

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Efecto de los adipocitos en el perfil proteómico
de las células Hs-578t de cáncer de mama
cocultivadas en tres dimensiones**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Karla Tovar Hernández

DIRECTOR

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

CODIRECTORA

DRA. LAURENCE ANNIE MARCHAT MARCHAU

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, junio de 2021

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Secretario: Dr. Mario César López Camarillo
Vocal: Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Plantel de adscripción:

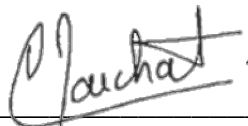
PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR



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

CODIRECTORA



Dra. Laurence Annie Marchat Marchau
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico brindado durante mi formación como estudiante del posgrado de Ciencias Genómicas y por la beca otorgada para la obtención de grado OGM-2021-I-52543.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada durante mi permanencia en el Posgrado de enero 2019 a enero 2021 (becario No. 734814).

Agradezco a la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del LaNSE-CINVESTAV y al M. en C. Emmanuel Ríos Castro y al Dr. José Tapia Ramírez por el análisis proteómico realizado para el presente trabajo.

Este proyecto forma parte del Proyecto Multinstitucional UAS-UACM-InCan de la Convocatoria Ciencia de Frontera 2019 numero 51207 “Deciphering the impact of 3D genome organization of oncogenic microRNAs in the hallmarks of breast cancer using 3D cultures” al cual agradezco el apoyo.

Agradezco al Dr. Mario César López Camarillo por haberme aceptado como parte de su equipo en el Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del cáncer en el Posgrado en Ciencias Genómicas y por su apoyo para la culminación del proyecto, así como sus consejos y conocimientos brindados en mi formación.

Agradezco a la Dra. Laurence Annie Marchat Marchau por aceptar ser la coodirectora del trabajo y permitirme trabajar en el Laboratorio de Biomedicina Molecular en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional; así como sus consejos y observaciones en las revisiones de los experimentos.

Quiero agradecer al M. en C. Gilberto Mandujano Lázaro por asesorarme en el trabajo del laboratorio y haberme brindado sus conocimientos y haberme guiado como asesor y a mi asesora la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por sus aportaciones y consejos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Principalmente quiero agradecer y dedicarle todo el trabajo realizado a mi hijo Carlos Rubén Díaz Tovar; por siempre ser mi motor de vida y saber ser paciente cuando no me encontraba en casa. Por darme ánimos cuando más lo necesite y tener siempre las palabras indicadas que me impulsan a ser mejor persona para saber guiarte.

Quiero agradecer a mis padres Carlos Tovar Tapia y Esmeralda Hernández Gutiérrez, por estar conmigo apoyándome en todas mis decisiones y no dejarme sola. Sabiéndome guiar con sus consejos.

A mis hermanas Daniela y Mayte Tovar Hernández por apoyarme siempre con el cuidado de mi hijo y por los ánimos; las amo mucho.

A mis amigas de generación Ereth Ameyatzin Robles Chavéz y Esther Joquebeb Calderón García por siempre apoyarnos en todo momento. Y a Yarely Marlene Salinas Vera por apoyarme en el trabajo de laboratorio y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

I. ÍNDICE DE FIGURA	7
II. ÍNDICE DE TABLAS	11
III. ABREVIATURAS	12
1. RESÚMEN	14
ABSTRACT	15
3. INTRODUCCIÓN	16
3.1 Antecedente generales.....	16
3.1.1 Cáncer de mama	16
3.1.2 Morbilidad y mortalidad del CM.....	16
3.1.3 Clasificación del CM.....	18
3.1.4 Clasificación genómica del CM	19
3.1.5 Factores de riesgo.....	20
3.1.6 Obesidad.....	20
3.1.7 Obesidad y cáncer	21
3.1.8 Tejido adiposo y tipos	22
3.1.9 Origen y marcadores moleculares de WAT	24
3.2.0 Adipocitos y relación con el cáncer	26
3.2.1 Adipocitos y cáncer de mama	29
3.2. Antecedentes particulares.....	32
3.2.1 Cultivos en 3D.....	32
3.2.2 Tipos de morfología de cultivos en 3D.....	33
3.2.3 Adipogénesis.....	34
3.2.4 Estímulo hormonal en la diferenciación	36
4. HIPÓTESIS	39
5. JUSTIFICACIÓN	39
6. OBJETIVOS	40
6.1 Objetivo general.....	40
6.2 Objetivos particulares	40
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	41
8. MATERIAL Y MÉTODOS	42
8.1 Mantenimiento de la línea celular	42
8.2 Mantenimiento de fibroblasto 3T3-L1.....	42
8.3 Diferenciación y mantenimiento de adipocitos maduros.....	43
8.4 Extracción de RNA y cuantificación.....	44
8.5 Obtención de cDNA	45

8.6	Amplificación de genes proadipogénicos	45
8.7	Tinción Oil Red O	45
8.8	Cuantificación de lípidos	46
8.9	Obtención de estructuras tumorales de la línea celular Hs-578t en 3D	46
8.10	Inmunofluorescencia de estructuras tumorales en 3D	46
8.11	Cocultivo de células Hs-578t con los adipocitos en 3D.....	47
8.12	Obtención de extractos proteicos totales	47
8.13	Cuantificación de proteínas totales y digestión enzimática	48
8.14	Electroforesis de proteínas desnaturalizadas	48
8.15	Ensayo de viabilidad celular	49
8.16	Obtención del perfil proteómico mediante Label-Free.....	49
8.17	Análisis de datos de espectrometría de masas.....	50
8.18	Análisis bioinformático de los datos	51
9	RESULTADOS	52
9.1	Diferenciación de fibroblastos murinos 3T3-L1 a adipocitos maduros	52
9.2	Cuantificación de lípidos en adipocitos maduros	57
9.3	Obtención de las estructuras tumorales tipo organoides Hs-578t.....	60
9.4	Caracterización de la diferenciación adipocitaria mediante el análisis de la expresión de genes de diferenciación.....	64
9.5	Análisis de adipocitos post-cocultivo.....	70
9.6	Caracterización de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t.....	71
9.7	Ensayo de viabilidad celular en estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t.	73
9.8	Ensayo de viabilidad celular en fibroblastos murinos 3T3-L1; adipocitos diferenciados y Adipocitos post-cocultivo.....	74
9.9	Extracción de proteínas totales de estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t. 75	
9.10	Obtención de perfil proteómico diferencial	76
9.11	Ontología y enriquecimiento de genes.....	81
9.12	Top-ten de las proteínas moduladas en las células Hs-578t cocultivadas con adipocitos.....	85
9.13	La ApoB se asocia a funciones de transporte lipídico	86
9.14	La APOB podría funcionar como un oncogen al exacerbar los hallmarks del cancer. 86	
9.15	La APOB interactúa con diversas proteínas con funciones en el metabolismo lipídico.	90
9.16	La apolipoproteína B-100 (APOB) se sobreexpresa en cáncer de mama y predice una supervivencia menor en las pacientes.	91
9.17	La proteína de transferencia de fosfatidilinositol asociada a membrana (PITPNM2) al transporte lipídico.....	92

9.18	La proteína de transferencia de fosfatidilinositol asociada a membrana (PITPNM2) se sobre expresa en cáncer de mama y predice una sobrevida menor en las pacientes.	93
9.19	Interacción de proteínas con base a las proteínas reguladas	94
9.20	Rutas de señalización con base a las proteínas sobre expresadas	96
9.21	Top-ten de las proteínas reprimidas en las células Hs-578t cocultivadas con adipocitos.....	98
9.22	Interacción de proteínas reprimidas con base a las proteínas reguladas	99
9.23	Rutas de señalización de proteínas reprimidas con base a las proteínas reguladas 102	
9.24	Modelo biológico regulado por las proteínas expresadas.....	104
10	DISCUSIÓN	106
10.1	Diferenciación de fibroblastos murinos 3T3-L1 a adipocitos maduros	106
10.2	Obtención de las estructuras tumorales.....	108
10.3	Caracterización de la diferenciación adipocitaria mediante el análisis de la expresión de genes de diferenciación	109
10.4	Análisis de adipocitos post-cocultivo	110
10.5	Viabilidad celular.....	111
10.6	Ontología y enriquecimiento de genes	112
10.7	Interacción de proteínas con base a las proteínas reguladas.....	113
12	ANEXO	117
13	BIBLIOGRAFÍA	167

I. ÍNDICE DE FIGURA

Fig. 1. Número de nuevos casos de cáncer en la mujer a nivel mundial.

Fig. 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en México.

Fig. 3. Exceso de masa corporal y cáncer de mama en América Latina.

Fig. 4. Morfología de los adipocitos.

Fig. 5. Origen de los adipocitos.

Fig. 6. La diafonía de células cancerosas con CAA.

Fig. 7. Clasificación de las colonias de las líneas celulares de mama en cultivo 3D con base a su morfología.

Fig. 8. Diferenciación de preadipocitos en adipocitos.

Fig. 9. Control transcripcional durante la adipogénesis en respuesta al estímulo hormonal.

Fig. 10. A) y B). Cultivo de los fibroblastos murinos 3T3-L1 en donde se observa su morfología fusiforme en confluencia del 80%.

Fig. 11. Cronología de la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos maduros durante 11 días con cuatro tratamientos diferentes.

Fig. 12. Eficiencia de diferenciación en porcentaje de los tratamientos utilizados para establecer el protocolo de adipogénesis de los fibroblastos murinos 3T3-L1 a adipocitos maduros.

Fig. 13. Tinción Red-Oil-O de los adipocitos 3T3-L1 en presencia de diferentes tratamientos.

Fig. 14. Imágenes obtenidas en ImageJ de la Tinción ORO de adipocitos en presencia de diferentes tratamientos.

Fig. 15. Cuantificación de lípidos por medio del análisis de área de las imágenes obtenidas de ImageJ.

Fig. 16. Esquema representativo en donde se muestra la técnica On-top utilizada para la obtención de las estructuras tumorales tipo organoides de Hs-578t.

Fig. 17. Estandarización de cultivos 3D con la línea celular Hs-578t en donde se aprecian las estructuras tumorales tipo organoides tomadas en microscopio óptico al 40X.

Fig. 18. Estructura tumoral tipo organoide Hs-578t en cocultivo con adipocitos maduros 3T3-L1.

Fig. 19. Análisis de la integridad del RNA obtenido. Gel de agarosa 1% para determinar la integridad del RNA.

Fig. 20. Programa para amplificar los genes que codifican para los factores PPAR γ y C/EBP α .

Fig. 21. Análisis de la expresión de PPAR γ y c/EBP α .

Fig. 22. Densitometría del análisis de la expresión de PPAR γ y c/EBP α .

Fig. 23. Análisis de la expresión de PPAR γ y c/EBP α .

Fig. 24. Tinción Oil-Red-O post-cocultivo con las estructuras tumorales de Hs-578t.

Fig. 25. Cuantificación de lípidos acumulados en adipocitos diferenciados, post-cocultivo y fibroblastos 3T3-L1.

Fig. 26. Inmunofluorescencia de las estructuras tumorales tipo organoide en 3D sin adipocitos maduros 3T3-L1.

Fig. 27. Inmunofluorescencia de las estructuras tumorales Hs-578t tipo organoides en 3D en cocultivo con adipocitos maduros 3T3-L1.

Fig. 28. Ensayo de viabilidad celular de las estructuras tumorales Hs-578t en 3D y en cocultivo, por medio del ensayo MTT.

Fig. 29. Ensayo de viabilidad celular realizado en fibroblastos 3T3-L1, adipocitos diferenciados con rosiglitazona y adipocitos expuestos a cocultivo con estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t.

Fig. 30. Separación electroforética (SDS-PAGE) de las proteínas totales extraídas de las estructuras tumorales en 3D.

Fig. 31. Cromatogramas alineados en modo HDMSE con un porcentaje de 87.4%.

Fig. 32. Diagrama de Venn de las 916 proteínas identificadas por espectrometría de masas.

Fig. 33. Volcano plot donde se encuentran graficadas 916 proteínas expresadas diferencialmente.

Fig. 34. Gráfico de error a nivel de péptidos donde se muestra que la mayoría de los péptidos (80%) son significativos.

Fig. 35. Procesos biológicos en los que participan las proteínas sobre expresadas de cocultivo celular en 3D con adipocitos 3T3-L1.

Fig. 36. Procesos biológicos en los que participan las proteínas reprimidas de cocultivo celular en 3D con adipocitos 3T3-L1.

Fig. 37. Funciones moleculares en los que participan las proteínas sobre expresadas, expresadas diferencialmente de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t en cocultivo 3D con adipocitos diferenciados 3T3-L1.

Fig. 38. Funciones moleculares en las que participan las proteínas reprimidas expresadas diferencialmente de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t en cocultivo 3D con adipocitos diferenciados 3T3-L1.

Fig. 39. Modelo tridimensional de la estructura cristalina de la APOB.

Fig. 40. Las proteínas ApoB y sus ligando.

Fig. 41. Lipoproteína esférica la cual se conforma por colesterol, fosfolípidos y la apolipoproteína B-100.

Fig. 42. La expresión de las apolipoproteínas está relacionada con los hallmarks del cáncer.

Fig. 43. Interactoma de la APOB.

Fig. 44. Análisis de correlación de supervivencia y expresión de APoB.

Fig. 45. Modelo tridimensional de la estructura cristalina de la PITPNM2.

Fig. 46. Análisis de correlación de supervivencia y expresión de PITPNM2.

Fig. 47. Proteínas sobre expresadas de las estructuras tumorales Hs-578t en cocultivo con 3T3-L1.

Fig. 48. Vía de señalización de las MAPK en donde participan proteínas sobre expresadas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Fig. 49. Vías de señalización implicadas en cáncer donde participan proteínas sobre expresadas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Fig. 50. Proteínas reprimidas de las estructuras tumorales Hs-578t en cocultivo con 3T3-L1.

Fig. 51. Vía de señalización de GAP en donde participan proteínas reprimidas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Fig. 52. Vía de señalización del ciclo celular en donde participan proteínas reprimidas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Fig. 53. Modelo biológico de regulación con base en las proteínas reguladas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Fig. 54. Modelo esquemático del efecto de diversos tratamientos en la lipogénesis

Fig. 55. Caracterización de la expresión de factores proadipogénicos

Fig. 56. Descripción general de las principales vías de metabolismo de los lípidos que se han visto afectadas por el estrés metabólico.

Fig. 57. Estructuras de MTT y producto formazán coloreado.

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de casos nuevos y muertes en el mundo por cáncer. Globocan 2020.

Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.

Tabla 3. Clasificación de la obesidad según el IMC.

Tabla 4. Medios y su contenido utilizado para la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos maduros.

Tabla 5. Genes y secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR.

Tabla 6. Componentes empleados para la preparación de los geles para el corrimiento electroforético de las proteínas.

Tabla 7. Componentes de los tratamientos empleados en la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos maduros.

Tabla 8. Cuantificación del RNA total.

Tabla 9. Resumen de proteínas detectadas por espectrometría de masas.

Tabla 10. Top ten de proteínas sobre expresadas detectadas por espectrometría de masas. En rojo se muestran proteínas asociadas al transporte de lípidos.

Tabla 11. Anotaciones de OG con base a la red de interacciones de proteínas sobre expresadas; obtenida de Cytoscape.

Tabla 12. Top ten de proteínas reprimidas detectadas por espectrometría de masas. En rojo se muestran proteínas asociadas al transporte de lípidos.

Tabla 13. Anotaciones de OG con base a la red de interacciones de proteínas reprimidas; obtenida de Cytoscape.

Tabla 14. Proteínas sobre expresadas detectadas y cuantificadas por espectrometría de masas de las estructuras tumorales Hs-578t en 3D durante cocultivo.

Tabla 15. Proteínas reprimidas detectadas y cuantificadas por espectrometría de masas de las estructuras tumorales Hs-578t en 3D durante cocultivo.

III. ABREVIATURAS

ACC Acetil-CoA carboxilasa

ADRP Proteína Relacionada con la Diferenciación Adiposa

AMPc Adeosín monofosfato cíclico

ARHGEF5 Factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina Rho

ATP Adenosín trifosfato

BAT Tejido adiposo marrón

BMP4 Proteína morfogenética ósea 4

BMP7 Proteína morfogenética ósea 7

C/EBP Ccaat-enhancer-binding proteins

C/EBP α Ccaat-enhancer-binding proteins α

C/EBP δ Ccaat-enhancer-binding proteins δ

CAA Adipocitos asociados a cáncer

CAF Fibroblastos asociados al cáncer

CD36/FAT Translocasa de ácido graso

CM Cáncer de mama

CREB Elemento modulador de respuesta AMPc

DGKG Diacilglicerol quinasa gamma

DNA Ácido desoxirribonucleico

FA Ácidos grasos

FABP Proteína de anclaje de ácidos grasos intracelulares

FAS Sintasa de ácidos grasos

FASN Ácido graso sintasa

GLUT4 Proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina 4

GM Glándula mamaria

GSK3 β La glucógeno sintasa quinasa 3 β

HGF Factor de crecimiento hepático

IBMX Isobutil Metil Xantina

IGF-1 Factor de crecimiento de insulina 1

IL-10 Interleucina 10

IL-1 β Interleucina 1 β

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

IMC Índice de masa corporal

LPL Lipoproteína lipasa
ME Matriz extracelular
ME Matriz extracelular
MTT Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
MyF5 Factor regulatorio miogénico 5
P2RX5 Receptor purinérgico
PAT Proteínas de gotitas de lípidos
PAT2 Proton-coupled amino acid transporter
PEPCK Fosfoenol-piruvato carboxikinasa
PI Fosfatidilinositol
PKA Proteína quinasa A
PPAR Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PPAR γ Receptores activados por proliferadores peroxisomales γ
PREF-1 Factor de preadipocito 1
Ro Rosiglitazona
Sox-9 Factor de transcripción Sox9
SREBP-1c Proteína 1 de unión a los elementos regulatorios de esteroides
TA Tejido adiposo
TAG Triacilglicerol
Tcf21 Factor de transcripción 21
TGRL Lipoproteínas ricas en triglicéridos celulares
TIP47 Proteína 1 de unión al receptor de fosfato de manosa 6
TME Microambiente tumoral
TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa
UCP-1 Proteína desacoplante de la cadena respiratoria 1
WAT Tejido adiposo blanco

1. RESÚMEN

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuente y de mayor mortalidad entre las mujeres a nivel mundial. Más de 6 millones sucumben ante la enfermedad y el número de fallecimientos se ha duplicado en 22 años. La obesidad se asocia con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de seno y el vínculo entre la obesidad y el cáncer parece depender del microambiente generado a nivel del tejido adiposo. La obesidad, se conoce como la acumulación anormal de grasa o tejido adiposo blanco el cual afecta la homeostasis del cuerpo; representada por un índice de masa corporal ≥ 30 kg/m². En el presente trabajo establecimos un sistema de cocultivo en donde las células tumorales Hs-578t crecidas sobre matrigel en tres dimensiones (3D) tipo organoide se cultivaron con adipocitos diferenciados *in vitro* a partir de fibroblastos 3T3 y posteriormente evaluamos los efectos en el proteoma de la célula tumoral por medio de espectrometría de masas. Los resultados de la diferenciación de las células 3T3 muestran cambios fenotípicos asociados a la diferenciación en adipocitos los cuales acumularon gotas lipídicas. De manera interesante, los adipocitos desarrollaron deslipidación en presencia de las células tumorales ya que el contenido lipídico disminuyó significativamente en comparación con los adipocitos crecidos sin células Hs-578t. También encontramos que los adipocitos crecidos con las células tumorales mostraron una disminución significativa en la expresión de factores pro-adipogénicos lo cual indica que adquirieron un fenotipo asociado al cáncer y asociado al proceso de desdiferenciación. El análisis proteómico por medio de espectrometría de masas detectó 916 proteínas moduladas (87 sobreexpresadas y 224 reprimidas) en las células Hs-578t en cocultivo con adipocitos. El análisis de ontología mostró que las proteínas moduladas regulan procesos celulares asociados al cáncer. De manera interesante, dentro de las 10 proteínas con mayor sobreexpresión encontramos factores que participan en el transporte de los lípidos tales como la apolipoproteína B-100 (ApoB) y diversas Proteínas Asociadas a la Membrana que transfieren Fosfatidil-inositol (PITPM2). Finalmente, detectamos que diversas proteínas moduladas en las células Hs-578t por los adipocitos participan en la vía de señalización de las MAPKs las cuales estimulan la proliferación y la sobrevivencia celular. En conclusión, los adipocitos estimularon la expresión de proteínas transportadoras de lípidos y un grupo de proteínas que participan en rutas de señalización asociadas a la activación de los hallmarks del cáncer.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most frequent neoplasm and with the highest mortality among women worldwide. More than 6 million succumb to the disease and the number of deaths has doubled in 22 years. Obesity is associated with an increased risk of developing breast cancer and the link between obesity and breast cancer appears to depend on the microenvironment generated at the level of adipose tissue. Obesity is known as the excessive or abnormal accumulation of fat or white adipose tissue which affects the homeostasis of the body; represented by a body mass index (BMI) ≥ 30 kg / m². Therefore, in the present work, it was proposed to set up a cell coculture system in which Hs-578t tumor cells were in coculture with mature 3T3-L1 adipocytes for 48 hours and subsequently evaluate the proteome by means of mass spectrometry and analyze how it was modified compared to the tumor structures grown without adipocytes. When studying the co-culture of organoid-type tumor structures with murine adipocytes, phenotypic changes were observed in adipocytes, which were evaluated by means of ORO (Oil-Red-O) staining; the results showed that adipocytes could be suffering from delipidation; since, the lipids housed within the adipocytes in coculture were lower compared to the differentiated adipocytes without coculture. Subsequently, the proadipogenic factors of adipocytes were evaluated to analyze how they were expressed in coculture and the results showed that this expression was decreased in coculture; Therefore, according to the literature, adipocytes acquire a phenotype associated with cancer and are used as a metabolic stimulus; this process is described as de-differentiation. In the proteomic analysis by means of mass spectrometry, 916 modulated proteins were obtained; Of these, 87 were found to be over-expressed in coculture and 224 repressed. An ontology analysis was carried out for both conditions, obtaining that they regulate cellular processes and their main function is union. Later, to carry out a more detailed analysis, the tops ten of the over-expressed and repressed proteins were analyzed, obtaining that mainly the over-expressed proteins participate in the transport of lipids such as ApoB and PITPNM2. The repressed were mainly binding proteins. Finally, they were analyzed to know the signaling pathways in which MAPKS over-expressed and repressed proteins participate in the cell cycle.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Antecedente generales

3.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuente y de mayor mortalidad entre las mujeres del mundo (IARC, 2020). Más de 6 millones de mujeres padecieron la enfermedad y el número de fallecimientos se ha duplicado en 22 años. En México a partir de 2006, la mortalidad por CM supera a la del cáncer cervicouterino (CCU) como principal causa de muerte por tumores malignos. Esto representa un grave problema de salud pública que amenaza a las mujeres de todos los niveles socio económicos. El diagnóstico molecular es de gran ayuda debido a que puede detectar el cáncer antes de que el tumor sea visible y aparezcan metástasis a tejidos cercanos, mejorando el pronóstico y sobrevida después del tratamiento.

3.1.2 Morbilidad y mortalidad del CM

Las estadísticas de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer reportadas en la base de datos Globocan (<http://www-dep.iarc.fr/>) revelan que el CM es la neoplasia más común en la población femenina mundial (IARC, 2020); se registra que a una tasa ajustada por edad (ASR, por las siglas de Age Standardized Ratio) de 47.8 por 100,000 mujeres de nuevos casos cada año a nivel mundial (Fig. 1).

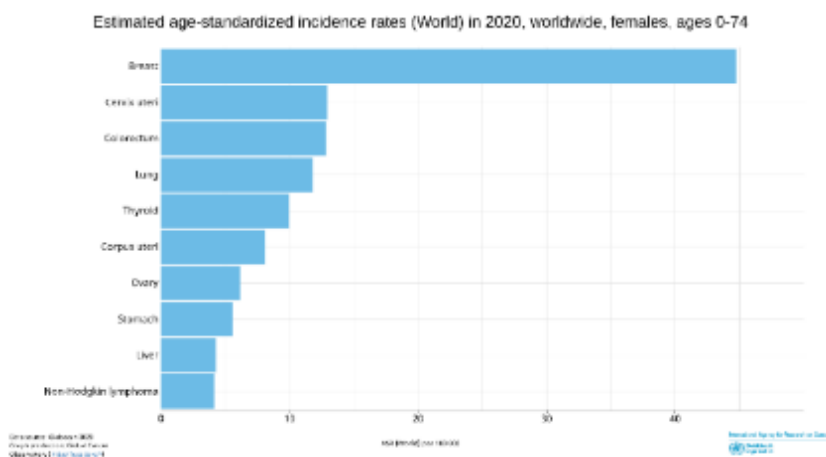


Fig. 1. Número de nuevos casos de cáncer en la mujer a nivel mundial. En donde se puede observar que el CM se posiciona en primer lugar con un 47.8 de incidencia en un total de 2,261,419 casos. Datos tomados de Globocan 2020.

En cuanto a la mortalidad, los datos muestran una tendencia preocupante: el CM es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres en el mundo (Tabla. 1). A partir de 2006, la mortalidad por CM representa la principal causa de muerte por tumores malignos en México; asimismo, se ha colocado como la principal causa de cáncer en mujeres de 30 a 74 años en Centro América (Fig. 2).

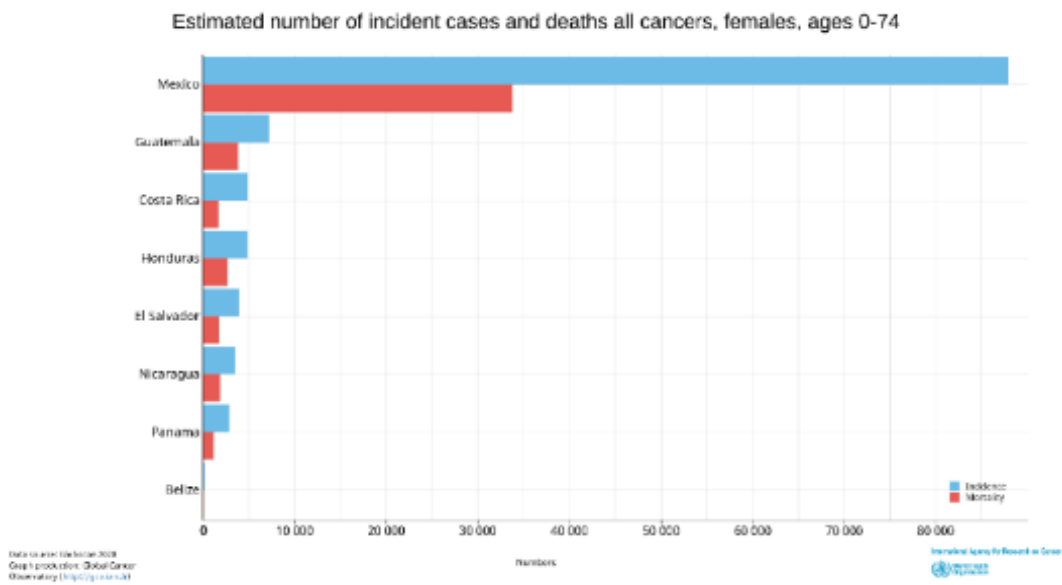


Fig. 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en México. En donde se puede observar que el CM se posiciona en primer lugar con 87,953 casos de incidencia y 33.807 casos de mortalidad. Datos tomados de Globocan 2020.

Según los datos de Globocan 2020, se observa que, aunque en los países más desarrollados el número de nuevos casos de cáncer es mayor que en los más pobres, el número de muertes es mayor en estos últimos. Esto refleja, la influencia que el estilo de vida, los patrones reproductivos, la cultura y la sociedad pueden tener en los factores de riesgo y representa también el sesgo que los diferentes métodos de detección y registro de cada país pueden repercutir en los datos de incidencia de la enfermedad.

Tabla 1. Número de casos nuevos y muertes en el mundo por cáncer. Globocan 2020.

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Mama	2261419	684996
Colon	865630	419536
Pulmón	770828	607465
Cervical	604127	341831
Tiroides	448915	27740
Útero	417367	97370
Estómago	369580	266005
Ovario	313959	207252
Hígado	273357	252658
Linfoma no hodgkiniano	240201	112576

3.1.3 Clasificación del CM

El CM es una enfermedad heterogénea representada por un amplio espectro de características moleculares e histopatológicas que resultan en diversos comportamientos clínicos. Los tumores de CM se clasifican de acuerdo al tipo histológico, grado y expresión de los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y del factor de crecimiento epidermal 2, HER-2 (eRBB2). De manera importante, la terapia convencional contra el CM va dirigida contra estos receptores. Con base en estas proteínas los tumores pueden ser clasificados en tres grupos: (i) aquellos que presentan receptores positivos ER+, PR+ y HER2- y que son tratados con terapia hormonal (tamoxifeno) acompañada de quimioterapia adyuvante; (ii) aquellos que presentan ER+, PR+ y HER2+, los cuales reciben adicionalmente terapia personalizada mediante el uso del anticuerpo Trastuzumab que bloquea de manera eficaz al receptor HER2 y; (iii) aquellos que no presentan la expresión de receptores (ER-, PR- y HER2-). En consecuencia, estos últimos son denominados tumores triple negativo para los cuales la quimioterapia representa la única modalidad de terapia sistémica (Vogelstein y Kinzler 2004) ; (Eliyatkin et al. 2015).

3.1.4 Clasificación genómica del CM

Recientemente, se determinó que la heterogeneidad morfológica y molecular del CM puede ser clasificada de acuerdo a sus perfiles de expresión genómica mediante el uso de microarreglos de DNA (Perou *et al*, 2000). Estos hallazgos han sido corroborados de manera sistemática por diversos grupos (Sorlie *et al* 2001; 2003; Reis-Filho *et al*, 2006; Brenton *et al*, 2005). Los datos de perfiles de expresión permiten clasificar el CM en 5 grupos: luminal A, luminal B, normal-like, HER2/neu+ y basal-like (Tabla. 2). Algunos autores los clasifican de acuerdo al estado de expresión de ER: (i) 2 grupos ER+ (luminal A y B) y; (ii) 3 ER- (normal breast-like, HER2 y basal-like). Diversos estudios han validado la utilidad clínica de la clasificación en términos de predicción de recurrencia distante y mortalidad. Los tumores basal-like son ER-, PR- y HER2-, pero son positivos para las citoqueratinas (CK) 5/6 y EGFR, mientras que los tumores que son negativos a estos 5 marcadores son definidos como normal-like. Se ha determinado que el grupo basal-like está enriquecido en tumores triple negativo los cuales poseen un comportamiento más agresivo, presentan un patrón de metástasis diferente y predicen un mal pronóstico a pesar de responder inicialmente a la quimioterapia (Carey *et al*, 2007).

Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.

CLASIFICACIÓN	EXPRESIÓN DE RECEPTORES	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES
LUMINAL A	ER+, PR+/-, HER2-	Bajo Ki-67(<14%) respuesta endocrina
LUMINAL B	ER+,PR+/-,HER2+	Alto Ki-67, respuesta endocrina
HER-2	ER-,PR-,HER2+	Alto Ki-67, respuesta a quimioterapia.
BASAL	ER-,PR-,HER2-	Alto Ki-67, expresión de EGFR y citoquinas 5 y 6.
BAJA CLAUDINA	ER-,PR-,HER2-	Alto Ki-67, E-cadherina, baja claudina 3,4 y 7, respuesta a la quimioterapia.

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidermal; ER, receptor de estrógenos; HER2, receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2; PR, receptor de progesterona. Tomado de Dai et al. 2015.

3.1.5 Factores de riesgo

El 15% de los casos de CM son hereditarios y el 85% restante son esporádicos. El 80% son carcinomas ductales y el resto lobulillares. La incidencia del CM se incrementa con la edad duplicándose cada 10 años hasta la menopausia. La relación de CM entre mujeres y hombres es de 100 a 1. En el 46% de las mexicanas el CM se presenta entre los 40-49 años mientras que en USA es hasta los 63 años. La enfermedad se relaciona con el estado hormonal, por lo que el periodo de exposición a estrógenos es un factor crítico de la carcinogénesis. La menstruación temprana, el término de ésta después de los 55 años, la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar CM. En particular, la ingesta de hormonas, el tiempo de uso de anticonceptivos, edad de la ingesta, la terapia de reemplazo hormonal, lactancia, cirugía previa de la mama y los casos de CM previos en la familia representan factores de riesgo importantes, así como la obesidad (Iyengar et al. 2016)

3.1.6 Obesidad

La obesidad se conoce como la acumulación excesiva o anormal de grasa o tejido adiposo blanco el cual afecta la homeostasis del cuerpo. Se ha convertido en una epidemia que se ha ido agravando a lo largo del tiempo. Es una enfermedad compleja y tiene una etiología multifactorial; principalmente se sabe que es el resultado de un desequilibrio entre la ingesta diaria de energía y el gasto energético, pero se sabe que puede ser causada por múltiples factores que pueden ser genéticos, culturales y sociales entre otros. Las causas más comunes suelen ser la reducción de actividad física, el insomnio, los hábitos alimenticios, así como trastornos endócrinos o metabólicos (Panuganti et al., 2021).

Una herramienta útil que ayuda a categorizar el grado de obesidad es el índice de masa corporal (IMC). Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. El $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ es indicador de presentar algún grado de obesidad (Tabla. 3). La obesidad afecta a más de 600 millones de adultos en todo el mundo, o el 13% de la población mundial siendo un importante problema de salud de particular importancia en países desarrollados, donde la obesidad afecta a más del 36% de los adultos (Picon-Ruiz et al, 2017).

Tabla 3. Clasificación de la obesidad según el IMC. Tomado de Moreno 2012.

