-2>
108. Lv, J., Qian, Y., Ni, X., Xu, X., & Dong, X. (2017). Feedback regulation of methyl methanesulfonate and ultraviolet-sensitive gene clone 81 via ATM/Chk2 pathway contributes to the resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Tumor Biology*, 39(3), 1010428317694307.
109. Ma, L., & Jiang, T. (2013). Clinical implications of Ezrin and CD44 co-expression in breast cancer. *Oncology Reports*, 30(4), 1899–1905. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2641>
110. Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 545). Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory.
111. Masood, S. (2016). Breast cancer subtypes: Morphologic and biologic characterization. *Women's Health*, 12(1), 103–119. <https://doi.org/10.2217/whe.15.99>
112. Melnikov, S. V., Söll, D., Steitz, T. A., & Polikanov, Y. S. (2016). Insights into RNA binding by the anticancer drug cisplatin from the crystal structure of cisplatin-modified ribosome. *Nucleic Acids Research*, 44(10), 4978–4987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw246>
113. Michaud, W. A., Nichols, A. C., Mroz, E. A., Faquin, W. C., Clark, J. R., Begum, S., ... & Rocco, J. W. (2009). Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*, 15(5), 1645-1654.
114. Monni, R., Haddaoui, L., Naba, A., Gallais, I., Arpin, M., Mayeux, P., & Moreau-Gachelin, F. (2008). Ezrin is a target for oncogenic Kit mutants in murine erythroleukemia. *Blood*, 111(6), 3163-3172.
115. Morales, F. C., Takahashi, Y., Momin, S., Adams, H., Chen, X., & Georgescu, M. M. (2007). NHERF1/EBP50 head-to-tail intramolecular interaction masks association with PDZ domain ligands. *Molecular and cellular biology*, 27(7), 2527-2537.
116. Nakamura, T., Shinriki, S., Jono, H., Guo, J., Ueda, M., Hayashi, M., ... & Shinohara, M. (2015). Intrinsic TGF- β 2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget*, 6(2), 1008.
117. Nakano, T., Sekine, S., Ito, K., y Horie, T. (2013). Ezrin regula la expresión de Mrp2 / Abcc2 y Mdr1 / Abcb1 a lo largo del tracto intestinal de rata. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305 (11), G807-G817.
118. Neault, J. . F., & Tajmir-Riahi, H. . a. (1998). Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1384(1), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00011-9)
119. Niggli, V., Andréoli, C., Roy, C., & Mangeat, P. (1995). Identification of a phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *Febs Letters*, 376(3), 172-176.
120. OMS (2017) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
121. Owczarek, T. B., Kobayashi, T., Ramirez, R., Rong, L., Puzio-Kuter, A. M., Iyer, G., ... & Zheng, T. (2017). ARF confers a context-dependent response to chemotherapy in muscle invasive bladder cancer. *Cancer research*, canres-2621.
122. Paciotti, R., Corinti, D., De Petris, A., Ciavardini, A., Piccirillo, S., Coletti, C., ... & Chiavarino, B. (2017). Cisplatin and transplatin interaction with methionine: bonding motifs assayed by vibrational spectroscopy in the isolated ionic complexes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(39), 26697-26707.
123. Parameswaran, N., Matsui, K., & Gupta, N. (2011). Conformational switching in ezrin regulates morphological and cytoskeletal changes required for B cell chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 186(7), 4088-4097.
124. Pelaseyed, T., & Bretscher, A. (2018). Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 131(20), jcs221853. <https://doi.org/10.1242/jcs.221853>
125. Pelaseyed, T., Viswanatha, R., Sauvanet, C., Filter, J. J., Goldberg, M. L., & Bretscher, A. (2017). Ezrin activation by LOK phosphorylation involves a PIP2-dependent wedge mechanism. *Elife*, 6, e22759.
126. Peleg-Shulman, T., Najajreh, Y., & Gibson, D. (2002). Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and

- transplatin towards biological nucleophiles. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 306–311. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00362-8](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00362-8)
127. Peres, L. A. B., & Cunha Júnior, A. D. da. (2013). Acute nephrotoxicity of cisplatin: Molecular mechanisms. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 35(4), 332–340. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130052>
 128. Perez, O. D., Kinoshita, S., Hitoshi, Y., Payan, D. G., Kitamura, T., Nolan, G. P., & Lorens, J. B. (2002). Activation of the PKB/AKT pathway by ICAM-2. *Immunity*, 16(1), 51–65.
 129. Piao, J., Liu, S., Xu, Y., Wang, C., Lin, Z., Qin, Y., & Liu, S. (2015). Ezrin protein overexpression predicts the poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.11.003>
 130. Plenchette, S., Cheung, H. H., Fong, W. G., LaCasse, E. C., & Korneluk, R. G. (2007). The role of XAF1 in cancer. *Current opinion in investigational drugs*, 8(6), 469.
 131. Podratz, J. L., Knight, A. M., Ta, L. E., Staff, N. P., Gass, J. M., Genelin, K., ... Windebank, A. J. (2011). Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiology of Disease*, 41(3), 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.11.017>
 132. Pogribny, I. P., Filkowski, J. N., Tryndyak, V. P., Golubov, A., Shpyleva, S. I., & Kovalchuk, O. (2010). Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *International Journal of Cancer*, 127(8), 1785–1794. <https://doi.org/10.1002/ijc.25191>
 133. Pokharel, D., Padula, M. P., Lu, J. F., Jaiswal, R., Djordjevic, S. P., & Bebawy, M. (2016). The role of CD44 and ERM proteins in expression and functionality of P-glycoprotein in breast cancer cells. *Molecules*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/molecules21030290>
 134. Pokharel, D., Padula, M. P., Lu, J. F., Tacchi, J. L., Luk, F., Djordjevic, S. P., & Bebawy, M. (2014). Proteome analysis of multidrug-resistant, breast cancer-derived microparticles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24384>
 135. Qu, K., Lin, T., Wei, J., Meng, F., Wang, Z., Huang, Z., ... Liu, C. (2013). Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University*, 33(9), 1253–9. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-4254.2013.09.01>
 136. Ray, M. R., & Jablons, D. M. (2009). Hallmarks of metastasis. In *Lung cancer metastasis* (pp. 29–46). Springer, New York, NY.
 137. Rebillard, A., Jouan-Lanhouet, S., Jouan, E., Legembre, P., Pizon, M., Sergent, O., ... & Dimanche-Boitrel, M. T. (2010). Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *European journal of cancer*, 46(8), 1445–1455.
 138. Ren, L., Hong, S. H., Chen, Q. R., Briggs, J., Cassavaugh, J., Srinivasan, S., ... & Khan, J. (2011). Dysregulation of ezrin phosphorylation prevents metastasis and alters cellular metabolism in osteosarcoma. *Cancer research*.
 139. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
 140. Rosenberg J, Sato P. *Mol Pharmacol* 1988;33:611–616. [PubMed: 3132607]
 141. Rosenberg JM, Sato PH. *Mol Pharmacol* 1993;43:491–497. [PubMed: 8450839]
 142. Sæther, N. H., Skuja, E., Irmejs, A., Maksimenko, J., Miklasevics, E., Purkalne, G., & Gardovskis, J. (2018). Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in BRCA1-positive breast cancer: a retrospective cohort analysis and literature review. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 4–8. <https://doi.org/10.1186/s13053-018-0092-2>
 143. Safaei, R., Holzer, A. K., Katano, K., Samimi, G., & Howell, S. B. (2004). The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *Journal of inorganic biochemistry*, 98(10), 1607–1613.
 144. Sakai, W., Swisher, E. M., Karlan, B. Y., Agarwal, M. K., Higgins, J., Friedman, C., ... & Urban, N. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182), 1116.
 145. Sánchez, D. J. C., Rocha, D. E. B., Valle, D. A. E., Molina, D. E. M., & Chacón, D. A. P. (2013). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario.
 146. Saotome, I., Curto, M., & McClatchey, A. I. (2004). Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Developmental cell*, 6(6), 855–864.

147. Sarin, N., Engel, F., Kalayda, G. V., Mannewitz, M., Cinatl Jr, J., Rothweiler, F., ... & Frötschl, R. (2017). Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS one*, 12(7), e0181081.
148. Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S. M., Dotor, A., Calero, F., Hardisson, D., & Palacios, J. (2006). Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*, 98(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9133-4>
149. Saygideğer-Kont, Y., Minas, T. Z., Jones, H., Hour, S., Çelik, H., Temel, I., ... & Üren, A. (2016). Ezrin enhances EGFR signaling and modulates erlotinib sensitivity in non–small cell lung cancer cells. *Neoplasia*, 18(2), 111-120.
150. Schlecht, N. F., Brandwein-Gensler, M., Smith, R. V., Kawachi, N., Broughel, D., Lin, J., ... & Childs, G. (2012). Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and neck pathology*, 6(2), 232-243.
151. Secretaria de Salud (2015). Recuperado de. <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
152. Shaw, R. J., Henry, M., Solomon, F., & Jacks, T. (1998). RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 9(2), 403-419.
153. Shen, D. W., & Gottesman, M. M. (2012). RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance. *Pharmaceutical research*, 29(3), 643-650.
154. Shruthi, S., & Shenoy, K. B. (2018). Genoprotective effects of gallic acid against cisplatin induced genotoxicity in bone marrow cells of mice. *Toxicology Research*.
155. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265.
156. Simon A., & Wolfgang, H. (2010) :Differential expression analysis for sequence count data, *Genome Biology*, 11:R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
157. Singh, K., Colmegna, I., He, X., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2008). Synovioyte stimulation by the LFA-1–intercellular adhesion molecule-2–Ezrin–Akt pathway in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1971-1978.
158. Sinha, S., Sharma, S., Vora, J., Shah, H., Srivastava, A., & Shrivastava, N. (2018). *Mucuna pruriens* (L.) DC chemo sensitize human breast cancer cells via downregulation of prolactin-mediated JAK2/STAT5A signaling. *Journal of ethnopharmacology*, 217, 23-35.
159. Sorenson, C. M., & Eastman, a. (1988). Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research*, 48(23), 6703–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3180081>
160. Soto-Perez-de-Celis, E., & Chavarri-Guerra, Y. (2016). National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001–2011: Analysis of a population-based database. *Cancer epidemiology*, 41, 24-33.
161. Spierings, D. C. J., De Vries, E. G. E., Vellenga, E., & De Jong, S. (2003). Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell death and differentiation*, 10(7), 808
162. Srivastava, J., Elliott, B. E., Louvard, D., & Arpin, M. (2005). Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling. *Molecular biology of the cell*, 16(3), 1481-1490.
163. Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63(1), 12–31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001>
164. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., ... & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545-15550.
165. Tang, C., Luo, H., Luo, D., Yang, H., & Zhou, X. (2018). Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2 mediates cisplatin-related drug resistance by inhibiting apoptosis and activating the Ras/PI3K/Akt1/survivin pathway in lung cancer cells. *Oncology reports*, 39(2), 611-618.
166. Tang, J., Liu, C., Xu, B., Wang, D., Ma, Z., & Chang, X. (2018). ARHGEF10L Contributes to Liver Tumorigenesis through RhoA-ROCK1 Signaling and the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Experimental cell research*.
167. Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., ... & Kuwano, M. (1996). A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Research*, 56(18), 4124-4129.