CLASIFICACIÓN	IMC
INFRAPESO	menos de $18,5 \text{ kg/m}^2$
PESO NORMAL	$18,5 \text{ kg/m}^2$ a $24,9 \text{ kg/m}^2$
SOBREPESO	25 kg/m^2 a $29,9 \text{ kg/m}^2$
OBESIDAD TIPO I	30 kg/m^2 a $34,9 \text{ kg/m}^2$
OBESIDAD TIPO II	35 kg/m^2 a $39,9 \text{ kg/m}^2$
OBESIDAD TIPO III	más de 40 kg/m^2

3.1.7 Obesidad y cáncer

La obesidad se asocia con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de seno (Lee et al. 2019); el GLOBOCAN en el 2018 realizó un estudio en Latino América en donde asocia el exceso de masa corporal con la incidencia del cáncer de mama Fig. 3. El vínculo entre la obesidad y el cáncer de mama parece depender del microambiente generado a nivel del tejido adiposo (Sánchez et al. 2019). Los adipocitos representan la mayor proporción de las células que comprenden el tejido mamario y representan el 90% del tejido estromal; por lo tanto, se consideran un tipo celular crítico en el microambiente tumoral y el desarrollo del cáncer de mama. Los adipocitos se encuentran adyacentes a las células cancerosas desempeñando un papel activo en el desarrollo, progresión, metástasis y respuesta al tratamiento del cáncer (Choi, 2018).

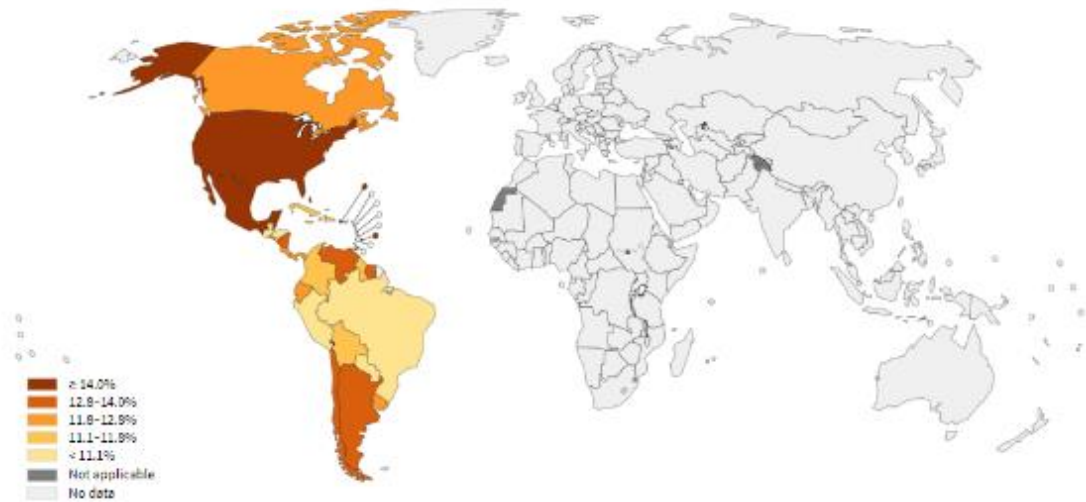


Fig. 3. Exceso de masa corporal y cáncer de mama en América Latina. Se señala el exceso de masa corporal como primera causa atribuible para el desarrollo del cáncer de mama.

3.1.8 Tejido adiposo y tipos

El tejido adiposo está conformado por adipocitos. En los primeros reportes este tejido era considerado como un complemento anatómico que brindaba protección, calor y energía. A partir de 1980 se revelaron funciones las cuales indican que su acción hace referencia a un órgano debido a su secreción de hormonas, factores solubles, citocinas, adipocinas entre otros. Estos factores secretados participan en la homeostasis del organismo y en diversos procesos biológicos. Además es el órgano con mayor plasticidad, ya que tiene la capacidad de regenerarse y aumenta o disminuye su tamaño dependiendo de la edad, actividad física, ingesta de alimentos, predisposición genética, función endocrina y programación neonatal (Vega-Robledo y Rico-Rosillo 2019).

Se han descrito cuatro tipos de tejido adiposo:

- i) tejido adiposo blanco (WAT): el cuál es el encargado de almacenar energía en forma de triacilglicerol (TAG), así como de la comunicación endocrina y la sensibilidad a la insulina, es el TA con mayor volumen en la mayoría de los mamíferos incluido el humano.
- ii) tejido adiposo pardo o marrón (BAT): es característico debido a que se presenta en gran medida en los mamíferos después del nacimiento y durante

la hibernación. También utiliza el almacenamiento de energía para la producción de calor, lo cual es fundamental en el mantenimiento de la temperatura corporal. Se sabe que tiene una mayor proporción y actividad en mujeres que en hombres y se ha demostrado que la actividad de BAT en cualquier sexo está inversamente correlacionada con la edad y el IMC.

Anatómicamente los adipocitos marrones y blancos tienen diferente forma, tamaño y orgánulos. Los adipocitos del WAT son generalmente de forma esférica y cada uno contiene una gota lipídica grande y única que empuja a los demás orgánulos a la periferia de la célula. Los adipocitos del BAT contienen diversas gotas lipídicas dispersas y la forma celular es más elipsoidal y está enriquecida con múltiples mitocondrias que contienen hierro, lo que le da a la célula un tono marrón. Su actividad termogénica es conferida a la proteína denominada UCP-1 (proteína desacoplante de la cadena respiratoria 1) un transportador de protones que altera el gradiente de protones que se genera por la ATPasa, lo cual genera ATP y permite la producción de calor a medida que los protones fluyen.

Las células grasas marrones crecen de 15 a 50 μm , mientras que las células del WAT tienen una mayor capacidad de almacenamiento lipídico y pueden expandirse hasta casi los 100 μm de diámetro (Robledo y Rosillo, 2019) (Richard et al. 2020) (Fig. 4).

Recientemente se han descrito dos nuevos tipos de adipocitos: el beige y el rosa. Los adipocitos beige muestran características de células grasas tanto marrones como blancas. Se desarrollan dentro del WAT subcutáneo a partir de un subconjunto distinto de preadipocito o mediante la transdiferenciación de adipocitos blancos existentes. Sin embargo, los análisis moleculares sobre la expresión génica indican que las células grasas beige representan un tipo distinto de célula grasa termogénica con la capacidad de almacenar TA.

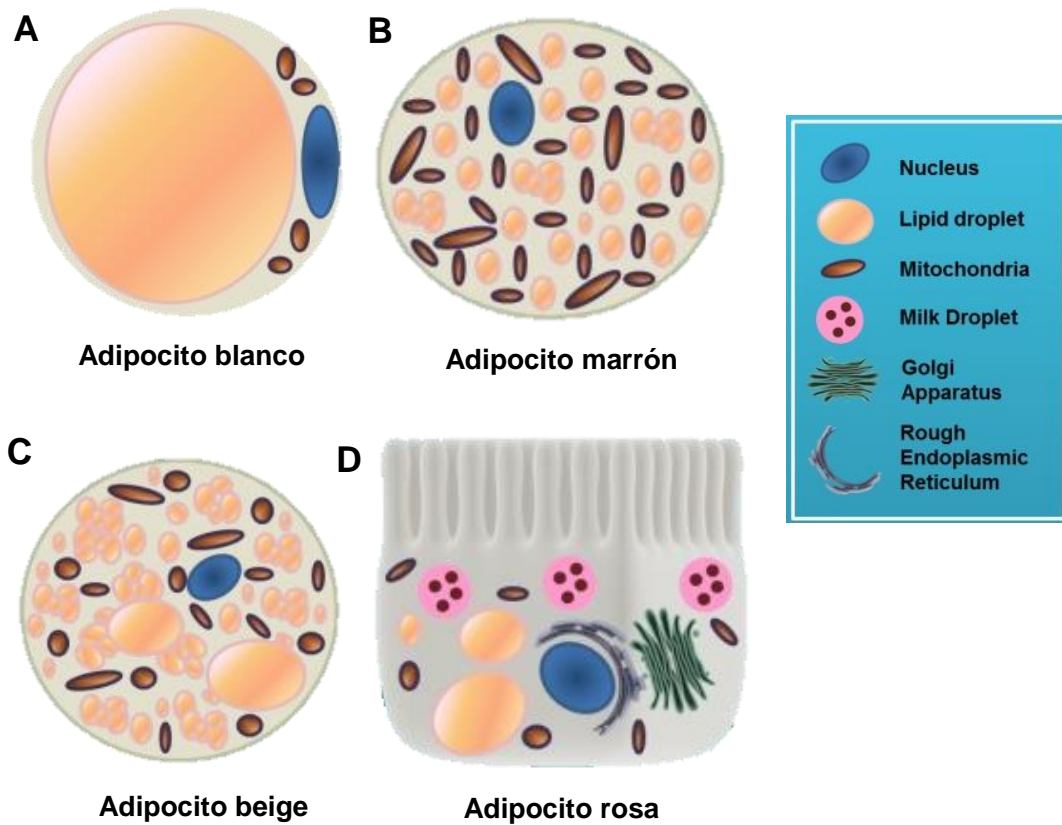


Fig. 4. Morfología de los adipocitos. Imagen tomada y modificada de Richard et al. 2020. (A) Adipocito blanco; (B) Adipocito marrón; (C) Adipocito beige y (D) Adipocito rosa.

Los adipocitos rosas se describieron por primera vez en el 2014, parece que su etiología se deriva del WAT, pero adquieren características de tipo epitelial para formar alvéolos secretores de leche, lo que le da al tejido el tono característico rosado. Éstos se caracterizan por contener gotas de lípidos compartimentadas, proyecciones citoplasmáticas y abundantes orgánulos como mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico rugoso lo que le confiere parecido a las células epiteliales. Aunque la transdiferenciación es reversible parece ser responsable del desarrollo y desaparición de los adipocitos durante el embarazo, lactancia y post-lactancia en roedores, sigue siendo incierta la formación en los humanos (Richard et al. 2020).

3.1.9 Origen y marcadores moleculares de WAT

Con el fin de esclarecer el origen de los diversos tipos de adipocitos se han hecho estudios que reportan que el WAT procede de distintos linajes derivados de células madre de la mesénquima. Una familia de factores de transcripción esencial para la maduración y la activación de los adipocitos blanco, pardo y

beige son los PPAR (receptores activados por proliferadores peroxisomales). Asimismo, las moléculas PAT2 (proton-coupled amino acid transporter 2) y P2RX5 (P2X receptor purinérgico 5) son consideradas como marcadores de superficie de los diversos tipos de adipocitos. El adipocito blanco deriva de la célula madre mesenquimatosa y tiene como etapas intermedias a los adipoblastos y a los preadipocitos que expresan el factor de transcripción 21 (Tcf21). El pardo deriva de las células de la mesénquima que expresan el factor de transcripción MyF5 (Factor regulatorio miogénico 5) y BMP7 (proteína morfogenética ósea 7). Los adipocitos beige pertenecen al linaje celular de los blancos y se relacionan más con BMP4.

Los adipocitos blancos en general no expresan MyF5, pero estudios recientes han detectado en algunos de sus progenitores a este marcador. Así, los adipocitos beige pueden ser MyF5+ o MyF5-, según el depósito de grasa donde se formen y pueden expresar además marcadores como Cd137, UCP-1 y proteína transmembrana 26. El adipocito rosa tiene su origen en la glándula mamaria de murinos. Durante el embarazo, los adipocitos blancos se convierten en células epiteliales productoras de leche y los adipocitos pardos en células mioepiteliales, ambas consideradas como reservorios grasos. Expresan como marcadores a las moléculas S-100b y a la leptina. Al finalizar la lactancia revierten a su forma original (Vega y Rico, 2019) (Fig. 5).

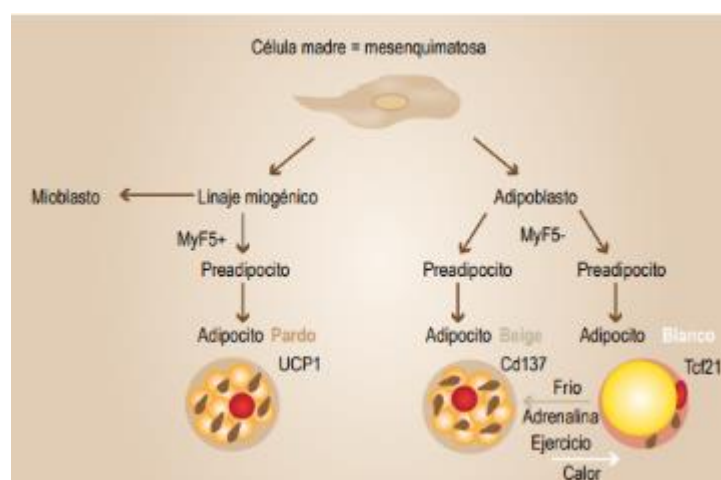


Fig. 5. Origen de los adipocitos. Diversos linajes procedentes de la célula madre de la mesénquima generan los diferentes tipos de adipocitos, acorde con la expresión de distintos genes o factores de transcripción. Tomado de Vega y Rico 2019.

3.2.0 Adipocitos y relación con el cáncer

Los adipocitos son los componentes primarios que comprenden el microambiente del CM, y la evidencia indica que los adipocitos impulsan la progresión tumoral a través de la comunicación mutua y dinámica entre éstos y las células tumorales. Las células tumorales toman a los adipocitos como parásitos metabólicos, estos adipocitos capturados pasan a ser adipocitos asociados a cáncer (CAA). Las cuales toman metabolitos de los CAA como ácidos grasos (FA), glicerol, piruvato y lactato (Wu et al. 2019). Esta influencia en el microambiente tumoral (TME) por factores secretados los adipocitos maduros pierden su contenido lipídico y muestran una morfología similar a un fibroblasto, lo que sugiere su contribución a la expansión de los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) (Cao, 2019).

La evidencia experimental acumulada muestra que los adipocitos hipertróficos o hiperplásicos al interactuar con las células tumorales se desencadenan varias cascadas de señalización las cuales ayudan al desarrollo de los hallmarks del cáncer como la proliferación, la migración y la supervivencia. Han surgido diversos posibles mecanismos al desarrollo y progresión de tumores incluido i) el suministro de lípidos para la membrana de las células cancerosas; ii) la liberación de hormonas endocrinas, factores de crecimiento, adipocinas y adipocitocinas; iii) reprogramación metabólica en las células cancerosas; iv) producción de proteasas degradadoras de la ME; v) reclutamiento de células inflamatorias y vasculares. También las células del sistema inmune producen proteínas buscando la homeostasis del TME; como los macrófagos asociados a tumores especialmente los macrófagos M2 inflamatorios, promueven la invasión y la metástasis del cáncer (Cao, 2019; Hoy, et al. 2017).

Hallazgos recientes demuestran que existe una fuerte asociación entre el sobrepeso y un mayor riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer. La obesidad se reconoce cada vez más como un marcador de mal pronóstico del cáncer; aunque no se conocen con exactitud los mecanismos que subyacen al alto riesgo de cáncer y la progresión de la obesidad. Sin embargo, según los continuos reportes se conocen diferentes procesos importantes que ocurren

en el TME: en donde los adipocitos contribuyen sustancialmente a procesos tumorales importantes como:

a) Transición fenotípica de adipocitos

Después de una exposición prolongada a las células cancerosas, los adipocitos obesos manifiestan cambios fenotípicos, pierden su contenido de lípidos y adquieren características similares a los fibroblastos para contribuir al conjunto celular de CAF, que se sabe que promueven la invasión del cáncer y metástasis.

b) Inestabilidad genómica

La obesidad aumenta el estrés oxidativo celular y el daño oxidativo del DNA, lo cual es un factor que aumenta el riesgo de cáncer. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del sistema de defensa antioxidante para eliminarlos. En este sentido, las células malignas se caracterizan por generar radicales libres favoreciendo el desarrollo de procesos relacionados con la supervivencia, proliferación, invasión y metástasis. El DNA es uno de los principales blancos de las especies reactivas de oxígeno. Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, entre los que se han reportado: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las 2 hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas (cross-links) ADN-ADN ó ADN-proteína, a través de diferentes mecanismos (Zorrilla et al. 2004):

1. Modificación de las bases de ADN.
2. Generación de sitios AP.
3. Ruptura de una cadena del ADN.
4. Mutaciones.
5. Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores.
6. Daño endotelial que favorece la metástasis.

c) Inflamación

El WAT obeso se caracteriza por presentar un estado inflamatorio crónico de bajo grado, en donde se reclutan diversas estirpes celulares como macrófagos, neutrófilos y células del sistema inmune. Los adipocitos obesos

asociados a cáncer secretan altos niveles de citocinas inflamatorias como: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α ; lo cual activa y recluta células inflamatorias.

d) Inhibición de la apoptosis

La insulina es un factor de sobrevivencia celular que induce la proliferación e inhibe la apoptosis en una amplia gama de células cancerosas. Los niveles altos de insulina en individuos obesos y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se asocian de forma independiente con varios tipos de cáncer. Además, la insulina también induce la expresión de IGF-1 que estimula la proliferación y sobrevivencia de numerosos cánceres.

e) Angiogénesis

El TA obeso está muy vascularizado y como consecuencia de la alta densidad de microvasos preexistentes y angiogénicos promueven la tumorigénesis, la progresión maligna e incluso la metástasis. Alternativamente, los adipocitos obesos ubicados distalmente del tumor primario liberan altos niveles de citocinas angiogénicas y factores de crecimiento en la circulación, que activan un fenotipo angiogénico e inician el crecimiento tumoral latente. Este mecanismo puede explicar por qué la dieta alta en grasas y la obesidad aceleran el crecimiento tumoral sin infiltrarse en el tejido tumoral.

f) Aumento de producción de proteínas transportadoras de ácidos grasos

Debido a la alta demanda de lípidos en el medio y el requerimiento de metabolizarlos para ser aprovechados por la célula tumoral, hallazgos recientes reportan una producción elevada de proteínas de unión a FA adiposos como A-FABP y lipoproteínas; lo cual, promueve el desarrollo del cáncer y la metástasis. En una etapa inicial del desarrollo del tumor se secretan diversas adipocinas y adipocitocinas derivadas de CAA facilitando la formación de los mismos. A lo largo de la progresión del tumor los lípidos almacenados proporcionan metabolitos y combustible para la expansión del tumor. Finalmente, en una etapa avanzada, el agotamiento de los lípidos almacenados puede influenciar al cambio de CAA en CAF, los cuales promueven la metástasis en el TME.

Por lo tanto, los procesos celulares son diversos y dinámicos durante la progresión del cáncer. En última instancia, se conoce que las alteraciones de procesos importantes darán como resultado la sensibilidad a los medicamentos contra el cáncer (Cignarelli, et al. 2019). La atrofia adiposa relacionada con la caquexia por cáncer puede representar la consecuencia de la incesante demanda de suministro de lípidos para la expansión del tumor (Iyengar, et al. 2016), (Hoy, et al. 2017).

3.2.1 Adipocitos y cáncer de mama

La glándula mamaria es un órgano dinámico que cambia continuamente su arquitectura y función, así como sus interacciones entre el epitelio y el tejido conectivo. En el desarrollo y función normales de la GM se encuentra la relación recíproca del adipocito en tejidos mamarios. Esta glándula está incrustada en el tejido conectivo comúnmente conocida como la almohadilla de grasa mamaria ya que contiene principalmente tejido adiposo (Hovey y Aimò, 2010). Esta evidente proximidad de adipocitos y células epiteliales en la mama permite plantear la hipótesis de que los adipocitos podrían jugar un papel durante la progresión del tumor. Los factores secretados contribuyen a la aparición de tumores agresivos con propensión a hacer metástasis en mujeres obesas (Tan, et al. 2011).

La incidencia del CM ha aumentado en los últimos años en un 30%, lo que se atribuye en parte a cambios en los patrones reproductivos y métodos mejorados de detección, sin embargo, este aumento también puede reflejar la creciente prevalencia de obesidad e inactividad física de la población a nivel mundial. El sobrepeso y la obesidad parece estar directamente relacionado con la incidencia en el CM en premenopáusicas; se ha considerado la obesidad como un factor de riesgo importante, un metaanálisis de estudios observacionales prospectivos reveló esta relación, concluyendo que existe un mayor riesgo del 12% de padecer cáncer de mama en mujeres con un aumento de 5 kg/m² en el IMC (Renehan, et al. 2008; Sánchez, et al. 2019).

El aumento de WAT se ha correlacionado con un tumor de gran tamaño, positividad de los ganglios tumorales y un mal pronóstico del CM. Un estudio acerca de la participación de adipocitos maduros murinos 3T3-L1 en cocultivo

con células MDA-MB-231 de cáncer de mama, muestra que se exacerban los hallmarks del cáncer debido a que el adipocito secreta FA al medio los cuales son aprovechados por las células cancerosas como suministro energético (Balaban et al; 2017). Estos datos muestran la influencia positiva que tienen los adipocitos del microambiente tumoral en la progresión tumoral (Fig. 6) donde se puede apreciar una influencia positiva en la inflamación al secretarse numerosas interleucinas proinflamatorias como IL-6; IL-1 β y TNF- α . Otro proceso importante implicado es el remodelaje de la ME; la cual se ve apoyada por la síntesis de metaloproteasas (MMP-11, MMP-10); por consecuencia los adipocitos que rodean a las células tumorales, mantienen un fenotipo parecido a los fibroblastos conocido como CAFs (adipocitos asociados a tumores); al analizar el procesos de adipogénesis se aprecia cómo se encuentran reprimidos los genes proadipogénicos como PPAR γ y C/EBP α ; reforzando así que los adipocitos presentan un fenotipo CAF; favoreciéndose así la expresión de genes oncogénicos. Finalmente, también se ve representada la respuesta del sistema inmune y como se sobre expresan los genes que principalmente son liberados por células reclutadas al reconocer una lesión en el organismo. Por tanto, existe un gran interés en comprender los mecanismos por los cuales los adipocitos contribuyen a la carcinogénesis, ya que la obesidad y trastornos metabólicos son enfermedades epidémicas.

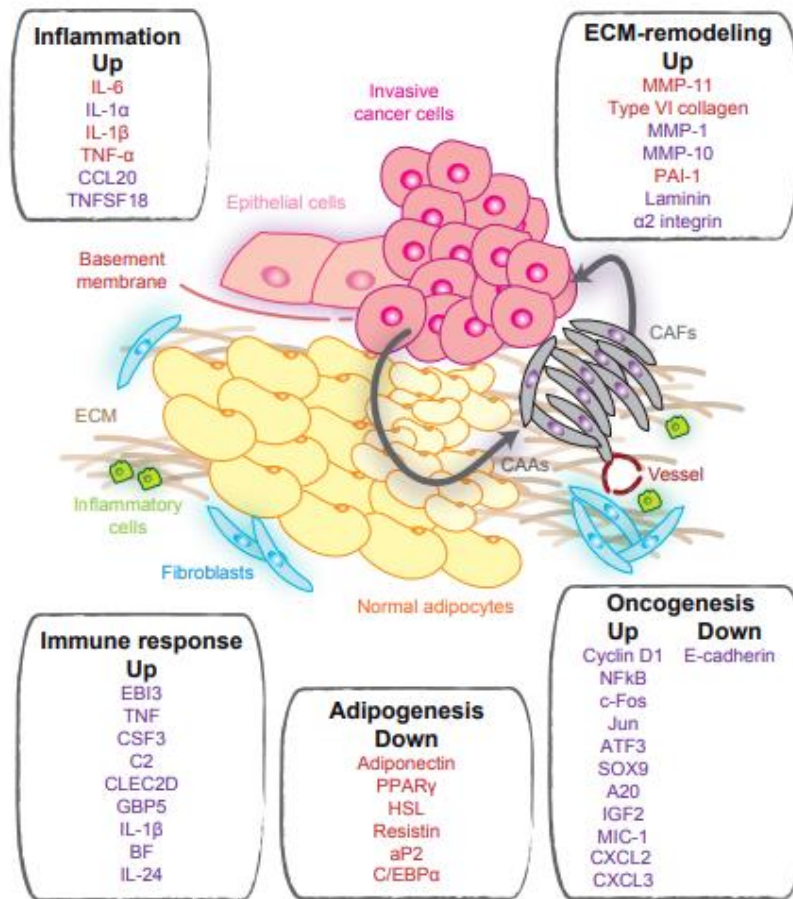


Fig. 6. La diafonía de células cancerosas con CAA. La orquesta se representa como un círculo vicioso que promueve la progresión del cáncer. Imagen tomada de Tan et al. 2011.

Los adipocitos son utilizados como combustible para las células tumorales y para ello sufren de cambios metabólicos los cuales no causan malignidad, pero son necesarios para la progresión del tumor. Como se conoce las células cancerosas proliferan rápidamente, por lo tanto, utilizan una alta tasa de consumo de energía, debido a esto es necesario mantener un suministro constante de lípidos y precursores de lípidos para alimentar la producción de membranas en la población de células cancerosas altamente proliferante. Los datos reportados han informado que las células epiteliales son capaces de utilizar FA secuestrados de los adipocitos de la almohadilla de grasa (Tan, et al. 2011).

En este caso las células tumorales inducen claramente la lipólisis en los adipocitos adyacentes produciendo la expresión y actividad de varias enzimas

implicadas en la vía lipogénica. Por ejemplo; los niveles elevados de la sintasa FASN, la principal enzima responsable de la biosíntesis de FA, se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Se observan aumentos tanto en la expresión como en la actividad de FASN en las primeras etapas de la oncogénesis y se correlacionan con la progresión del cáncer, así los tumores que sobreexpresan FASN presentan fenotipos más agresivos. La síntesis de FA regulada positivamente impulsa la biogénesis de la membrana en las células cancerosas que proliferan rápidamente y hace que los FA de la membrana estén más saturados. Esto afecta a los procesos celulares fundamentales, incluida la transducción de señales, la expresión génica y la capacidad de respuesta terapéutica (Zaidi et al. 2013).

3.2. Antecedentes particulares

3.2.1 Cultivos en 3D

El microambiente tumoral, incluida la ME y las células vecinas, son fundamentales para la forma y características del tumor. La ME es crítica para dirigir la tumorigénesis y metástasis. Aunque los modelos de cultivo bidimensionales (2D) se han empleado ampliamente para comprender los mecanismos de tumorigénesis en cáncer, en las últimas décadas estos modelos aún exhiben una visión limitada. La evidencia reportada muestra que se requieren modelos de cultivo tridimensionales (3D) fisiológicamente relevantes para comprender mejor la progresión del cáncer y desarrollar tratamientos más efectivos. Dichas plataformas incluyen arquitecturas específicas que comprende interacciones entre el estroma y las células cancerosas, las células del sistema inmune y las interacciones célula-matriz que se encuentran en el microambiente tumoral *in vivo*. Los cultivos en 3D para crecer las células tumorales *in vitro*, asemejan la arquitectura de la matriz extracelular que ocurre *in vivo* por lo que representan un mejor modelo de estudio (Belgodere *et al*, 2018).

Las células del microambiente tales como los adipocitos permiten la secreción de diversos factores como las adipocinas, leptina, autotaxina, interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y factor de crecimiento hepático

(HGF), los cuales inducen el aumento controlado de la mama. La transferencia de ácidos grasos para aumentar la β -oxidación mitocondrial, la remodelación de la matriz extracelular (ME) y la producción de endotropina a partir del colágeno tipo IV y los cambios en el fenotipo de fibroblastos asociados al cáncer han sido implicados como un proceso integral. Además, los adipocitos pueden actuar como obstáculos para la terapia, ya que están involucrados en mecanismos de resistencia contra diversos tratamientos contra el cáncer de mama (Wu et al. 2019).

La ME es el componente del tejido no celular que proporciona soporte estructural y bioquímico de las células circundantes como adhesión celular, la comunicación paracrina y señales de diferenciación. El mantenimiento de la ME compuesta por fibronectina y colágenos; involucra una variedad de tipos celulares, incluidos fibroblastos, macrófagos, adipocitos y pre-adipocitos. Es importante que la función y sobrevivencia de los adipocitos están estrechamente reguladas por la composición molecular y propiedades mecánicas de la ME. La hipertrofia rápida del adipocito durante el desarrollo de la obesidad puede provocar hipoxia regional intracelular, lo cual induce programas transcripcionales en adipocitos y otras células del estroma que conducen al depósito excesivo de componentes fibrilares de la ME (Cozzo et al. 2017).

3.2.2 Tipos de morfología de cultivos en 3D

Las células tumorales responden a la quimioterapia y otros factores como la sobrevivencia, el crecimiento y la metástasis de manera diferente en distintos microambientes. Se ha reportado que existen diferencias morfológicas y por lo tanto bioquímicas entre las células normales y malignas en 2D y 3D (Nelson y Bissell 2005). Además, se ha demostrado la plasticidad y la diversidad de las propias células malignas cuando crecen en cultivos 3D (Kenny et al. 2007). Existen cuatro clases morfológicas (redonda, en masa, racimo de uva y estrellado) distintas que muestran correlaciones con los patrones de expresión de genes y proteínas subyacentes (Fig. 7). La clase de células redondas incluye HCC1500, MCF-12A y S1. Estas líneas celulares forman colonias redondas en la parte superior de los cultivos en 3D, tienen núcleos que se

organizan de manera regular. La clase tipo masa formada por las líneas celulares BT-474, MCF-7 y T-47D, forman colonias, pero poseen núcleos desorganizados. La clase tipo Uva, formadas por las líneas celulares SK-BR-3, ZR-75-1 y ZR-75, forman colonias con malos contactos célula-célula y se distinguen por su apariencia de uva. Por último, la clase con forma estrellada, formada por las líneas celulares BT-549, Hs-578T, MDA-MB-231 y MDA-MB-436, se distingue por su fenotipo invasivo en cultivo 3D, con proyecciones estrelladas que a menudo unen múltiples colonias celulares, debido a su capacidad invasiva fue utilizada en el presente trabajo la línea Hs-578t (Kenny et al., 2007).

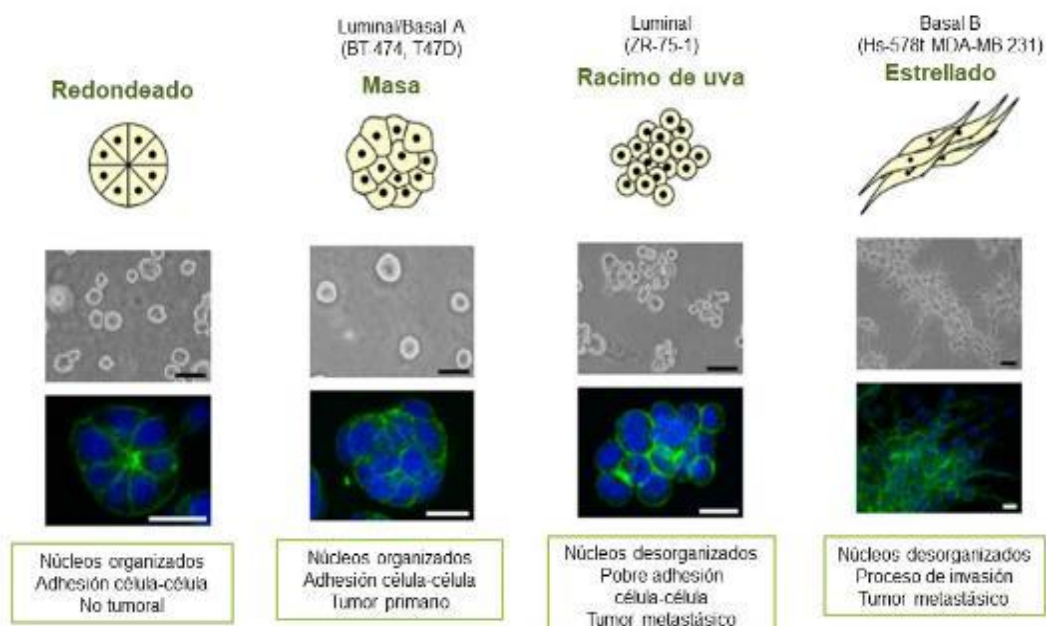


Fig. 7. Clasificación de las colonias de las líneas celulares de mama en cultivo 3D con base a su morfología. Tomada y modificada de Kenny et al, 2007.

3.2.3 Adipogénesis

La adipogénesis es un proceso complejo en donde los fibroblastos deben interrumpir su crecimiento y salir del ciclo celular previamente a su conversión terminal en adipocitos maduros. En este cambio también ocurren cambios cronológicos de expresión génica, adquiriendo genes característicos de adipocitos y reprimiendo aquellos que limiten la adipogénesis o no sean necesarios. Todos estos cambios de expresión y función conducen a la adquisición de un fenotipo terminal característico (Xu et al. 2017)

El proceso de diferenciación de fibroblastos a adipocitos se ha investigado ampliamente en varios modelos celulares de preadipocitos blanco como 3T3-L1; 3T3-F442A y líneas inmortalizadas de preadipocitos marrones; pero la más empleada y mejor descrita es la línea de murinos 3T3-L1. En la cual, se han reportado cuatro etapas en el proceso de transición (Fig. 8A)

i) Detención de la proliferación: inducida por la inhibición del contacto, que indica que se ha alcanzado la confluencia.

ii) Expansión clonal: inducida por señales hormonales y representada por algunas divisiones mitóticas destinadas a sincronizar el ciclo celular.

iii) Diferenciación temprana: en esta etapa se detiene la división celular, los genes característicos comienzan a expresarse y comienza la acumulación de lípidos.

iv) Diferenciación terminal: en esta etapa se hace presente la morfología típica de los adipocitos y se induce la transcripción de genes típicos de los adipocitos maduros.

La coordinación de estas etapas está bajo control de una compleja cascada transcripcional de factores reguladores donde el receptor nuclear PPAR γ y varios miembros de la familia de C/EBP factores de transcripción son esenciales para una diferenciación exitosa (Fig. 8B). Se sabe que PPAR γ es necesario para la diferenciación de adipocitos y también para el mantenimiento de la diferenciación. Se ha reportado que cuando este factor de transcripción es silenciado en adipocitos 3T3-L1 ya diferenciados, se induce la dediferenciación caracterizada por la pérdida de lípidos y expresión disminuida de marcadores de adipocitos maduros (Esteve Ràfols 2014).