168. Tanley, S. W. M., & Helliwell, J. R. (2014). Structural dynamics of cisplatin binding to histidine in a protein. *Structural Dynamics*, 1(3), 1–8. <https://doi.org/10.1063/1.4883975>
169. Timerbaev, A. R., Hartinger, C. G., Aleksenko, S. S., & Keppler, B. K. (2006). Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology. *Chemical Reviews*, 106(6), 2224–2248. <https://doi.org/10.1021/cr040704h>
170. Torres-Arreola, L. D. P., & Vladislavovna Doubova, S. (2007). Cáncer de mama. *Revista Medica Del IMSS*, 45(2), 157–166. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=24957812&lang=es&site=ehost-live>
171. Tsuji W, Teramukai S, Ueno M, Toi M and Inamoto T: Prognostic factors for survival after first recurrence in breast cancer: a retro- spective analysis of 252 recurrent cases at a single institution. *Breast Cancer*: Apr 5, 2012 (Epub ahead of print).
172. Turunen, O., Wahlström, T., & Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *The Journal of cell biology*, 126(6), 1445-1453.
173. Un, F. (2007). G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anti-Cancer Drugs*, 18(4), 411–417. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32801429ed>
174. Viswanatha, R., Ohouo, P. Y., Smolka, M. B., & Bretscher, A. (2012). Local phosphocycling mediated by LOK/SLK restricts ezrin function to the apical aspect of epithelial cells. *J Cell Biol*, 199(6), 969-984.
175. Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, 465(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
176. Wang K, Lu J, Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord Chem Rev* 1996;151:53–88
177. Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
178. Wang, H., Zhang, S. Y., Wang, S., Lu, J., Wu, W., Weng, L., ... & Chen, Y. (2009). REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: the potential of its RNAi for synergistic therapy. *Neuro-oncology*, 11(6), 790-802.
179. Wang, J., Tochio, N., Takeuchi, A., Uewaki, J. ichi, Kobayashi, N., & Tate, S. ichi. (2013). Redox-sensitive structural change in the A-domain of HMGB1 and its implication for the binding to cisplatin modified DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.085>
180. Wang, W., Liu, Y., Guo, J., He, H., Mi, X., Chen, C., ... & Bai, L. (2018). miR-100 maintains phenotype of tumor-associated macrophages by targeting mTOR to promote tumor metastasis via Stat5a/IL-1ra pathway in mouse breast cancer. *Oncogenesis*, 7(12), 97.
181. Wang, Y., Lin, Z., Sun, L., Fan, S., Huang, Z., Zhang, D., ... & Chen, W. (2014). Akt/Ezrin Tyr353/NF-κB pathway regulates EGF-induced EMT and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*, 110(3), 695.
182. Wang, Y., Mao, H., Hao, Q., Wang, Y., Yang, Y., Shen, L., ... & Liu, P. (2012). Association of expression of XIAP-associated factor 1 (XAF1) with clinicopathologic factors, overall survival, microvessel density and cisplatin-resistance in ovarian cancer. *Regulatory peptides*, 178(1-3), 36-42.
183. Welters, M. J. P., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Baan, R. A., Jacobs-Bergmans, A. J., Kegel, A., Van Der Vijgh, W. J. F., & Braakhuis, B. J. M. (1999). Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: Correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, 79(1), 82–88. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690015>
184. Wiltshaw E (1979) Cisplatin in the treatment of cancer. *Platin Met Rev* 23:90–98
185. Wu, D. W., Wu, T. C., Wu, J. Y., Cheng, Y. W., Chen, Y. C., Lee, M. C., ... & Lee, H. (2014). Phosphorylation of paxillin confers cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via activating ERK-mediated Bcl-2 expression. *Oncogene*, 33(35), 4385.
186. Wu, H. H., Wu, J. Y., Cheng, Y. W., Chen, C. Y., Lee, M. C., Goan, Y. G., & Lee, H. (2010). cIAP2 upregulated by E6 oncoprotein via epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway confers resistance to cisplatin in human papillomavirus 16/18–infected lung cancer. *Clinical cancer research*, 16(21), 5200-5210.
187. Xie, C., Pan, Y., Hao, F., Gao, Y., Liu, Z., Zhang, X., ... Wang, E. (2014). C-Myc participates in β-catenin-mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *Apmis*, 122(12), 1251–1258. <https://doi.org/10.1111/apm.12296>
188. Xie, X. Q., Zhao, Q. H., Wang, H., & Gu, K. S. (2017). Dysregulation of RNAm profile in cisplatin-resistant gastric cancer cell line SGC7901. *World journal of gastroenterology*, 23(7), 1189.

189. Xie, Y. X., Shang, X. L., & Fan, J. (2017). The expression and clinical significance of RhoA, Ezrin and CD44 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi= Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, 31(3), 191-194.
190. Xing, Y., Liu, Y., Liu, T., Meng, Q., Lu, H., Liu, W., ... & Huang, J. (2018). TNFAIP8 promotes the proliferation and cisplatin chemoresistance of non-small cell lung cancer through MDM2/p53 pathway. *Cell Communication and Signaling*, 16(1), 43.
191. Yang, H. S., & Hinds, P. W. (2003). Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Molecular cell*, 11(5), 1163-1176.
192. Yasuda, T., Homma, Y., & Fukuda, M. (2015). Slp2-a inactivates ezrin by recruiting protein phosphatase 1 to the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(4), 896-902.
193. Yeh, P. Y., Chuang, S. E., Yeh, K. H., Song, Y. C., Ea, C. K., & Cheng, A. L. (2002). Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NFκB activation. *Biochemical pharmacology*, 63(8), 1423-1430.
194. Youn, C. K., Kim, M. H., Cho, H. J., Kim, H. B., Chang, I. Y., Chung, M. H., & You, H. J. (2004). Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer research*, 64(14), 4849-4857.
195. Yuan, M., Luong, P., Hudson, C., Gudmundsdottir, K., & Basu, S. (2011). c-Abl phosphorylation of ΔNp63α is critical for cell viability. *Cell death & disease*, 1(1), e16.
196. Zaharia, M., & Gómez, H. (2013). Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30, 649-656.
197. Zeidan, Y. H., Jenkins, R. W., & Hannun, Y. A. (2008). Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *Journal of Cell Biology*, 181(2), 335–350. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705060>
198. Zhang, L., Guo, X., Zhang, D., Fan, Y., Qin, L., Dong, S., & Zhang, L. (2017). Upregulated miR-132 in Lgr5+ gastric cancer stem cell-like cells contributes to cisplatin-resistance via SIRT1/CREB/ABCG2 signaling pathway. *Molecular carcinogenesis*, 56(9), 2022-2034.
199. Zhang, S., Ma, H., Zhang, D., Xie, S., Wang, W., Li, Q., ... & Wang, Y. (2018). LncRNA KCNQ1OT1 regulates proliferation and cisplatin resistance in tongue cancer via miR-211-5p mediated Ezrin/Fak/Src signaling. *Cell death & disease*, 9(7), 742
200. Zhang, Y., Mi, X., Song, Z., Li, Y., & Niu, J. (2018). Cripto-1 promotes resistance to drug-induced apoptosis by activating the TAK-1/NF-κB/survivin signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 729-737.
201. Zhen, W., Link, C. J., O'Connor, P. M., Reed, E., Parker, R., Howell, S. B., & Bohr, V. A. (1992). Increased gene-specific repair of cisplatin interstrand cross-links in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 3689–98. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.9.3689>
202. Zhong, J. T., Yu, J., Wang, H. J., Shi, Y., Zhao, T. S., He, B. X., ... & Feng, Z. W. (2017). Effects of endoplasmic reticulum stress on the autophagy, apoptosis, and chemotherapy resistance of human breast cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Tumor Biology*, 39(5), 1010428317697562.
203. Zhou, L., Xu, S., Yin, W., Lin, Y., Du, Y., & Jiang, Y. (2017). Weekly paclitaxel and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy with locally advanced breast cancer : a prospective, single arm, phase II study. *Oncotarget.*, 8(45), 79305–79314. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17954>
204. Zhou, R., Cao, X., Watson, C., Miao, Y., Guo, Z., Forte, J. G., & Yao, X. (2003). Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35651-35659.
205. Zimmermann, T., & Burda, J. V. (2010). Reactions of cisplatin with cysteine and methionine at constant pH; A computational study. *Dalton Transactions*, 39(5), 1295–1301. <https://doi.org/10.1039/b913803j>
206. Zou, J., An, F., Liu, G., & Wang, K. (n.d.). The binding of platinum II complexes to rabbit skeletal muscle g-actin induces conformation changes, (11), 233–240.

XV. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Ligas suplementarias donde se puede consultar donde se puede consultar la evaluación de la calidad de los reads de cada muestra por FastQC :

S1

file:///C:/Users/araceli/Desktop/Mi%20tesis/EXPERIMENTOS/4)%20secuenciacion/Resultados%20se
cenciacion%20ARA/qc/fastqc_report.html#M0

S2

file:///C:/Users/araceli/Desktop/Mi%20tesis/EXPERIMENTOS/4)%20secuenciacion/Resultados%20se
cenciacion%20ARA/qc/fastqc_report-2.html#M0

S3

file:///C:/Users/araceli/Desktop/Mi%20tesis/EXPERIMENTOS/4)%20secuenciacion/Resultados%20se
cenciacion%20ARA/qc/fastqc_report-3.html#M0

S4

file:///C:/Users/araceli/Desktop/Mi%20tesis/EXPERIMENTOS/4)%20secuenciacion/Resultados%20se
cenciacion%20ARA/qc/fastqc_report-4.html#M0

S5

file:///C:/Users/araceli/Desktop/Mi%20tesis/EXPERIMENTOS/4)%20secuenciacion/Resultados%20se
cenciacion%20ARA/qc/fastqc_report-5.html#M0

S6

file:///C:/Users/araceli/Desktop/Mi%20tesis/EXPERIMENTOS/4)%20secuenciacion/Resultados%20se
cenciacion%20ARA/qc/fastqc_report-6.html#M0

Tabla 1. Lista de genes resultado del RNA-seq. Se enlistan 1047 transcritos resultados del RNA-seq de muestras de células MCF-7WT y cpRMCF-7 con un *p-Value* < 0.05, y FC ≥ 2 en cpRMCF-7 en comparación con muestras de su línea parental.

LISTA DE GENES RESULTADO DEL RNA-seq			
ENSEMBL	HUGO	<i>p-Value</i> (PPEE)	RealFC
ENSG00000100167.19	SETP3	6.11E-07	0.53704479
ENSG00000184702.17	SEPT5	0.04648991	2.06380326
ENSG00000158122.11	AAED1	0.02624106	0.59665739
ENSG00000254180.1	AB015752.3	0	3.90696118
ENSG00000154263.17	ABCA10	0.01467726	2.62592471
ENSG00000144452.14	ABCA12	0	2.64604553
ENSG00000135776.4	ABCB10	1.15E-08	0.55980247
ENSG00000164163.10	ABCE1	0.00661686	0.59078086
ENSG00000225969.1	ABHD11-AS1	0.01522218	4.94972022
ENSG00000234477.1	AC004231.2	0.03204724	12.6546575
ENSG00000204380.4	AC005042.4	1.37E-06	7.35819716
ENSG00000231312.6	AC007246.3	0.00205528	5.225246
ENSG00000277196.4	AC007325.2	0.02162176	3.27566824
ENSG00000227308.2	AC009502.4	0.00349211	4.68960587
ENSG00000267022.1	AC084219.2	0.04047728	329.655604
ENSG00000226383.5	AC093375.1	0.00843875	3.05648749
ENSG00000224738.1	AC099850.1	2.96E-06	0.48525376
ENSG00000177822.7	AC108142.1	0.00016214	0.16611579
ENSG00000230650.1	AC112229.1	0.03786188	2.03356873
ENSG00000274847.1	AC145212.2	0.01701455	2.14515172
ENSG00000075239.13	ACAT1	0.00036309	0.44152024
ENSG00000120437.8	ACAT2	0.00042532	0.42919409
ENSG00000176244.6	ACBD7	0.00040993	0.41790137
ENSG00000159640.15	ACE	1.03E-07	3.23758204
ENSG00000177076.5	ACER2	1.66E-05	3.01617285
ENSG00000144648.15	ACKR2	1.22E-14	8.47674413
ENSG00000168306.12	ACOX2	7.31E-05	0.21709144
ENSG00000102575.10	ACP5	0.00452938	28.6299069
ENSG00000151726.13	ACSL1	0.01705916	2.36857071
ENSG00000068366.19	ACSL4	0.03396021	0.05212776
ENSG00000107796.12	ACTA2	1.67E-07	6.75178572
ENSG00000101442.9	ACTR5	1.08E-06	0.53899574
ENSG00000229186.4	ADAM1A	0.0443232	0.18542773
ENSG00000008277.14	ADAM22	0.02916387	0.46565907
ENSG00000168594.15	ADAM29	3.11E-06	6.67895134
ENSG00000142303.13	ADAMTS10	0.03473807	2.82527254