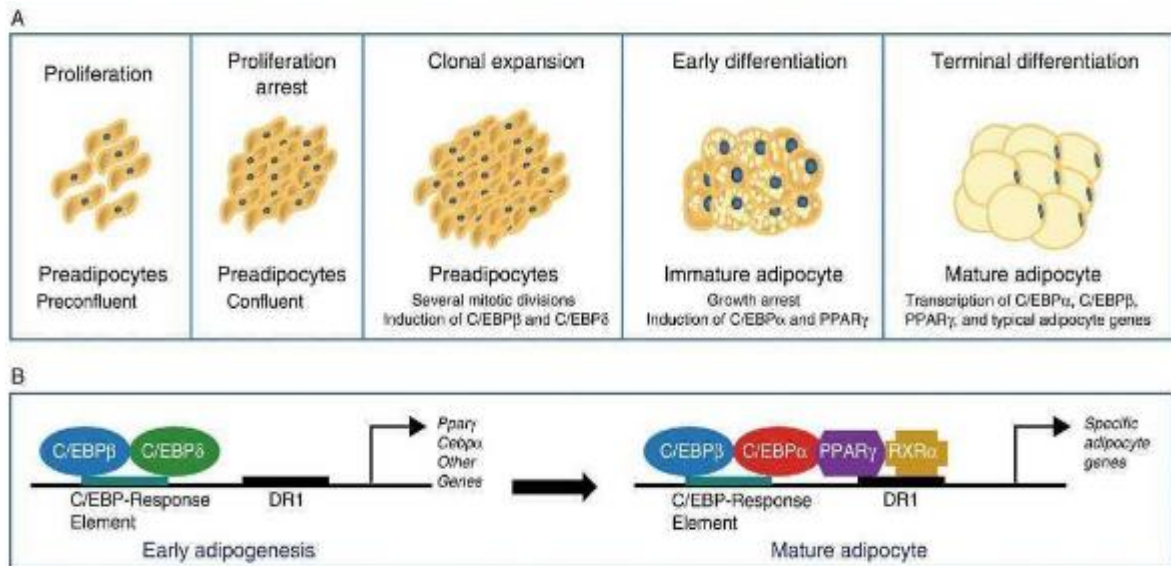


Fig. 8. Diferenciación de preadipocitos en adipocitos. (A) Esquema del proceso de transición de preadipocito a adipocito maduro incluyendo las diferentes etapas i) proliferación; ii) arresto de la diferenciación; iii) expansión clona; iv) diferenciación temprana y v) diferenciación terminal. (B) Modelo secuencial de control transcripcional durante la adipogénesis donde se muestran los genes más importantes en la adipogénesis como PPAR γ y C/EBP α . Imagen tomada de Esteve Ràfols 2014.

3.2.4 Estímulo hormonal en la diferenciación

Los preadipocitos son mantenidos en un estado indiferenciado por el factor del preadipocito PEF-1 que disminuye su expresión a lo largo del proceso de diferenciación. PEF-1 es una proteína transmembranal que contiene repeticiones en tándem similares al factor de crecimiento epidérmico; la cual reprime la maduración adipocítica cuando se activa al escindirse enzimáticamente en una forma soluble, estimulando la vía ERK lo cual incrementa la expresión del factor de transcripción Sox-9 un inhibidor de la adipogénesis.

Durante la fase inicial del proceso, los primeros factores de transcripción que se inducen de forma transitoria en respuesta a la estimulación hormonal son C/EBP β y C/EBP δ , que responde a IBMX y a la dexametasona respectivamente. El aumento de AMPc debido al IBMX produce la activación de la proteína quinasa A (PKA), que fosforila a la proteína de unión a CRE (CREB), permitiendo así su unión al elemento de respuesta a AMPc (CRE) del

promotor de C/EBP β y llevando a cabo su transcripción durante las primeras horas de la diferenciación. A pesar de que su expresión alcanza los máximos niveles durante las primeras horas, C/EBP β no adquiere su actividad hasta las 16-20 horas de haber comenzado el proceso de diferenciación. La actividad de C/EBP β está regulada mediante fosforilaciones secuenciales mediadas por ERK, Cdk2/Ciclina A y GSK3 β . La primera fosforilación en la Thr188 por acción de ERK y posteriormente por Cdk2/Ciclina A es necesaria para que la GSK3 β pueda fosforilar la Thr179 y la Ser184. Estas fosforilaciones inducen un cambio conformacional de C/EBP β que permite su dimerización a través de su dominio de cremallera de leucina C-terminal, facilitando la adquisición de su actividad de unión al DNA y de transcripción. Por su parte, la activación transcripcional de C/EBP δ se ve facilitada por la presencia de glucocorticoides y por el propio C/EBP β . Estos factores de transcripción, a su vez, son los responsables del inicio de la segunda fase mediante la activación de los factores de transcripción C/EBP α , PPAR γ y SREBP-1c, que se expresarán hasta el final del proceso de diferenciación.

La aparición de C/EBP α , PPAR γ y SREBP-1c permiten la expresión de la mayoría de los genes que confieren y mantienen el fenotipo adipocítico, como son la LPL, la FAS, la PEPCK y la ACC, enzimas implicadas en la lipogénesis de *novo*. Estos genes también aumentan la sensibilidad a insulina, debido al incremento de los receptores de insulina y de los transportadores de glucosa dependientes de insulina como el GLUT4. También se expresan otros genes y productos específicos de adipocitos como la translocasa de ácido graso CD36/FAT, la proteína de unión a ácido graso FABP4/aP2 y proteínas asociadas a las gotas lipídicas, como las proteínas perilipina, ADRP y TIP47, conocidas como la familia PAT. Debido a la expresión de estos genes, en el citoplasma de la célula van apareciendo gotas lipídicas que a lo largo del tiempo irán incrementando y fusionándose hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocuparán gran parte del citoplasma (Peña M, 2014).

Finalmente, C/EBP α y PPAR γ coregulan su expresión durante la diferenciación adipocítica y C/EBP α , además, mantiene su expresión por autoactivación durante la adipogénesis. SREBP-1c también actúa durante la diferenciación adipocítica regulando PPAR γ , activando tanto su transcripción

por interacción directa con elementos de respuesta en su promotor, produciendo ligandos de PPAR γ que aumentan su acción (Fig.9).

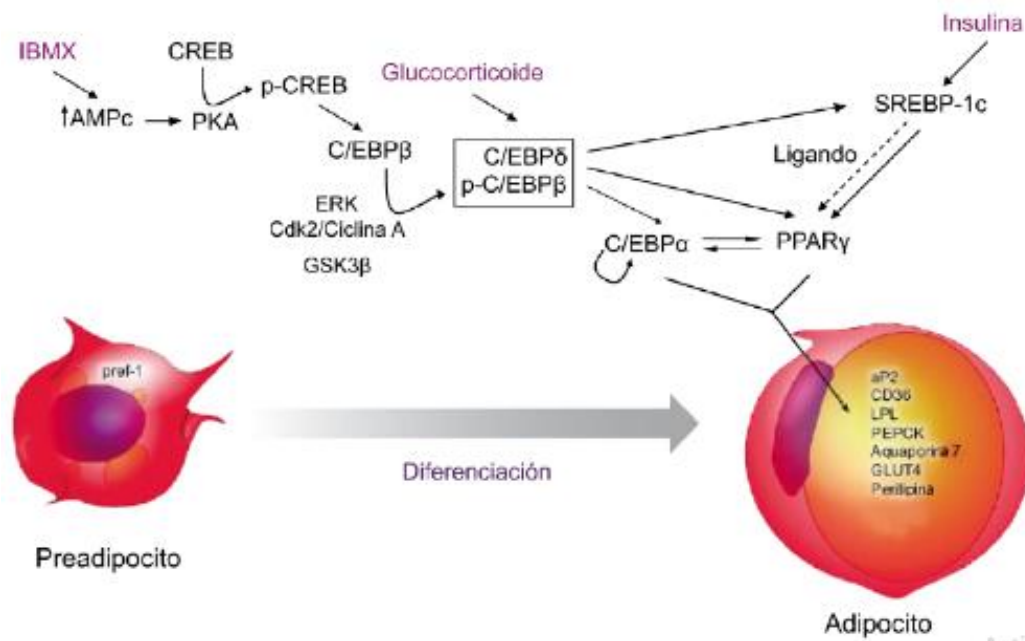


Fig. 9. Control transcripcional durante la adipogénesis en respuesta al estímulo hormonal. Tomado de Peña M, 2014.

4. HIPÓTESIS

Si los adipocitos y el microambiente de cultivo en 3D poseen una importancia funcional en el cáncer, entonces esperamos que al cocultivar adipocitos con las células Hs-578t de cáncer de mama triple negativo se active la expresión diferencial de proteínas involucradas en hallmarks del cáncer.

5. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. Debido a que se conoce poco acerca de la función de los adipocitos en la progresión del cáncer, nos enfocaremos en el estudio del efecto de los adipocitos en el perfil proteómico de las células Hs-578t de cáncer de mama en un sistema de cultivo en 3D, lo cual nos permitirá evaluar el efecto del microambiente tumoral en la expresión global de proteínas relacionadas a los hallmarks del cáncer de mama.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Analizar el efecto de los adipocitos en el perfil proteómico de las células Hs-578t de cáncer de mama cultivadas en 3D.

6.2 Objetivos particulares

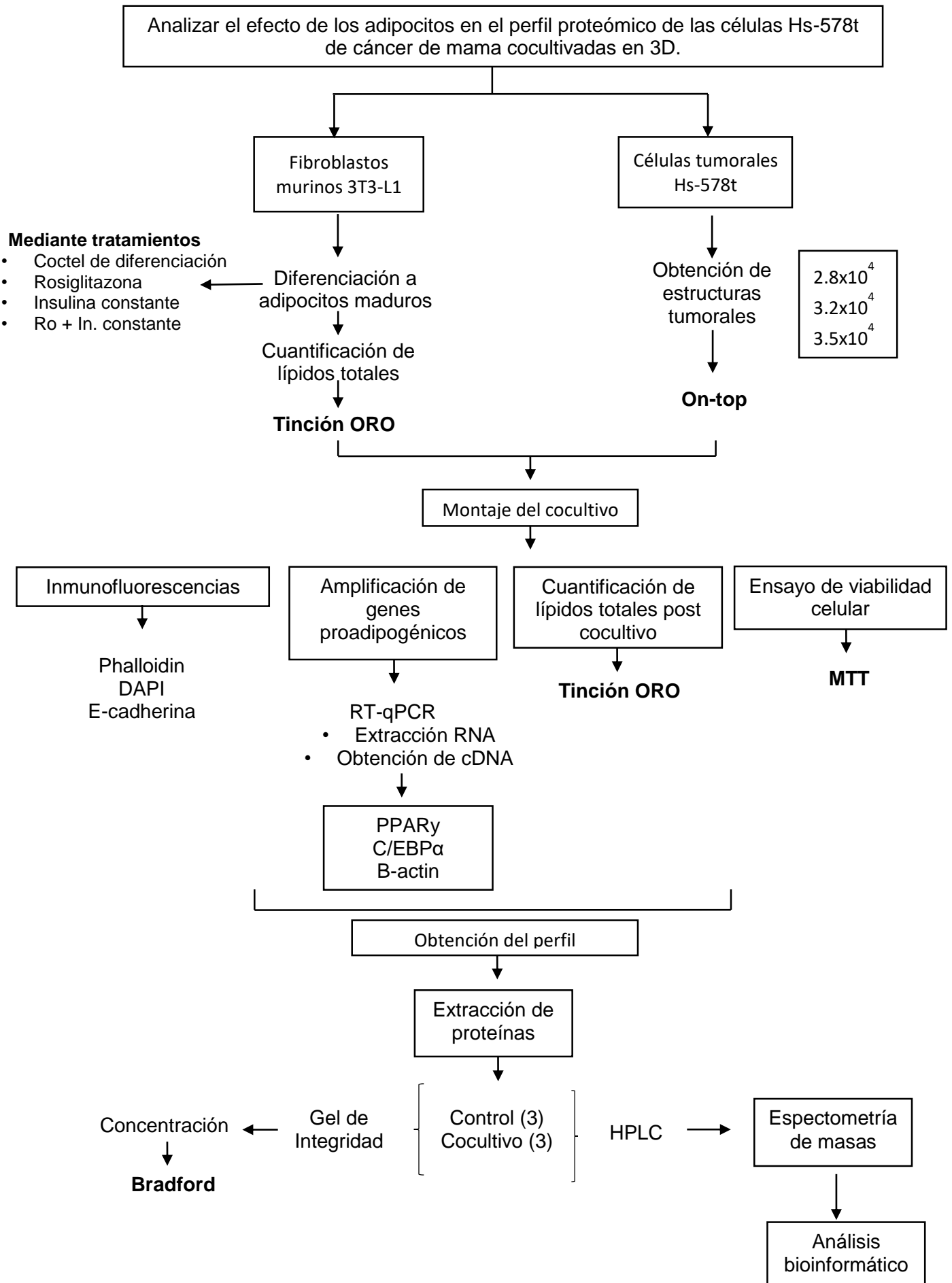
6.2.1. Establecer el cocultivo de las células tumorales Hs-578t en 3D tipo organoides con los adipocitos murinos 3T3-L1.

6.2.2. Evaluar si el cocultivo con adipocitos modifica el perfil proteómico de las células tumorales Hs-578t crecidas en cultivos 3D tipo organoides.

6.2.3. Identificar las rutas de señalización y procesos celulares en las cuales participan las proteínas moduladas las células Hs-578t crecidas en cultivos 3D.

6.2.4. Elaborar un modelo de regulación de los hallmarks del cáncer de mama con base en las proteínas moduladas en el modelo adipocitos-células tumorales crecidas en 3D.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Mantenimiento de la línea celular

La línea celular adherente de cáncer de mama Hs-578t (ATCC: ATCC® HTB-126™), se cultivó en medio Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 % (Gibco, Life Technologies), penicilina y estreptomycin (0.5 %). Se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Para el mantenimiento de la línea celular, primero se removió el medio de cultivo y se realizó un lavado a las células con Buffer fosfato salino (PBS 1X) a pH 7.0. Posteriormente para la división del cultivo se retiró el PBS y se agregó PBS 1X-EDTA pH 7.0; 6.8 mM, luego se colocó tripsina 0.25 % (Gibco) 64 µL por cada 1.5 mL de PBS-EDTA (1%); se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios y se incubó durante 5 min a 37°C. Una vez transcurridos los 5 min de incubación con tripsina se visualizó en microscopio para observar si se despegaron las células. Consecutivamente, se le agregó 1 mL de medio DMEM y se mezcló por pipeteo sobre toda la superficie, se transfirieron las células despegadas a un tubo falcón de 15 mL y se centrifugó a 1500 r.p.m por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 1 mL de medio de cultivo suplementado y se distribuyó en cajas nuevas y estériles de 25 cm² con 5mL de DMEM/F-12 suplementado.

8.2 Mantenimiento de fibroblasto 3T3-L1

La línea celular de fibroblastos murinos 3T3-L1 (ATCC-CL-173) se cultivó en botella de cultivo de 75 cm² con **medio de proliferación** compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alto en glucosa y con L-glutamina (ATCC-30-2002) suplementado con suero de ternera recién nacida (NBCS) al 10% V/V (Gibco, Life Technologies), L-Glutamina [200 mM] 1% V/V (gibco-25030), aminoácidos no esenciales 1% V/V (sigma M7145), piruvato de sodio [100 mM] 1% V/V (gibco-11360), finalmente penicilina y estreptomycin al 1% V/V. Las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂.

8.3 Diferenciación y mantenimiento de adipocitos maduros

Una vez obtenida la confluencia óptima en las botellas de cultivo anteriormente descritas, los fibroblastos se sembraron en placas de 6 pozos con una densidad de 5×10^4 células/pozo en **medio de proliferación** a 37°C y 5% de CO₂; hasta que se obtuvo una confluencia del 80% en los pozos, posteriormente, se adicionó el **medio de diferenciación I** (Día 0), compuesto por medio DMEM (ATCC-30-2002) suplementado con SFB al 10% V/V (Gibco, Life Technologies), L-Glutamina [200 mM] 1% V/V (gibco 25030), aminoácidos no esenciales 1% V/V (sigma M7145), piruvato de sodio [100 mM] 1% V/V (gibco-11360) y con antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1% V/V) más un coctel de diferenciación compuesto por 0.5 mM de Isobutil-Metil-Xantina [IBMX] (sigma-I5879) , 0.25 µM de Dexametasona [DEX] (sigma-D4902) y 1.5 µl/ml de insulina Novolin [0.2 UI]. Al tercer día se realizó un cambio de medio adicionando **medio de diferenciación II**, que contenía, medio DMEM suplementado con SFB al 10% V/V (Gibco, Life Technologies), L-Glutamina [200 mM] 1% V/V (gibco-25030), aminoácidos no esenciales 1% V/V (sigma M7145), piruvato de sodio [100 mM] 1% V/V (gibco11360), con antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1% V/V) y 1 µL/ml de insulina Novolin [0.1 UI] por dos días. Posteriormente se realizó un cambio de medio a **medio basal** con DMEM suplementado con SFB al 10% V/V (Gibco, Life Technologies), L-Glutamina [200 mM] 1% V/V (gibco-25030), aminoácidos no esenciales 1% V/V (sigma M7145), piruvato de sodio [100 mM] 1% V/V (gibco-11360), con antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1% V/V), este medio se cambió cada dos días hasta observar la diferenciación y obtener adipocitos maduros.

Tabla 4. Medios y su contenido utilizado para la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos maduros.

Nombre	Contenido
Medio de proliferación	DMEM NBCS 10% Antibiótico 1%
Medio basal	DMEM SFB 10% Antibiótico 1%
Medio de diferenciación I	Medio basal IBMX 0.5mM Insulina 0.2 Ui. Dexametasona 0.25µM Rosiglitazona* 2 µM
Medio de diferenciación II	Medio basal Insulina 0.1 Ui.

8.4 Extracción de RNA y cuantificación

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos una vez diferenciadas a adipocitos maduros se adicionaron 500 µL de Trizol ® Reagent (Ambion) a cada pozo, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se recuperó la suspensión celular en un tubo de 1.5 mL incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 300 µL de cloroformo y se mezcló por inversión de 3 a 5 veces, se incubó cada tubo por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm y 4°C por 3 minutos, se recuperó la fase acuosa sin tocar la interfase en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL, a este se le adicionaron 800 µL de isopropanol para precipitar el RNA y se mezcló por inversión de 3 a 5 veces, se incubó cada tubo por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm y 4°C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 75% dos veces, la pastilla se dejó secar en un lapso de 5 a 10 minutos, a la pastilla seca se le adicionaron 50 µL de agua libre de nucleasas a 55°C, se dejó incubando por 3 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en la misma agua. Se

cuantificó el RNA obtenido por espectrofotometría en equipo nanodrop y se analizó su calidad e integridad corriendo 1 µg de cada muestra por electroforesis en gel de agarosa/TAE al 1%.

8.5 Obtención de cDNA

Se usó un kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.) y 10 unidades de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems) para convertir el RNA total en cDNA de acuerdo con el protocolo del fabricante.

8.6 Amplificación de genes proadipogénicos

Tabla 5. Genes y secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR.

Gen	Secuencia
PPARγ	5' -TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3' 5' -AATCCTTGGCCC<TCTGAGAT-3'
C/EBPα	5' -TTGAAGCACAATCGATCCATCC-3' 5' -GCACACTGCCATTGCACAAG-3'
B-actin	5' -CCACAGCTGAGAGGGAAATC-3' 5' -AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'

8.7 Tinción Oil Red O

Transcurridos 14 días a partir del día 0, se decantó el **medio basal** (DMEM; SFB 10% y Antibiótico 5%); en la placa de 6 pozos en donde se encontraban diferenciándose los adipocitos, posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X a pH 7.0 y después se fijaron los pozos con formaldehído al 3.7% y con PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente (TA). Una vez terminado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X pH 7.0. Se adicionó 1 mL de colorante ORO-60% Isopropanol/PBS 1X (1.2 mg de ORO/ml de solución isopropanol 60%-PBS 1X) por pozo y se dejó incubando por 15 minutos a TA

homogeneizando ocasionalmente. Posteriormente, se descartó el colorante ORO y se retirará el exceso adicionando 500 μ l de etanol 70%-PBS 1X; finalmente se observó el resultado con ayuda de un microscopio óptico.

8.8 Cuantificación de lípidos

Una vez observado el resultado se retiró el etanol-PBS 1X y se recuperó el colorante adherido a los lípidos adicionando 1 mL de isopropanol puro a cada pozo adicionando el colorante recuperado a un tubo de 1.5 ml para cada condición. Se adicionaron 100 μ L por pozo del colorante de cada tubo en una placa de 96 pozos con el propósito de cuantificar la acumulación de lípidos por espectrofotometría; la absorbancia de la muestra fue determinada a una longitud de onda de 510 nm.

8.9 Obtención de estructuras tumorales de la línea celular Hs-578t en 3D

Para la obtención de los esferoides de la línea celular de cáncer de mama Hs-578t en 3D se utilizaron células cultivadas como se describió anteriormente en el mantenimiento celular. Posteriormente en una placa de 96 pozos Corning™ se colocaron 15 μ L de Matrigel, BD Biosciences or Cultrex BME, Trevigen, se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Después del tiempo transcurrido se colocó 3.2×10^4 de células / cm^2 y se dejó reposar 30 minutos a 37°C sin dar movimientos giratorios. Después se colocó la placa en hielo y se colocó Matrigel, BD Biosciences or Cultrex BME, Trevigen al 10% V/V con DMEM/F-12 (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 % (Gibco, Life Technologies), penicilina y estreptomicina (0.5 %). Se mantuvo el cultivo durante 4 días reemplazando el medio cada 2 días.

8.10 Inmunofluorescencia de estructuras tumorales en 3D

Para llevar a cabo las inmunofluorescencias se realizó un cultivo celular en una placa de 24 pozos Corning™ en donde se colocaron 80 μ l de Matrigel, BD Biosciences or Cultrex BME, Trevigen, sobre un cubreobjetos colocado en los pozos de la placa y se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Después del periodo de incubación y al visualizar las estructuras tumorales esperadas

en el 3 día se colocaron los cubreobjetos en la placa de los adipocitos diferenciados dejando incubar por 48 horas. Posteriormente se fijaron las células con formaldehído 4% durante 15 min a TA. Transcurrido el tiempo se lavó con PBS 1X previamente filtrado y se agregó Triton-100X al 0.1% y se dejó reposar por 5 min a TA; después se añadió Rhodamine Phalloidin; Invitrogen 1X, se dejó incubar 60 min a TA y se lavó de 2-3 veces con PBS 1X. A continuación, se colocó DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride); Sigma-Aldrich y se dejó incubar durante 5 min y el anticuerpo E-Cadherina Santa Cruz Biotechnology, después se realizaron tres lavados con PBS-1X. Ya lavado se agregó VECTASHIEL Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, H-1200) a (1:2000) se dejó reposar 5 min y finalmente se montó en el portaobjetos.

8.11 Cocultivo de células Hs-578t con los adipocitos en 3D

Los experimentos de cocultivo se realizaron en un sistema transwell (tamaño de poro de 8.0 μm , de 24 pozos con 12 insertos de membrana de poliéster (PET); Corning Life Sciences, Lowell, MA, EE. UU). Se diferenciaron los adipocitos en el sistema transwell en la parte inferior, y posteriormente se colocó el inserto y ahí se colocaron las células cancerosas Hs-578t en esferoides utilizando el protocolo descrito anteriormente; se dejó el cocultivo durante 48 h.

8.12 Obtención de extractos proteicos totales

El extracto proteico total de la línea celular de cáncer de mama Hs-578t fue obtenido en cocultivo con adipocitos maduros (n=3) y sin adipocitos (n=3). Se removió el medio de cultivo y posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X pH 7.0, después se les colocó PBS 1X-EDTA 6.8mM a pH 7.0 y se adicionaron 64 μL de tripsina por cada 1.5 mL de buffer salino, la solución se distribuyó en las células con movimientos oscilatorios suaves y se incubó por 5 minutos a 37°C; posteriormente se observó la botella del cultivo en el microscopio óptico y se le dieron golpes suaves al cultivo hasta observar la solución turbia, después se le adicionó 1 mL de medio de cultivo suplementado y se mezcló por pipeteo. Se recuperó la solución en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la

pastilla fue resuspendida en 450 μ L de buffer de lisis TNTE (Tris-HCl 50 mM a pH de 7.4, NaCl 150 mM. Tritón X-100 al 0.1 %, EDTA 1 mM) suplementado con 50 μ L de Complete Protease Inhibitor Cocktail 10X (Roche), la mezcla se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se dio vortex por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12,500 r.p.m. durante 10 minutos y 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y estéril de 1.5 mL

8.13 Cuantificación de proteínas totales y digestión enzimática

La cantidad de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford, para ello se realizó una curva estándar con solución de BSA (1 mg/mL), la curva se leyó en un espectrofotómetro a una λ de 595 nm, y los resultados se graficaron determinando el coeficiente de correlación lineal. Los resultados de absorbancia de las muestras fueron obtenidos por interpolación mediante la sustitución en la ecuación de la recta ($y= mx+b$) obtenida de los datos de la curva estándar sustituyendo los valores de y como los datos de la absorbancia de la muestra a 595 nm y x como la concentración de proteína. Obtenidos 50 μ g de proteína para cada condición, finalmente se les adicionó tripsina a ambos extractos para la obtención de péptidos.

8.14 Electroforesis de proteínas desnaturalizadas

Para la electroforesis se elaboró un gel de poliacrilamida con las siguientes condiciones

Tabla 6. Componentes empleados para la preparación de los geles para el corrimiento electroforético de las proteínas.

Gel de resolución pH 8.8 al 10%		Gel separador pH 6.8 al 3%	
H₂O	4 ml	H ₂ O	1.4 ml
Acrilamida	3.3 ml	Acrilamida	1.5 ml
Tris-HCL pH 8.8	2.5 ml	Tris-HCL pH 6.8	50 μ l
SDS	100 μ l	SDS	500 μ l
PSA 10%	50 μ l	PSA 10%	50 μ l
TEMED	50 μ l	TEMED	1.5 μ l
Volúmen final=	10 ml	Volúmen final=	5 ml

Una vez polimerizado se cargó en el primer carril 3 μL Dual color Standards; BIO-RAD y en los siguientes dos carriles 50 μL de muestra con Buffer de Corrida 5X. Las muestras antes de cargar ebulleron a 100°C durante 5 min. El soporte de los geles se colocó dentro de la cámara de corrida; se añadió buffer de corrida (SDS). Finalmente se dejó correr el gel a 120 V durante 40 minutos aproximadamente. Al finalizar el tiempo el gel se colocó Azul de Coomassie (0.05%p/v) en agitación constante (R-250) durante 1 hora aproximadamente. Transcurrido el tiempo se realizaron 2 lavados con la solución desteñidora compuesta de (50% metanol, 10% de ácido acético y 40% de agua destilada) se dejó reposar 30 min entre cada lavado y finalmente se observó el gel obtenido.

8.15 Ensayo de viabilidad celular

Se sembraron las células en una placa de 96 pozos, una vez alcanzada la confluencia del 80%; se retiró el medio y se lavaron con PBS-1X. Posteriormente se añadieron 100 μL de MTT por pozo y se dejó incubar durante 3 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μL de isopropanol puro para hidrolizar los cristales y se llevó al espectrofotómetro para leer a una longitud de onda de 570 nm.

8.16 Obtención del perfil proteómico mediante Label-Free

Los péptidos resultantes se inyectaron en un espectrómetro de masas Synapt G2-S i (Waters, Milford, MA) en MS^E para calcular el AUC (área bajo la curva) del cromatograma de iones totales (TIC); y así se normalizó la inyección en el nanoUPLC. Se cargó la misma cantidad de péptidos trípticos en cada condición en la precolumna Symmetry C18 Trap V/M (180 μm X 20 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 5 μm) y se desaló usando ácido fórmico (FA) al 0,1% en H₂O como fase móvil A, y 0.1% FA en ACN como fase móvil B, bajo el siguiente gradiente isocrático: 99.9% de fase móvil A y 0.1% de fase móvil B a un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$ durante 3 min. Posteriormente, los péptidos se cargaron y se separaron en una columna HSS T3 C18 (75 μm X 150 mm, tamaño de poro 100 Å, tamaño de partícula 1,8 μm), utilizando una clase M de UPLC ACQUITY con las mismas fases

móviles bajo el siguiente gradiente: 0 min. 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 a 126.46 min 85% B, 129 a 130 min 7% B, a un flujo de 400 nl. min⁻¹ y 45 ° C. Los datos del espectro se adquirieron en un espectrómetro de masas con ESI y Synapt G2-S i de separación de movilidad iónica (IMS), utilizando el enfoque de adquisición independiente de datos (DIA) a través del modo HDMS^E (Waters). La página de sintonización para la fuente de ionización se configuró con los siguientes parámetros: 2,75 kV en la muestra capilar, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el desplazamiento de la fuente, 70°C para la temperatura de la fuente, 0,5 Bar para el gas de nanoflujo y 150 Lh⁻¹ para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modo positivo en un rango de m / z 50–2000 con un tiempo de exploración de 500 ms. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que, para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en la transferencia utilizando una rampa de energía de colisión de 19–55 V. Los archivos generados * .raw se analizaron con el software DriftScope v2.8 (Aguas) para aplicar selectivamente energías de colisión casi específicas basadas en el tiempo de deriva para cada péptido detectado en el espectrómetro de masas. Se generó un archivo * .rul el cuál se usó para aplicar energía de colisión específica para cada péptido detectado en el modo UDMS^E (en lugar de una rampa lineal como en el HDMS^E modo). Con las mismas condiciones cromatográficas y fuente utilizadas en el modo HDMS^E, se inyectaron los péptidos en triplicado para cada condición, por lo cual se aplicó el modo UDMS^E.

8.17 Análisis de datos de espectrometría de masas

Las intensidades MS y MS / MS contenidas en los archivos * .raw generados se normalizaron, alinearon, compararon y cuantificaron relativamente usando Progenesis QI para el software Proteomics v3.0.3 (Waters) contra un *Rattus norvegicus** Base de datos .fasta (descargada de UniProt, 29971 secuencias de proteínas, modificada por última vez el 1 de diciembre de 2017), concatenada con su base de datos invertida. Para la identificación de proteínas fueron digeridas y se permitió una escisión perdida; carbamidometilo (C) como modificación fija y oxidación (M), amidación (C-terminal),

desamidación (Q, N) o fosforilación (S, T, Y) como modificaciones variables; la tolerancia de péptidos y fragmentos se estableció en automático, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por péptido: 2, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por proteína: 5, coincidencias mínimas de péptidos por proteína: 1 y tasa de descubrimiento falso $\leq 4\%$. Synapt G2-S *i* fue calibrado con [Glu1] -fibrinopeptido, $[M+ 2H]^{2+}=785.84261$ a ≤ 1 ppm. Los resultados generados por Progenesis Software se exportaron a archivos * .xlsx para verificar dos niveles de control de calidad de datos para experimentos sin etiquetas (nivel de péptido y proteína) de acuerdo con las cifras de mérito (FOM) descritas, todas las proteínas consideradas con el fenotipo troncal presentaron al menos una relación ± 1.2 (expresada como un logaritmo de base 2); significa que estas proteínas tuvieron al menos ± 2.29 interacciones de cambio de pliegue absoluto (disminuidas o aumentadas), en CSC de cáncer de mama con adipocitos. La relación se calculó dividiendo la respuesta de señal de MS promedio de los tres péptidos trípticos más intensos (Hi3) de cada proteína bien caracterizada en los experimentos MetS por el Hi3 de cada proteína en los ensayos de control.

8.18 Análisis bioinformático de los datos

Para el análisis bioinformático ontológico y de enriquecimiento funcional se utilizó el software PHANTER; las proteínas se clasificaron según el proceso biológico relacionado y su función molecular basada en la base de datos GO como guía. Para conocer las vías de señalización en las que participaban las proteínas expresadas diferencialmente se empleó el software DAVID; el cual con la herramienta KEGG se mostraron las vías implicadas en las que participaron. Para saber la relación de las proteínas entre sí se usó la base de datos Cytoscape que se basa en un análisis directo y representación de redes utilizando pruebas hipergeométricas; finalmente se realizó un modelo biológico el cual señala los procesos implicados en ambas estirpes celulares al encontrarse en cocultivo.

9 RESULTADOS

9.1 Diferenciación de fibroblastos murinos 3T3-L1 a adipocitos maduros

Para iniciar el estudio del papel de los adipocitos en la regulación de la expresión de proteínas de las células tumorales Hs-578t crecidas sobre matrigel en cultivos en 3D, procedimos primeramente a establecer el mantenimiento de los fibroblastos 3T3-L1; durante el mantenimiento del cultivo celular se observó que las células desarrollan una morfología fusiforme; es decir, con forma alargada, elipsoide con las extremidades más estrechas que el centro; como se observa en la Fig.10. Estas células son características de desarrollar prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser delgadas y alargadas o ramificadas; debido a esto los fibroblastos pueden estar en contacto unos con otros por uniones tipo nexo o por contactos físicos simples, utilizando la ME como intermediaria. En conclusión, este tipo celular es característico por desarrollar extensiones citoplasmáticas alargadas para mantenerse en contacto con células aledañas.

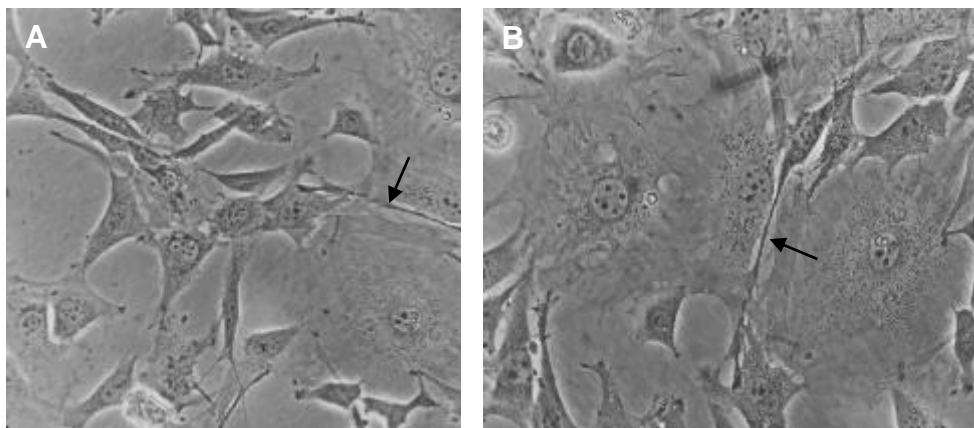


Fig. 10. (A y B). Cultivo de los fibroblastos murinos 3T3-L1 en donde se observa su morfología fusiforme en confluencia del 80%. Con flechas negras se indican las extensiones citoplasmáticas. Imágenes tomadas en microscopio óptico 40X.

Posteriormente proseguimos a establecer el protocolo de diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a un linaje de adipocitos maduro con un tratamiento eficiente que pudiera simular un ambiente obesogénico. Para ello, se realizaron cuatro tratamientos a los fibroblastos, además del control: i) coctel de diferenciación, ii) insulina, iii) rosiglitazona y iv) rosiglitazona más insulina; los cuales se describen en la Tabla 7; por un periodo de 11 días durante el cual se documentaron los cambios morfológicos de las células cada 3 días mediante microscopio óptico Fig. 11.

Tabla 7. Componentes de los tratamientos empleados en la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos maduros.

TRATAMIENTO	CONTENIDO
CONTROL	Medio basal*
COCTEL DE DIFERENCIACIÓN	IBMX 0.5mM Insulina 1.5 µM Dexametasona 0.25µM
INSULINA	IBMX 0.5mM Insulina 1.5 µM** Dexametasona 0.25µM
ROSIGLITAZONA	IBMX 0.5mM Insulina 1.5 µM Dexametasona 0.25µM Rosiglitazona 2 µM***
ROSIGLITAZONA MAS INSULINA	IBMX 0.5mM Insulina 1.5 µM** Dexametasona 0.25µM Rosiglitazona 2 µM***

* Como se describe en la Tabla 4.

** La aplicación de la insulina fue de manera contante durante los 11 días de diferenciación.

*** La rosiglitazona, fue administrada con un solo pulso en el día 0-3.

Los resultados muestran que al adicionar tratamientos adicionales con el coctel de diferenciación se induce una diferenciación más acelerada. El control se mantuvo con medio basal (DMEM; SFB 10% y antibióticos 1%) durante los 11 días de la diferenciación.

Cuando se les adicionó el **coctel de diferenciación** en el día 3 se pudo apreciar que las células se comenzaron a ensanchar (como se indica con la línea roja). En el día 5 las células ya presentaban vacuolas en el citoplasma y en el día 7 fue cuando se comenzaron a apreciar gotas lipídicas en el interior del fibroblasto. Posteriormente estas gotas lipídicas fueron creciendo de tamaño y de número (señaladas con flecha verde). Al finalizar en el día 11 se aprecia que las células diferenciadas tenían un gran tamaño y una gran cantidad de lípidos en el interior.

Cuando se le añadió **insulina** como tratamiento adicional se pudo apreciar que el cultivo que en el día 3 se presentaban grandes espacios intracelulares en comparación con el control (señalados con un asterisco azul); y los fibroblastos se mostraban alargados con grandes extensiones citoplasmáticas (señaladas con flecha amarilla). Durante el día 5 y 7 las células agrandaron su tamaño y en el día 9 se comenzaron a apreciar las gotas lipídicas. Al finalizar el tratamiento en el día 11 se apreciaron numerosas gotas lipídicas en comparación con la diferenciación solo con coctel de diferenciación.

Con el tratamiento con **rosiglitazona** se apreció que en los cultivos se desarrollaron espacios intracelulares (los cuales están señalados con un asterisco azul) pero en comparación con los tratamientos descritos anteriormente en el día 5 ya se podían apreciar adipocitos diferenciados con numerosos lípidos en el citoplasma. Esta diferenciación siguió en el transcurso de los días 7 y 9. En el día 11 el tratamiento mostró una eficiencia de diferenciación del 80% aproximadamente en comparación con los demás tratamientos (Fig. 12).

Cuando se administró **rosiglitazona más insulina** se apreció que se había espacios intracelulares en el cultivo con fibroblastos alargados en el día 3. Ya en el día 5 los fibroblastos murinos 3T3-L1 comenzaron a acumular lípidos en

su interior como se señala en la Fig.11 con flechas verdes. A partir del día 7 ya se apreciaban adipocitos aparentemente maduros con gotas lipídicas en su interior. Cabe resaltar que en comparación con los otros tratamientos la diferenciación fue más rápida y con un porcentaje de diferenciación del 90% aproximadamente, siendo el más alto en comparación con los demás tratamientos.

Estos datos demuestran que la rosiglitazona mas la insulina constante fue el tratamiento más efectivo en la inducción de la diferenciación de los fibroblastos murinos 3T3-L1 y fueron los que acumularon más gotas lipídicas en su interior y de mayor tamaño. Por lo cual éste fue el tratamiento elegido para los siguientes ensayos.

Coctel de diferenciación

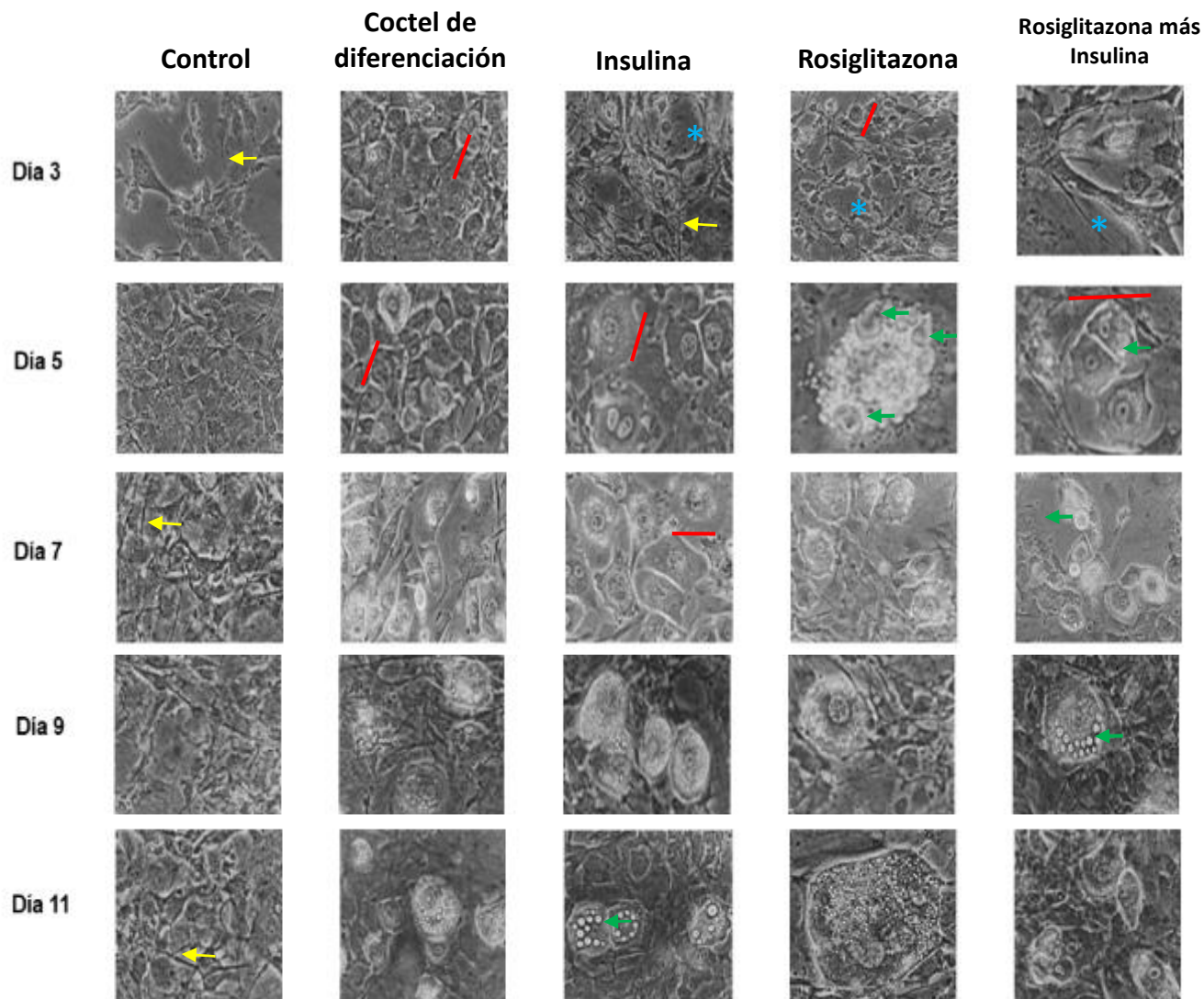


Fig. 11. Cronología de la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos maduros durante 11 días con cuatro tratamientos diferentes. Con una línea roja se señalan las células ensanchadas. Con flechas amarillas se señalan las extensiones citoplasmáticas de los fibroblastos. Con asterisco azul se señalan los espacios intracelulares y con flechas verdes se señalan las gotas lipídicas. Imágenes tomadas en microscopio óptico 40X

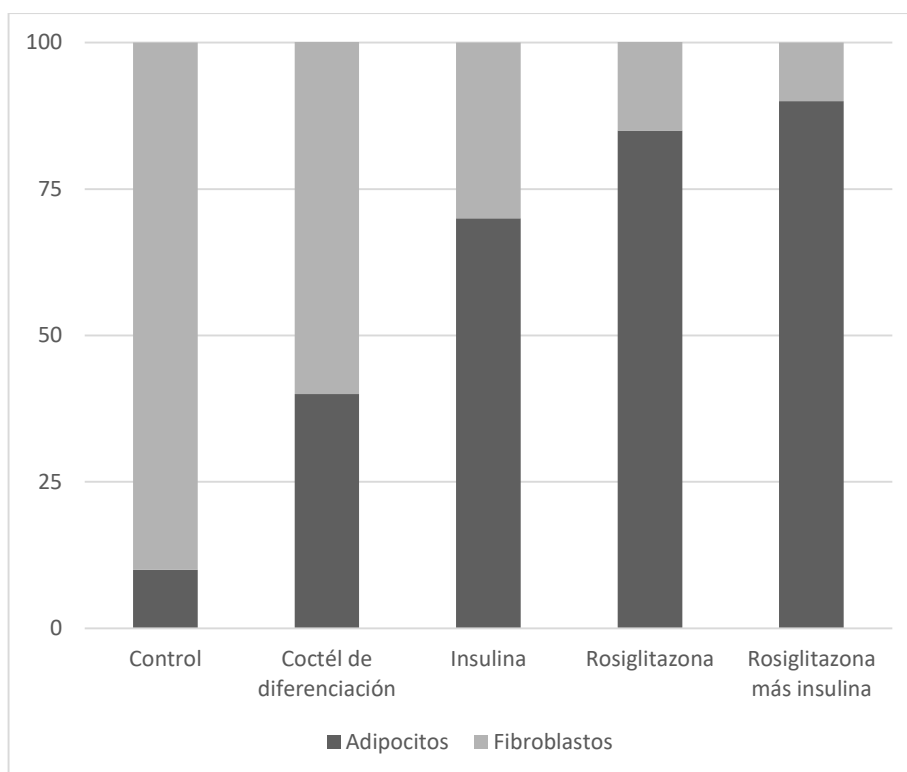


Fig. 12. Eficiencia de diferenciación en porcentaje de los tratamientos utilizados para establecer el protocolo de adipogénesis de los fibroblastos murinos 3T3-L1 a adipocitos maduros.

9.2 Cuantificación de lípidos en adipocitos maduros

Para poder cuantificar los lípidos almacenados por los fibroblastos murinos 3T3-L1 después de 11 días de diferenciación con cuatro tratamientos los cuales se describen en la Tabla 7. Se realizó la técnica de tinción Red-Oil-O (ORO); la cual evidencia las grasas neutras en una coloración rojiza al unirse el colorante ORO; este es un tinte diazo lisocromo con propiedades hidrofóbicas debido a esta propiedad se une a las grasas neutras o lípidos intracelulares. La tinción fue analizada mediante microscopio óptico como se muestra en la Fig. 13. Los resultados obtenidos nos muestran que la línea celular 3T3-L1 al mantenerla con medio basal hay una adipogénesis del 10% como se indica en la Fig. 12. Cuando se usó el coctel de diferenciación sin algún tratamiento adicional se pudo apreciar que los adipocitos maduros aumentaron su tamaño y almacenaron una mayor cantidad de lípidos en

comparación con el control. Por el contrario, se puede apreciar que con el tratamiento de insulina los adipocitos maduros son de menor tamaño y con vesículas lipídicas pequeñas; aunque se apreció en el cultivo un 70% aproximadamente de adipocitos maduros. Cuando se analizó la tinción del tratamiento con rosiglitazona se observó que las gotas lipídicas eran de mayor tamaño y más numerosas en comparación con el tratamiento anterior descrito. Finalmente, cuando se empleó la rosiglitazona mas la insulina las gotas lipídicas se evidenciaron en mayor cantidad en comparación con los demás tratamientos. Una vez al obtener una tinción efectiva se prosiguió a cuantificar los pixeles en rojo de las imágenes obtenidas del microscopio óptico.



Fig. 13. Tinción Red-Oil-O de los adipocitos 3T3-L1 en presencia de diferentes tratamientos. A) Control (fibroblastos murinos 3T3-L1 mantenidos con medio basal). B) Adipocitos diferenciados con coctel de diferenciación (IBMX, insulina y dexametasona). C) Adipocitos diferenciados con coctel de diferenciación más insulina. D) Adipocitos maduros diferenciados con rosiglitazona. E) Adipocitos diferenciados con rosiglitazona más insulina. Imágenes tomadas en microscopio óptico 40X.

Para la cuantificación de lípidos almacenados en los adipocitos maduros diferenciados con los cuatro tratamientos se usó el software ImageJ; el cual es una herramienta bioinformática que nos ayuda a procesar imágenes digitales; en donde se cuantificó el área en pixeles rojos (Fig. 14) obteniendo el siguiente gráfico Fig. 15. Con base a los resultados obtenidos podemos demostrar que el tratamiento que ayudó al fibroblasto murino 3T3-L1 a acumular lípidos en su interior fue la rosiglitazona mas la insulina en comparación con los demás tratamientos utilizados. Por lo cual podemos concluir que este tratamiento es el que mejor que imita un mejor microambiente obesogénico *in vitro*; y fue el protocolo utilizado para los siguientes ensayos.

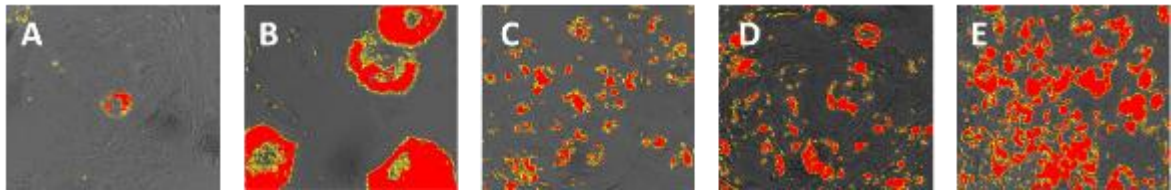


Fig. 14. Imágenes obtenidas en ImageJ de la Tinción ORO de adipocitos en presencia de diferentes tratamientos. A) Control. B) Coctel de diferenciación. C) Insulina. D) Rosiglitazona y E) Rosiglitazona mas insulina.

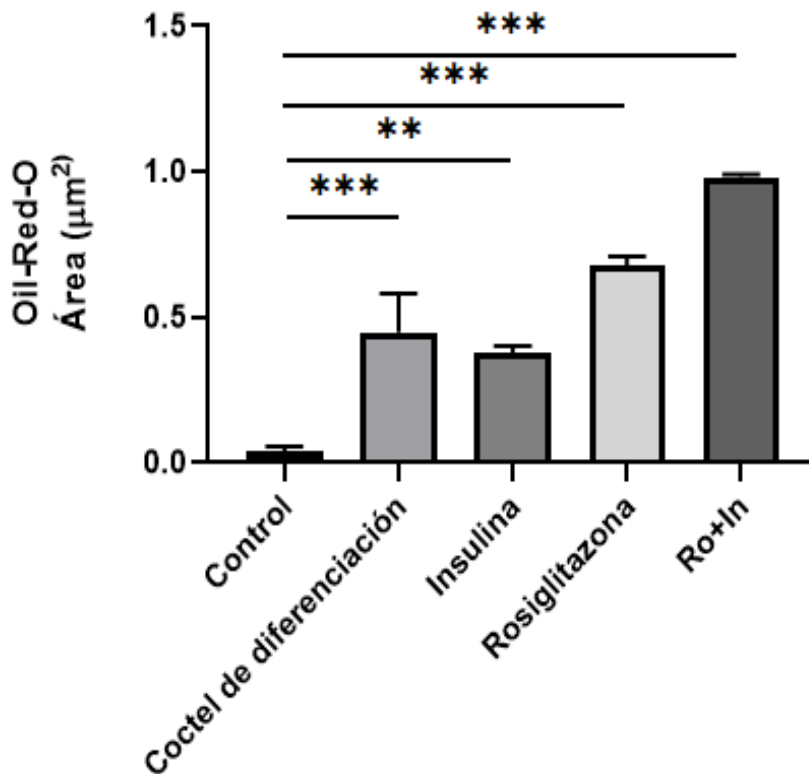


Fig. 15. Cuantificación de lípidos por medio del análisis de área de las imágenes obtenidas de ImageJ.

9.3 Obtención de las estructuras tumorales tipo organoides Hs-578t

Para proseguir con el estudio del papel de los adipocitos en la regulación de la expresión de proteínas de las células tumorales Hs-578t crecidas sobre matrigel en cultivos en 3D; ya estandarizada la técnica de diferenciación se llevó a cabo la obtención de estructuras tumorales tipo organoides en 3D en donde se utilizó la técnica on-top (Lee, et al. 2007) en donde las células se encuentran sobre la matrigel como se muestra en la Fig. 16. Según la bibliografía es la técnica empleada con mejores resultados y la que optimiza el uso de la Matrigel.

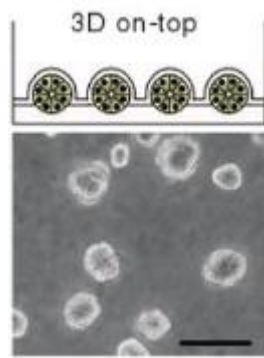


Fig. 16. Esquema representativo en donde se muestra la técnica On-top utilizada para la obtención de las estructuras tumorales tipo organoides de Hs-578t. Tomado de Lee et al. 2007.

Con base a la bibliografía se decidió montar tres sistemas en 3D con diferentes cantidades de Hs-578t, 2.8×10^4 , 3.2×10^4 y 3.5×10^4 de células / cm^2 en una placa de 24 pozos. Se analizaron los cultivos; observando en cuál de ellos hubo mejor desarrollo de las estructuras tumorales tipo organoide con microscopio óptico como se muestra en la Fig. 17.

Los resultados demostraron que la obtención de estructuras tumorales tipo organoide con la cantidad celular de 3.2×10^4 fue la mejor; debido a que fue en este cultivo fue donde se obtuvieron una mayor cantidad de estructuras tumorales tipo organoide. Por ello se pudo concluir que esta cantidad fue la adecuada y por lo tanto fue utilizada para los siguientes ensayos.

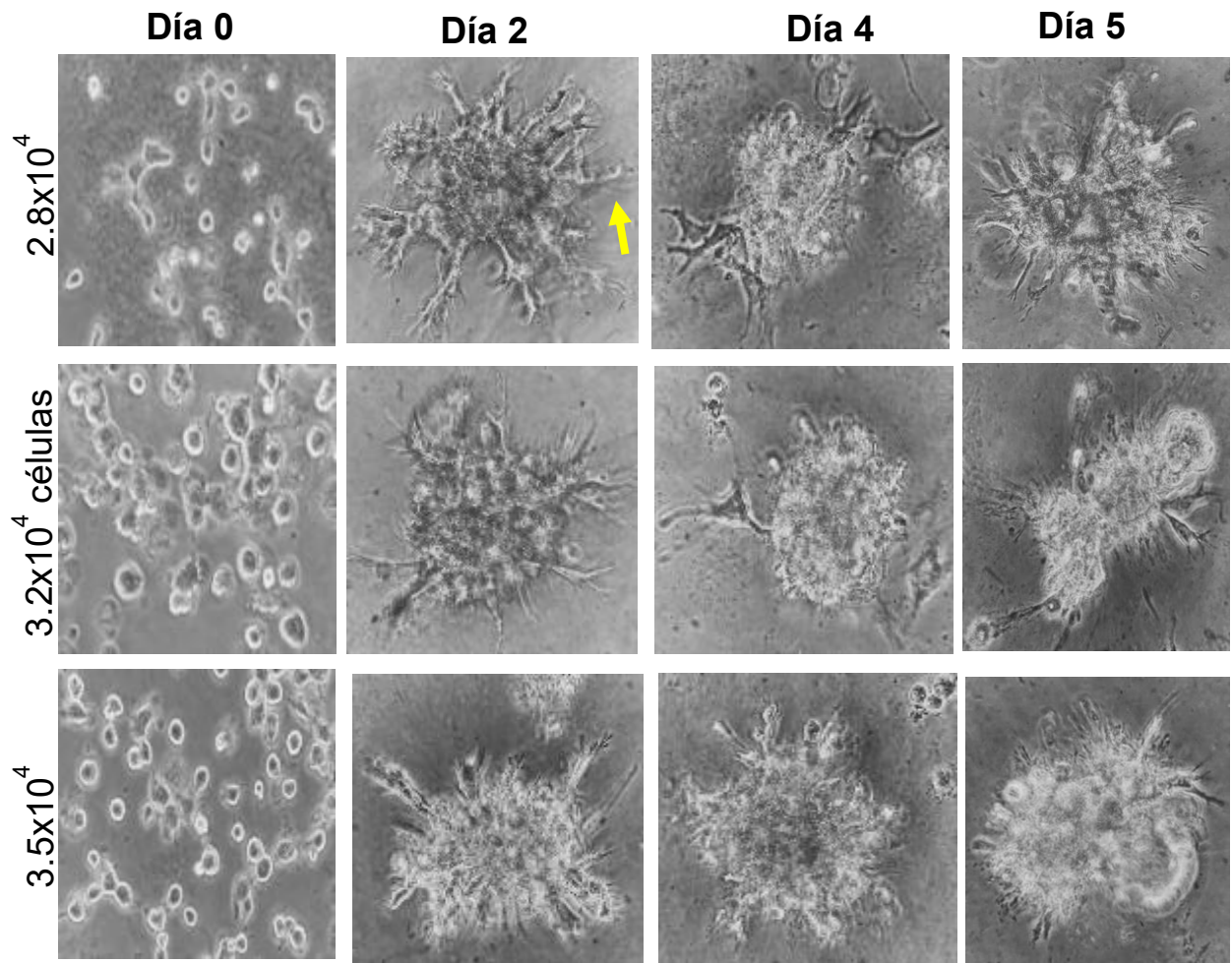


Fig. 17. Estandarización de cultivos 3D con la línea celular Hs-578t en donde se aprecian las estructuras tumorales tipo organoides tomadas en microscopio óptico al 40X.

Al observar a los organoides celulares se pudo apreciar que desarrollaban extensiones citoplasmáticas las cuales están señaladas con una flecha amarilla en la Fig.17. Con base en lo reportado por Franchi y su grupo de colaboradores en el 2020; se sugiere que las estructuras citoplasmáticas reportadas en los cultivos en 3D de Hs-578t podrían tratarse de i) filopodios; ii) lamelipodios y iii) nanotubos tunelizados.

Los filopodios son protuberancias ultrafinas en forma de puente 5–40 μm de largo con un diámetro constante de aproximadamente 50–300 nm adheridos fuertemente al sustrato; con diferencia a los nanotubos tunelizados se

caracterizan por ser extensiones de membrana, en forma de puente y no se encuentran adheridos al sustrato de cultivo con una longitud de 100 μm y de 50-200 nm de diámetro. Finalmente, los lamelipodios son estructuras citoplasmáticas anchas y laminares; las cuales presentan diversos tamaños; pueden extenderse hasta cubrir el organoide en búsqueda de nutrientes para un mejor desarrollo. En conclusión, la cantidad utilizada para la obtención de estructuras tumorales tipo organoide posteriores de Hs-578t se llevó a cabo con 3.2×10^4 células / cm^2 .

Con el fin de que los adipocitos maduros de 3T3-L1 pudieran estimular de mejor manera a las estructuras tumorales tipo organoide de Hs-578t; se realizó una búsqueda bibliográfica obteniendo que en el día 8 de diferenciación es el día idóneo para cocultivar a ambos linajes celulares durante 48 horas; debido a que se ha reportado que en éste periodo de tiempo es cuando los adipocitos maduros tienen una mayor secreción de factores al medio. Basados en el reporte se decidió cocultivar a los adipocitos en el día 8 de diferenciación con las estructuras tumorales tipo organoide con 3 días de formación durante 48 horas; en un sistema de transwell de 12 insertos. Colocando en la parte inferior a los fibroblastos 3T3-L1 (flechas amarillas) y en el inserto a los organoides Hs-578t (flecha blanca) como se muestra en la Fig. 18.

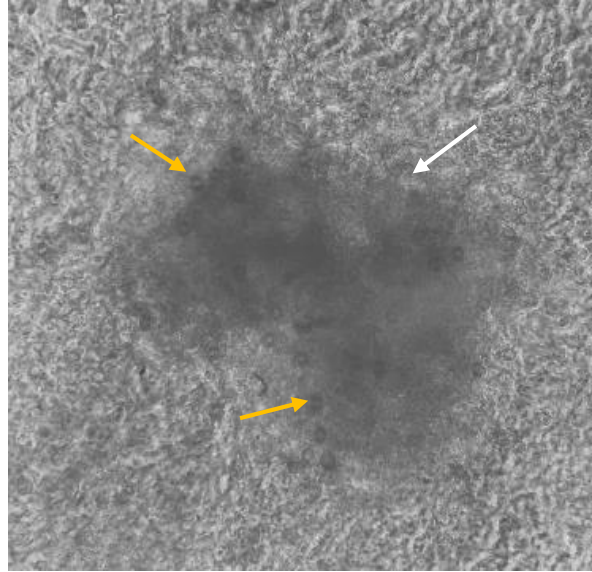


Fig. 18. Estructura tumoral tipo organoide Hs-578t en cocultivo con adipocitos maduros 3T3-L1. Imagen tomada en microscopio óptico a 10X. Con flechas amarillas se indican adipocitos maduros y la flecha blanca señala la estructura tumoral.

9.4 Caracterización de la diferenciación adipocitaria mediante el análisis de la expresión de genes de diferenciación

Con el propósito de caracterizar más a fondo el proceso de diferenciación adipocitaria, se analizó la expresión de factores proadipogénicos característicos de la adipogénesis (PPAR γ y C/EBP α). Para ello realizamos RT-PCRs de los factores mencionados en los fibroblastos murinos 3T3-L1 sin diferenciar y los adipocitos maduros que estuvieron en interacción con las estructuras tumorales durante 48 h. Para ello primeramente se llevó a cabo la extracción de RNA total de ambas condiciones y para analizar su calidad se realizó una electroforesis del ácido nucleico en geles de agarosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 19; los cuales indican que la calidad del RNA es buena y no se observó algún tipo de degradación en el material por lo cual se decidió proseguir con la obtención del cDNA. Concluyendo así que la extracción en Trizol para la obtención de RNA es buena y confiable para las siguientes extracciones y se puede seguir el análisis de la expresión de los factores proadipogénicos.

Tabla 8. Cuantificación del RNA total.

TIPO CELULAR	Concentración
3T3-L1 SIN DIFERENCIAR	153.2 ng/ μ l
3T3-L1 POST- COCULTIVO	500 ng/ μ l

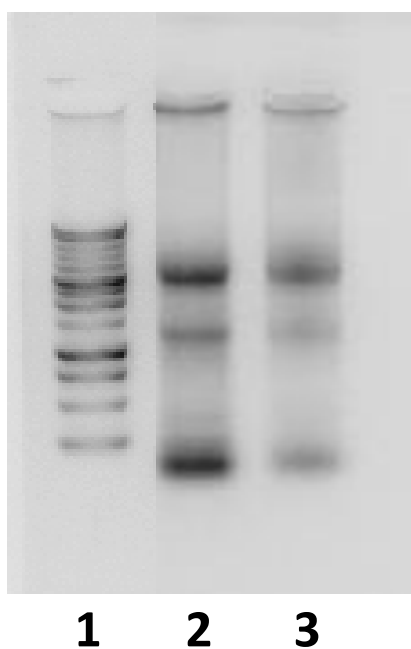


Fig. 19. Análisis de la integridad del RNA obtenido. Gel de agarosa 1% para determinar la integridad del RNA. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** Extracto de RNA de los fibroblastos 3T3-L1 sin diferenciar. **Carril 3:** Extracto de RNA de adipocitos maduros post-cocultivo con estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t.

Una vez obtenido el RNA de buena calidad de fibroblastos sin diferenciar y adipocitos post-cocultivo se realizó una retrotranscripción para producir cDNA en ambas condiciones usando Random Hexamer. Se prosiguió con la amplificación de los factores proadipogénicos (Fig.20) mediante los oligos específicos descritos en la Tabla 5. Para un fragmento del mensajero con una longitud de 134 pb para C/EBP α y 196 pb para PPAR γ y β -actina como control constitutivo. Se realizó la PCR tiempo final utilizando como templado el cDNA obtenido de ambas condiciones. Se observa en la Fig.21 el amplificado del tamaño esperado para ambos genes en cada condición a partir de los cuales se realizó un análisis densitométrico normalizado con β -actina considerando tres experimentos independientes (Fig. 22).

Los resultados indican que los factores proadipogénicos de los adipocitos maduros post-cocultivo con las estructuras tumorales tipo organoide; tienen una expresión similar a la de los fibroblastos murinos 3T3-L1 sin diferenciar; lo cual puede sugerir que los adipocitos maduros post-cocultivo podrían estar sufriendo de una desdiferenciación.

También se corrió una electroforesis libre de nucleasas para comprobar que la extracción de RNA fuera de buena calidad y estuviera libre de contaminaciones de DNA como se muestra en la Fig 23. En donde se puede apreciar que no hubo amplificación para ninguna de las condiciones. Lo que sugiere que nuestra muestra se encuentra libre de contaminantes.

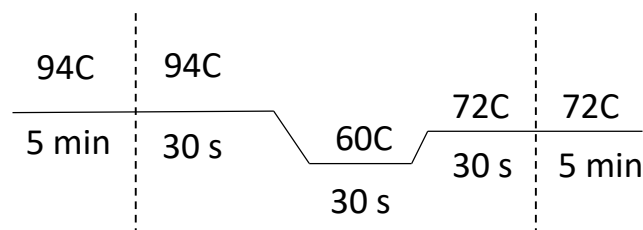


Fig. 20. Programa para amplificar los genes que codifican para los factores PPAR γ y C/EBP α . Análisis de expresión de factores proadipogénicos mediante RT-PCR.

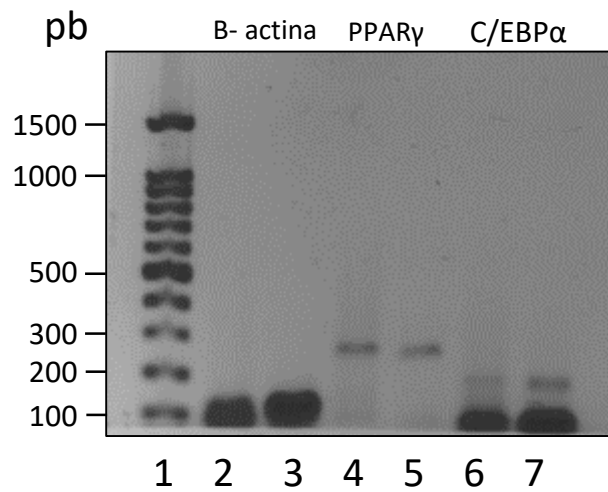


Fig. 21. Análisis de la expresión de PPAR γ y c/EBP α . **Carril 1:** Marcador de peso molecular de 100pb. **Carril 2:** Amplificado de β -actina en c-DNA de fibroblastos. **Carril 3:** Amplificado de β -actina en c-DNA de adipocitos diferenciados. **Carril 4:** Amplificado de PPAR γ en c-DNA de fibroblastos. **Carril 5:** Amplificado de PPAR γ en c-DNA de adipocitos diferenciados. **Carril 5:** Amplificado de C/EBP α en c-DNA de fibroblastos. **Carril 6:** Amplificado de C/EBP α en c-DNA de adipocitos maduros. Gel de agarosa 1.5%.