ENSG00000140470.13	ADAMTS17	0	2.1365809
ENSG00000173157.16	ADAMTS20	0.00065528	2.72532731
ENSG00000153294.11	ADGRF4	0.00212267	4.69733725
ENSG00000117114.19	ADGRL2	0.00098459	0.11492412
ENSG00000147576.15	ADHFE1	0.00064041	2.38187043
ENSG00000148926.9	ADM	0.01359829	5.18033427
ENSG00000239900.11	ADSL	1.54E-12	0.56115989
ENSG00000223959.8	AFG3L1P	3.64E-06	0.56082923
ENSG00000116771.5	AGMAT	0.00024031	0.4500217
ENSG00000173467.8	AGR3	6.24E-06	3.21106695
ENSG00000101444.12	AHCY	8.18E-12	0.58799106
ENSG00000170017.12	ALCAM	0.04006989	3.61136725
ENSG00000108602.17	ALDH3A1	0.0068235	13.1359283
ENSG00000088035.15	ALG6	5.36E-07	0.57917152
ENSG00000136383.6	ALPK3	8.03E-05	2.30382996
ENSG00000183684.7	ALYREF	0.01832248	0.55289941
ENSG00000078053.16	AMPH	0.0030278	2.26233759
ENSG00000196510.12	ANAPC7	4.25E-05	0.59498083
ENSG00000167772.11	ANGPTL4	2.62E-11	2.18086252
ENSG00000089847.12	ANKRD24	5.03E-05	3.90357524
ENSG00000148513.17	ANKRD30A	0.00295126	0.0142071
ENSG00000198483.12	ANKRD35	6.28E-05	4.05630555
ENSG00000259271.1	ANKRD62P1	0.00360443	2.87664594
ENSG00000182287.13	AP1S2	0.00085696	0.46612282
ENSG00000100478.14	AP4S1	1.60E-05	0.58779814
ENSG00000175279.21	APITD1	1.32E-07	0.55105627
ENSG00000242247.10	ARFGAP3	7.82E-05	2.04186069
ENSG00000146376.10	ARHGAP18	0	2.6961054
ENSG00000136002.16	ARHGEF4	2.60E-09	2.8209977
ENSG00000105676.13	ARMC6	9.04E-09	0.45830527
ENSG00000140450.8	ARRDC4	0.00892102	2.17303126
ENSG00000100299.17	ARSA	6.07E-06	2.74081838
ENSG00000105011.8	ASF1B	0.02959584	0.4188553
ENSG00000127249.14	ATP13A4	0.00167573	9.43221646
ENSG00000254870.5	ATP6V1G2-DDX39B	0.01494792	23.2075107
ENSG00000132932.16	ATP8A2	0.00027879	0.14663274
ENSG00000107518.16	ATRNL1	0.00016884	2.43151668
ENSG00000162650.15	ATXN7L2	0.04460217	0.43702577
ENSG00000127423.10	AUNIP	0.0027768	0.49228584
ENSG00000087586.17	AURKA	0.00036498	0.49614081
ENSG00000178999.12	AURKB	0.00367489	0.43739291
ENSG00000160862.12	AZGP1	0.00017353	8.694606

ENSG00000235863.3	B3GALT4	0.00010139	3.14259911
ENSG00000179913.10	B3GNT3	0.00157585	2.53752553
ENSG00000156966.6	B3GNT7	0.01723882	4.9577964
ENSG00000187244.10	BCAM	3.62E-06	2.40708311
ENSG00000064787.12	BCAS1	0.00461845	5.42882996
ENSG00000127152.17	BCL11B	0.00582332	0.49762805
ENSG00000126453.9	BCL2L12	0.00026741	0.56264021
ENSG00000074582.12	BCS1L	0.01199247	0.55699039
ENSG00000168398.6	BDKRB2	0.03368375	2.85566415
ENSG00000170819.4	BFSP2	0.00081965	0.0583877
ENSG00000180535.3	BHLHA15	0.00016593	17.3698352
ENSG00000123095.5	BHLHE41	0.03150466	4.00550236
ENSG00000023445.13	BIRC3	0.01929583	3.62797962
ENSG00000089685.14	BIRC5	0.01702519	0.44300169
ENSG00000108578.14	BLMH	0.01160683	0.53807765
ENSG00000259040.5	BLOC1S5-TXNDC5	0.02044738	3.49776484
ENSG00000163141.18	BNIPL	3.21E-08	4.54601857
ENSG00000144857.14	BOC	0.0161251	0.35670637
ENSG00000261236.5	BOP1	0.00081673	0.44182028
ENSG00000012048.20	BRCA1	4.16E-06	0.40376421
ENSG00000184992.10	BRI3BP	0.00011043	0.53984319
ENSG00000198797.6	BRINP2	5.77E-06	0.21917275
ENSG00000136492.8	BRIP1	0.00021824	0.55279927
ENSG00000165288.10	BRWD3	5.52E-10	2.92394769
ENSG00000159388.5	BTG2	0.00016456	4.22627236
ENSG00000026950.16	BTN3A1	0.00014108	8.19959474
ENSG00000186470.13	BTN3A2	0.00113331	7.68766883
ENSG00000111801.15	BTN3A3	1.83E-06	6.86207996
ENSG00000187479.5	C11orf96	0.00722034	6.13295386
ENSG00000174206.12	C12orf66	5.92E-07	0.58967628
ENSG00000185347.17	C14orf80	1.05E-06	0.59961621
ENSG00000166920.10	C15orf48	0.04699221	3.70905959
ENSG00000162062.14	C16orf59	0.00195535	0.44448081
ENSG00000125319.14	C17orf53	0.00535348	0.50864349
ENSG00000187013.4	C17orf82	0.00238468	2.73232174
ENSG00000132016.11	C19orf57	0.02205868	0.43323578
ENSG00000130813.17	C19orf66	0.00026763	2.77326045
ENSG00000163362.10	C1orf106	0.00788749	2.33581545
ENSG00000162384.13	C1orf123	0.00145876	0.5831705
ENSG00000203685.9	C1orf95	9.66E-07	18.6413235
ENSG00000108561.8	C1QBP	7.51E-06	0.55165698
ENSG00000101220.17	C20orf27	6.43E-10	0.47602923

ENSG00000160298.17	C21orf58	0.0005325	0.52054597
ENSG00000197927.12	C2orf27A	0.00058254	2.73186019
ENSG00000172478.17	C2orf54	3.65E-05	3.70145368
ENSG00000114529.12	C3orf52	0.02862275	3.31666329
ENSG00000244731.7	C4A	0.00492495	2.17087941
ENSG00000106804.7	C5	1.02E-12	0.38398378
ENSG00000164898.12	C7orf55	0.00043557	0.55239914
ENSG00000188959.9	C9orf152	2.22E-14	2.70220715
ENSG00000186312.10	CA5BP1	0.00539871	0.54702845
ENSG00000178538.9	CA8	0.00014236	0.43897191
ENSG00000165995.18	CACNB2	3.03E-05	5.41424312
ENSG00000116161.17	CACYBP	0.0023149	0.55831023
ENSG00000134072.10	CAMK1	0.01986547	0.47700646
ENSG00000183049.12	CAMK1D	4.77E-08	0.52147512
ENSG00000162545.5	CAMK2N1	3.11E-15	2.07134931
ENSG00000042493.15	CAPG	8.55E-07	2.53414658
ENSG00000182472.8	CAPN12	0.01392114	4.47199819
ENSG00000162909.17	CAPN2	0.04085918	2.21808181
ENSG00000149260.14	CAPN5	0.00017883	4.69677181
ENSG00000135773.12	CAPN9	0.0330272	4.56832346
ENSG00000204682.5	CASC10	0.00324382	0.52442144
ENSG00000003400.14	CASP10	6.47E-12	3.25192667
ENSG00000196954.12	CASP4	2.62E-08	5.03375874
ENSG00000005059.15	CCDC109B	0	0.46693653
ENSG00000135205.14	CCDC146	5.09E-10	2.4956738
ENSG00000197816.13	CCDC180	0.00026505	2.72865702
ENSG00000213213.13	CCDC183	0.01335912	2.7212839
ENSG00000260220.5	CCDC187	0.0054118	13.6188613
ENSG00000109881.16	CCDC34	3.08E-05	0.51074779
ENSG00000120647.9	CCDC77	2.47E-07	0.47383306
ENSG00000110104.11	CCDC86	0.00389351	0.5524057
ENSG00000102962.4	CCL22	0.00243215	38.1127059
ENSG00000133101.9	CCNA1	0.02617512	0.13737637
ENSG00000145386.9	CCNA2	0.00033081	0.42925082
ENSG00000134057.14	CCNB1	0.00524256	0.52839176
ENSG00000175305.16	CCNE2	0.02554888	0.4989921
ENSG00000166226.12	CCT2	8.74E-09	0.59779336
ENSG00000177675.8	CD163L1	1.38E-06	2.39244387
ENSG00000167775.10	CD320	7.60E-06	0.43370802
ENSG00000117877.10	CD3EAP	0.01205878	0.43871681
ENSG00000129226.13	CD68	0.00099765	16.4174541
ENSG00000079335.18	CDC14A	0.00166363	2.11135217

ENSG00000117399.13	CDC20	0.02772798	0.37036715
ENSG00000231007.5	CDC20P1	0.0319105	0.3624085
ENSG00000164045.11	CDC25A	1.43E-05	0.39777827
ENSG00000167617.2	CDC42EP5	0.01374062	2.03283117
ENSG00000093009.9	CDC45	9.78E-05	0.40295548
ENSG00000094804.9	CDC6	5.91E-05	0.40087867
ENSG00000097046.12	CDC7	0.00366498	0.42284932
ENSG00000184661.13	CDCA2	0.02840264	0.46390822
ENSG00000111665.11	CDCA3	7.74E-05	0.43468943
ENSG00000146670.9	CDCA5	1.23E-06	0.4058557
ENSG00000144354.13	CDCA7	5.38E-11	0.1617336
ENSG00000164649.19	CDCA7L	0.00126787	0.41068114
ENSG00000134690.10	CDCA8	0.00180697	0.43098349
ENSG00000154162.13	CDH12	0.03475483	3.62130282
ENSG00000089486.16	CDIP1	0.02614635	3.42560409
ENSG00000176749.8	CDK5R1	0.01276693	0.50171015
ENSG00000205111.8	CDKL4	0.00045157	5.03642398
ENSG00000124762.13	CDKN1A	4.82E-07	8.03526542
ENSG00000091527.15	CDV3	1.25E-09	0.29970445
ENSG00000105388.15	CEACAM5	0.00027827	17.9760803
ENSG00000153044.9	CENPH	0.00974231	0.50497476
ENSG00000102384.13	CENPI	0.02772508	0.50346464
ENSG00000123219.12	CENPK	0.0080796	0.51799534
ENSG00000100162.14	CENPM	3.03E-13	0.39317946
ENSG00000166451.13	CENPN	6.83E-05	0.43287741
ENSG00000188312.13	CENPP	3.64E-07	0.42666575
ENSG00000151725.11	CENPU	1.32E-05	0.48608242
ENSG00000166582.9	CENPV	0.00163884	0.28516689
ENSG00000110318.13	CEP126	6.34E-09	2.43594653
ENSG00000100629.16	CEP128	1.65E-07	0.4231015
ENSG00000148019.12	CEP78	0.00187195	0.43246011
ENSG00000173588.14	CEP83	7.30E-13	0.59213729
ENSG00000172824.14	CES4A	0.04241388	2.04472835
ENSG00000243649.8	CFB	0.00453307	3.43304354
ENSG00000128849.10	CGNL1	3.26E-07	2.20095158
ENSG00000274615.1	CH17-258A22.4	0.03433573	13.1530795
ENSG00000280018.3	CH507-154B10.2	0.04616491	0.51739901
ENSG00000279094.3	CH507-24F1.1	0.00175137	0.28625897
ENSG00000280164.1	CH507-254M2.3	5.22E-05	0.39285672
ENSG00000159259.7	CHAF1B	0.00499469	0.5343907
ENSG00000149554.12	CHEK1	0.00346854	0.41563085
ENSG00000064886.13	CHI3L2	0.04197517	5.6726928

ENSG00000086065.13	CHMP5	0.04550677	2.23619416
ENSG00000123989.13	CHPF	0.00276307	2.61566277
ENSG00000090539.15	CHRD	0.00058102	3.14771095
ENSG00000165215.6	CLDN3	2.32E-12	2.33046792
ENSG00000169583.12	CLIC3	0.00020236	2.47222484
ENSG00000139182.13	CLSTN3	1.31E-05	2.25123345
ENSG00000168405.14	CMAHP	0.01367139	6.94631889
ENSG00000184220.10	CMSS1	8.66E-15	0.41666624
ENSG00000174469.17	CNTNAP2	0.00577752	0.31073024
ENSG00000162377.5	COA7	0.02529142	0.53324042
ENSG00000065618.16	COL17A1	0.00128038	10.3782446
ENSG00000124749.16	COL21A1	6.13E-09	4.28550164
ENSG00000142173.14	COL6A2	1.10E-12	2.25524361
ENSG00000049089.13	COL9A2	0.00076499	0.56413328
ENSG00000158270.11	COLEC12	0.00013722	4.29174753
ENSG00000169019.10	COMMD8	7.57E-07	0.49370012
ENSG00000172301.10	COPRS	0.00011854	0.53424332
ENSG00000173085.13	COQ2	0.00478296	0.4808352
ENSG00000109472.13	CPE	0.0158584	2.24924887
ENSG00000137449.15	CPEB2	2.00E-05	2.25608034
ENSG00000196353.11	CPNE4	0.00041077	3.38711972
ENSG00000157613.10	CREB3L1	1.74E-06	5.68065964
ENSG00000163703.17	CRELD1	0.00011607	2.99326104
ENSG00000096006.11	CRISP3	0.00659375	5.21880445
ENSG00000176390.11	CRLF3	0.02268145	0.58167736
ENSG00000114646.9	CSPG5	0.01561246	0.43059501
ENSG00000280206.1	CTB-193M12.5	0.0440122	0.56620395
ENSG00000280239.1	CTB-50L17.8	0.03442748	0.17147472
ENSG00000267179.1	CTD-2006C1.13	0.00536976	7.62202473
ENSG00000269825.1	CTD-3099C6.9	0.0362304	0.52143503
ENSG00000119326.14	CTNNAL1	0.0001877	0.31303149
ENSG00000107562.16	CXCL12	1.41E-07	0.4951455
ENSG00000169429.10	CXCL8	0.04947564	14.9141706
ENSG00000162144.9	CYB561A3	0.04191428	0.5993529
ENSG00000140465.13	CYP1A1	0.00356056	5.42300334
ENSG00000130649.9	CYP2E1	0.00710718	5.2531201
ENSG00000106258.13	CYP3A5	0.00216165	39.1059913
ENSG00000197191.4	CYSRT1	0.00012703	3.70829989
ENSG00000226950.6	DANCR	0	0.47063813
ENSG00000196730.12	DAPK1	0.00163411	5.34632015
ENSG00000070190.12	DAPP1	0.00264032	4.35945616
ENSG00000161692.17	DBF4B	0.01722335	0.51578575