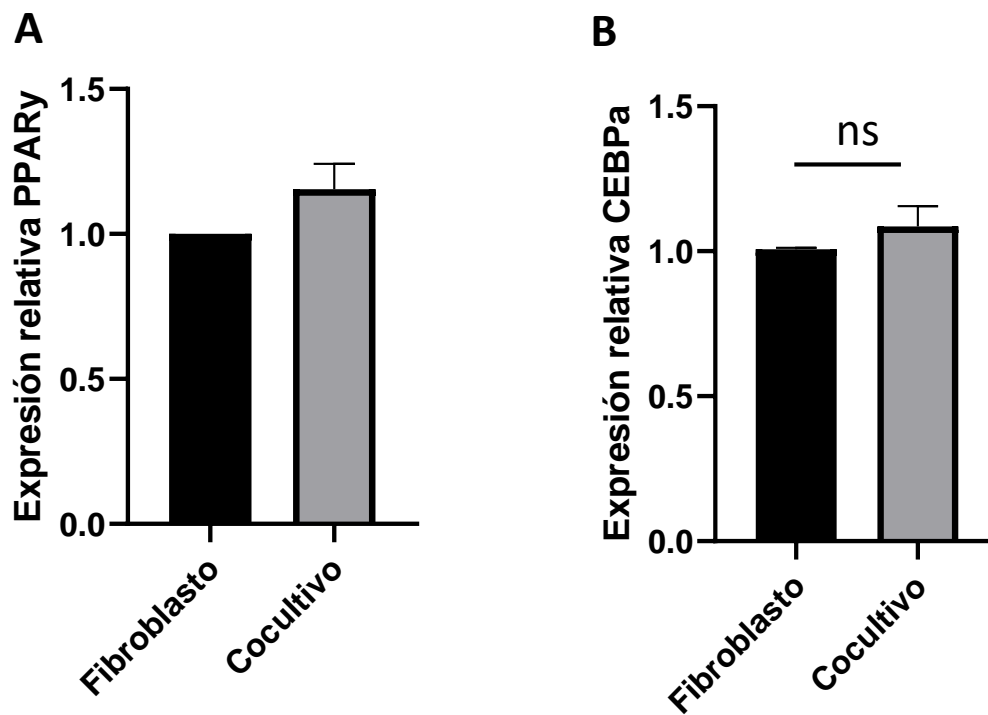


Fig. 22. Densitometría del análisis de la expresión de PPAR γ y c/EBP α . (A) Gráfica de la densitometría realizada para PPAR γ . (B) Gráfica de la densitometría realizada para C/EBP α . Los valores fueron normalizados en relación a β -actina. Se observa un aumento significativo en la expresión de PPAR γ en los adipocitos diferenciados con respecto a la del fibroblasto. Gel de agarosa 1.5%. * P < 0.05

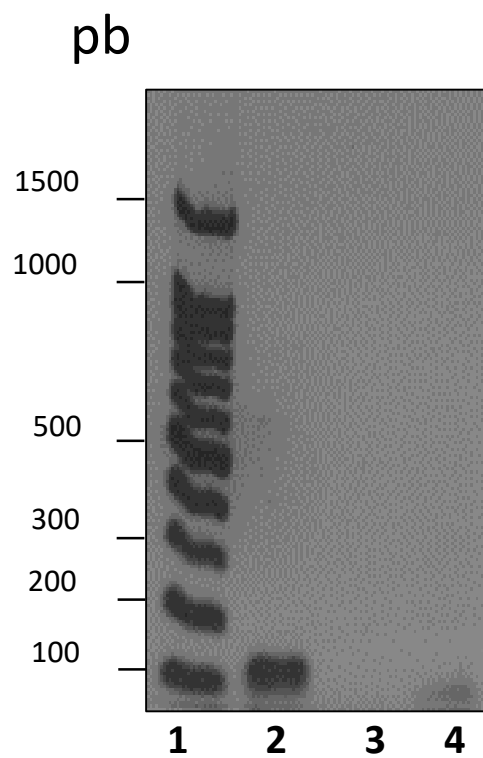


Fig. 23. Análisis de la expresión de PPAR γ y c/EBP α . Electroforesis control negativo (muestra libre de nucleasas). **Carril 1:** Marcador de peso molecular 100pb. **Carril 2:** β -actina. **Carril 3:** PPAR γ . **Carril 4:** C/EBP α . Gel de agarosa 1.5%.

9.5 Análisis de adipocitos post-cocultivo

Al finalizar el tiempo de cocultivo de las estructuras tumorales tipo organoide de Hs-578t durante 48 horas; se observó que los lípidos de los adipocitos maduros 3T3-L1 ya no tenían la forma característica redonda como se presentan en adipocitos maduros diferenciados control (sin colocarlos en cocultivo). Debido a esto, se realizó una tinción ORO para cuantificar los lípidos dentro de los adipocitos post-cocultivo y se comparó con la cuantificación de lípidos dentro de los fibroblastos y adipocitos diferenciados. Como se muestra en la Fig. 24 la observación de estas células al microscopio óptico nos indica que el área correspondiente a los lípidos se encuentra disminuida lo cual se corroboró mediante un análisis cuantitativo de los lípidos detectados en las imágenes usando el software ImageJ.

Se prosiguió a realizar la cuantificación de los lípidos albergados en el interior del adipocito diferenciado; post-cocultivo y fibroblastos, obteniendo la gráfica (Fig.25). Los resultados demostraron que los adipocitos post-cocultivo tenían menos lípidos en el interior que los adipocitos maduros diferenciados con rosiglitazona mas insulina; lo cual sugiere que al colocar el cocultivo con las estructuras tumorales tipo organoide se indujo una lipólisis en los adipocitos murinos 3T3-L1.

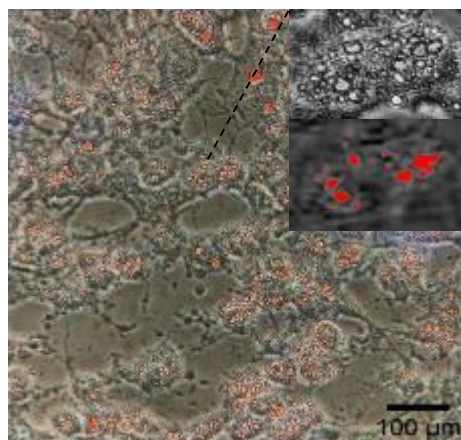


Fig. 24. Tinción Oil-Red-O post-cocultivo con las estructuras tumorales de Hs-578t. A) Imagen tomada del post-cocultivo procesada con ImageJ. Imagen tomada en microscopio óptico 40X.

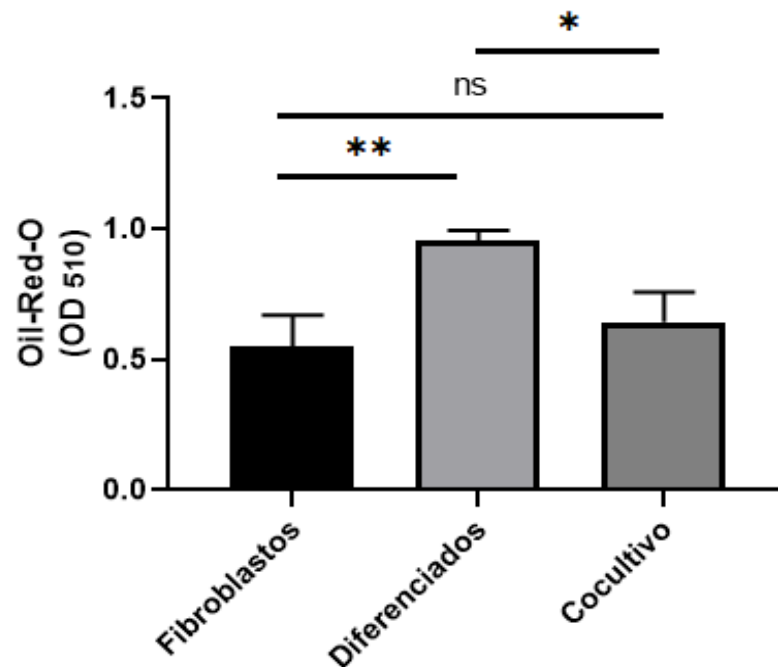


Fig. 25. Cuantificación de lípidos acumulados en adipocitos diferenciados, post-cocultivo y fibroblastos 3T3-L1. El análisis se realizó a una absorbancia de 510 nm. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, sin significancia estadística. El experimento se realizó en triplicado y los datos fueron analizados en GraphPad Prims y se aplicó la prueba estadística de ANOVA.

9.6 Caracterización de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t

Para poder caracterizar las estructuras tumorales tipo organoide en 3D sin adipocitos (control) Fig. 26 y con adipocitos (cocultivo) Fig. 27; se realizaron inmunofluorescencias en donde se utilizó DAPI o (4',6-diamidino-2-fenilindol) como marcador de ácidos nucleicos ricos en adenina y timina; también se utilizó Rhodamine Phalloidin el cual es un conjugado de faloidina que se utilizan para teñir filamentos de actina y E-cadherina; esta glicoproteína participa en uniones intercelulares de tipo adherente y su expresión ayudó a inferir el comportamiento celular con respecto a la adhesividad y cohesividad

del tejido epitelial. Se obtuvo que la estructura tumoral tipo organoide en la condición control y como se puede observar se trata de conjuntos celulares pequeños en comparación con el organoide obtenido en cocultivo; donde se puede apreciar una estructura de gran tamaño con uniones fuertes. Lo cual sugiere que al colocar a la estructura tumoral en cocultivo con los adipocitos maduros 3T3-L1 puede estar alterando los procesos celulares; favoreciendo la proliferación en la estructura tumoral Hs-578t.

CONTROL

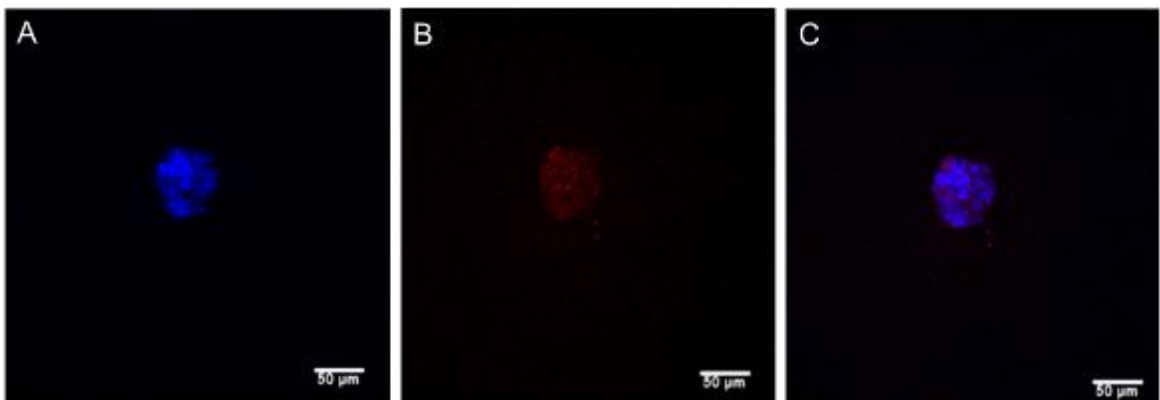


Fig. 26. Inmunofluorescencia de las estructuras tumorales tipo organoide en 3D sin adipocitos maduros 3T3-L1. (A) DAPI; (B) Rhodamine Phalloidin; (C) Merge.

COCULTIVO

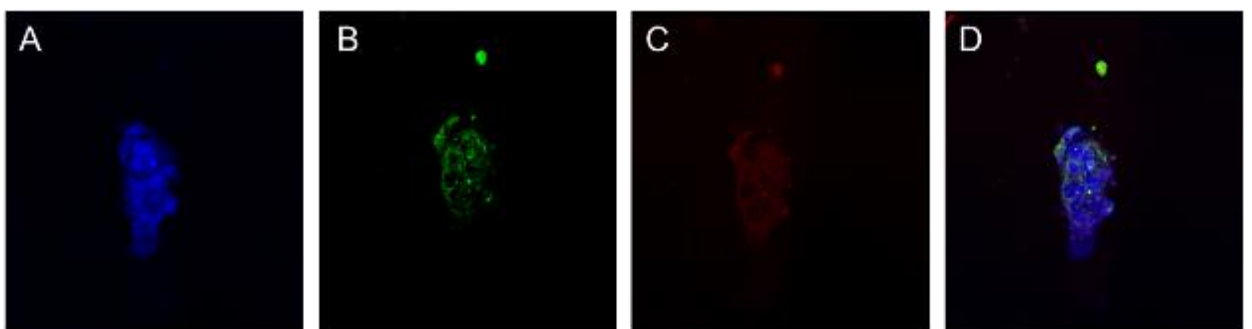


Fig. 27. Inmunofluorescencia de las estructuras tumorales Hs-578t tipo organoides en 3D en cocultivo con adipocitos maduros 3T3-L1. (A) DAPI; (B) E-Cadherina; (C) Rhodamine Phalloidin; (D) Merge.

9.7 Ensayo de viabilidad celular en estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t.

Para determinar si al obtener estructuras tumorales tipo organoide en 3D de la línea celular Hs-578t o exponerlas en cocultivo con adipocitos maduros diferenciados con rosiglitazona más insulina de 3T3-L1 se tuviera algún efecto citotóxico que estuviera afectando la viabilidad celular, se realizó un ensayo de MTT; el cuál se basa en la actividad metabólica de las mitocondrias, la cual es directamente proporcional con células vivas. Los resultados demuestran que la actividad mitocondrial no se vio afectada de la línea Hs-578t en ambas condiciones; en 3D y cocultivo (Fig. 28).

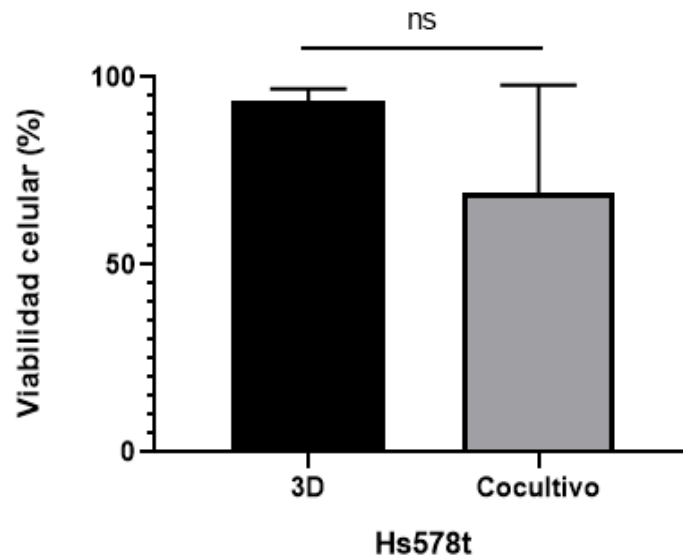


Fig. 28. Ensayo de viabilidad celular de las estructuras tumorales Hs-578t en 3D y en cocultivo, por medio del ensayo MTT. El análisis se midió a una absorbancia de 570 nm. Los resultados fueron procesados en GraphPad Prism y se aplicó la prueba estadística t student. (ns; sin significancia estadística)

9.8 Ensayo de viabilidad celular en fibroblastos murinos 3T3-L1; adipocitos diferenciados y Adipocitos post-cocultivo.

También se determinó la viabilidad celular de los fibroblastos murinos 3T3-L1 comparados con adipocitos maduros diferenciados con Ro y con adipocitos expuestos a cocultivo durante 48 horas con estructuras tumorales Hs-578t. Los resultados demuestran (Fig.29). que la viabilidad no se altera al diferenciar a los fibroblastos administrando rosiglitazona; ni se afecta la viabilidad exponiéndolos en condiciones de cocultivo; al contrario, se observa un ligero incremento; lo que sugiere que los adipocitos a pesar de presentar lipólisis se encuentran en óptimas condiciones. Concluyendo así, que las condiciones empleadas en el montaje del modelo en cocultivo, no afecta a las estirpes celulares utilizadas.

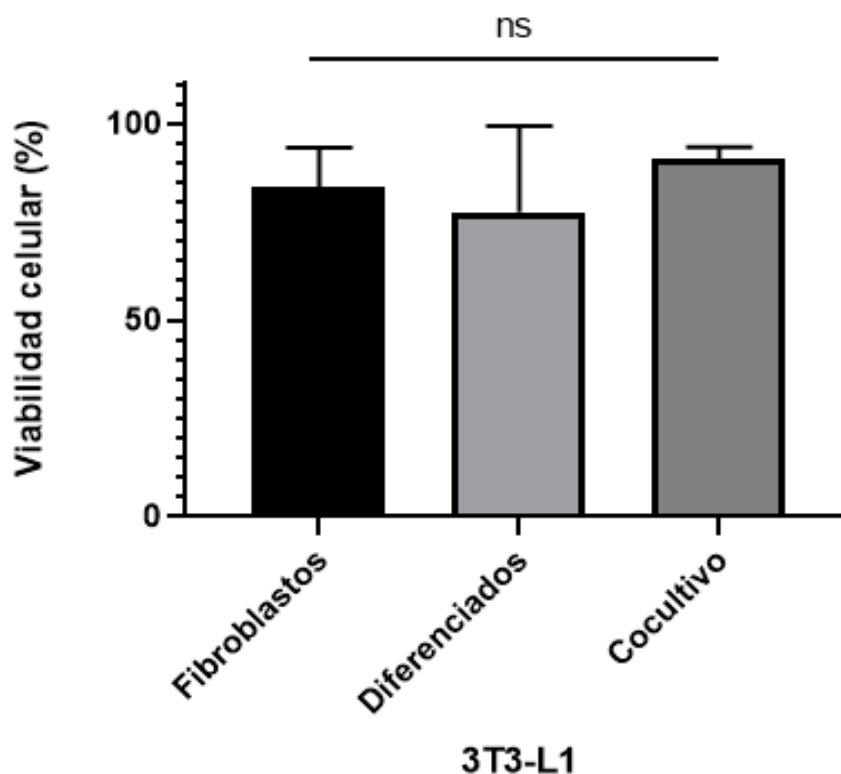


Fig. 29. Ensayo de viabilidad celular realizado en fibroblastos 3T3-L1, adipocitos diferenciados con rosiglitazona y adipocitos expuestos a cocultivo con estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t. El análisis se midió a una absorbancia de 570 nm. Los resultados fueron procesados en GraphPad Prism y se aplicó la prueba estadística t student. (ns; sin significancia estadística)

9.9 Extracción de proteínas totales de estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t.

Con la finalidad de identificar cambios en la expresión en las proteínas de las células tumorales Hs-578t cultivadas con y sin adipocitos durante 48 horas, realizamos el análisis mediante espectrometría de masas de las muestras totales de proteínas en ambas condiciones. Primeramente, obtuvimos extractos totales de proteínas tal como se describe en materiales y métodos (8.12) y posteriormente cuantificamos las proteínas obtenidas. Posteriormente, con la finalidad de evaluar la cantidad y calidad de los extractos proteicos obtenidos en ambas condiciones se realizó una electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE). Los resultados se muestran en la figura 30, en la cual podemos observar que la calidad de proteínas es adecuada debido a que no se detectó degradación significativa de las muestras, por lo que se decidió continuar con estas muestras para su análisis posterior mediante espectrometría de masas.

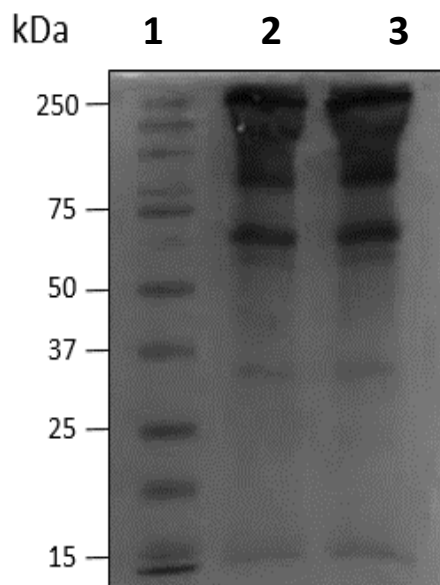


Fig. 30. Separación electroforética (SDS-PAGE) de las proteínas totales extraídas de las estructuras tumorales en 3D. La imagen muestra el corrimiento electroforético de las dos muestras de proteínas totales extraídas de estructuras tumorales en 3D. **Carril 1:** Marcadores de peso molecular (Dual color). **Carril 2:** Extracto de proteínas totales obtenidas de las células tumorales Hs-578t crecidas sin adipocitos (control). **Carril 3:** Extracto de proteínas totales obtenido de las células Hs578t crecidas en cocultivo con los adipocitos durante 48 h. Gel SDS-PAGE al 13% teñido con azul de Coomassie

9.10 Obtención de perfil proteómico diferencial

Para poder estudiar la influencia de los adipocitos maduros en la expresión proteica de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t se analizaron las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas. Para ello primero se cuantificó el extracto proteico utilizando el kit 2D Quant (Cytiva; Sigma Aldrich) obtenido de los organoides control o sin adipocitos (n=3); y del cocultivo con adipocitos maduros (n=3). Después se sometieron a digestión enzimática con el kit llamado PreOMics (iST). Los niveles de péptidos se normalizaron y se compararon con la base de datos. Finalmente se obtuvieron los cromatogramas Fig.31, donde se puede apreciar que un alto porcentaje (90%) de los péptidos obtenidos caen dentro de valores óptimos. Por lo cual podemos concluir que la cantidad de materia es muy buena y confiable; y decidimos continuar con el análisis en el espectrómetro de masas.

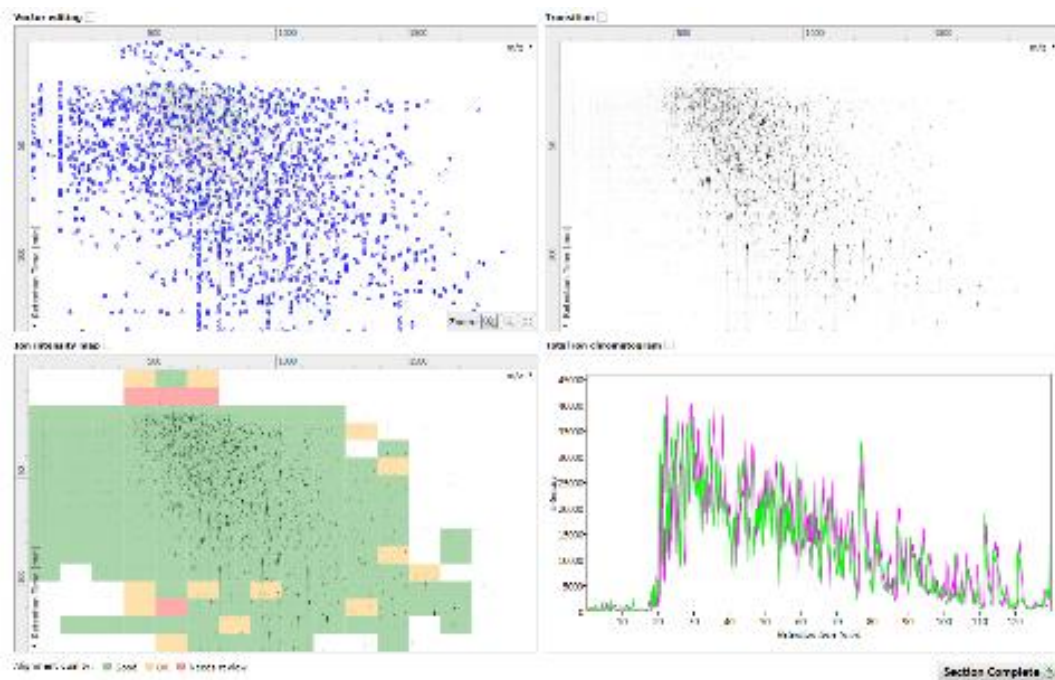


Fig. 31. Cromatogramas alineados en modo HDMSE con un porcentaje de 87.4%. Los cuales indican que los péptidos caen dentro de parámetros óptimos.

Para identificar y cuantificar las proteínas que se aislaron de las estructuras tumorales tipo organoide cocultivadas en 3D; se inyectaron los péptidos obtenidos en el espectrómetro de masas Synapt G2-Si; los cuales fueron

ionizados e identificados basados en una base de datos de *Rattus norvegicus*; cada réplica biológica fue inyectada dos veces como réplica técnica; por lo cual, de los triplicados por condición (control y cocultivo); en total, se realizaron 12 inyecciones. Por lo cual hace que el experimento tenga un alto grado de confiabilidad, ya que el análisis depende de características físicas de la materia y no de reacciones químicas; las cuales pueden tener una eficiencia menor en la identificación de las mismas. Los resultados muestran que se lograron identificar 1322 proteínas totales; de las cuales 916 son las que se encuentran expresadas significativamente (87 sobre expresadas y 224 reprimidas) en cocultivo en comparación con la condición control.

También se lograron identificar proteínas exclusivas de la condición control (estructuras tumorales tipo organoide cultivadas sin adipocitos) y cocultivo n=8 y n=57 respectivamente. Concluyendo que las proteínas identificadas (Tabla 9) tienen un gran sustento estadístico, lo que hace al estudio confiable.

Tabla 9. Resumen de proteínas detectadas por espectrometría de masas.

PROTEÍNAS	#
TOTALES DETECTADAS	1322
FILTRADAS Y CUANTIFICADAS	916
SOBRE EXPRESADAS EN COCULTIVO	87
REPRIMIDAS EN COCULTIVO	224
EXCLUSIVAS DE CONTROL	8
EXCLUSIVAS DE COCULTIVO	57

Con la finalidad de estudiar las proteínas expresadas significativamente n=916 se realizó un gráfico de volcano Fig. 33; el cual, nos ayudó a visualizar las

proteínas que se encontraban sobre expresadas y las proteínas reprimidas. También se realizó un diagrama de Venn; y así visualizar las proteínas compartidas en ambas condiciones n=605; Fig.32.

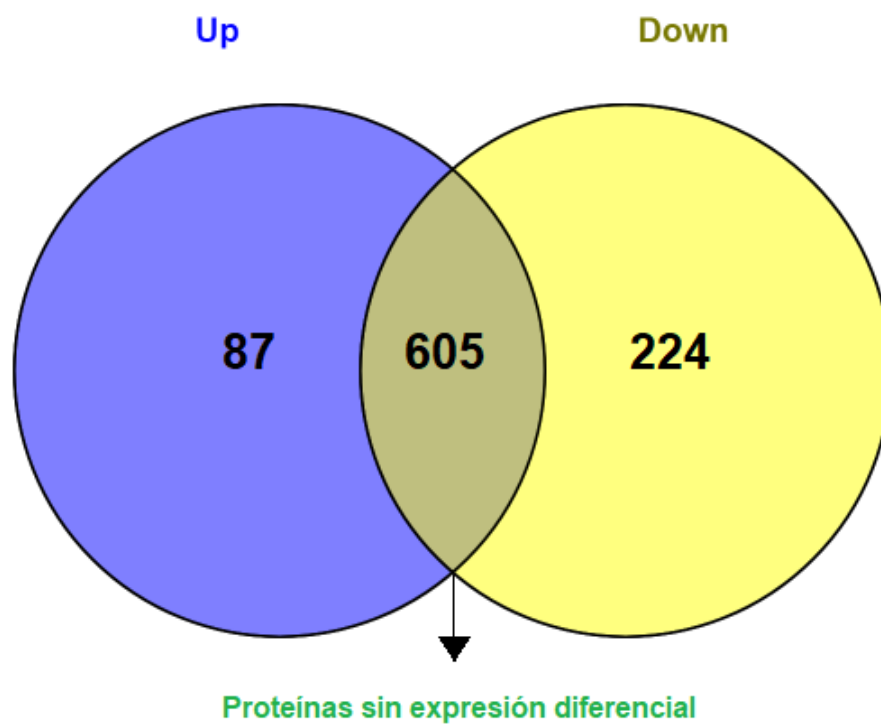


Fig. 32. Diagrama de Venn de las 916 proteínas identificadas por espectrometría de masas. En azul se muestran las proteínas sobre expresadas n=87; y en amarillo las proteínas reprimidas n=224 ambas en cocultivo.

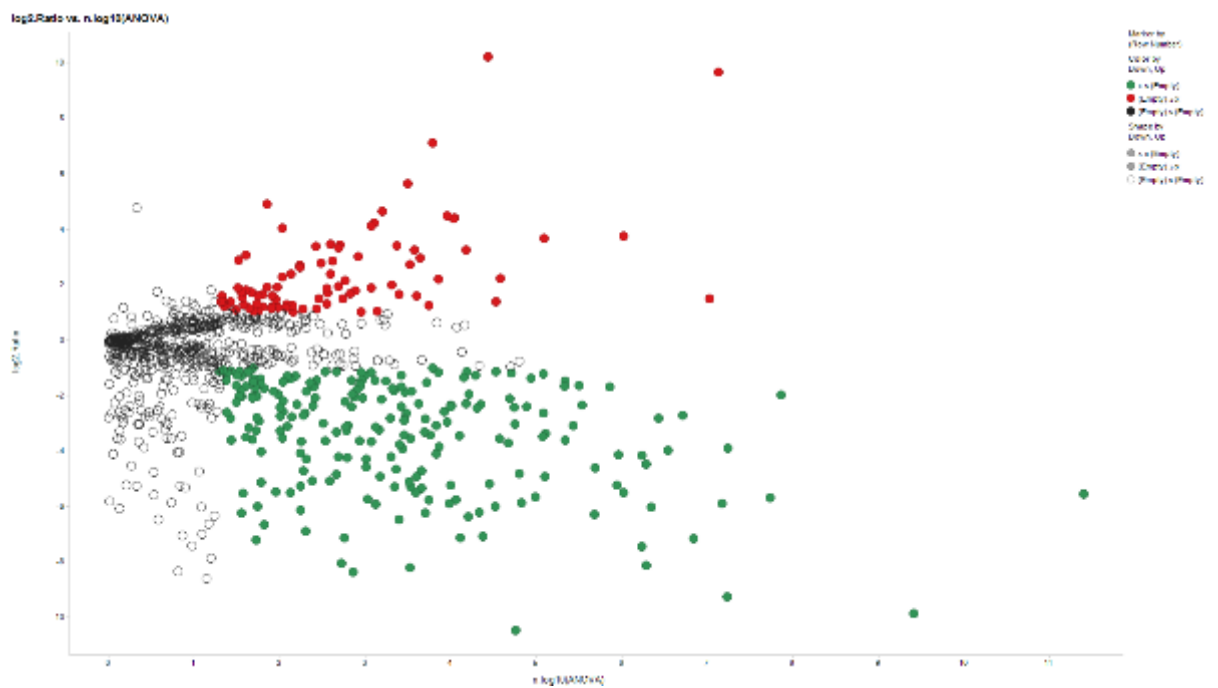


Fig. 33. Volcano plot donde se encuentran graficadas 916 proteínas expresadas diferencialmente. En rojo se muestran las proteínas sobre expresadas n=87; y en verde las proteínas reprimidas n=224 ambas en cocultivo.

También los péptidos fueron analizados obteniendo el gráfico de error de las inyecciones en masas, para apreciar la calidad de los mismos; según el resultado que se muestra en la Fig. 34; se demuestra que el 80% de los péptidos analizados son significativos, lo cual sugiere que la obtención de los péptidos fue adecuada y de buena calidad por lo cual se prosiguió con el análisis de los mismos.

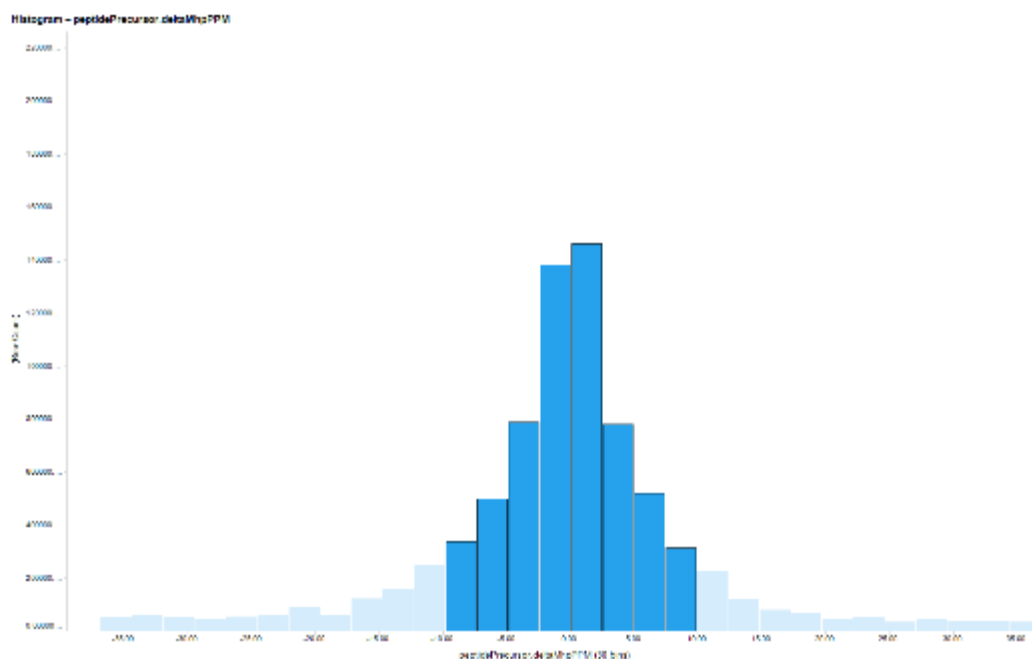


Fig. 34. Gráfico de error a nivel de péptidos donde se muestra que la mayoría de los péptidos (80%) son significativos.

9.11 Ontología y enriquecimiento de genes

Se prosiguió con el análisis bioinformático de las proteínas extraídas de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t crecidas en 3D cocultivadas con adipocitos maduros 3T3-L1 comparadas con las proteínas extraídas de las estructuras tumorales sin la influencia de los adipocitos (Control). Con el objetivo de identificar la función molecular de las proteínas identificadas y su rol en procesos biológicos de múltiples direcciones se hizo un análisis de ontología de genes utilizando el software Panther Classification System de las proteínas expresadas diferencialmente en cocultivo. En el caso de las proteínas sobre expresadas los resultados se muestran en la Fig. 35; y de las proteínas reprimidas en la Fig. 36. Del mismo modo se muestran las funciones moleculares en las que están implicadas las proteínas sobre expresadas Fig. 37 y en la Fig. 38 las funciones de las proteínas reprimidas. Según los resultados obtenidos en la Fig. 35, los procesos en los que participan las proteínas sobre expresadas son: i) procesos celulares; ii) regulación biológica y iii) procesos metabólicos. Concluyendo así que las proteínas sobre expresadas que participan en estos procesos están regulando los eventos celulares que el esferoide tumoral de Hs-578t desarrolla en respuesta al estímulo de lo secretado por los adipocitos maduros.

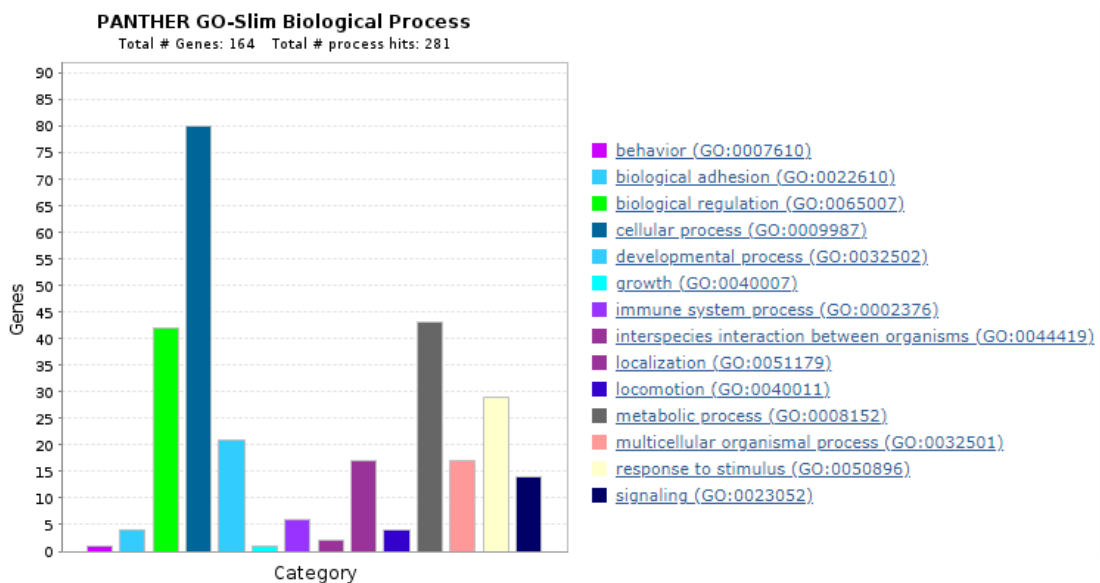


Fig. 35. Procesos biológicos en los que participan las proteínas sobre expresadas de cocultivo celular en 3D con adipocitos 3T3-L1.

Los procesos biológicos en los que participan las proteínas reprimidas se muestran en la Fig. 36 son: i) procesos celulares; ii) procesos metabólicos y iii) procesos de regulación. Los cuales nos puede sugerir que estas proteínas reprimidas están interfiriendo en procesos proliferativos principalmente con base en los resultados obtenidos a través de todo el análisis experimental.

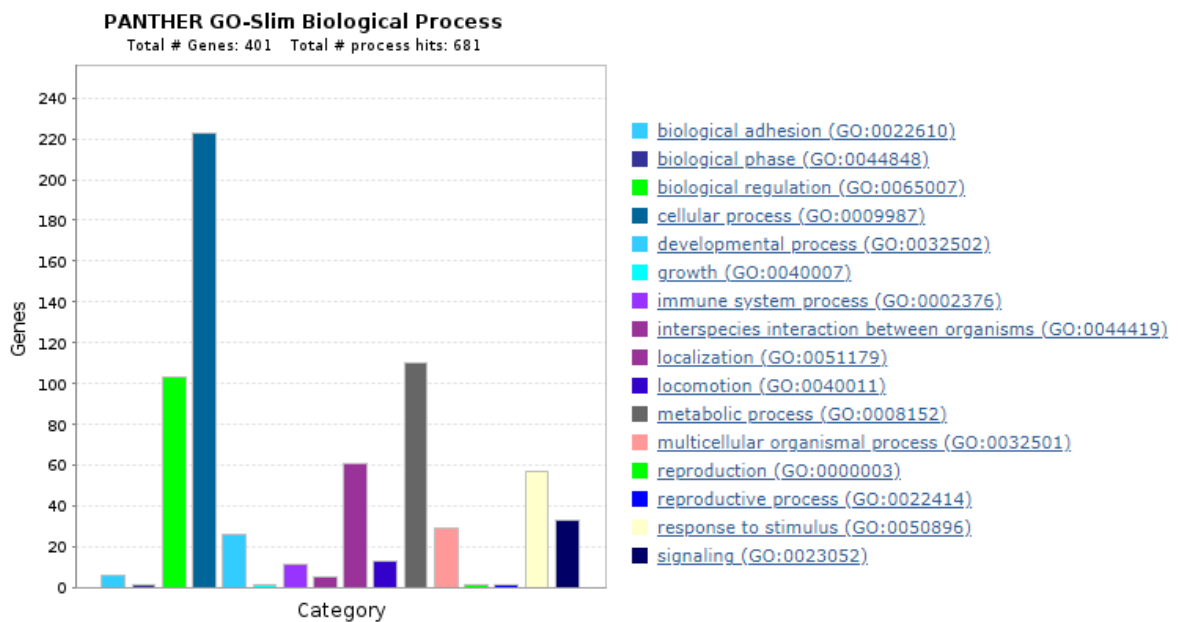


Fig. 36. Procesos biológicos en los que participan las proteínas reprimidas de cocultivo celular en 3D con adipocitos 3T3-L1.

Para conocer las funciones moleculares en donde participan las proteínas sobre expresadas, extraídas de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t con adipocitos se realizó un análisis en el software PANTHER GO-Slim el cual se muestra en la Fig. 37; en donde nos indicó que la función molecular que desempeñaban las proteínas implicadas son: i) unión; ii) actividad catalítica y iii) funciones regulatorias.

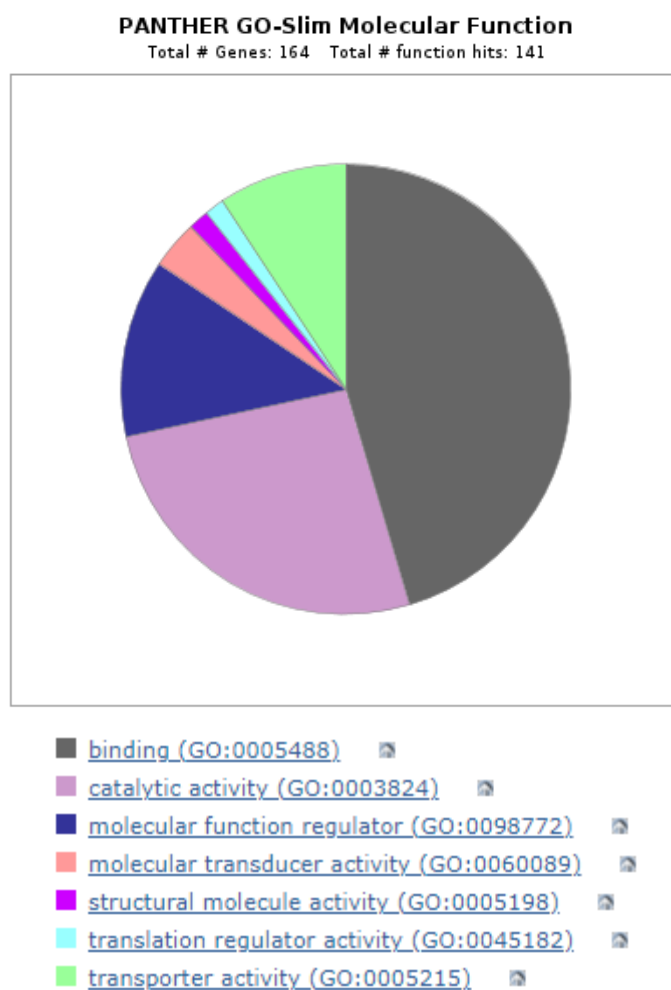


Fig. 37. Funciones moleculares en los que participan las proteínas sobre expresadas, expresadas diferencialmente de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t en cocultivo 3D con adipocitos diferenciados 3T3-L1.

En el análisis de las funciones moleculares de las proteínas reprimidas de las estructuras tumorales tipo organoide de Hs578t; que se muestra en la Fig. 38; los resultados indican las siguientes funciones: i) unión; ii) actividad catalítica y iii) funciones regulatorias.

Los resultados demuestran que las funciones moleculares descritas para las proteínas sobre expresadas y las reprimidas fueron las mismas. Lo cual sugiere que hay una relación de sobre expresión y represión que regulan procesos importantes para la supervivencia, proliferación, regulación entre otros, de los organoides Hs-578 al cocultivarse con los adipocitos maduros 3T3-L1.

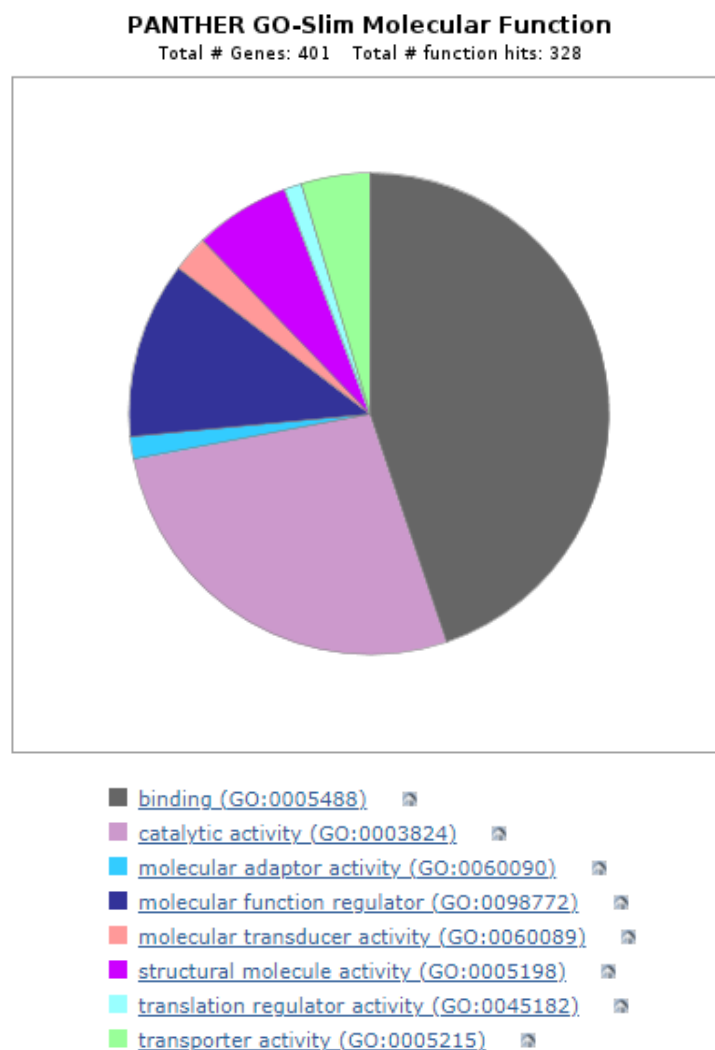


Fig. 38. Funciones moleculares en las que participan las proteínas reprimidas expresadas diferencialmente de las estructuras tumorales tipo organoide Hs-578t en cocultivo 3D con adipocitos diferenciados 3T3-L1.

9.12 Top-ten de las proteínas moduladas en las células Hs-578t cocultivadas con adipocitos.

Para poder hacer un análisis más detallado de las proteínas identificadas por espectrometría de masas de las células tumorales Hs-578t se decidió realizar un listado con las proteínas top ten las cuales se describen en la Tabla 10; en ella podemos encontrar proteínas importantes para el transporte de lípidos como: ApoB; PITPNM2; SLC25A43; ABCA9. También proteínas implicadas en el transporte de iones (ACA9; RNF213); y de unión al DNA (ANKRD17; POU2F3; IRX-6). Con ello podemos tener un panorama más acercado a las proteínas moduladas en el cocultivo con fibroblastos murinos 3T3-L1.

Tabla 10. Top ten de proteínas sobre expresadas detectadas por espectrometría de masas. En rojo se muestran proteínas asociadas al transporte de lípidos.

Nombre	Accession number Uniprot	q Value	log2.Ratio
Ankyrin repeat domain-containing protein 17 (ANKRD17)	O75179	0.000109633	10.2218272
Iroquois-class homeodomain protein (IRX-6)	P78412	1.05E-06	9.67884941
Apolipoprotein B-100 (ApoB)	P04114	0.000326247	7.10920822
LIX1-like protein (LIX1L)	Q8IVB5	0.000526765	5.6334759
Solute carrier family 25 member 43 (SLC25A43)	Q8WUT9	0.009155648	4.91325186
ATP-binding cassette sub-family A member9 (ABCA9)	H0Y4U7	0.000901743	4.64596801
E3 ubiquitin-protein ligase (RNF213)	Q63HN8;A0A0A0MTR7	0.000245028	4.48097519
Calcium-transporting ATPase (ACA9)	B4E2Q0;H0Y9V7;P98194;	0.000219359	4.40850704
Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2 (PITPNM2)	Q9BZ72	0.000219888	4.37403642

9.13 La ApoB se asocia a funciones de transporte lipídico

Como ejemplo de las funciones de proteínas sobre expresadas en las células tumorales en el transporte de lípidos, nos enfocamos en la descripción de la proteína ApoB. Para conocer las funciones en las que se encuentra implicada la proteína ApoB y poder determinar la importancia en el modelo biológico de cocultivo que se implementó llevamos a cabo un análisis de ontología obteniendo que las funciones principales en las que participa APOB son:

1. Cholesterol transporter activity [IMP]
2. Heparin binding [IDA]
3. Lipase binding [IPI]
4. Low-density lipoprotein particle receptor binding [IMP]
5. Phospholipid binding [IDA]
6. Protein binding [IPI]

Con el fin de conocer la estructura tridimensional de APOB se realizó una reconstrucción en el software "Swiss Model". Los datos muestran en la Fig 39. que se trata de una proteína conformada por α hélices en su estructura principalmente.

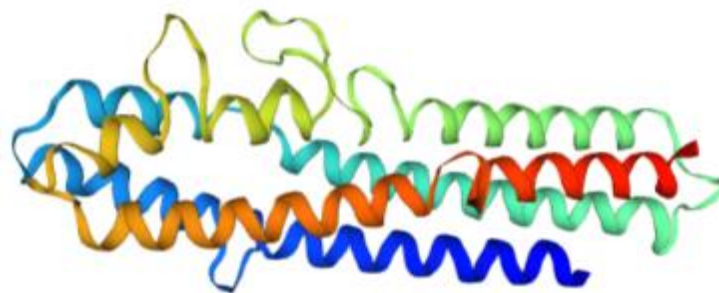


Fig. 39. Modelo tridimensional de la estructura cristalina de la APOB.

9.14 La APOB podría funcionar como un oncogen al exacerbar los hallmarks del cancer.

Las apolipoproteínas son responsables del transporte de lípidos y colesterol. La apolipoproteína B (apoB) es una lipoproteína no intercambiable y existe en dos formas en los seres humanos, apoB-100 y apoB-48. ApoB-100 es la proteína de

longitud completa, que consta de 4536 residuos de aminoácidos. ApoB-48 es la forma truncada de apoB-100 (que consta de los residuos de aminoácidos 1-2152) y se produce mediante la introducción de un codón de parada prematuro en la secuencia de ARNm mediante el empalme alternativo del ARNm por el complejo APOBEC-1. ApoB-48 se sintetiza en el intestino y es esencial para la formación y secreción de quilomicrones. ApoB-100 se sintetiza en el hígado y es un componente estructural esencial de la lipoproteína de muy baja densidad, lipoproteínas de densidad intermedia y lipoproteínas de baja densidad. ApoB-100 también sirve como ligando para la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mediada por receptores por una variedad de células. La deficiencia en la secreción de apoB se acompaña de la falta de producción de lipoproteínas de muy baja densidad y quilomicrones, lo que conduce a una mala absorción de grasas y vitaminas liposolubles. Los niveles plasmáticos elevados de colesterol LDL y apoB son factores de riesgo de aterosclerosis, una de las principales causas de muerte en los países occidentales (Paul et al. 2005)

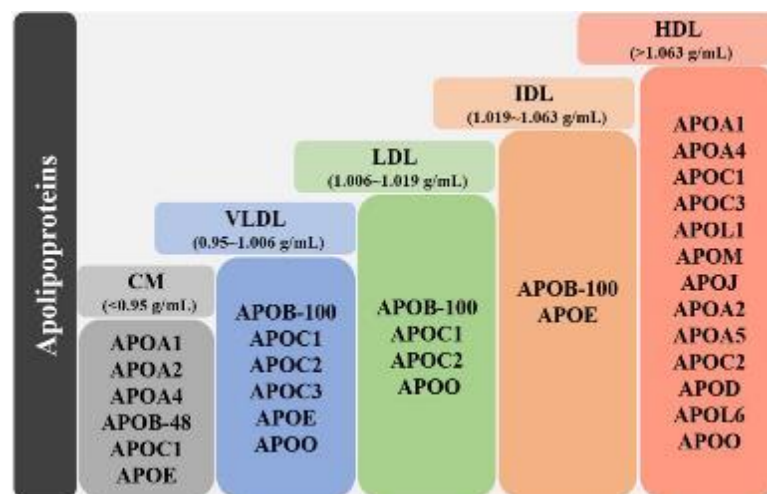


Fig. 40. Las proteínas ApoB y sus ligando. En gris se muestran las Apo que interactúan con CM; en azul las con VLDL; en verde LDL; en naranja IDL y rojo HDL.

Debido a su alta insolubilidad en un ambiente acuoso, la apoB está asociada irreversiblemente con la partícula de lipoproteína y nunca se encuentra libre en el plasma. Esta insolubilidad ha dificultado la determinación de la estructura de apoB. La evidencia experimental y las predicciones teóricas han ofrecido información sobre la estructura de las partículas de lipoproteínas de apoB y apoB. Los primeros trabajos utilizando calorimetría y difracción de rayos X y más recientemente

microscopía crioelectrónica, indicaron que la apoB está ubicada en la superficie de una partícula de lipoproteína esférica (Fig 41), (Lee et al. 2018).

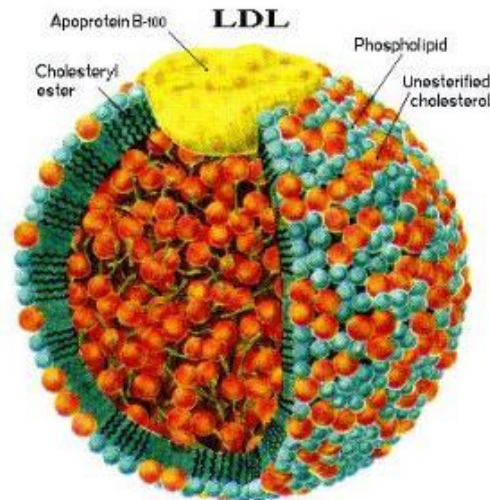


Fig. 41. Lipoproteína esférica la cual se conforma por colesterol, fosfolípidos y la apolipoproteína B-100.

Apolipoproteína B (APOB) regula la expresión de muchos genes en desarrollo de CHC y se relacionó con mal pronóstico en pacientes con CHC36. La baja expresión de APOB se relacionó al aumento de reguladores metastásicos y oncogénicos en HCC, como FOXM1, MTIF, HGF, CD44 y ERBB2, y supresión de supresores de tumores, como PTEN y TP53. La inactivación de APOB se relacionó con un mal pronóstico en pacientes con CHC posiblemente a través de su función en la regulación numerosos genes relacionados con el desarrollo del CHC36 (Ren et al. 2019).

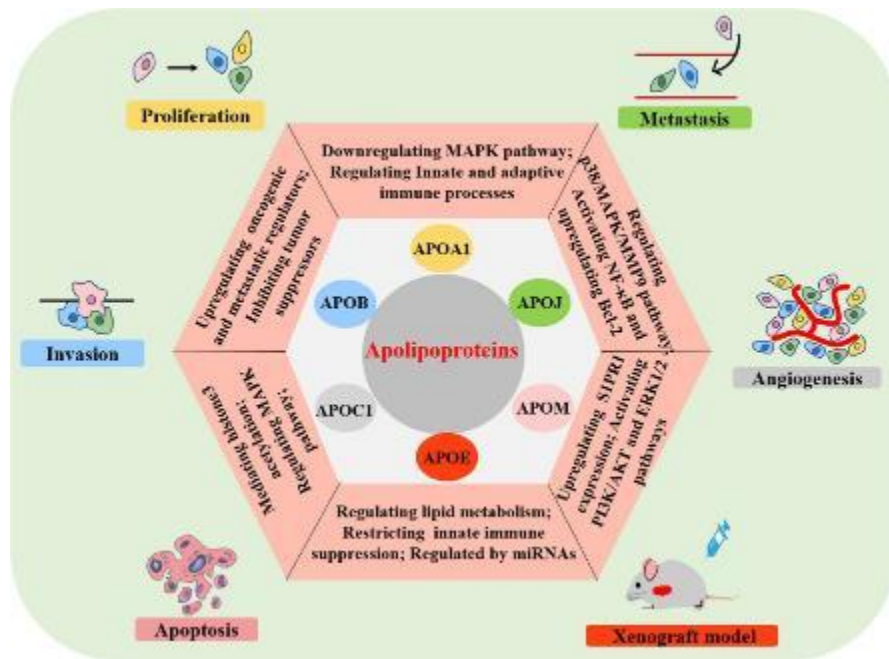


Fig. 42 La expresión de las apolipoproteínas está relacionada con los hallmarks del

9.16 La apolipoproteína B-100 (APOB) se sobreexpresa en cáncer de mama y predice una sobrevida menor en las pacientes.

Para determinar la importancia clínica de ApoB llevamos a cabo un análisis para correlacionar la sobrevida libre de enfermedad y la expresión de la proteína ApoB. Para ello utilizamos la herramienta bioinformática “KM Plotter”.

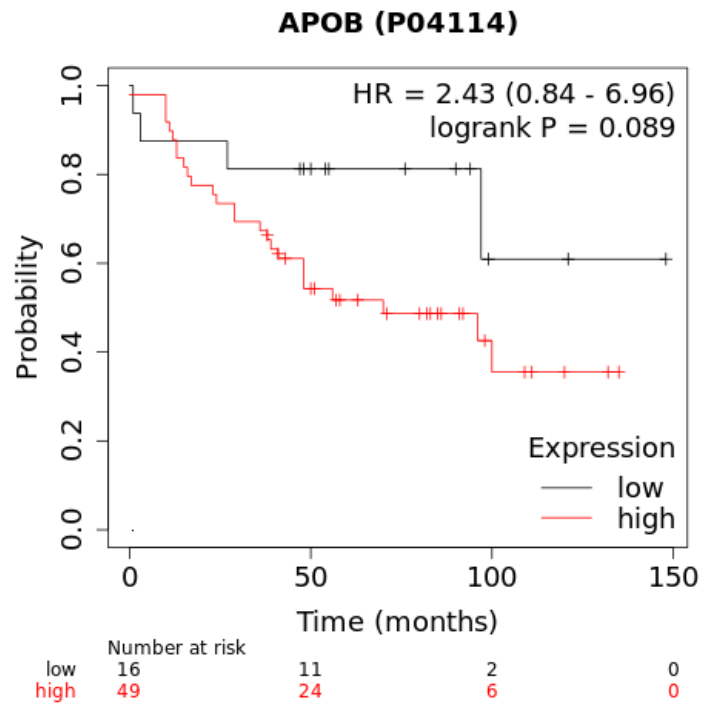


Fig. 44. Análisis de correlación de sobrevida y expresión de APoB.

Los datos obtenidos muestran que la alta expresión de la proteína APOB se relaciona con una baja sobrevida de las pacientes con cáncer de mama en el periodo máximo de 150 meses posteriores al diagnóstico.

9.17 La proteína de transferencia de fosfatidilinositol asociada a membrana (PITPNM2) al transporte lipídico

Otra proteína importante en el transporte de lípidos que se sobreexpresa en las células tumorales Hs-578t cocultivadas con adipocitos es la PITPNM2. Pertenece a una familia de proteínas que contienen dominios de transferencia de fosfatidilinositol asociadas a la membrana que comparten homología con la proteína de degeneración retiniana B (rdgB) de *Drosophila* (Ocana et al., 2005) El sello distintivo de las proteínas PITP es extraer moléculas de PI (fosfatidilinositol) de una membrana, secuestrarlas en su bolsa de unión y depositar el lípido en las membranas. Los PITP regulan la síntesis de fosfoinosítidos (PPI) ya sea mediante la entrega del sustrato, PI a compartimentos de membrana específicos o potenciando las actividades de las lípido quinasas, o ambos. A la luz de estudios recientes, se propone que los PITP son reguladores de las vías de los fosfoinosítidos mediante el reclutamiento en las membranas a través de interacciones proteicas específicas para promover el intercambio molecular entre membranas estrechamente opuestas, es decir, en los sitios de contacto de la membrana. Las proteínas PITP individuales desempeñan funciones muy específicas en muchos procesos biológicos, incluido el crecimiento de neuritas, el tráfico de membranas, la citocinesis y la transducción sensorial en mamíferos. El requisito común para las diversas funciones de todos los PITP es su capacidad para unirse a PI y acoplar su función a las vías dependientes de fosfoinosítidos (Cockcroft, 2012). Hoy en día no es utilizada como molécula de diagnóstico en cancer, pero se sabe que su sobre expresión se relaciona con una baja sobre vida (Figura.46).

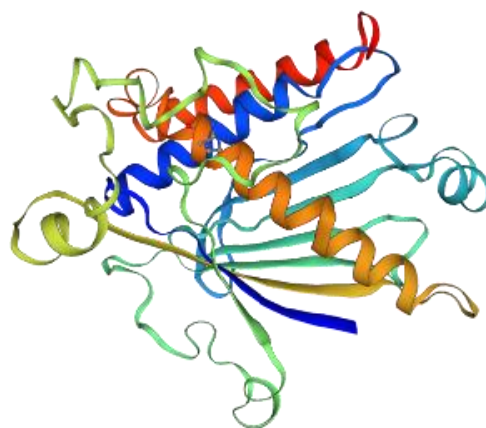


Fig. 45. Modelo tridimensional de la estructura cristalina de la PITPNM2.

9.18 La proteína de transferencia de fosfatidilinositol asociada a membrana (PITPNM2) se sobre expresa en cáncer de mama y predice una sobrevida menor en las pacientes.

Para determinar la importancia clínica de PITPNM2 llevamos a cabo un análisis para correlacionar la sobrevida libre de enfermedad y la expresión de la proteína PITPNM2. Para ello utilizamos la herramienta bioinformática “KM Plotter”. Los datos obtenidos muestran que la alta expresión de la proteína PITPNM2 se relaciona con una baja sobrevida de las pacientes con cáncer de mama en el periodo máximo de 150 meses posteriores al diagnóstico.

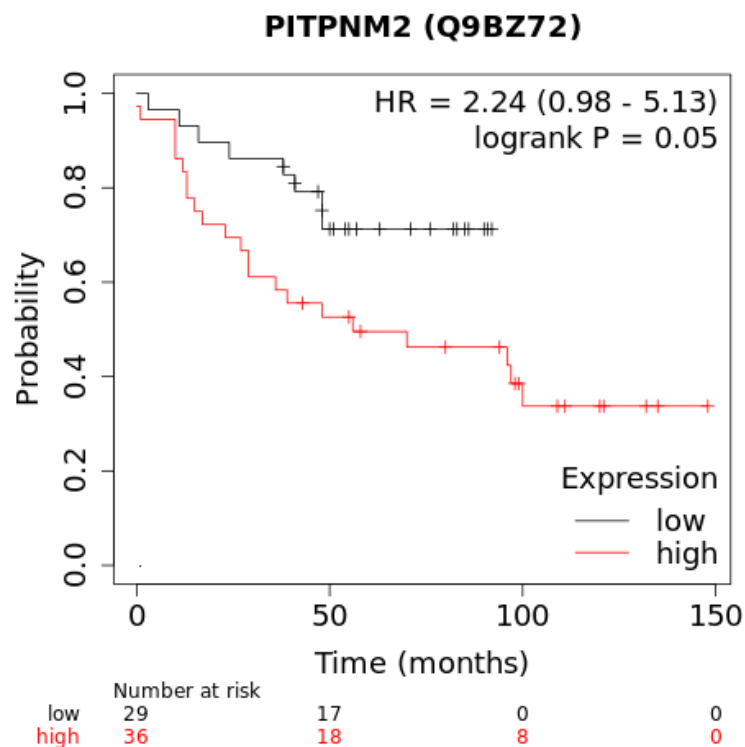


Fig. 46. Análisis de correlación de sobrevida y expresión de PITPNM2.

9.19 Interacción de proteínas con base a las proteínas reguladas

Para conocer la relación entre las proteínas extraídas de Hs-578t en cocultivo se utilizó el software Cytoscape, es una herramienta para representar las interacciones proteína-proteína conocidas y predichas en forma de red como se muestra en la Fig. 39. En dicho análisis se identificaron proteínas importantes que interactúan con proteínas como PITP y ATPasas. De lo anterior se pudo concluir que estas proteínas son importantes como elementos del microambiente tumoral en el cocultivo celular de los organoide Hs-578t con los adipocitos murinos 3T3-L1 que podrían llevar a cabo funciones de transporte lípidos.

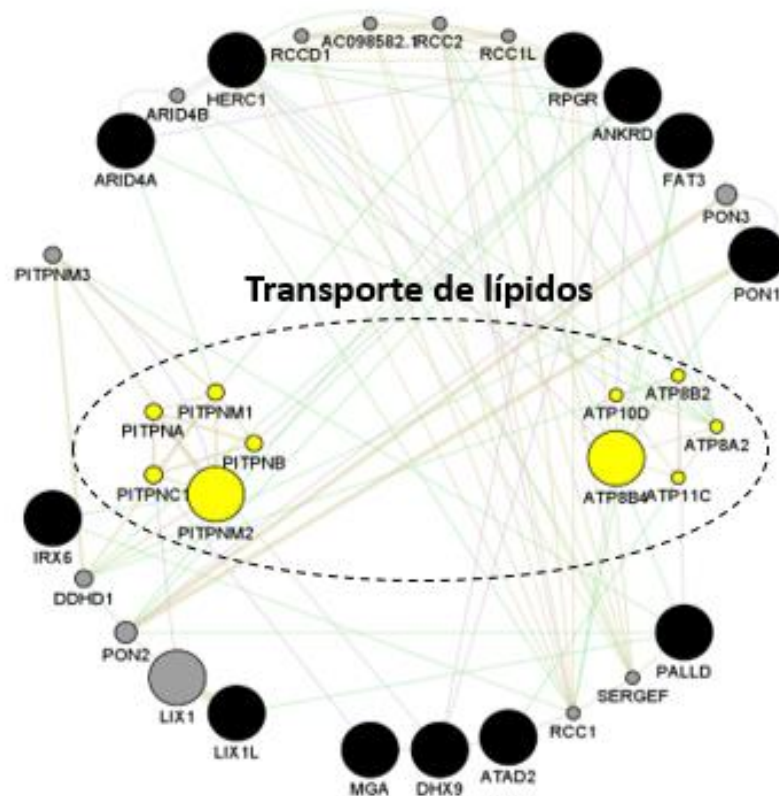


Fig. 47. Proteínas sobre expresadas de las estructuras tumorales Hs-578t en cocultivo con 3T3-L1. Red de interacción de proteínas elaborada con el software Cytoscape.

Tabla 11. Anotaciones de OG con base a la red de interacciones de proteínas sobre expresadas; obtenida de Cytoscape.

OG	P-VALUE	COVERAGE
TRANSPORTE ACTIVO DE LÍPIDOS	1.80E-10	10/118
TRANSPORTE ESTER ORGANOFOSFATO	1.40E-09	9/101
TRANSPORTE DE LIPIDOS	2.00E-07	10/265
TRANSPORTE ACTIVO DE FOSFOLIPIDOS	5.90E-07	6/42
TRANSFERENCIA ACTIVA DE FOSFOLIPIDOS	2.00E-06	5/23
TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS INTRERMEMBRANA	5.80E-06	5/29
TRANSFERENCIA ACTIVA DE LIPIDOS	2.40E-05	5/39
TRASLOCACIÓN DE LÍPIDOS	3.00E-05	5/42
DISTRIBUCIÓN Y REGULACIÓN DE LIPIDOS	3.10E-05	5/43
TRANSPORTE DE FOSFOLÍPIDOS	0.00012	5/57
UNIÓN	0.00045	4/30

9.20 Rutas de señalización con base a las proteínas sobre expresadas

Con la finalidad de conocer las vías de señalización en las que participan las proteínas expresadas diferencialmente del cocultivo celular se utilizó el software DAVID el cual nos mostró las rutas donde participan las proteínas sobre expresadas obteniendo como ruta principal la vía de señalización de las MAPK (Fig. 48); y en segundo lugar fueron las vías implicadas en cáncer (Fig. 49).