ENSG00000118655.4	DCLRE1B	0.00029092	0.58910103
ENSG00000165490.12	DDIAS	0.00048747	0.42358808
ENSG0000013573.16	DDX11	0.00366583	0.585232
ENSG00000214826.5	DDX12P	0.00039457	0.42192393
ENSG00000064703.11	DDX20	2.22E-16	0.54235662
ENSG00000123136.14	DDX39A	0.00082013	0.54953505
ENSG00000185163.9	DDX51	0.00016268	0.59559403
ENSG00000107201.9	DDX58	0.00250745	2.12653276
ENSG00000137628.16	DDX60	0.01185349	9.71963231
ENSG00000143753.12	DEGS1	2.13E-06	0.5739805
ENSG00000105339.10	DENND3	0.02249022	2.42639955
ENSG00000024526.16	DEPDC1	0.03333965	0.43143093
ENSG00000228716.6	DHFR	0.00058746	0.42870221
ENSG00000167536.13	DHRS13	0.02921977	0.58549547
ENSG00000162496.8	DHRS3	0.03764025	2.72575472
ENSG00000139734.17	DIAPH3	1.89E-05	0.51204508
ENSG00000211452.10	DIO1	0.00062053	6.82754541
ENSG00000130826.15	DKC1	9.09E-05	0.50959218
ENSG00000155011.8	DKK2	0.00276397	31.4662144
ENSG00000144355.14	DLX1	2.74E-07	0.27516708
ENSG00000108813.10	DLX4	0.00023937	2.65604219
ENSG00000138346.14	DNA2	2.25E-05	0.47563824
ENSG00000197653.14	DNAH10	0.01797854	6.09717653
ENSG00000108176.14	DNAJC12	1.93E-13	2.89084153
ENSG00000116675.15	DNAJC6	1.57E-07	0.56483578
ENSG00000213221.4	DNLZ	0.00080271	0.52305895
ENSG00000115325.13	DOK1	2.15E-06	0.28812811
ENSG00000011332.19	DPF1	4.56E-08	0.37605945
ENSG00000144045.13	DQX1	0.01169499	3.9957317
ENSG00000136982.5	DSCC1	0.00029309	0.41448905
ENSG00000149636.15	DSN1	9.46E-11	0.52937329
ENSG00000125821.11	DTD1	3.16E-12	0.47208957
ENSG00000143476.17	DTL	0.00918507	0.48170145
ENSG00000135144.7	DTX1	0.03308591	17.7825536
ENSG00000163840.9	DTX3L	0.01240603	2.23915776
ENSG00000141994.15	DUS3L	0.00010129	0.4403338
ENSG00000143507.17	DUSP10	0.03365249	2.16338237
ENSG00000158050.4	DUSP2	0.00055245	0.58027466
ENSG00000101412.12	E2F1	0.03573157	0.47464361
ENSG00000007968.6	E2F2	3.24E-05	0.36917117
ENSG00000088881.20	EBF4	0.04490505	0.51230743
ENSG00000143369.14	ECM1	0.00028901	3.99955644

ENSG00000131080.14	EDA2R	1.91E-06	4.31016031
ENSG00000127129.9	EDN2	0.01598488	4.05749842
ENSG00000232472.1	EEF1B2P3	0.03517495	0.58034141
ENSG00000115380.19	EFEMP1	2.76E-05	0.47656136
ENSG00000172638.12	EFEMP2	0.04648004	3.08149853
ENSG00000138798.11	EGF	0.00766853	3.49981353
ENSG00000172071.11	EIF2AK3	0.00741382	2.00108057
ENSG00000163577.7	EIF5A2	6.52E-09	0.55802045
ENSG00000118985.15	ELL2	7.72E-06	2.59959342
ENSG00000125746.14	EML2	0.02817702	2.23072589
ENSG00000165675.16	ENOX2	0.0072157	0.52645045
ENSG00000112796.9	ENPP5	0.01649427	2.10521632
ENSG00000178568.13	ERBB4	9.09E-08	4.21719481
ENSG00000157554.18	ERG	0.03263779	0.37712066
ENSG00000226887.7	ERVMER34-1	0.00013751	0.36614936
ENSG00000175832.12	ETV4	0.01533292	0.10347607
ENSG00000174371.16	EXO1	0.00882199	0.42702508
ENSG00000130713.15	EXOSC2	0.00028429	0.50175796
ENSG00000077348.8	EXOSC5	2.71E-12	0.51870646
ENSG00000120699.12	EXOSC8	9.69E-06	0.53935754
ENSG00000106462.10	EZH2	4.09E-05	0.54738945
ENSG00000117525.13	F3	0.01519866	0.34600449
ENSG00000164687.10	FABP5	0.00109349	0.34274888
ENSG00000170231.15	FABP6	0.04930022	2.57249442
ENSG00000158234.12	FAIM	0.04559818	0.45070729
ENSG00000167106.11	FAM102A	0.02575447	2.19802309
ENSG00000169122.11	FAM110B	4.02E-06	0.31999758
ENSG00000184731.5	FAM110C	0.00349555	2.73021856
ENSG00000189057.10	FAM111B	0.04663065	0.38609668
ENSG00000197712.11	FAM114A1	0.00106212	2.23021159
ENSG00000170264.12	FAM161A	3.95E-07	0.41446533
ENSG00000047346.12	FAM214A	6.38E-05	2.03597519
ENSG00000005238.19	FAM214B	2.29E-07	3.95802882
ENSG00000204856.11	FAM216A	0.00016842	0.46626083
ENSG00000231528.2	FAM225A	0.03124401	0.39292691
ENSG00000197872.11	FAM49A	0.04055892	2.9988396
ENSG00000129195.15	FAM64A	0.0093377	0.46475715
ENSG00000188610.12	FAM72B	0.00809412	0.53655001
ENSG00000105523.3	FAM83E	0.00212098	8.66496434
ENSG00000187741.14	FANCA	0.03445098	0.56856551
ENSG00000178162.8	FAR2P2	0.02617579	8.78537567
ENSG00000026103.19	FAS	0.00326751	4.22975163

ENSG00000105202.7	FBL	7.31E-05	0.52827336
ENSG00000132004.12	FBXW9	0.01590187	0.58517779
ENSG00000267673.6	FDX1L	1.57E-05	0.56514226
ENSG00000088340.15	FER1L4	0.00417898	6.2477983
ENSG00000073712.14	FERMT2	0.00021963	0.51472129
ENSG00000102302.7	FGD1	0.00192171	0.39495304
ENSG00000129682.13	FGF13	2.96E-08	2.93961791
ENSG00000077782.19	FGFR1	5.44E-05	0.56148311
ENSG00000066468.20	FGFR2	0	0.41754761
ENSG00000132436.11	FIGNL1	1.91E-05	0.48254626
ENSG00000168386.18	FILIP1L	3.45E-06	0.41241001
ENSG00000004478.7	FKBP4	0.0101771	0.58028093
ENSG00000181027.10	FKRP	0.00327561	0.45517092
ENSG00000161791.13	FMNL3	1.78E-09	0.44995328
ENSG00000131781.12	FMO5	8.01E-11	2.63124695
ENSG00000075426.11	FOSL2	1.28E-09	2.35670949
ENSG00000138759.17	FRAS1	0.00193651	2.09059563
ENSG00000151474.19	FRMD4A	0.00865388	0.44507937
ENSG00000105255.10	FSD1	3.24E-08	0.39893735
ENSG00000134363.11	FST	0.04672001	0.05554062
ENSG00000171124.12	FUT3	1.37E-06	5.72158014
ENSG00000104290.10	FZD3	0.00011774	0.58442093
ENSG00000128683.13	GAD1	6.17E-07	4.75965899
ENSG00000158089.14	GALNT14	0.0132611	0.5056479
ENSG00000136542.8	GALNT5	5.43E-06	11.4396951
ENSG00000117226.11	GBP3	0	5.11405139
ENSG00000130513.6	GDF15	0.02338857	10.4886698
ENSG00000092208.16	GEMIN2	9.18E-06	0.59626072
ENSG00000179409.10	GEMIN4	4.02E-05	0.53643548
ENSG00000137563.11	GGH	5.29E-08	0.44930624
ENSG00000101003.9	GIN51	3.98E-06	0.44851883
ENSG00000131153.8	GIN52	0.00069213	0.37199538
ENSG00000198814.12	GK	0.00120052	0.5026449
ENSG00000106415.12	GLCCI1	3.33E-16	2.20455302
ENSG00000186417.13	GLDN	6.73E-11	2.11938304
ENSG00000122694.15	GLIPR2	0.01496644	0.25349463
ENSG00000107249.21	GLIS3	0	6.74070513
ENSG00000174842.16	GLMN	9.94E-06	0.52089216
ENSG00000145451.12	GLRA3	0.00049687	10.9631017
ENSG00000173221.13	GLRX	1.52E-06	3.54558275
ENSG00000250903.8	GMDS-AS1	0	2.26456815
ENSG00000156049.6	GNA14	0.00774657	2.48529985

ENSG00000203618.5	GP1BB	0.0031438	2.55737755
ENSG00000063660.8	GPC1	0.04993053	2.11431887
ENSG00000163328.13	GPR155	0.00379584	3.5886295
ENSG00000170075.8	GPR37L1	0.02553926	3.19417421
ENSG00000132522.15	GPS2	0.00166025	0.58669537
ENSG00000121957.12	GPSM2	0.00251563	0.56958552
ENSG00000164294.13	GPX8	0.0102896	4.84435119
ENSG00000164418.19	GRIK2	1.26E-12	5.54719342
ENSG00000163873.9	GRIK3	0.00344468	0.33615107
ENSG00000116032.5	GRIN3B	9.15E-05	2.55511478
ENSG00000105447.12	GRWD1	0.00291326	0.58406631
ENSG00000147697.8	GSDMC	0.00075857	6.80959262
ENSG00000148180.17	GSN	0.01225823	3.49119923
ENSG00000243955.5	GSTA1	4.98E-05	6.19070406
ENSG00000148834.12	GSTO1	7.68E-11	0.53406435
ENSG00000226259.10	GTF2H2B	0.01446575	0.55475874
ENSG00000178605.13	GTPBP6	0.00048379	0.57528212
ENSGR0000178605.13	GTPBP6	0.00048379	0.57528212
ENSG00000075218.18	GTSE1	0.02977863	0.45593018
ENSG00000152402.10	GUCY1A2	0.02168008	0.04375329
ENSG00000164116.16	GUCY1A3	7.17E-09	18.200537
ENSG00000061918.12	GUCY1B3	0.00027792	5.90040132
ENSG00000188486.3	H2AFX	0.00599522	0.49681371
ENSG00000164032.11	H2AFZ	0.01201998	0.56739881
ENSG00000188921.13	HACD4	0.00456517	2.1938791
ENSG00000140511.11	HAPLN3	0.01312047	3.84186154
ENSG00000152240.12	HAUS1	1.50E-07	0.55654031
ENSG00000249115.8	HAUS5	1.89E-15	0.58390321
ENSG00000213397.10	HAUS7	0.00022574	0.53723188
ENSG00000131351.14	HAUS8	0.00114161	0.51495664
ENSG00000163517.14	HDAC11	0.00685644	2.07837345
ENSG00000130589.16	HELZ2	1.09E-05	2.02780992
ENSG00000162639.15	HENMT1	0.00156392	0.4841066
ENSG00000138646.8	HERC5	0.00037936	0.48061915
ENSG00000069812.11	HES2	0.00081961	3.32496593
ENSG00000143512.12	HHIPL2	8.12E-05	2.84820877
ENSG00000181061.13	HIGD1A	5.07E-06	3.43885164
ENSG00000275221.1	HIST1H2AK	0.01959728	0.52102743
ENSG00000218690.2	HIST1H2APS4	0.00761179	0.43106051
ENSG00000233822.4	HIST1H2BN	0.01067681	0.57668392
ENSG00000274641.1	HIST1H2BO	0.04618411	0.41702869
ENSG00000197409.7	HIST1H3D	0.02616164	0.56651497

ENSG00000278637.1	HIST1H4A	3.13E-06	0.40620067
ENSG00000203812.2	HIST2H2AA3	0.00089747	0.50764168
ENSG00000272196.2	HIST2H2AA4	1.31E-06	0.40311594
ENSG00000184270.4	HIST2H2AB	3.30E-09	0.40310547
ENSG00000184260.5	HIST2H2AC	0.00015396	0.48828337
ENSG00000184678.9	HIST2H2BE	0.00032799	0.56612384
ENSG00000203814.6	HIST2H2BF	7.70E-05	0.37963704
ENSG00000203852.3	HIST2H3A	4.76E-06	0.29458539
ENSG00000203811.1	HIST2H3C	0.00382075	0.43751204
ENSG00000183598.3	HIST2H3D	9.45E-09	0.31069289
ENSG00000270882.2	HIST2H4A	1.31E-06	0.34957179
ENSG00000196890.4	HIST3H2BB	1.45E-13	0.33722693
ENSG00000206503.11	HLA-A	1.75E-10	2.28222375
ENSG00000234745.9	HLA-B	0	2.83128119
ENSG00000204525.15	HLA-C	7.31E-14	2.56327788
ENSG00000196126.10	HLA-DRB1	0.03811912	3.72119353
ENSG00000198502.5	HLA-DRB5	0.0172994	4.26353821
ENSG00000229391.7	HLA-DRB6	0.01444839	4.97082692
ENSG00000204642.13	HLA-F	0.02415486	2.42252003
ENSG00000243753.5	HLA-L	0.00066724	2.44289437
ENSG00000164104.11	HMGB2	9.43E-05	0.41715118
ENSG00000198830.10	HMG2	0.00025314	0.55041435
ENSG00000234664.1	HMG2P5	0.04097773	0.53446593
ENSG00000072571.19	HMMR	0.00545566	0.49635425
ENSG00000164749.11	HNF4G	0.00822306	2.83932125
ENSG00000214223.4	HNRNPA1P10	0.01050915	0.22302833
ENSG00000197451.10	HNRNPAB	5.34E-05	0.50413785
ENSG00000123364.4	HOXC13	3.65E-06	0.56687519
ENSG00000249641.2	HOXC13-AS	0.00030591	0.27455623
ENSG00000168453.14	HR	0.00279835	0.54678211
ENSG00000196639.6	HRH1	0.03042526	11.1196692
ENSG00000153976.2	HS3ST3A1	0.00083494	2.42347184
ENSG00000171004.17	HS6ST2	2.97E-05	0.59545529
ENSG00000072506.12	HSD17B10	4.56E-14	0.56097069
ENSG00000087076.8	HSD17B14	0.02367499	10.1747131
ENSG00000196684.12	HSH2D	0.00167788	14.6468484
ENSG00000133265.10	HSPBP1	2.70E-09	0.58662595
ENSG00000142798.17	HSPG2	0.00438121	2.04870582
ENSG00000114378.16	HYAL1	0.02491443	3.72613337
ENSG00000165949.12	IFI27	0.00255997	34.5089977
ENSG00000126709.14	IFI6	0.00192139	17.6220967
ENSG00000115267.5	IFIH1	0.01837939	2.04413284

ENSG00000185745.9	IFIT1	0.00907567	26.4990457
ENSG00000215515.2	IFIT1P1	0.00255425	0.15150451
ENSG00000119922.8	IFIT2	0.00473014	8.21445423
ENSG00000211891.5	IGHE	0.00096959	26.283252
ENSG00000147255.18	IGSF1	0	4.40967001
ENSG00000188263.10	IL17REL	0.03779205	4.63240805
ENSG00000150782.11	IL18	0.04721387	2.10503151
ENSG00000162891.10	IL20	0.00272682	0.06903517
ENSG00000141401.11	IMPA2	3.31E-14	0.51783892
ENSG00000071243.15	ING3	0.00228499	0.58725303
ENSG00000168918.13	INPP5D	0.00475599	5.8113586
ENSG00000160051.11	IQCC	9.77E-07	0.5072266
ENSG00000184216.11	IRAK1	0.03522467	0.55015793
ENSG00000213928.8	IRF9	0.03480744	4.07578264
ENSG00000172183.14	ISG20	2.28E-05	2.60850205
ENSG00000164171.10	ITGA2	0.00036803	0.54342502
ENSG00000005961.17	ITGA2B	0.0289261	0.36341749
ENSG00000161638.10	ITGA5	0	3.73870226
ENSG00000151655.17	ITIH2	0.01730417	4.11506831
ENSG00000009765.14	IYD	2.22E-06	7.19412335
ENSG00000102221.13	JADE3	0.00013889	0.56558341
ENSG00000101384.11	JAG1	2.34E-11	3.3540757
ENSG00000152969.16	JAKMIP1	0.01724601	2.21809125
ENSG00000107104.18	KANK1	0.01453762	0.56491168
ENSG00000082482.13	KCNK2	1.40E-11	0.23502903
ENSG00000153885.14	KCTD15	0.00299122	0.54093547
ENSG00000102445.18	KIAA0226L	0.02124839	9.89636281
ENSG00000050030.13	KIAA2022	0.01979944	2.24050583
ENSG00000163808.16	KIF15	8.46E-05	0.42667613
ENSG00000142945.12	KIF2C	0.00075612	0.44062895
ENSG00000136826.14	KLF4	8.07E-05	3.59040136
ENSG00000119138.4	KLF9	4.83E-09	2.6749624
ENSG00000179023.8	KLHDC7A	3.74E-05	6.08831681
ENSG00000102271.13	KLHL4	0.00385085	3.88013138
ENSG00000167757.13	KLK11	0.00287412	7.82352252
ENSG00000186474.15	KLK12	0.00153855	8.86072627
ENSG00000167754.12	KLK5	0.03546677	18.9756664
ENSG00000169035.11	KLK7	0.0116281	26.1476504
ENSG00000129455.15	KLK8	0.01423444	4.78189855
ENSG00000171798.17	KNDC1	6.24E-05	3.03704988
ENSG00000182481.8	KPNA2	0.00912921	0.5584369
ENSG00000183762.12	KREMEN1	0.00041474	2.08344161

ENSG00000186832.8	KRT16	0.0061207	2.77509116
ENSG00000128422.15	KRT17	0.00537214	11.9890022
ENSG00000205426.10	KRT81	0.00014758	5.39147235
ENSG00000115919.14	KYNU	8.70E-14	0.35994304
ENSG00000196878.12	LAMB3	0.00132708	3.31784913
ENSG00000058085.14	LAMC2	2.31E-07	5.4700075
ENSG00000148346.11	LCN2	0.01884063	7.53599934
ENSG00000131981.15	LGALS3	0.00019447	2.70412303
ENSG00000108679.12	LGALS3BP	4.07E-06	4.13568259
ENSG00000105486.13	LIG1	0.0004009	0.48436208
ENSG00000224511.1	LINC00365	0.00194424	0.13817237
ENSG00000185168.5	LINC00482	0.01073187	7.63572745
ENSG00000251191.7	LINC00589	0.04479293	7.8709946
ENSG00000233058.1	LINC00884	0.0017228	5.63613661
ENSG00000235314.1	LINC00957	0.00378709	2.13353465
ENSG00000250337.5	LINC01021	0.01346826	7.98018907
ENSG00000224559.2	LINC01087	4.68E-12	3.09194327
ENSG00000248771.5	LINC01207	0.00063175	16.7235177
ENSG00000132832.9	LINC01260	0.01674652	8.09929324
ENSG00000204792.2	LINC01291	0.00095512	11.8659812
ENSG00000227953.6	LINC01341	0.02982812	3.65245622
ENSG00000163898.9	LIPH	3.86E-08	3.60550647
ENSG00000115318.11	LOXL3	3.44E-08	0.1525196
ENSG00000087253.11	LPCAT2	9.68E-07	0.37250669
ENSG00000123384.13	LRP1	0.00027134	3.09062881
ENSG00000165501.16	LRR1	0.00067897	0.4963456
ENSG00000271013.1	LRR37A9P	0.00704571	0.26398021
ENSG00000131409.12	LRR37A9P	0.01600433	5.16774655
ENSG00000181350.11	LRR37A9P	0.00070173	0.42562667
ENSG00000162620.15	LRR37A9P	0.01474634	0.23746428
ENSG00000119681.11	LRR37A9P	5.19E-06	2.03585766
ENSG00000145220.13	LRR37A9P	0.00162479	0.46418393
ENSG00000143669.13	LYST	0	2.18990971
ENSG00000164109.13	MAD2L1	0.02306809	0.52804088
ENSG00000116670.14	MAD2L2	1.49E-14	0.58350836
ENSG00000178573.6	MAF	2.35E-07	4.95903051
ENSG00000176746.6	MAGEB6	0.00573994	4.94681425
ENSG00000046774.9	MAGEC2	0.00018532	10.2844632
ENSG00000179222.17	MAGED1	0.0001117	2.11289637
ENSG00000251562.7	MALAT1	0.00013865	2.53548226
ENSG00000189221.9	MAOA	5.32E-07	3.78712334
ENSG00000131711.14	MAP1B	0.00085662	2.11784063

ENSG00000107968.9	MAP3K8	0.01211415	2.24186465
ENSG00000129680.15	MAP7D3	4.94E-05	0.55002151
ENSG00000185386.14	MAPK11	0.00137867	2.38832718
ENSG00000151224.12	MAT1A	0.03835044	5.34744715
ENSG00000071655.17	MBD3	4.33E-05	0.52793525
ENSG00000104738.16	MCM4	0.00016462	0.39889719
ENSG00000100297.15	MCM5	1.24E-06	0.41253552
ENSG00000166508.17	MCM7	8.53E-05	0.37710248
ENSG00000055732.12	MCOLN3	5.92E-05	0.35146531
ENSG00000111554.14	MDM1	1.71E-08	0.53599729
ENSG00000143995.19	MEIS1	3.78E-13	2.24764373
ENSG00000037897.16	METTL1	1.95E-08	0.38767647
ENSG00000214756.7	METTL12	1.28E-10	0.53560953
ENSG00000123600.18	METTL8	1.26E-06	0.57795865
ENSG00000135596.17	MICAL1	0.00040827	2.97611776
ENSG00000215417.10	MIR17HG	4.39E-07	0.36177458
ENSG00000247095.2	MIR210HG	0.0004954	2.47166364
ENSG00000115648.13	MLPH	0.00076401	2.12325059
ENSG00000132763.14	MMACHC	7.47E-09	0.46081907
ENSG00000108960.7	MMD	6.34E-09	0.31319029
ENSG00000142606.15	MMEL1	0.00055958	3.20640507
ENSG00000156103.15	MMP16	1.56E-05	0.07642307
ENSG00000121211.7	MND1	5.43E-08	0.36851071
ENSG00000138587.5	MNS1	0.01263375	0.37583546
ENSG00000135698.9	MPHOSPH6	0.00042253	0.55473639
ENSG00000108852.14	MPP2	0.0324725	0.57413313
ENSG00000066382.16	MPPED2	0.0009225	2.81789825
ENSG00000149573.8	MPZL2	1.44E-15	2.19540367
ENSG00000153029.14	MR1	0.0077762	2.86221727
ENSG00000137547.8	MRPL15	0	0.53218628
ENSG00000111639.7	MRPL51	0	0.5618677
ENSG00000053372.4	MRTO4	3.55E-07	0.45825366
ENSG00000125148.6	MT2A	0.00016736	0.37740716
ENSG00000099810.18	MTAP	0.04799337	2.31514533
ENSG00000172167.7	MTBP	2.09E-06	0.58244494
ENSG00000156469.8	MTERF3	1.85E-09	0.54830164
ENSG00000100714.15	MTHFD1	4.06E-14	0.42499189
ENSG00000180354.15	MTURN	0	2.0515966
ENSG00000185499.16	MUC1	3.71E-05	5.75253211
ENSG00000181143.15	MUC16	1.39E-05	3.18012864
ENSG00000176945.16	MUC20	0.00058312	5.08991755
ENSG00000224769.1	MUC20P1	0.00221274	3.89514658