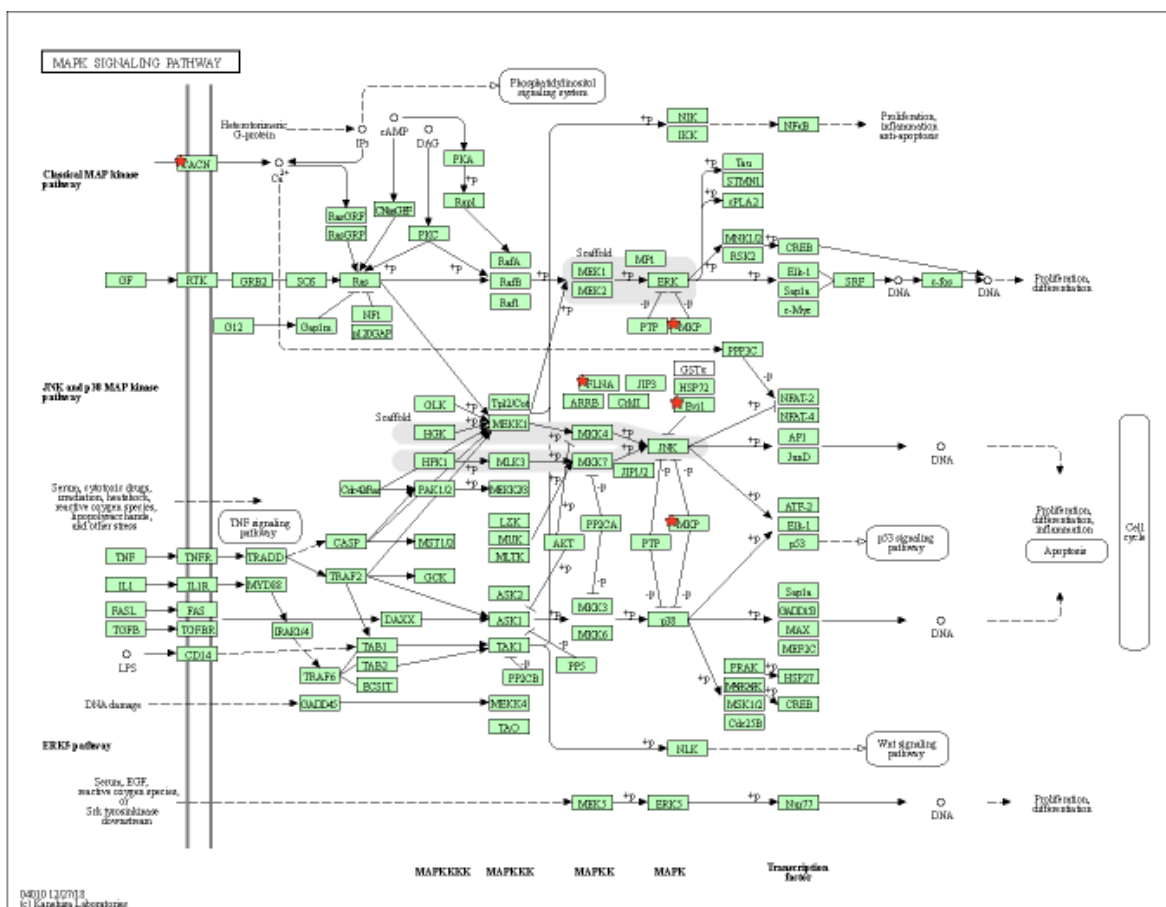


Fig. 48. Vía de señalización de las MAPK en donde participan proteínas sobre expresadas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

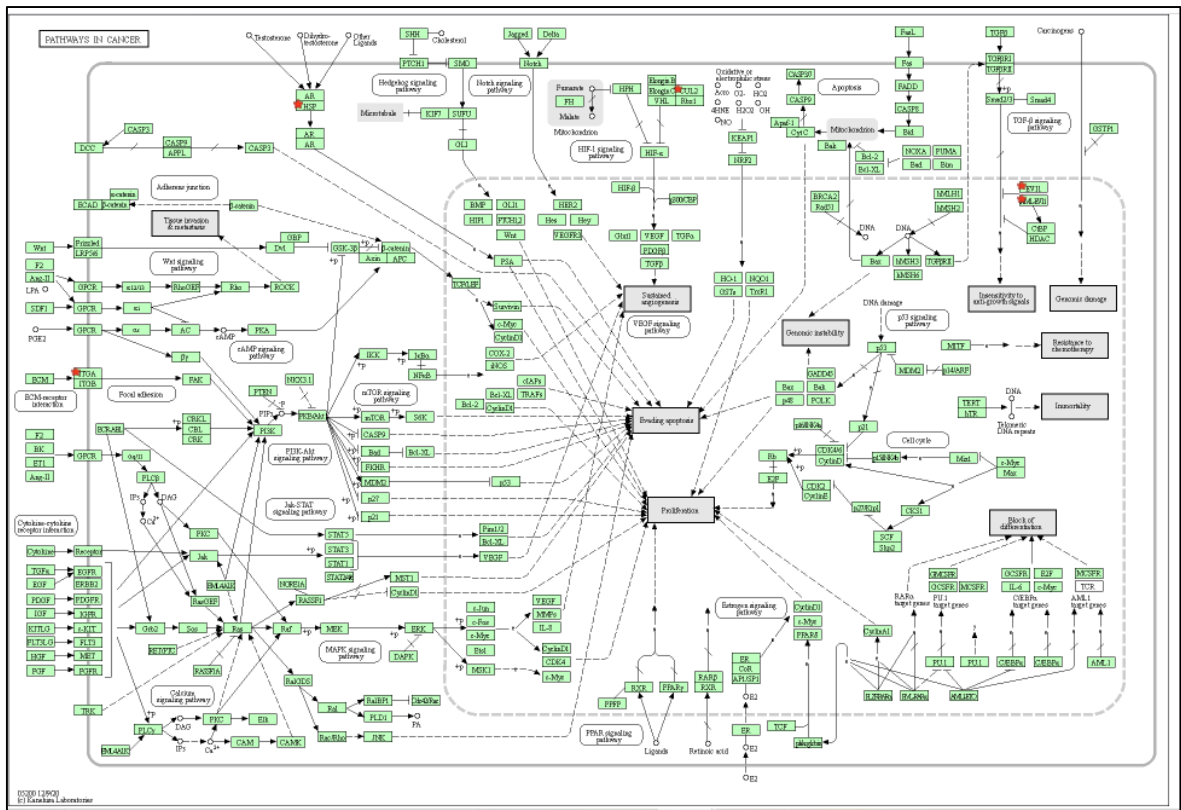


Fig. 49. Vías de señalización implicadas en cáncer donde participan proteínas sobre expresadas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Las rutas de señalización relacionadas con las proteínas sobre expresadas fueron la vía de las MAPK y de las vías implicadas en el cáncer como se muestra en la Fig. 48 y Fig 49.

La señalización celular alterada ha sido reconocida durante mucho tiempo como un mecanismo empleado por las células en el desarrollo y progresión del cáncer. La vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es solo uno de los muchos módulos de señalización implicados en este proceso. Las tres ramas principales de la familia MAPK están involucradas tanto en el crecimiento celular como en la muerte celular, y la regulación estricta de estas vías es primordial para determinar el destino celular. De forma endógena, las MAPK están reguladas negativamente por las proteínas quinasas fosfatasa activadas por mitógenos (MKP). Los MKP pertenecen a la familia de especificidad dual de las proteínas tirosina fosfatasa. Se ha demostrado que

tanto las MAPK como las MKP están implicadas en la resistencia a la quimioterapia en el cáncer de mama (Haagenson y Wu, 2010).

Una vez que se fosforilan, las MAPK son capaces de fosforilar factores de transcripción, que luego influyen en la transcripción de sus genes diana. Los objetivos posteriores de ERK incluyen ETS-1, c-Jun y c-Myc. ETS-1 se une al ADN a través de un dominio ETS y posteriormente regula al alza la transcripción de p21. BID / BAX, que promueven la apoptosis, y metaloproteinasas de matriz (MMP-1, MMP-3, MMP-9 y VEGF / VEGFR), que son genes implicados en la motilidad celular y la angiogénesis (Boutros et al., 2008); (Wu, 2017); (Keyse, 2008).

Las vías implicadas en el cáncer mostradas en la Fig.49 exacerbaban los hallmarks del cáncer. Estos distintivos sugieren que todas las células cancerosas deben tener 10 características moleculares esenciales: (1) mantener la señalización proliferativa, (2) evadir el supresor del crecimiento, (3) resistir la muerte celular, (4) permitir la inmortalidad replicativa, (5) inducir la angiogénesis, (6) activar la invasión y la metástasis, (7) inestabilidad y mutación del genoma, (8) inflamación que promueve el tumor, (9) desregular la energía celular y (10) evitar la destrucción inmunológica. Desde que se propuso la teoría, se ha utilizado ampliamente para interpretar los resultados de la investigación del cáncer, particularmente en estudios a gran escala donde se comparan datos completos del genoma y del transcriptoma (Chen et al., 2021).

9.21 Top-ten de las proteínas reprimidas en las células Hs-578t cocultivadas con adipocitos.

Para poder hacer un análisis más detallado de las proteínas identificadas por espectrometría de masas de las células tumorales Hs-578t se decidió realizar un listado con las proteínas top ten las cuales se describen en la Tabla 11; en ella podemos encontrar proteínas importantes de unión como: TNKS; VIM; el gen supresor de tumores BRCA2; transportador de colesterol GRAMD1C. Con ello podemos tener un panorama más acercado a las proteínas reprimidas en el cocultivo con fibroblastos murinos 3T3-L1.

Tabla 12. Top ten de proteínas reprimidas detectadas por espectrometría de masas. En rojo se muestran proteínas asociadas al transporte de lípidos.

Nombre	Accession number Uniprot	q Value	log2.Ratio
Probable E3 ubiquitin-protein ligase (HECTD4)	J3KPF0	0.00032625	-1.01284888
Poly [ADP-ribose] polymerase tankyrase-1 (TNKS)	O95271	0.01181302	-1.0174099
Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 (EPS15L1)	M0R165	0.02183469	-1.08844249
Mannan-binding lectin serine protease 2 (MASP2)	O00187	0.01909803	-1.11309227
Vimentin (VIM)	P08670	0.01552023	-1.13140344
Breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)	P51587	9.2186E-05	-1.13142978
Protein Aster-C (GRAMD1C)	Q8IYS0	0.00016739	-1.13373208
E3 ubiquitin-protein ligase (UBR4)	Q5T4S7	0.0022527	-1.13598464
Hydrocephalus-inducing protein homolog (HYDIN)	Q4G0P3	0.01311199	-1.14144888
Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family B member 2 (APBB2)	Q92870	0.01282778	-1.14406073

9.22 Interacción de proteínas reprimidas con base a las proteínas reguladas

Con la finalidad de conocer las funciones de las proteínas reprimidas en el cocultivo de las células tumorales Hs-578t y los adipocitos murinos 3T3-L1 se utilizó la herramienta de GeneMania de Cytoscape y se obtuvo la Fig.50. En donde se pueden apreciar las principales funciones de las proteínas obtenidas de espectrometría de masas; como lo son: i) unión y regulación, ii) actividad motora; iii) organización de la matriz y iv) actividad fosfatidilinositol. Con esto podemos demostrar que las proteínas reprimidas participan en estas funciones principalmente y deben ser reguladas para un mejor desarrollo de la estructura tipo organoide en cocultivo.

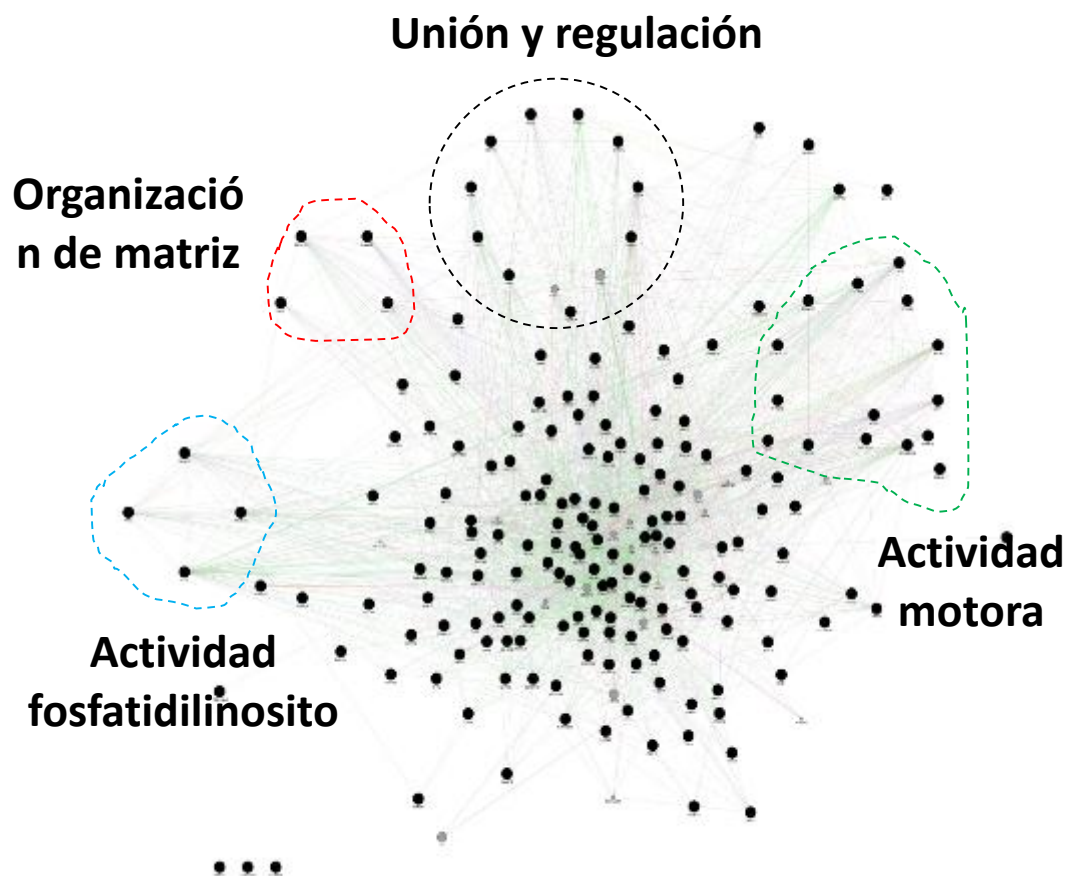


Fig. 50. Proteínas reprimidas de las estructuras tumorales Hs-578t en cocultivo con 3T3-L1. Red de interacción de proteínas elaborada con el software Cytoscape.

Tabla 13. Anotaciones de OG con base a la red de interacciones de proteínas reprimidas; obtenida de Cytoscape.

GO	P-VALUE	COVERAGE
ACTIVIDAD MOTORA	0.012	9/93
TRANSPORTE INTRACELULAR	0.033	10/157
REGIÓN CITOPLASMÁTICA	0.033	10/150
ENSAMBLE DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	0.033	05/26
ACTIVIDAD FOSFATIDILINOSITOL	0.058	4/15
ACTIVIDAD ATPASA	0.1	10/192
PROYECCIONES CITOPLASMÁTICAS	0.1	8/118
ORGANIZACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR	0.28	3/10
UNIÓN Y REGULACIÓN	0.28	11/266
TRANSPORTE DE LÍPIDOS	0.38	7/118

9.23 Rutas de señalización de proteínas reprimidas con base a las proteínas reguladas

Las rutas de señalización donde participan las proteínas reprimidas reportadas en la espectrometría de masas del cocultivo en 3D de células tumorales triple negativo Hs-578t con adipocitos murinos fueron dos; i) gap junction (Fig.51) y ii) ciclo celular (Fig.52).

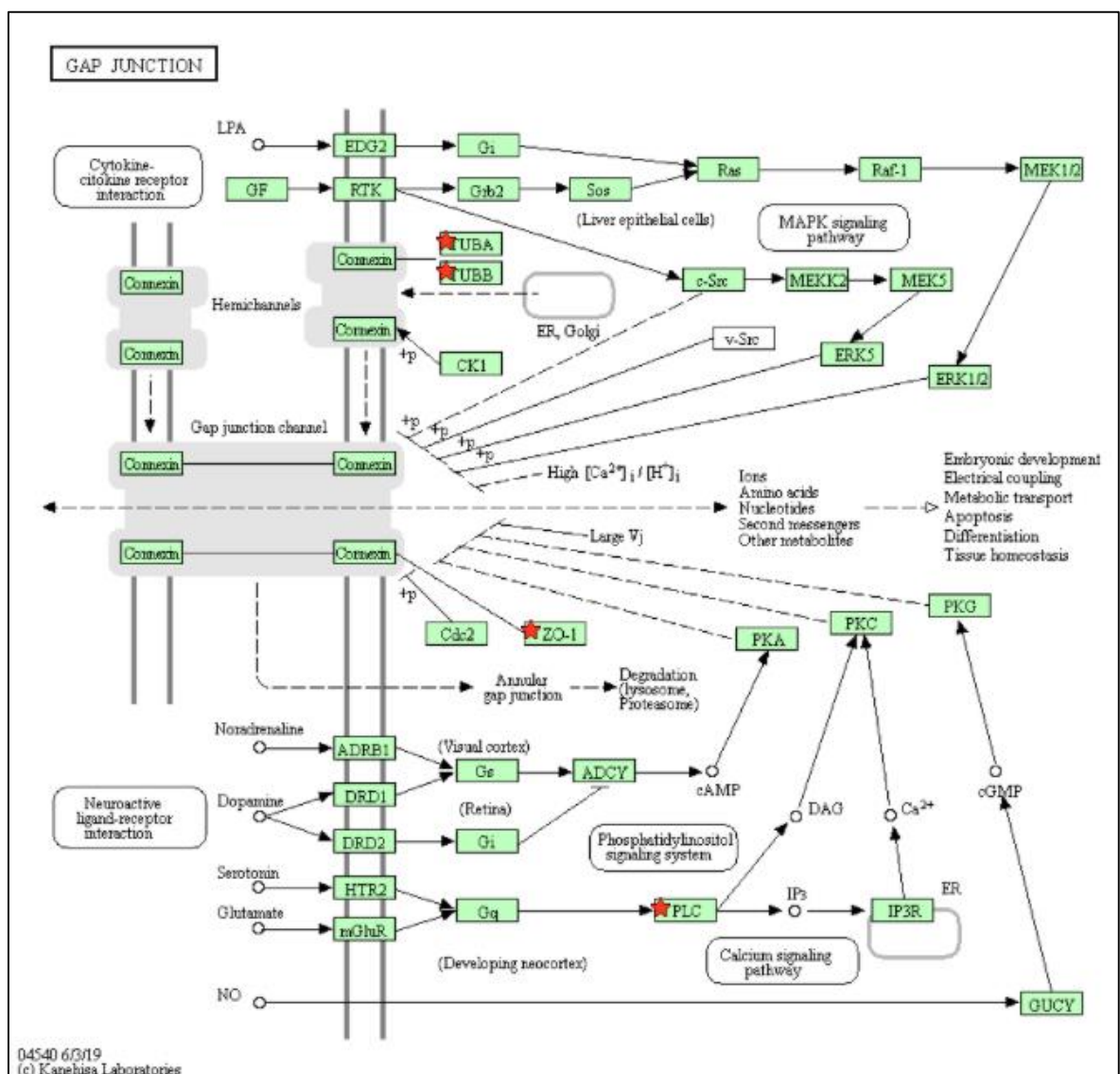


Fig. 51. Vía de señalización de GAP en donde participan proteínas reprimidas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

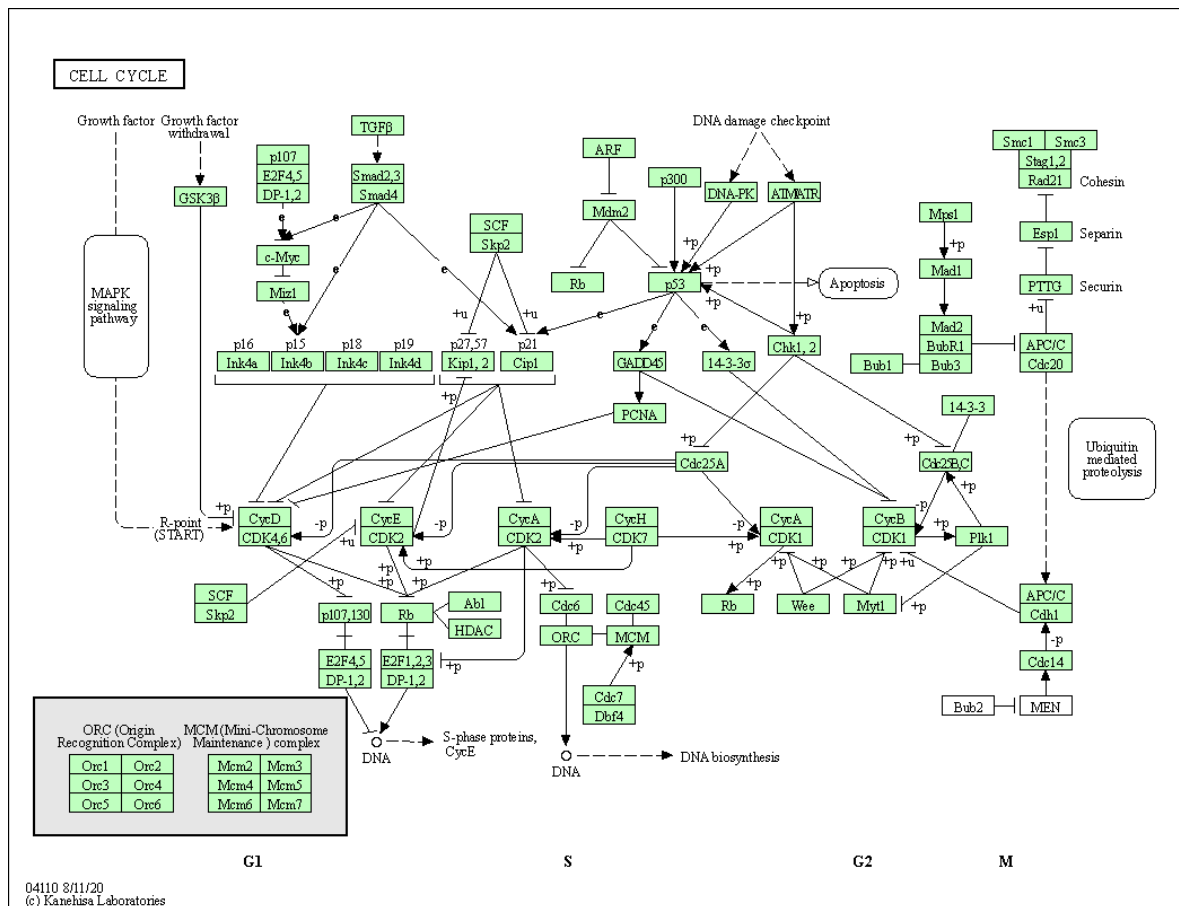


Fig. 52. Vía de señalización del ciclo celular en donde participan proteínas reprimidas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

Al analizar las vías de señalización reguladas por las proteínas reprimidas en el cocultivo 3D (Fig.51 y Fig.52). Se obtuvo que la vía del ciclo celular está modulada; la desregulación del ciclo celular es un sello distintivo del cáncer que permite una división celular ilimitada. Para respaldar este fenotipo maligno, las células adquieren alteraciones moleculares que anulan o evitan los mecanismos de control en las vías de señalización y los puntos de control celulares que normalmente funcionan para prevenir la inestabilidad genómica y la proliferación celular descontrolada.

La progresión de las células a través del ciclo celular es un proceso esencial que gobierna la duplicación del genoma y la división celular y ha sido ampliamente revisado en la literatura. Brevemente, el ciclo celular se compone de cuatro fases ordenadas, denominadas G1 (Gap 1), S (síntesis de ADN), G2

(Gap 2) y M (Mitosis) y contiene múltiples puntos de control para garantizar la fiel replicación y segregación de los cromosomas en células hijas. Estos puntos de control sirven para prevenir la inestabilidad genómica, que puede impulsar o potenciar la tumorigénesis (Dominguez et al., 2015).

La desregulación del ciclo celular mediante la inactivación de supresores de tumores y la activación aberrante de ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDK) es una característica definitoria del cáncer de mama. Dada su esencialidad para mantener la proliferación de células cancerosas, no es sorprendente que este proceso celular represente un objetivo terapéutico prometedor. Sin embargo, los agentes dirigidos al ciclo celular de generación temprana tuvieron un desempeño deficiente en la clínica debido a la falta de especificidad de la diana y toxicidades limitantes de la dosis. A pesar de la decepcionante eficacia clínica de los fármacos anteriores, el perfeccionamiento de la estrategia terapéutica para mejorar el índice terapéutico y el desarrollo de nuevos inhibidores potentes y selectivos ha renovado el optimismo en la selección del ciclo celular como estrategia terapéutica contra el cáncer. La clave de este progreso ha sido el reconocimiento de que dirigirse a los reguladores del ciclo celular que están específicamente alterados y son esenciales en las células proporciona una ventana terapéutica tal que las vulnerabilidades que imponen a las células cancerosas pueden explotarse con efectos secundarios tolerables debido a la toxicidad tisular normal. Esta es la razón fundamental detrás de la mayoría de los inhibidores del ciclo celular que se están investigando actualmente en pacientes con cáncer de mama (Thu et al., 2018).

9.24 Modelo biológico regulado por las proteínas expresadas

Finalmente, con el propósito de señalar los procesos biológicos importantes que se modularon al cocultivar las células tumorales Hs-578t con los adipocitos murinos 3T3-L1. Se realizó un modelo biológico de regulación de los hallmarks del cáncer de mama con base en las proteínas identificadas que se expresan significativamente en el cocultivo en 3D (Fig. 53). En el modelo se indican procesos como la proliferación, daño celular, diferenciación celular en células Hs-578t y en los adipocitos; la lipólisis, la lipogénesis y la diferenciación. Con

base en estos resultados podemos demostrar que existe una relación bidireccional entre ambas estirpes celulares al encontrarse cocultivadas en 3D; y de esta manera se desarrollan procesos importantes que regulan la homeostasis del microambiente tumoral.

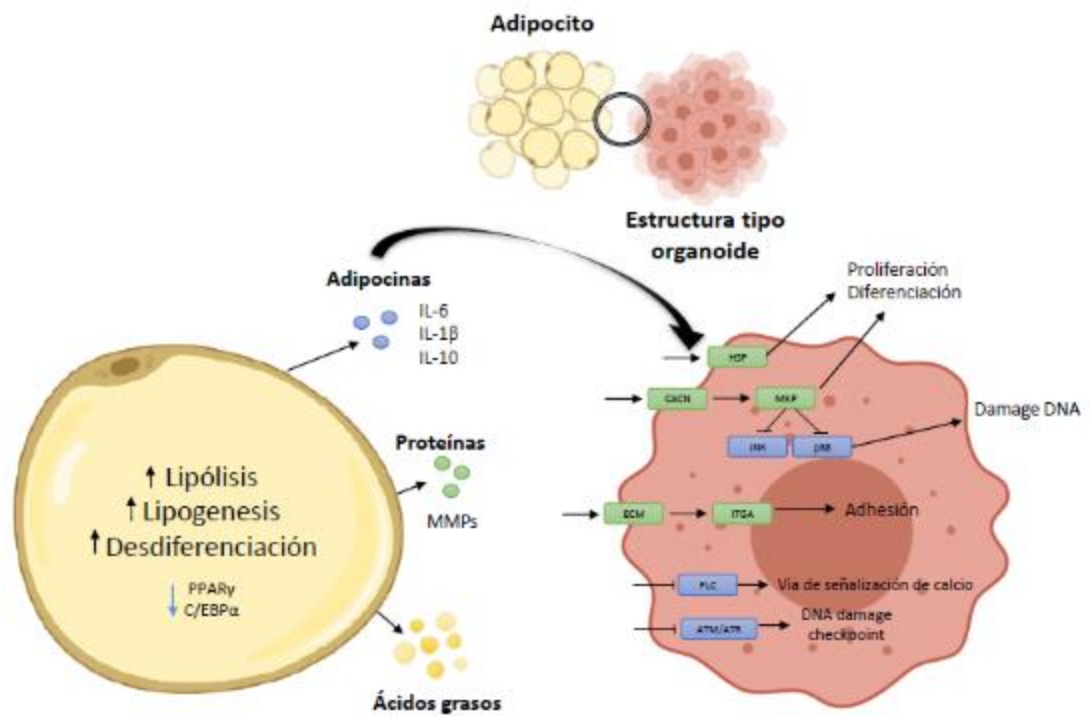


Fig. 53. Modelo biológico de regulación con base en las proteínas reguladas del cocultivo en 3D de células de cáncer de mama Hs-578t y adipocitos.

10 DISCUSIÓN

10.1 Diferenciación de fibroblastos murinos 3T3-L1 a adipocitos maduros

Al analizar los tratamientos se concluyó que las diferenciaciones más óptimas se obtuvieron cuando se empleaba rosiglitazona ya que su acción estimula la síntesis de lípidos de novo y acarrea ácidos grasos del medio al interior del adipocito con mayor facilidad; por lo tanto, fue el tratamiento utilizado para las diferenciaciones posteriores.

La rosiglitazona pertenece a una familia de medicamentos antidiabéticos orales denominados glitazonas; éste medicamento mejora la resistencia a la insulina y se caracteriza por ser agonista de PPAR γ activando éste receptor. La unión de este tipo de medicamentos activa selectivamente la transcripción génica en las células diana lo que altera la expresión de varios genes que poseen un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos; incrementando así la disponibilidad de glucosa al tejido adiposo y favorece el almacenamiento lipídico. Pero se ha reportado que su administración se asocia a un incremento de peso moderado en pacientes diabéticos.

La insulina también utilizada como tratamiento de diferenciación efectivo es una hormona endocrina que participa en la regulación del metabolismo de la energía y los lípidos a través de la cascada de señalización intracelular INRS-PI3K-AKT. Además, la insulina regula el crecimiento y la diferenciación del tejido adiposo mejorando la expresión génica de varios factores de transcripción proadipogénicos SREBP-1c y PPAR γ ; favoreciendo la captación de la glucosa y de los ácidos grasos libres (FFA), inhibiendo la lipólisis y estimulando la lipogénesis. También aumenta la captación de la glucosa en los adipocitos regulando el transporte intracelular por GLUT4 (el principal transportador de la glucosa). La administración constante de ésta hormona regula el almacenamiento lipídico y estimula la hipertrofia (o lipogénesis) de los adipocitos como la hiperplasia (o adipogénesis) ya que es de los principales inductores de la diferenciación de preadipocitos activando INRS (receptor intracelular de la insulina) Fig. 54 (Cignarelli et al 2019).

Por éstas razones los adipocitos tuvieron una mejor respuesta en el almacenamiento lipídico y su diferenciación; fue el tratamiento que reflejó un ambiente obesogénico donde los adipocitos almacenaron la mayor cantidad de lípidos en comparación con los demás tratamientos empleados.

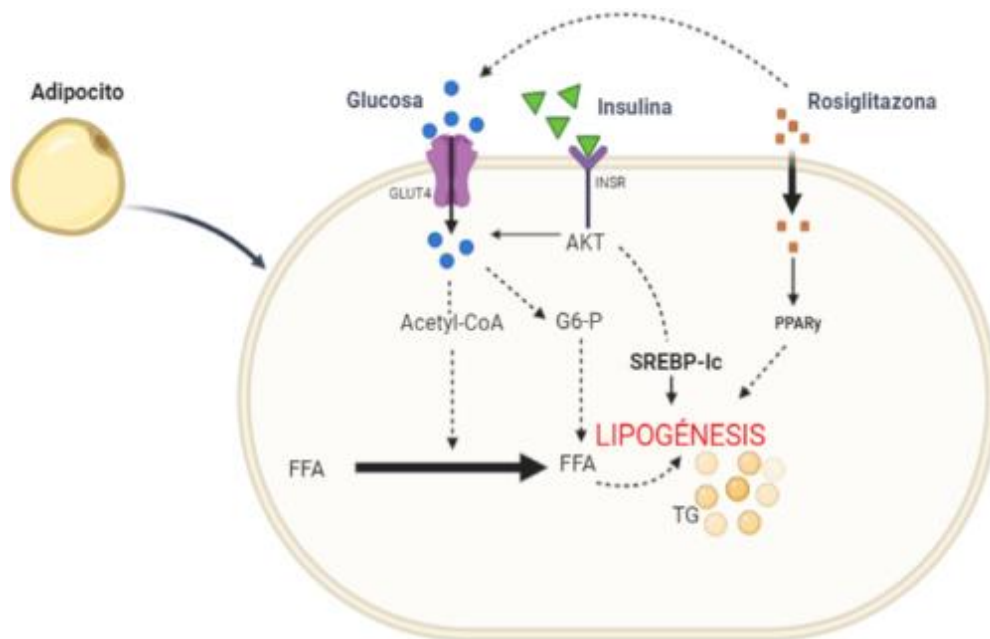


Fig. 54. Modelo esquemático del efecto de diversos tratamientos en la lipogénesis.

10.2 Obtención de las estructuras tumorales

Los cultivos en 3D nos ayudan a crecer las células tumorales *in vitro* simulando la arquitectura de la ME que se presenta *in vivo* por lo que representan un excelente modelo de estudio ya que es de suma importancia la relación que tiene la ME con la célula cancerosa pues es crítica para dirigir la tumorigénesis y metástasis. Aunque los modelos de cultivo bidimensionales (2D) se han utilizado ampliamente para comprender los mecanismos del cáncer, en las últimas décadas estos modelos aún exhiben una visión limitada. La evidencia reportada muestra que se requieren modelos de cultivo tridimensionales (3D) fisiológicamente relevantes para comprender mejor la progresión del cáncer y desarrollar tratamientos más efectivos. La ME es el componente del tejido no celular que proporciona soporte estructural y bioquímico de las células circundantes como adhesión celular, la comunicación paracrina y señales de diferenciación. Con el mantenimiento de la ME compuesta por fibronectina y colágenos; se promueve la formación de esferoides para diversos tipos celulares, incluidos fibroblastos, macrófagos, adipocitos y preadipocitos.

Kenny y su grupo de colaboradores en el 2007 describieron cuatro clases morfológicas de esferoides tumorales (redonda, en masa, racimo de uvas y estrellada) gracias a los patrones de expresión de genes y proteínas subyacentes características de cada línea celular. En el presente trabajo se obtuvo una estructura tumoral estrellada de la línea celular Hs-578t; lo cual concuerda con lo reportado ya que ésta línea celular pertenece a la clasificación molecular de cáncer Basal B, se caracteriza por presentar un alto grado de metástasis y ésta morfología estrellada ayuda a que las células formen colonias celulares y presenten una mejor capacidad invasiva hacia tejidos subyacentes. En los tres sistemas montados obtuvimos esferoides tumorales, pero se obtuvo una mejor respuesta con 3.2×10^4 .

10.3 Caracterización de la diferenciación adipocitaria mediante el análisis de la expresión de genes de diferenciación

En el 2013 Arsenijevic y su grupo de colaboradores reportaron que los factores proadipogénicos PPAR γ y C/EBP α en el proceso de adipogénesis en las células 3T3-L1 en el día 7 tienen un incremento de expresión significativo en comparación con el día 0; como se muestra en la Fig. 55. Nuestros resultados mostrados en la Fig.22 indican que no hubo diferencias significativas en la expresión de PPAR γ y C/EBP α en adipocitos post-cocultivo con estructuras tumorales Hs-578t. Por lo cual se demuestra que esta diferencia de expresión se debió a que el análisis de expresión se realizó en adipocitos post-cocultivo y no en adipocitos control. En conclusión, el cocultivo de los adipocitos murinos 3T3-L1 con las estructuras tumorales promueven una disminución de expresión de factores proadipogénicos, éste proceso es conocido como desdiferenciación.