ENSG00000215182.8	MUC5AC	0	3993.42339
ENSG00000117983.17	MUC5B	0	8.69097242
ENSG00000110921.11	MVK	6.08E-08	0.49642716
ENSG00000013364.18	MVP	3.18E-05	6.89378651
ENSG00000059728.10	MXD1	0.01896043	2.1880828
ENSG00000213347.10	MXD3	0.00794494	0.55069188
ENSG00000101057.15	MYBL2	2.86E-06	0.34836284
ENSG00000136997.15	MYC	5.49E-12	0.40973013
ENSG00000132780.16	NASP	0.02063049	0.52351363
ENSG00000274180.1	NATD1	0.02158226	3.12409225
ENSG00000109805.9	NCAPG	0.00131586	0.38713356
ENSG00000146918.19	NCAPG2	0.00092378	0.50245281
ENSG00000025770.18	NCAPH2	7.17E-06	0.54347294
ENSG00000080986.12	NDC80	0.00016987	0.43755744
ENSG00000103034.14	NDRG4	0.01484494	5.74939996
ENSG00000213619.9	NDUFS3	3.01E-10	0.59293597
ENSG00000245532.5	NEAT1	4.53E-05	4.35791772
ENSG00000109674.3	NEIL3	0.00071218	0.43627877
ENSG00000117650.12	NEK2	0.00022433	0.48489417
ENSG00000171208.9	NETO2	1.21E-06	0.34901167
ENSG00000165030.3	NFIL3	0.00671651	2.41758172
ENSG00000145912.8	NHP2	3.30E-11	0.59788033
ENSG00000204131.8	NHSL2	0.01580171	6.10127373
ENSG00000084628.9	NKAIN1	8.66E-08	0.22596288
ENSG00000239672.7	NME1	2.36E-09	0.5047971
ENSG00000109255.11	NMU	0.01556681	0.26398217
ENSG00000173145.11	NOC3L	0.00133716	0.58550486
ENSG00000166197.16	NOLC1	1.45E-14	0.5567306
ENSG00000048162.19	NOP16	1.00E-11	0.51175945
ENSG00000111641.10	NOP2	9.52E-09	0.58867796
ENSG00000101361.14	NOP56	2.32E-05	0.50368091
ENSG00000198929.12	NOS1AP	0.00120693	2.34973503
ENSG00000163072.14	NOSTRIN	5.20E-09	9.80312924
ENSG00000170485.16	NPAS2	0	4.18752258
ENSG00000015520.14	NPC1L1	0.00571183	3.76132224
ENSG00000107833.10	NPM3	0.00031987	0.58623048
ENSG00000184162.14	NR2C2AP	1.09E-07	0.43344166
ENSG00000119508.17	NR4A3	0.00204827	5.15439175
ENSG00000116833.13	NR5A2	0.0011226	0.42127482
ENSG00000225950.7	NTF4	0.00066594	4.33220195
ENSG00000074527.11	NTN4	0.0241774	5.4165294
ENSG00000101188.4	NTSR1	0.03935973	2.58148477

ENSG00000070081.15	NUCB2	5.25E-07	2.74963691
ENSG000000106268.15	NUDT1	1.90E-10	0.44633008
ENSG000000111581.9	NUP107	6.98E-08	0.56216797
ENSG000000113569.15	NUP155	4.67E-05	0.59933375
ENSG00000030066.13	NUP160	3.84E-05	0.51851323
ENSG000000234685.1	NUS1P2	0.04944297	0.39887203
ENSG000000205978.5	NYNRIN	0.00013096	2.95214553
ENSG000000089127.12	OAS1	1.51E-06	16.1208549
ENSG000000111335.12	OAS2	0.00539301	14.8738759
ENSG000000135114.12	OASL	0.00571671	2.37775506
ENSG000000125741.4	OPA3	1.75E-10	0.56141703
ENSG000000085840.12	ORC1	0.00016253	0.37392655
ENSG000000091651.8	ORC6	0.00029191	0.41723563
ENSG000000079156.16	OSBPL6	0.01108493	0.47258658
ENSG000000083720.12	OXCT1	0.00015678	0.4852872
ENSG000000187848.12	P2RX2	0.04489785	3.72727988
ENSG000000122884.12	P4HA1	0	2.05390827
ENSG000000072682.18	P4HA2	5.58E-09	2.27549371
ENSG000000187867.8	PALM3	0.00417641	3.80724733
ENSG000000169116.11	PARM1	1.41E-05	4.92182305
ENSG000000178685.13	PARP10	0.00723816	3.20217351
ENSG000000173193.13	PARP14	1.74E-09	2.56521007
ENSG000000185480.11	PARPBP	0.03862099	0.58666335
ENSG000000214106.7	PAXIP1-AS2	0.02573826	2.07852456
ENSG000000168078.9	PBK	0.01009947	0.41989145
ENSG000000173599.13	PC	2.85E-06	0.53856117
ENSG000000120328.6	PCDHB12	0.02198304	2.43977086
ENSG000000113248.5	PCDHB15	0.00124642	2.22585514
ENSG000000255622.3	PCDHB17P	0.01783153	3.31672762
ENSG000000132646.10	PCNA	0.04620934	0.49160245
ENSG000000163710.7	PCOLCE2	4.81E-08	0.11066605
ENSG000000102109.8	PCSK1N	4.44E-16	2.06801936
ENSG000000105185.11	PDCD5	2.24E-07	0.53712926
ENSG000000105650.21	PDE4C	0.01805695	3.03748127
ENSG000000258429.1	PDF	0.01403572	0.48601641
ENSG000000004799.7	PDK4	0	4.4375494
ENSG000000148459.15	PDSS1	0.00297742	0.46057702
ENSG000000178921.13	PFAS	0.04046158	0.57951697
ENSG000000114268.11	PFKFB4	0.04590846	2.18639989
ENSG000000247077.6	PGAM5	0.00062828	0.59534186
ENSG000000177614.9	PGBD5	0.04912535	0.50407964
ENSG000000167085.11	PHB	1.44E-08	0.59733475

ENSG00000119403.13	PHF19	0.00014432	0.46488417
ENSG00000092621.11	PHGDH	0.00400347	0.2626754
ENSG00000174307.6	PHLDA3	0.02562383	2.27971513
ENSG00000277161.1	PIGW	1.78E-05	0.43612642
ENSG00000117461.14	PIK3R3	0.00289248	2.25905521
ENSG00000141506.13	PIK3R5	0.00033661	2.79951137
ENSG00000254093.8	PINX1	0.00602152	0.52841815
ENSG00000205038.11	PKHD1L1	6.68E-05	4.14191464
ENSG00000127564.16	PKMYT1	0.00338626	0.45838839
ENSG00000160447.6	PKN3	8.97E-12	0.3688104
ENSG00000081277.11	PKP1	0.00073347	0.41416372
ENSG00000168907.13	PLA2G4F	2.87E-06	3.59457558
ENSG00000104368.17	PLAT	8.62E-08	123.738606
ENSG00000187091.13	PLCD1	0.03822519	2.54518854
ENSG00000075651.15	PLD1	4.24E-06	2.25154344
ENSG00000023902.13	PLEKHO1	0.000698	0.34521543
ENSG00000166819.11	PLIN1	0.00094824	9.29263618
ENSG00000102934.9	PLLP	0.01571824	2.06182759
ENSG00000276840.1	PMS2P10	0.02382471	0.20175075
ENSG00000130822.15	PNCK	0.02125117	7.4517011
ENSG00000130653.15	PNPLA7	9.97E-08	2.35595155
ENSG00000146278.10	PNRC1	1.89E-12	2.36899519
ENSG00000164087.7	POC1A	0.00084121	0.4554581
ENSG00000101868.10	POLA1	0.04007112	0.56297634
ENSG0000014138.8	POLA2	1.13E-05	0.48550933
ENSG00000062822.12	POLD1	4.68E-07	0.48924084
ENSG00000106628.10	POLD2	4.52E-07	0.56730325
ENSG00000177084.16	POLE	2.44E-05	0.44302039
ENSG00000100479.12	POLE2	6.03E-05	0.45518368
ENSG00000144647.5	POMGNT2	0.00058224	0.55705548
ENSG00000222038.3	POTEJ	0.01876055	11.7659594
ENSG00000204434.5	POTEKP	1.18E-10	3.27277402
ENSG00000218416.4	PP14571	0.00115953	12.1273697
ENSG00000130810.19	PPAN	2.61E-06	0.56198647
ENSG00000109819.8	PPARGC1A	2.53E-05	3.49849504
ENSG00000139220.16	PPFIA2	1.61E-08	14.2409771
ENSG00000150722.10	PPP1R1C	0.00278071	2.58471188
ENSG00000219607.3	PPP1R3G	0.00410971	7.68136925
ENSG00000141391.13	PRELID3A	0.00759199	0.417472
ENSG00000198056.13	PRIM1	2.08E-07	0.43897796
ENSG00000198890.7	PRMT6	2.28E-05	0.59468296
ENSG00000100033.16	PRODH	3.94E-08	3.50083119

ENSG00000169618.6	PROKR1	0.00846979	0.17408017
ENSG00000155066.15	PROM2	0.00497471	2.68909908
ENSG00000136875.12	PRPF4	0.00042705	0.5920764
ENSG00000068489.12	PRR11	0.04670163	0.45360496
ENSG00000005001.9	PRSS22	1.72E-08	2.64079919
ENSG00000052344.15	PRSS8	2.40E-10	2.48032386
ENSG00000178597.5	PSAPL1	0.03695653	15.4233567
ENSG00000146005.3	PSD2	0.00882405	3.95100161
ENSG00000156011.16	PSD3	0.00304637	2.48507435
ENSG00000165916.8	PSMC3	2.51E-05	0.56407612
ENSG00000131470.14	PSMC3IP	0.00013161	0.51207982
ENSG00000183527.11	PSMG1	7.19E-12	0.42471498
ENSG00000146733.13	PSPH	0.00369015	0.50165616
ENSG00000134222.16	PSRC1	1.18E-08	0.48246868
ENSG00000050628.20	PTGER3	0.00830343	0.47359836
ENSG00000112245.9	PTP4A1	2.20E-11	2.21898382
ENSG00000080031.9	PTPRH	0.00690821	10.1085279
ENSG00000155093.17	PTPRN2	1.40E-06	12.8117116
ENSG00000164611.12	PTTG1	0.03573379	0.51850197
ENSG00000177192.13	PUS1	1.75E-05	0.49978669
ENSG00000091127.13	PUS7	2.26E-05	0.5267525
ENSG00000241945.7	PWP2	0.01275224	0.42225758
ENSG00000176894.9	PXMP2	3.47E-05	0.54187135
ENSG00000255857.5	PXN-AS1	0.02356221	0.56799178
ENSG00000171016.11	PYGO1	0.00524606	0.36576135
ENSG00000213339.8	QTRT1	4.45E-08	0.49863646
ENSG00000104679.10	R3HCC1	0.00027618	0.5939054
ENSG00000135631.15	RAB11FIP5	0.00029355	2.9643249
ENSG00000105649.9	RAB3A	0.00046769	2.74811023
ENSG00000172780.16	RAB43	3.87E-09	2.24592931
ENSG00000232400.1	RAD17P1	0.00028417	3.17069116
ENSG00000111247.14	RAD51AP1	0.00102327	0.51183839
ENSG00000108384.14	RAD51C	1.34E-05	0.51177835
ENSG00000197275.12	RAD54B	0.00091233	0.51710966
ENSG00000039560.13	RAI14	0.0171571	0.4537621
ENSG00000111344.11	RASAL1	9.70E-06	3.62402051
ENSG00000101773.16	RBBP8	1.71E-05	0.37983062
ENSG00000089050.14	RBBP9	4.22E-05	0.57764643
ENSG00000080839.11	RBL1	1.47E-05	0.39645326
ENSG00000106344.8	RBM28	0.00638176	0.57126562
ENSG00000177483.11	RBM44	0.0331665	5.39399466
ENSG00000180198.15	RCC1	4.76E-12	0.54486498

ENSG00000100918.12	REC8	0.02602019	2.72281077
ENSG00000160957.12	RECQL4	0.00061945	0.39496643
ENSG00000049541.10	RFC2	3.88E-06	0.47704069
ENSG00000133119.12	RFC3	5.44E-05	0.4441003
ENSG00000091844.7	RGS17	0.00113617	2.30547675
ENSG00000132554.19	RGS22	0	12.8084386
ENSG00000138835.22	RGS3	0.01484429	0.59867858
ENSG00000171792.10	RHNO1	0.00211914	0.5933267
ENSG00000104140.6	RHOV	0	2.07068969
ENSG00000104889.4	RNASEH2A	0.00013869	0.44202674
ENSG00000026297.15	RNASET2	3.43E-06	2.27888325
ENSG00000145860.11	RNF145	9.25E-05	0.26642742
ENSG00000176641.10	RNF152	0.00398132	0.41282178
ENSG00000165188.13	RNF183	0.00304895	5.80983875
ENSG00000204618.8	RNF39	0.00646062	2.22433182
ENSG00000135119.14	RNFT2	0.00397694	0.56521693
ENSG00000207422.1	RNU6-813P	0.01691025	8.63568332
ENSG00000143365.16	RORC	1.77E-12	5.62061298
ENSG00000248751.6	RP1-130H16.18	0.00117769	4.5144424
ENSG00000251095.6	RP11-115D19.1	0	8.87044386
ENSG00000232445.1	RP11-132A1.4	0.00025516	0.37174705
ENSG00000273328.5	RP11-141M3.6	0.02297022	7.18529869
ENSG00000276672.1	RP11-142E9.1	1.67E-07	0.4740008
ENSG00000260566.2	RP11-20G6.3	0.00038825	0.43864922
ENSG00000111788.10	RP11-22B23.1	7.55E-09	0.39351783
ENSG00000255036.6	RP11-23J9.4	0.00067888	2.26582048
ENSG00000250899.3	RP11-253E3.3	6.38E-06	0.36823333
ENSG00000233836.7	RP11-255H23.2	0	2.45267304
ENSG00000272405.1	RP11-284F21.10	4.64E-13	3.76194682
ENSG00000229953.1	RP11-284F21.7	0.00201094	3.91949804
ENSG00000272068.1	RP11-284F21.9	1.05E-11	3.89734224
ENSG00000261061.1	RP11-303E16.2	2.70E-07	0.39204032
ENSG00000273301.1	RP11-314B1.2	0.00777209	4.4705457
ENSG00000270426.1	RP11-326I11.5	0.02176837	3.69093121
ENSG00000253878.5	RP11-347C18.3	0.00203333	2.82954944
ENSG00000260912.1	RP11-363E7.4	2.57E-12	3.14986193
ENSG00000260337.3	RP11-386M24.6	0.00106093	4.9242768
ENSG00000181097.5	RP11-429J17.2	0.01829041	3.15476734
ENSG00000273588.1	RP11-433A19.2	0	3.8722128
ENSG00000254692.1	RP11-468E2.1	0.01386141	1529.31033
ENSG00000243155.1	RP11-46A10.5	0.00192097	2.28733943
ENSG00000225339.3	RP11-513I15.6	0.00228518	2.67262133

ENSG00000267702.1	RP11-53B2.2	0.03287405	0.31543281
ENSG00000223478.1	RP11-545E17.3	0.00991242	0.56128934
ENSG00000215244.2	RP11-563J2.2	0.00420462	2.63964543
ENSG00000212743.2	RP11-563J2.3	0.01259426	2.65863067
ENSG00000279348.1	RP11-566E18.1	0.00399059	0.51425584
ENSG00000272916.5	RP11-574K11.31	1.56E-07	0.39231086
ENSG00000257803.2	RP11-575G13.2	0.04752593	0.40545682
ENSG00000260244.1	RP11-588K22.2	0.00032628	16.0781389
ENSG00000260586.1	RP11-592N21.2	4.90E-06	4.08613431
ENSG00000248429.5	RP11-597D13.9	0.03526268	3.74515695
ENSG00000253882.6	RP11-61L23.2	0.00550455	3.38037881
ENSG00000259781.1	RP11-673C5.1	0.0038966	0.43483523
ENSG00000251081.1	RP11-713M6.2	0.00252321	16.0675646
ENSG00000254140.1	RP11-731F5.1	0.01820402	23.3724705
ENSG00000251129.1	RP11-734I18.1	1.68E-05	2.21459211
ENSG00000255471.1	RP11-736K20.5	0.03402201	2.33940341
ENSG00000260276.2	RP11-77H9.2	3.10E-09	3.04595454
ENSG00000272189.1	RP3-325F22.5	6.18E-05	0.44620892
ENSG00000274173.1	RP4-568C11.4	8.87E-05	3.01466574
ENSG00000276223.1	RP4-781B1.5	0.01046234	0.20394503
ENSG00000266680.1	RP5-1148A21.3	7.32E-05	4.13879965
ENSG00000259768.5	RP5-991G20.1	1.51E-08	0.44712495
ENSG00000105193.8	RPS16	0.01146735	0.59965498
ENSG00000185088.13	RPS27L	0.03675296	2.52581761
ENSG00000071242.11	RPS6KA2	0.00012128	3.27082403
ENSG00000025039.14	RRAGD	0.00035903	2.98473059
ENSG00000167325.14	RRM1	0.00014473	0.57686143
ENSG00000160214.12	RRP1	1.24E-07	0.53375435
ENSG00000067533.5	RRP15	8.83E-07	0.52255368
ENSG00000182010.10	RTKN2	0.02351757	0.4174298
ENSG00000175792.11	RUVBL1	8.47E-06	0.53558426
ENSG00000188643.10	S100A16	0.0014736	3.27962165
ENSG00000163993.6	S100P	0.00379855	5.35102183
ENSG00000166788.9	SAAL1	0.02669689	0.53350092
ENSG00000229558.2	SACS-AS1	0.0148426	21.0587877
ENSG00000205413.7	SAMD9	2.11E-15	16.9211205
ENSG00000186193.8	SAPCD2	0.00369078	0.54285351
ENSG00000156876.9	SASS6	0.00201521	0.51059546
ENSG00000130066.16	SAT1	0	3.86842551
ENSG00000102098.17	SCML2	1.73E-06	0.47217338
ENSG00000111319.12	SCNN1A	7.78E-05	2.50338524
ENSG00000146197.8	SCUBE3	0.00185775	2.51101105

ENSG00000115884.10	SDC1	0.00565635	2.24306226
ENSG00000125775.14	SDCBP2	0.0326358	2.61375521
ENSG00000170786.12	SDR16C5	5.55E-05	3.63797922
ENSG00000103184.11	SEC14L5	0.00285189	7.09797662
ENSG00000085415.15	SEH1L	9.75E-05	0.56799055
ENSG00000188404.8	SELL	0.04987511	3.27698391
ENSG00000205572.9	SERF1B	0.04989284	0.59618836
ENSG00000197249.12	SERPINA1	0.00087815	3.84351312
ENSG00000082497.11	SERTAD4	0.00054507	0.49403873
ENSG00000080546.13	SESN1	1.45E-14	2.08792975
ENSG00000149212.11	SESN3	9.69E-06	2.40148972
ENSG00000103037.11	SETD6	1.13E-09	0.45575559
ENSG00000174938.14	SEZ6L2	0.03061495	2.25829061
ENSG00000107819.13	SFXN3	0.02591813	2.03788282
ENSG00000107957.16	SH3PXD2A	0.00011411	4.31247394
ENSG00000156463.17	SH3RF2	0.00183182	2.51971897
ENSG00000125089.16	SH3TC1	4.00E-05	2.51629022
ENSG00000185634.11	SHC4	0.03289608	2.2251952
ENSG00000171241.8	SHCBP1	0.00393881	0.4193533
ENSG00000180730.4	SHISA2	0.01327478	0.12399812
ENSG00000154839.9	SKA1	3.38E-09	0.36252572
ENSG00000182628.12	SKA2	4.97E-07	0.50335514
ENSG00000180592.16	SKIDA1	3.30E-08	0.26569237
ENSG00000145604.15	SKP2	0.01701246	0.45051514
ENSG00000140199.11	SLC12A6	5.36E-10	2.32419864
ENSG00000113504.20	SLC12A7	4.52E-05	4.06586061
ENSG00000155380.11	SLC16A1	3.55E-10	0.19372074
ENSG00000119899.12	SLC17A5	3.09E-14	2.67002454
ENSG00000101194.17	SLC17A9	0.03259759	5.61575747
ENSG00000106688.11	SLC1A1	0.00035625	4.45059628
ENSG00000115902.10	SLC1A4	0.00370618	0.57010617
ENSG00000004864.13	SLC25A13	0.02592773	0.5395881
ENSG00000125454.11	SLC25A19	7.23E-07	0.4345311
ENSG00000171612.6	SLC25A33	0.01500298	0.53330745
ENSG00000130304.16	SLC27A1	0.00039043	2.08188065
ENSG00000197496.5	SLC2A10	0.00032329	3.03019949
ENSG00000146411.5	SLC2A12	0.04237444	3.35707167
ENSG00000180773.14	SLC36A4	0.01206093	0.47788943
ENSG00000204385.10	SLC44A4	0.00830311	7.52773294
ENSG00000139514.12	SLC7A1	0.00268846	0.58772622
ENSG00000180251.4	SLC9A4	3.98E-06	3.71784866
ENSG00000120693.13	SMAD9	0	2.6318672

ENSG00000136824.18	SMC2	0.00054347	0.46018635
ENSG00000178947.8	SMIM10L2A	0.00018921	4.0874535
ENSG00000267795.5	SMIM22	0.00017812	7.74151442
ENSG00000240204.2	SMKR1	0.03145118	0.42532048
ENSG00000143499.13	SMYD2	0.00981042	0.54481173
ENSG00000164975.15	SNAPC3	0.00200487	2.12756366
ENSG00000162804.13	SNED1	1.10E-08	2.33212205
ENSG00000221716.1	SNORA11	0.00705456	3.32308795
ENSG00000221475.1	SNORA11D	5.62E-05	5.89635693
ENSG00000222370.1	SNORA36B	0.00504844	2.69393524
ENSG00000208308.1	SNORA40	0.04620136	2.11369732
ENSG00000207523.1	SNORA66	0.02502041	2.5412894
ENSG00000273587.1	SNORA78	0.0156753	2.07687412
ENSG00000167088.10	SNRPD1	2.29E-09	0.58672966
ENSG00000139343.10	SNRPF	1.65E-09	0.59803859
ENSG00000184557.4	SOC53	0.00593605	0.41186416
ENSG00000186212.3	SOWAHB	0.00120967	2.03939796
ENSG00000067066.16	SP100	0.00078204	2.89759371
ENSG00000135899.16	SP110	0.00073105	2.51650636
ENSG00000061656.9	SPAG4	0.03168991	3.84690931
ENSG00000163071.10	SPATA18	0.00243201	2.88571817
ENSG00000161888.11	SPC24	0.03513744	0.46415213
ENSG00000152253.8	SPC25	0.01473429	0.38732424
ENSG00000040275.16	SPDL1	0.00158867	0.53876954
ENSG00000186767.5	SPIN4	0.00626911	0.54133047
ENSG00000166145.14	SPINT1	7.05E-06	2.42734513
ENSG00000183018.8	SPNS2	0.00244958	6.93634281
ENSG00000152377.13	SPOCK1	5.81E-10	6.63374085
ENSG00000137877.9	SPTBN5	0.0107204	4.15775585
ENSG00000172296.12	SPTLC3	0.00157414	4.32330788
ENSG00000075142.13	SRI	0.00012982	0.56777237
ENSG00000116649.9	SRM	0.04866747	0.5860481
ENSG00000161547.14	SRSF2	0.00789395	0.57464009
ENSG00000149136.8	SSRP1	4.38E-06	0.53389028
ENSG00000117155.16	SSX2IP	0.02360596	0.55594878
ENSG00000070526.14	ST6GALNAC1	0.00070986	14.590865
ENSG00000166888.10	STAT6	0.00038313	2.4311874
ENSG00000117632.20	STMN1	1.31E-06	0.44798327
ENSG00000173320.9	STOX2	0	2.4278691
ENSG00000255145.2	STX17-AS1	0.00217553	3.16369406
ENSG00000148291.9	SURF2	0.02192882	0.52339186
ENSG00000147642.16	SYBU	0.00177745	2.93706951

ENSG00000153157.12	SYCP2L	0.0391315	2.21702388
ENSG00000182253.14	SYNM	0.01150858	0.5222052
ENSG00000110975.8	SYT10	2.00E-06	2.40379927
ENSG0000019505.7	SYT13	1.96E-07	5.20743605
ENSG00000184292.6	TACSTD2	0.01154319	2.46832231
ENSG00000141384.11	TAF4B	1.06E-08	0.52425167
ENSG00000149591.16	TAGLN	0.02192394	2.27633047
ENSG00000204219.9	TCEA3	0.00150973	3.10823679
ENSG00000197905.8	TEAD4	4.78E-08	0.48744657
ENSG00000164362.18	TERT	0.00106123	0.16886064
ENSG00000151287.16	TEX30	4.88E-11	0.45233926
ENSG00000112561.17	TFEB	4.85E-13	3.73845441
ENSG00000160182.2	TFF1	0.00145899	2.42286499
ENSG00000160181.8	TFF2	0.00576497	3.17455134
ENSG00000163235.15	TGFA	5.60E-12	2.17466297
ENSG00000137801.10	THBS1	0.01093736	0.56532042
ENSG00000185875.12	THNSL1	0.00094583	0.47344378
ENSG00000079134.11	THOC1	0.00069726	0.58049905
ENSG00000172009.14	THOP1	4.51E-10	0.53616823
ENSG00000187720.14	THSD4	2.60E-09	2.06159513
ENSG00000111602.11	TIMELESS	1.65E-06	0.41513823
ENSG00000134809.8	TIMM10	3.33E-16	0.54111493
ENSG00000177370.4	TIMM22	0.02231219	0.56956066
ENSG00000126953.5	TIMM8A	0.00064755	0.52467294
ENSG00000102265.11	TIMP1	1.78E-10	2.92911586
ENSG00000135926.12	TMBIM1	0.00188485	3.96490932
ENSG00000167608.11	TMC4	2.17E-05	3.91837138
ENSG00000185332.6	TMEM105	0.00101098	2.4350942
ENSG00000011638.10	TMEM159	0.00154778	2.03694081
ENSG00000188807.12	TMEM201	0.00400917	0.52281846
ENSG00000281991.1	TMEM265	0.00164501	4.32130656
ENSG00000175606.10	TMEM70	0	0.56657714
ENSG00000137103.16	TMEM8B	2.13E-10	4.45222243
ENSG00000109084.13	TMEM97	3.86E-05	0.50633469
ENSG00000120802.13	TMPO	0.00511157	0.49793709
ENSG00000187045.16	TMPRSS6	0.00499371	13.4983176
ENSG00000173535.13	TNFRSF10C	0.00020579	4.65529062
ENSG00000186891.13	TNFRSF18	0.02769193	3.79477971
ENSG00000121858.10	TNFSF10	0.01014162	4.34223171
ENSG00000154310.16	TNIK	7.27E-06	2.44425218
ENSG00000136205.16	TNS3	0	0.55132646
ENSG00000168477.17	TNXB	0.00395235	6.04565331

ENSG00000175662.17	TOM1L2	0.00057316	2.147213
ENSG00000130204.12	TOMM40	0.00095771	0.54253024
ENSG00000160949.16	TONSL	2.16E-05	0.52950212
ENSG00000131747.14	TOP2A	0.00086391	0.47448294
ENSG00000164938.13	TP53INP1	0.00020035	3.32088713
ENSG00000183763.8	TRAIP	9.34E-08	0.45077567
ENSG00000182606.14	TRAK1	8.68E-05	2.07547174
ENSG00000168016.13	TRANK1	0.03730505	2.28440559
ENSG00000071575.11	TRIB2	3.13E-11	3.7995168
ENSG00000137699.16	TRIM29	1.04E-05	8.34739229
ENSG00000258659.6	TRIM34	4.69E-07	2.80863707
ENSG00000112343.10	TRIM38	1.86E-05	2.32186711
ENSG00000134253.9	TRIM45	0.03025433	0.37393945
ENSG00000132256.18	TRIM5	0	3.16544993
ENSG00000147573.16	TRIM55	0.01424003	9.94605946
ENSG00000206557.5	TRIM71	0.00142548	0.40990664
ENSG00000071539.13	TRIP13	0.00010742	0.35943263
ENSG00000089195.14	TRMT6	0.0003988	0.53141039
ENSG00000135451.12	TROAP	0.00019691	0.43994196
ENSG00000117472.9	TSPAN1	3.48E-06	7.7155404
ENSG00000155158.20	TTC39B	0.04376962	2.38020271
ENSG00000116830.11	TTF2	5.41E-11	0.47072897
ENSG00000100304.12	TTL12	0.03232934	0.57420293
ENSG00000155657.24	TTN	0.00048046	45.5460776
ENSG00000124120.10	TTPAL	3.49E-12	0.59184656
ENSG00000167552.13	TUBA1A	0.00034018	0.50950188
ENSG00000123416.15	TUBA1B	1.55E-05	0.41501036
ENSG00000175063.16	UBE2C	0.00014582	0.45162063
ENSG00000156587.15	UBE2L6	0.02491267	2.32255608
ENSG00000077152.9	UBE2T	0.00302197	0.54456496
ENSG00000122042.9	UBL3	0.00197587	0.53867028
ENSG00000143179.12	UCK2	5.58E-07	0.5619123
ENSG00000244474.5	UGT1A4	0.03748034	9.07531384
ENSG00000196620.8	UGT2B15	0.02343726	4.87577547
ENSG00000197888.2	UGT2B17	0.02293905	3.03673841
ENSG00000131015.4	ULBP2	0.00104189	3.16739479
ENSG00000076248.10	UNG	0.01813506	0.55311748
ENSG00000243566.6	UPK3B	0.00121316	4.01174965
ENSG00000135763.9	URB2	0.00034442	0.49495485
ENSG00000126088.12	UROD	0	0.56494273
ENSG00000120800.4	UTP20	1.98E-09	0.46392363
ENSG00000168899.4	VAMP5	0.01052085	2.29438875

ENSG00000162738.5	VANGL2	0.00578625	5.64536059
ENSG00000136059.14	VILL	0.00405145	3.73859389
ENSG00000114812.12	VIPR1	1.94E-05	2.52836742
ENSG00000147852.15	VLDLR	0	2.06472041
ENSG00000100749.7	VRK1	9.13E-06	0.55188859
ENSG0000019102.11	VSIG2	0.00085796	39.9773124
ENSG00000110002.15	VWA5A	0.0064388	6.14583311
ENSG00000204396.10	VWA7	2.93E-08	10.5360782
ENSG00000198554.11	WDHD1	0.00768388	0.53309483
ENSG00000065183.15	WDR3	0.01629288	0.5607736
ENSG00000075702.16	WDR62	1.25E-06	0.42241221
ENSG00000116455.13	WDR77	0	0.52631057
ENSG00000070540.12	WIPI1	6.79E-05	2.6860795
ENSG00000196632.10	WNK3	0.04158363	0.26505013
ENSG00000141499.16	WRAP53	1.15E-05	0.53530685
ENSG00000124343.12	XG	6.09E-05	4.20139201
ENSG00000047597.5	XK	8.77E-05	0.4302785
ENSG00000196584.2	XRCC2	0.00026326	0.41119519
ENSG00000250264.1	XXbac-BPG246D15.9	0.0086192	0.15860785
ENSG00000175155.8	YPEL2	0.04017263	3.78653148
ENSG00000119801.12	YPEL5	0.01409752	2.06434307
ENSG00000250802.6	ZBED3-AS1	0.01926199	0.28292189
ENSG00000206559.7	ZCWPW2	0.00170619	3.93272341
ENSG00000043355.10	ZIC2	0.00303479	0.50533399
ENSG00000139800.8	ZIC5	2.07E-05	0.46540473
ENSG00000178150.8	ZNF114	2.42E-06	0.48928389
ENSG00000165512.4	ZNF22	0	0.51954238
ENSG00000196793.13	ZNF239	0.00143698	0.53353342
ENSG00000083844.10	ZNF264	2.63E-07	2.61633185
ENSG00000170954.11	ZNF415	0.00027675	3.79241072
ENSG00000181444.12	ZNF467	6.66E-16	2.01564699
ENSG00000198298.12	ZNF485	0.002746	0.53000808
ENSG00000229676.2	ZNF492	0.00081718	0.46693834
ENSG00000167555.13	ZNF528	3.28E-06	2.44685452
ENSG00000171817.16	ZNF540	0.03513603	3.22364168
ENSG00000167981.5	ZNF597	0.00505647	2.29530021
ENSG00000167554.14	ZNF610	2.13E-07	2.16336537
ENSG00000182983.14	ZNF662	0.00437058	9.93843812
ENSG00000197472.14	ZNF695	0.00016348	0.41588168
ENSG00000182111.8	ZNF716	3.64E-11	7.0668525
ENSG00000214652.5	ZNF727	0.0198753	9.30085761
ENSG00000267500.1	ZNF887P	0.00135225	0.51366992

ENSG00000213988.9	ZNF90	0.0064526	5.87385548
ENSG00000167232.13	ZNF91	1.63E-10	2.46758502
ENSG00000121413.12	ZSCAN18	0.04740987	2.55941281
ENSG00000122952.16	ZWINT	0.03000678	0.43079328

Tabla 2. Lista de genes relacionados con Ezrin. Se enlistan un total de 213 genes que se ha reportado en literatura y bases de datos (STRING, KEGG y Reactome) tener relación con Ezrin, ya sea unión, activación, co-expresión o relacionados a no más de dos nodos de distancia de moléculas con las que se una Ezrin.

LISTA DE GENES RELACIONADOS CON EZRIN								
SC12A7	SYK	AKT1	MYO5B	EGF	BIRC2	F2R	GNAT1	AP2S1
CLIC3	CD44	PDK1	ATP4A	ROCK1	SLC9A1	DCC	FGB	F2
EIF5A2	GEM	PIK3CB	HRH2	EGFR	ADRB2	THBD	CALM2	VCL
TMEM8B	RHOG	ABCC2	ADCY1	CASP10	STAT3	SRC	ITGAL	GNG2
FERMT2	PLEKHG6	NFKB1	CCKBR	FASLG	VCAM1	RAC1	CLTA	GNAI1
S100P	RAPGEF3	ABCG2	CHRM3	CAPN1	ACTA1	MST4	TNFRSF10A	GNB1
FABP5	STK10	PTPA	GNAQ	FAS	ROCK2	ITGB1	GNAI3	CXCR4
SELL	SLK	SMPD1	PLCB1	PRKCQ	NET1	ITSN2	ICAM1	PXN
RCC1	FN1	KCNQ1OT1	CDC42	FADD	CAB39	TRADD	EDN1	SERPINC1
AURKA	CTTN	MIR211	MAPK1	L1CAM	TPM1	CFLAR	CLTCL1	TLN1
SLC12A7	CLDN2	PRRT2	MAP2K7	CASP8	ITGA5	PTPN1	ACTB	AP2A2
SEPT3	PRKCZ	RB1	ARPC5	CAPNS1	PKN2	ITGA1	PIP5K1C	PRKACG
SOS2	LPA	CDK5	WASL	CXCL12	MSN	PAK1	PIK3CA	FGA
GRB2	SSTR2	FAK	AP1	PRKAR1A	SLC9A3R1	SERPIND1	PARVA	SPTAN1
PLAU	ABCB11	CTNNB1	SP1	SLC9A3R2	SDC2	GNG12	EDNRB	PRKACA
MMP9	LPA2	WNT1	MAP2K2	PRKR1B	ADRBK1	GNG10	CLTB	FGG
KDR	LPA1	HRAS	MAP2K1	PRKACB	EPN1	ARHGAP1	ACTG1	ITSN1
MIR183	GNA13	SOS1	E3KARP	ARHGEF10L	RTKN	PFN1	PRKAR2A	AP2A1
NF2	ASM	RDX	GNA12	SERPINA5	GNAO1	CFL1	GNG13	PTK2B
BIRC5	PRKCE	NTN1	CRK	CHP1	EDNRA	PKN1	GNAI2	PTK2
XIAP	PAK5	GNG3	RHOA	GP1BA	GNGT2	TNFRSF1A	GNGT1	CLTC
PDCD10	ITGB2	CFTR	BCAR1	ACTN2	GSN	PPP1R12A	MDR1	TNFSF10
PRKAR2B	ICAM2	ACTN1	AP1B1	PRKCA	ARHGDI	GNG4	ABCB1	
	AP2M1	GNG5	GNG11	ACTN4	PAK2	ITGB3	AP2B1	

Tabla 3. Lista de genes relacionados con el mecanismo de acción de cisplatino. Se enlistan un total de 122 genes que se ha reportado en literatura y bases de datos (STRING, KEGG y Reactome) tener relación con el mecanismo de acción del cisplatino, o con relación directa en un fenotipo resistente al fármaco.

LISTA DE GENES RELACIONADOS CON EL MECANISMO DE ACCIÓN DE CISPLATINO								
SLC31A1	MSH2	GJA1	BBC3	MIR214	MAD2L2	BCL2L2	TRPM6	LRRC8D
ABCG2	MSH6	MIR214	BAD	XPD	MSH3	MCL1	CASP10	RDM1
ABCC2	MT1A	PTEN	APAF1	POLZ	TOP2A	BCL2A1	CXCL12	CLPTM1L
ATP7A	MT2A	FOXO3	BCL2	CTNNB1	BRCA1	BCL2L10	ERBB2	ADIRF
ATP7B	NQO1	YWHAQ	BCL2L1	WNT1	ATM	BOK	RAB8A	MAPK11
ERCC1	PMS2	FASLG	MAPK1	ATP11B	TP53	BID	TMEM205	MAPK14
ERCC2	POLB	TP73	PI3K	SLC22A2	MDM2	BIK	MUS81	VDAC1
ERCC3	POLH	CASP1	PDK	LRRC8A	P14ARF	BLK	TNFAIP8	HSPB1
ERCC4	POLM	IRF1	AKT1	FADD	BAX	BMF	CDKN2A	HSPB2
ERCC6	REV3L	TP63	CDKN1A	FAS	BAK	HRK	GSTT1	TNFSF10
GSTM1	SMARCA1	ADD1	MAP3K5	ATOX1	MAPK8	TDGF1	HMGB1	MIR200B
GSTP1	SOD1	CDK12	CASP8	BRCA2	MAPK9	XAF1	MLH1	ICAM1
XPA	EGF	BIRC5	MAP2K7	CHEK2	XIAP	DYRK1B	MPO	GSN
CALCR	HBEGF	CASP9		NFKB1	MT-CO2		CASP3	