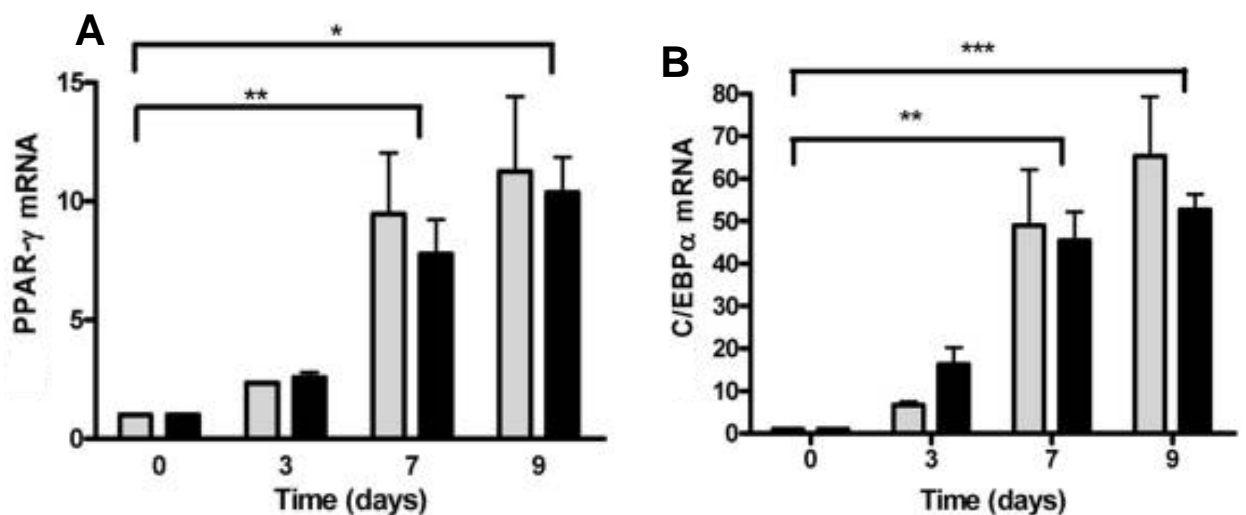


Fig. 55. Caracterización de la expresión de factores proadipogénicos. A) PPAR γ y B) C/EBP α . Imagen tomada de Arsenijevic et al, 2013.

10.4 Análisis de adipocitos post-cocultivo

Al observar los adipocitos post- cocultivo se puede apreciar que las gotas lipídicas ya no tienen la forma característica de gota lipídica, si no tiene un aspecto irregular. Posteriormente se cuantificaron los lípidos albergados en el interior como se muestra en la Fig. 24. La cuantificación lipídica, incrementa significativamente en adipocitos diferenciados en comparación con los fibroblastos y en condiciones de cocultivo, por el contrario, al comparar la cuantificación de lípidos de fibroblastos con respecto a adipocitos puestos en cocultivo no muestra algún cambio significativo. Por lo que podríamos concluir que la célula adiposa podría sufrir de una reprogramación metabólica en donde los ácidos grasos son liberados al medio (Fig. 56); a este fenómeno se le conoce hoy en día como lipólisis, según lo reportado por Zaidi y colaboradores en el 2013, y es desarrollado en células que sufren estrés metabólico.

Por el contrario, las estructuras tumorales tipo organoide se sabe que expresan proteínas implicadas en la digestión lipídica como LPL. Se ha especulado que la LPL, unida a un motivo proteoglicano de heparán sulfato similar a la heparina en la superficie de la célula cancerosa o en la superficie luminal del epitelio vascular, libera FA de las lipoproteínas ricas en triglicéridos celulares (TGRL). La lipólisis extracelular regulada por LPL en células cancerosas puede facilitar la captación de FA en el microambiente tumoral (Munir et al. 2019).

conveniente solo de las células viables. El metabolismo celular reportado en la literatura involucra enzimas mitocondriales específicas concluyendo que el ensayo de MTT mide la actividad mitocondrial (Riss, et al. 2013).

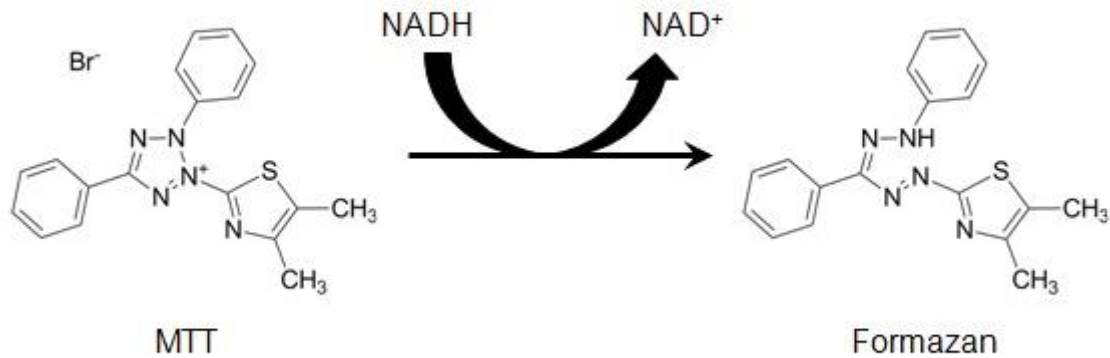


Fig. 57. Estructuras de MTT y producto formazán coloreado.

El producto formazán del MTT tetrazolio se acumuló como un precipitado insoluble dentro de las células y se depositó cerca de la superficie celular y en el medio de cultivo. El formazán registro lecturas de absorbancia óptimas de viabilidad en las estructuras tumorales tipo organoide de las Hs-578t y de los fibroblastos murinos 3T3-L1.

10.6 Ontología y enriquecimiento de genes

Según el análisis OG y enriquecimiento de las proteínas obtenidas del análisis de espectrometría de masas los procesos biológicos en los que participan las proteínas sobre expresadas son de procesos celulares principalmente, seguido de procesos de regulación biológica, así como de adhesión biológica. Los procesos celulares se definen como cualquier proceso que se lleve a cabo a nivel celular: metabolismo, catabolismo, respiración celular, ciclo celular etc., pero no necesariamente restringido a una sola célula. Por ejemplo, la comunicación celular ocurre entre más de una célula, pero ocurre a nivel celular. En la comprensión de los procesos celulares se debe tomar en cuenta que es un camino complejo para su estudio a detalle ya que, se engloban procesos importantes en general estos mecanismos trabajan dentro de la célula para lograr su estabilidad dentro de los orgánulos. Los procesos de

regulación biológica u homeóstasis es la función que realiza la célula para mantener el equilibrio celular mediante estímulos que alteren la estabilidad.

Las funciones moleculares en las que participan la mayoría de las proteínas detectadas son de unión o adhesión celular. Lo cual concuerda con lo esperado ya que se montaron cultivos en 3D con medio rico en matrigel la cual simula la ME proporcionando andamios para el soporte celular que están presentes en todos los tejidos. La ME es una mezcla compleja de moléculas de la matriz, incluidas las glicoproteínas fibronectina, colágenos, lamininas, proteoglicanos y proteínas que temporalmente se alojan en la matriz como son, los factores de crecimiento. La adhesión celular a la ME induce estructuras discretas en la superficie celular estrechamente asociadas con la matriz denominadas adhesiones célula-matriz, que median las interacciones directas de la célula con su entorno extracelular. Las adhesiones entre la célula y la matriz son esenciales para la migración celular, la organización y diferenciación de los tejidos y, como resultado, desempeñan funciones centrales en el desarrollo embrionario, la remodelación y la homeostasis de los sistemas de tejidos y órganos. Las señales de adhesión a la matriz cooperan con otras vías para regular procesos biológicos como la supervivencia celular, la proliferación celular, cicatrización de heridas y tumorigénesis. Por lo tanto, dilucidar la estructura y función de las adhesiones célula-matriz proporciona un punto de vista crítico para comprender la regulación de los fenotipos celulares eucariotas *in vivo* (Berrier y Yamada, 2007).

En el análisis de las proteínas reprimidas nos indicó los procesos celulares que se vieron alterados fueron principalmente la adhesión celular y regulación celular en donde las proteínas implicadas tienen función catalítica.

10.7 Interacción de proteínas con base a las proteínas reguladas

Otras proteínas importantes que regulan positivamente el cáncer de mama son: DGKG; ARHGEF5; ANKRD17 y OSBPL11. Y tuvieron una participación importante en los hallazgos encontrados durante el análisis de las proteínas.

La DGKG (diacilglicerol quinasa gamma); invierte el flujo normal de biosíntesis de glicerolípidos al fosforilar el diacilglicerol de nuevo a ácido fosfatídico; pertenece a la familia de las diacilglicerol quinatas eucariotas. El metabolismo de lípidos anormal es uno de los defectos metabólicos tumorales más notables. El aumento de la síntesis o absorción de lípidos contribuye al rápido crecimiento de las células cancerosas y a la tumorigénesis (Xiong et al., 2021).

El metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol está regulado por los FA. Por lo tanto, al identificar a DGKG como gen regulador clave de la síntesis de FA. Este hallazgo es consistente con estudios reportados en la literatura (Oh et al., 2008); (Torres-Ayuso et al., 2014); (Kai et al., 2017); (Xiong et al., 2021); y puede sugerir la confiabilidad de nuestro estudio.

ARHGEF5 (factor 5 de intercambio de nucleótidos de guanina Rho; factor de intercambio de nucleótidos de guanina que activa Rho GTPasas) es un factor que activa fuertemente a RHOA. También activa fuertemente RHOB, activa débilmente RHOC y RHOG y no muestra ningún efecto sobre RHOD, RHOV, RHOQ o RAC1 (por similitud). Este factor está involucrado en la regulación de la forma celular y la organización citoesquelética de actina. Así mismo desempeña un papel en la organización de la actina al generar una pérdida de las fibras de tensión de la actina y la formación de membranas onduladas y filopodios. Como se sabe la línea celular que se utilizó para el presente trabajo fue la Hs-578t la cual pertenece a la clasificación triple negativo, con alto grado metastásico y en estas se pudieron apreciar en los cultivos en 3D extensiones citoplasmáticas parecidas a filopodios; la identificación de ARHGEF5 sugiere que las estructuras identificadas en nuestros resultados se trataban de filopodios.

OSBPL11 es una proteína que pertenece a la familia de OSBP y está relacionada con la proteína de unión a oxisterol, lo cual desempeña un papel en la regulación de los niveles de expresión de ADIPOQ y FABP4 y su participación en la diferenciación de adipocitos. Se ha descrito también su función en la regulación del almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos, además se ha reportado que se une débilmente al 25-hidroxicolesterol.

La desregulación de la composición de la matriz afecta varias afecciones patológicas, incluido el cáncer. La invasión tumoral, que es anterior a la

metástasis, implica interacciones mutuas y dinámicas entre las células del tumor primario y el microambiente estromal circundante. La comunicación intercelular entre las células cancerosas y en particular entre el cáncer y las células del estroma juega un papel importante en la progresión tumoral. Las células cancerosas, desarrollan protuberancias citoplasmáticas especiales llamadas invadopodios, pero también se conocen otras extensiones citoplasmáticas como los filopodios (Franchi et al., 2020). Recientemente se ha demostrado una función fisiológica novedosa de los filopodios para la captura de exosomas mediante imágenes *en vivo* de células en fibroblastos primarios humanos, lo que demuestra que pueden actuar como vías para la entrada celular de exosomas (Heusermann et al., 2016).

11 CONCLUSIONES

En este estudio dirigido a conocer el proteoma modificado por la influencia de los adipocitos 3T3-L1 a las células cancerosas triple negativo Hs-578t de cáncer de mama. Se ha identificado un papel importante en la secreción de ácidos grasos; así como de factores solubles, adipocinas, hormonas entre otros; como estímulos importantes que promueven los hallmarks del cáncer, principalmente la proliferación que pueden utilizarse como combustible metabólico. Así nuestras conclusiones son que los efectos de la obesidad sobre el comportamiento de las células del cáncer de mama incluyen un suministro metabólico directo de sustratos junto con los efectos de señalización paracrina y endocrina bien establecidos. Dichos efectos estimulan la progresión y un mal pronóstico de cáncer en las pacientes que padecen dichas enfermedades conjuntas.

12 ANEXO

Tabla 14. Proteínas sobre expresadas detectadas y cuantificadas por espectrometría de masas de las estructuras tumorales Hs-578t en 3D durante cocultivo.

Description	Accession	q Value	log2.Ratio
Ankyrin repeat domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKRD17 PE=1 SV=3	O75179	0.00010963	10.2218272
Iroquois-class homeodomain protein IRX-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IRX6 PE=1 SV=3	P78412	1.0454E-06	9.67884941
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2	P04114;A8MUN2; A0A669KB70	0.00032625	7.10920822
LIX1-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LIX1L PE=2 SV=1	Q8IVB5	0.00052676	5.6334759
Solute carrier family 25	Q8WUT9	0.00915565	4.91325186

member 43 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25 A43 PE=2 SV=2			
ATP- binding cassette sub-family A member 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA 9 PE=1 SV=2	H0Y4U7;Q8IUA7; Q8IUA7- 3;Q8IUA7-4	0.00090174	4.64596801
E3 ubiquitin- protein ligase RNF213 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNF2 13 PE=1 SV=3	Q63HN8;A0A0A0 MTR7	0.00024503	4.48097519
Calcium- transporti ng ATPase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2 C1 PE=1 SV=1	B4E2Q0;HOY9V7;P 98194;P98194- 2;P98194- 3;P98194- 4;P98194- 5;P98194- 6;P98194- 7;P98194- 9;P98194- 8;HOY9S7	0.00021936	4.40850704
Membran e- associate d phosphati dylinositol transfer protein 2	Q9BZ72	0.00021989	4.37403642

OS=Homo sapiens OX=9606 GN= PITPN M2 PE=1 SV=1			
POU domain class 2 transcription factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POU2F3 PE=2 SV=3	Q9UKI9;Q9UKI9-2;Q9UKI9-3;H0YLC5	0.00107385	
Nucleus accumbens-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NACC1 PE=1 SV=1	Q96RE7;K7ENW4	0.00112203	4.10728909
Isoform 3 of Ninein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIN	Q8N4C6-10;Q8N4C6-7;Q8N4C6-2;Q8N4C6-5;Q8N4C6-9;C9J066;Q8N4C6-4;E9PN67;Q8N4C6-11;Q8N4C6-6;A0A669KBI5;H7C162;A0A669KBE5	0.00704062	4.03101773
RING finger protein 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNF1	Q9BXT8;Q9BXT8-4;Q9BXT8-5	6.4613E-06	3.74962549

7 PE=1 SV=3			
Voltage- dependen t calcium channel subunit alpha- 2/delta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACN A2D1 PE=1 SV=3	P54289;H0Y715;P 54289-2;P54289- 3;P54289- 4;P54289-5	3.5263E-05	3.6710527
Biotin-- protein ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HLCS PE=1 SV=1	A0A6Q8PFK4;P50 747;A0A0C4DG27 ;C9JCQ9	0.00256693	3.46973086
Cadherin- like and PC- esterase domain- containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPED 1 PE=2 SV=1	A4D0V7;A4D0V7- 2;E7ENG7;E9PCC8 ;G5E9U2	0.00214323	3.43656537
RanBP2- like and GRIP domain- containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RGPD 3 PE=3 SV=2	A6NKT7;J3KNE0	0.00065329	3.41287601

Envoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EVPL PE=1 SV=3	Q92817;K7EKIO	0.00350723	3.39485454
Unconventional myosin-XVB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO15B PE=1 SV=1	A0A0J9YY01;A0A2R8YFM0;A0A0J9YW50;A0A0J9YYJ7	0.00217558	3.33198226
Protein PRRC2C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRRC2C PE=1 SV=4	Q9Y520;Q9Y520-5;Q9Y520-7;E7EPN9;Q9Y520-4;Q9Y520-6;Q9Y520-2;Q9Y520-3;H7C5N8;A0A2R8YET2;A0A0A0MS30;A0A2R8Y7F4;E9PI26;F5GYG5;H0YG54;H0YGR4;H7C519;O75330-4;P32780-2;Q5T7N2;Q9H857;Q9H857-2;Q9H857-3;Q9H857-4;Q9Y3B8-2;Q9Y3B8-3	0.00046458	3.24895864
Sodium channel protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCN8A PE=1 SV=1	A0A590UK43;Q9UQD0;Q9UQD0-2;Q9UQD0-3;Q9UQD0-5	0.00016994	3.242245
Probable E3 ubiquitin-protein	Q15751	0.01393752	3.05912062

ligase HERC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HERC 1 PE=1 SV=2			
Heat shock protein HSP 90- beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP9 0AB1 PE=1 SV=4	P08238;Q58FF6;Q 58FF7;Q58FF8;G3 V2J8	0.00144318	3.00530492
A-kinase anchor protein SPHKAP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPHK AP PE=1 SV=1	Q2M3C7;Q2M3C7 -2	0.00041022	2.959451
Protein Smaug homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAM D4A PE=1 SV=3	Q9UPU9;Q9UPU9- 2;Q9UPU9-3	0.0156328	2.87410918
NHS-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NHSL 2 PE=1 SV=2	Q5HYW2;A0A1W2 PQQ1	0.00245146	2.85221273
Trinucleot ide	O15417;H9KVB4; O15417-2	0.00312738	2.78059594

repeat-containing gene 18 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNRC18 PE=1 SV=3			
Pecanex-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNX2 PE=1 SV=3	A6NKB5;HOYBF4	0.00050901	2.71561783
Kelch-like protein 42 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KLHL42 PE=1 SV=2	Q9P2K6	0.00487083	2.69351298
Serine/threonine-protein kinase Chk2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHEK2 PE=1 SV=1	O96017;O96017-12;O96017-7;O96017-8;A0A3B3ITA7;B7ZBF8;C9JFD7;F8WCV2;O96017-10;O96017-2;O96017-5;O96017-6	0.00487083	2.63181562
Protocadherin Fat 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAT3 PE=2 SV=3	Q8TDW7	0.00586167	2.39423884
DNA polymerase epsilon catalytic	Q07864;F5H1D6;A0A5F9ZHA7	0.00256693	2.39043902

subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLE PE=1 SV=5			
ATPase family AAA domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD 2 PE=1 SV=1	Q6PL18	0.00708424	2.26755933
Histone-lysine N-methyltransferase MECOM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MECOM PE=1 SV=3	Q03112;Q03112-3;Q03112-4	8.4227E-05	2.21798197
Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PON1 PE=1 SV=3	P27169	0.0002975	2.19531918
Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4	P21333;P21333-2;Q60FE5;A0A087WWY3;A0A7I2V3E6;C9JM20;H0Y5F3;H7C0N9;H7C2D3;O75410;O75410-2;O75410-7;O75410-9;O95841;Q6PCB5-2	0.00196205	2.15902368

ATP-binding cassette sub-family A member 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA12 PE=1 SV=3	Q86UK0;Q86UK0-2	0.00072884	1.97873519
MAX gene-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGA PE=1 SV=4	Q8IWI9	0.00216328	1.9439664
Differentially expressed in FDCP 8 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DEF8 PE=1 SV=2	Q6ZN54;H3BMP4;H3BMT5;H3BQH5;H3BQX9;H3BRA7;H3BSH6;H3BT01;H3BT87;H3BTS7;Q6ZN54-2;Q6ZN54-3;Q6ZN54-4;Q6ZN54-5;Q6ZN54-6	0.0091291	1.91148033
Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT2 PE=1 SV=2	P35908;O95678;H0YIN9	0.00762014	1.91032056
Integrin alpha-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA6 PE=1 SV=5	P23229;P23229-2;P23229-3;P23229-4;P23229-5;P23229-6;P23229-7;P23229-9	0.01603352	1.87635644

Cilia- and flagella-associated protein 69 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFAP69 PE=1 SV=3	A5D8W1;A5D8W1-2;A5D8W1-3;A5D8W1-4;H7C002	0.00112203	1.87319813
Spectrin beta chain_erythrocytic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTB PE=1 SV=5	P11277;P11277-2;P11277-3	0.00275568	1.86751606
AT-rich interactive domain-containing protein 4A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARID4A PE=1 SV=3	P29374	0.01392408	1.81008275
Palladin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PALLD PE=1 SV=3	Q8WX93	0.00157891	1.7699889
OTU domain-containing protein 7A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OTUD7A PE=1 SV=1	Q8TE49;Q8TE49-2;H0YN66	0.01491074	1.73857818

Tripeptidyl- peptidase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPP2 PE=1 SV=1	A0A494C0U1;A0A 494C1B8;P29144; Q5VZU9	0.01229271	1.71420311
Dual specificity protein phosphatase 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DUSP 7 PE=1 SV=4	Q16829;H7C4Z0; Q16829-2	0.00269239	1.69680531
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPM 2 PE=1 SV=1	E9PGK7;O94759; O94759- 2;O94759- 3;C9JZQ8	0.00172224	1.66086687
Pikachurin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EGFL AM PE=1 SV=2	Q63HQ2;Q63HQ2- 2;Q63HQ2- 4;Q63HQ2- 3;Q63HQ2- 5;D6RJD2	0.00062719	1.64330264
Transmembrane protein KIAA1109 OS=Homo sapiens	Q2LD37;Q2LD37- 4;Q2LD37- 7;Q2LD37- 6;Q2LD37- 2;H0Y781;H7C121 ;H3BLT5;H7C070	0.01012237	1.64093765

OX=9606 GN=KIAA1 109 PE=1 SV=2			
Ankyrin repeat domain- containing protein 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKR D12 PE=1 SV=3	Q6UB98;Q6UB98- 2	0.00825842	1.60535918
Filamin-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNC PE=1 SV=3	Q14315;Q14315-2	0.01086329	1.59952938
Forkhead- associate d domain- containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FHAD 1 PE=2 SV=2	B1AJZ9;B1AJZ9- 3;B1AJZ9- 4;HOY5P0;HOYCR1 ;HOYE38;Q5JYW6; HOY3C6;HOYEU3	0.02274307	1.59783918
(E2- independ ent) E3 ubiquitin- conjugati ng enzyme FATS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C10or f90 PE=2 SV=2	Q96M02;Q96M02 - 2;A0A0A0MSX2;S 4R3N7	0.00043671	1.58841953
Tripartite motif- containing	Q14142;Q14142-3	0.01479927	1.54821253

protein 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM14 PE=1 SV=2			
ABC-type organic anion transporter ABCA8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA8 PE=1 SV=4	O94911;A0A0A0MSU4;O94911-1;A0A075B774	0.00330447	1.49004094
Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNRC6B PE=1 SV=4	Q9UPQ9;Q9UPQ9-1;H0Y720	1.2597E-06	1.48878034
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FARSA PE=1 SV=3	Q9Y285;K7ER00;Q9Y285-2;K7EPH2;K7ER16	0.00200484	1.47865646
Dynein regulatory complex protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606	Q9H095;Q9H095-2;C9J6M9;C9JKX8	0.00774412	1.46036422

GN=IQCG PE=1 SV=1			
Ankyrin repeat domain- containing protein 20B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKR D20A8P PE=2 SV=2	Q5CZ79	0.02232542	1.43375885
La-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LARP 1 PE=1 SV=2	Q6PKG0;Q6PKG0- 3	9.2186E-05	1.39293231
X-linked retinitis pigmento sa GTPase regulator OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPGR PE=1 SV=2	Q92834	0.02177365	1.38914233
Lactopero xidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LPO PE=1 SV=2	P22079;F5H386;P 22079-2	0.02300382	1.38645529
Serine/thr eonine- protein phosphat ase 4 regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606	Q8TF05;Q8TF05-2	0.01908411	1.37341628

GN=PPP4 R1 PE=1 SV=1			
Protein furry homolog- like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FRYL PE=1 SV=2	O94915;A0A669K B90;A0A6E1XQM 6;F2Z2S2	0.01114138	1.31576594
Receptor- type tyrosine- protein phosphat ase delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPR D PE=1 SV=2	P23468;P23468- 2;F5GWR7;P2346 8-3;P23468- 4;P23468- 5;P23468- 6;P23468- 7;Q3KPI9	0.00277233	1.29560436
Mucosa- associate d lymphoid tissue lymphom a translocat ion protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MALT 1 PE=1 SV=1	Q9UDY8;Q9UDY8- 2;A0A3B3IS32	0.00640005	1.28979243
Triple functional domain protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIO PE=1 SV=2	O75962;O75962- 4;E7EPJ7;O75962- 2;O75962- 5;E7EWP2	0.01431374	1.28698873

StAR-related lipid transfer protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STAR D9 PE=1 SV=3	Q9P2P6;Q9P2P6-2;Q9P2P6-3	0.00564336	1.25946492
Coagulation factor VIII OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F8 PE=1 SV=1	A0A2R8Y707	0.0003542	1.24490675
Axonemal dynein light chain domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AXDN D1 PE=2 SV=1	Q5T1B0;B1AM31;A6H900	0.02068866	1.24100222
Probable phospholipid-transporting ATPase IM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP8 B4 PE=1 SV=3	Q8TF62	0.02171468	1.23824663
Ceramide transfer protein (Fragment) OS=Homo	A0A2R8Y5H3;A0A2R8Y5S9;A0A2R8Y7C5;A0A2R8Y7Q9;A0A2R8YE18;A0A2R8YEK8;Q9Y5P4;Q9Y5P4-	0.00823715	1.19679944

sapiens OX=9606 GN=CERT 1 PE=1 SV=1	2;Q9Y5P4- 3;A0A2R8YEA4;A0 A2R8YFI2;A0A2U3 TZL3;A0A2R8YCI0; A0A2R8YE59;A0A 2R8YDX6		
E3 ubiquitin- protein ligase DZIP3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DZIP3 PE=1 SV=2	Q86Y13;C9J9M8;C 9J702;Q86Y13-2	0.01006124	1.18878117
Cullin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CUL2 PE=1 SV=2	Q13617;A0A0A0 MTN0;Q13617- 2;Q5T2B5	0.00656968	1.16528207
FYVE_ RhoGEF and PH domain- containing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGD6 PE=1 SV=2	Q6ZV73;F8VY01;Q 6ZV73-2;F8VQX5	0.00748681	1.16507513
Microtubu le- associate d protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1	E7EVA0;P27816- 6;P27816- 2;P27816- 5;H7C456;A0A0J9 YVV8;A0A0J9YW3 7;P27816-7	0.01272301	1.13696802
Xin actin- binding repeat- containing protein 2 OS=Homo sapiens	A4UGR9;A4UGR9- 2;A4UGR9- 8;A0A5F9ZH43;A4 UGR9-3	0.0084564	1.13472816

OX=9606 GN=XIRP2 PE=1 SV=2			
Protein furry homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FRY PE=1 SV=1	Q5TBA9;A0A286Y FA9;A0A2R8Y5V8; A0A2R8YCY2;A0A 0C4DFX2	0.00341965	1.12644571
Echinoder m microtubu le- associate d protein- like 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EML6 PE=2 SV=2	Q6ZMW3;Q6ZM W3-2	0.00454237	1.11466597
Vigilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLB P PE=1 SV=2	Q00341;Q00341- 2;A0A024R4E5;H0 Y394;H7C2D1;C9J 5E5;C9JBS3;C9JEJ 8;C9JES8;C9JHN6; C9JHS7;C9JHZ8;C9 JIZ1;C9JK79;C9JM Q6;C9JQ82;C9JT6 2;C9JZI8	0.01678462	1.08216343
ATP- dependen t RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4	Q08211	0.01162806	1.05481061
cAMP- specific 3'_5'- cyclic phosphod iesterase 4B OS=Homo	Q07343;Q07343- 3;Q07343- 2;Q07343- 4;E9PMG3;HOYCV 7	0.00100251	1.04301099

sapiens OX=9606 GN=PDE4 B PE=1 SV=1			
Protein-tyrosine-phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPR B PE=1 SV=1	F8VU56;P23467;P23467-2;P23467-3;P23467-4	0.01089263	1.04001835
85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLA2 G6 PE=1 SV=1	A0A590UJC7;A0A590UK51;HOY6T3;O60733;O60733-2	0.0013885	1.02314581
Striated muscle preferentially expressed protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPEG PE=1 SV=4	Q15772;Q15772-1;B9ZVR7;Q15772-3	0.00555769	1.00506473

Tabla 15. Proteínas reprimidas detectadas y cuantificadas por espectrometría de masas de las estructuras tumorales Hs-578t en 3D durante cocultivo.

Description	Accession	q Value	log2.Ratio
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HECTD4 PE=1 SV=3	J3KPF0;F8V WT9;Q9Y4D 8-4	0.00032625	-1.01284888
Poly [ADP-ribose] polymerase tankyrase-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNKS PE=1 SV=2	O95271	0.01181302	-1.0174099
Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPS15L1 PE=1 SV=1	M0R165;Q9 UBC2;Q9UB C2- 2;Q9UBC2- 3;Q9UBC2- 4;M0R1V5	0.02183469	-1.08844249
Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MASP2 PE=1 SV=4	O00187	0.01909803	-1.11309227
Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM PE=1 SV=4	P08670;B0Y JC4;A0A1B0 GTT5	0.01552023	-1.13140344
Breast cancer type 2 susceptibility protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BRCA2 PE=1 SV=3	P51587	9.2186E-05	-1.13142978
Protein Aster-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRAMD1C PE=1 SV=2	Q8IYS0;E9P HT3;Q8IYS0 -2	0.00016739	-1.13373208
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Homo sapiens	Q5T4S7;Q5 T4S7- 2;Q5T4S7- 3;Q5T4S7-4	0.0022527	-1.13598464

OX=9606 GN=UBR4 PE=1 SV=1			
Hydrocephalus- inducing protein homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HYDIN PE=1 SV=3	Q4G0P3;F8 WD03;J3QL 79;Q4G0P3- 10;Q4G0P3- 5;Q4G0P3- 6;Q4G0P3- 8;H0YF91	0.01311199	-1.14144888
Amyloid-beta A4 precursor protein- binding family B member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APBB2 PE=1 SV=3	Q92870	0.01282778	-1.14406073
Pre-mRNA-splicing factor SLU7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLU7 PE=1 SV=2	O95391;E5 RGM7;E5RK 41	0.02335217	-1.15039222
Zinc finger homeobox protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZFH4 PE=1 SV=1	Q86UP3;E7 EVZ1;Q86U P3- 2;Q86UP3- 4;Q86UP3- 5;A0A494B ZV7;E5RI93; H0YC81	0.00284259	-1.15258341
Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=1	A0A0D9SF5 4;A0A0D9S GF6;Q1381 3;Q13813- 2;Q13813-3	0.0013885	-1.15853737
Importin-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO5 PE=1 SV=4	O00410;H0 Y8C6;O004 10- 3;E7ETV3;E 7EQT5;E7E V12;C9JQT6 ;C9JZD8;E7 ESZ1;E7ETV 8;E7EWK4;E 7EX05	0.00112203	-1.15920805
Protein CBFA2T1 OS=Homo sapiens OX=9606	Q06455;A0 A087WWT6 ;A0A0A0MS	0.00029612	-1.16317339

GN=RUNX1T1 PE=1 SV=2	U1;Q06455- 2;Q06455- 3;Q06455- 4;Q06455- 5;Q06455- 6;E5RHJ8		
Coiled-coil domain- containing protein 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC18 PE=1 SV=1	Q5T9S5;J3K P97;E9PFB9 ;Q5T9S5-2	6.7359E-05	-1.1890115
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TACC2 PE=1 SV=3	O95359;E7E MZ9;E9PBC 6;O95359- 3;O95359- 5;O95359- 1;Q4VXL8;D 6RAA5;O95 359- 6;O95359- 2;Q4VXL4;E 9PGB3;H0Y 911;H0Y8P9 ;H0YA73	0.02050964	-1.19174458
Protein NPAT OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPAT PE=1 SV=3	Q14207;H0 YET3	3.5263E-05	-1.22721252
Collagen alpha-5(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A5 PE=1 SV=1	A8TX70;A8T X70- 2;E9PAL5;H 0Y393;H0Y9 35;H0Y9T2	0.01635877	-1.26653444
Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SREK1 PE=1 SV=1	Q8WXA9;Q 8WXA9-2	0.00130192	-1.27343819
Isoform 2 of Dystonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DST	Q03001- 8;A0A494C 1D7;A0A49 4C073;A0A 494C1U5;H 0YC82;Q03 001- 10;Q49AI9	0.0001411	-1.27424759

Isoform 3 of Dystonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DST	Q03001-3	0.00059928	-1.28106477
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA PE=1 SV=2	P00338;P00338-3;P00338-4;P00338-2;P00338-5;F5GXY2;F5GXH2;F5GYU2;F5GZQ4;F5H5J4;F5H6W8	0.01491074	-1.29596197
Myomegalin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDE4DIP PE=1 SV=3	Q5VU43;A0A075B749;A0A087WX83;Q5VU43-3;Q5VU43-4;Q5VU43-6;Q5VU43-7;A0A087WYE4;E9PNE0;E9PS60;Q5VU43-10;Q5VU43-11;Q5VU43-12;Q5VU43-8;Q5VU43-9	0.00539219	-1.30177894
Terminal uridylyltransferase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUT4 PE=1 SV=3	Q5TAX3;A0A0C4DFM7;E9PKX1;E9PKY2;Q5TAX3-2;H0YDJ1	0.0062883	-1.31143853
182 kDa tankyrase-1- binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNKS1BP1 PE=1 SV=4	Q9C0C2;Q9C0C2-2	0.00017839	-1.35180099
Keratin_ type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT14 PE=1 SV=4	P02533	4.5609E-05	-1.37094749

Carboxypeptidase E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPE PE=1 SV=1	P16870;C9J E88;D6R93 0;D6RF88;P 16870-2	0.01168858	-1.40911489
Zinc finger E-box- binding homeobox 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZEB1 PE=1 SV=2	P37275;P37 275- 2;P37275- 3;P37275- 4;P37275- 5;HOYMD3; HOYND9;A0 A1B0GV02; A0A1B0GV V8;A0A1B0 GW50;A0A 1X7SC99;A0 JP08;E7ESP 8;E7EUW9; O60315;O6 0315- 2;U3KQ51	0.0059887	-1.41252391
Exportin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPO1 PE=4 SV=1	A0A7I2V2S3 ;A0A7I2V2Y 6;A0A7I2V3 P3;A0A7I2V 3W6;A0A7I 2V461;A0A 7I2V488;A0 A7I2V6B9;A 0A7I2YQV4; O14980;A0 A7I2V3N0;A 0A7I2V4A3; A0A7I2YQX 3	0.01053024	-1.41442417
Synemin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNM PE=1 SV=2	O15061;A0 A075B7B1; O15061-2	0.00345903	-1.45027834
Poly [ADP-ribose] polymerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP10 PE=1 SV=1	E9PK67;E9P NI7;E9PPE7 ;Q53GL7;F8 W8G7;E9PI A6;E9PIK9;E 9PJI2;E9PLE 8;E9PM86;E 9PPU2;E9P PV8;E9PQQ 6;E9PSE7;E 9PSG8	0.00344174	-1.45891789

Nuclear receptor coactivator 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCOA2 PE=1 SV=2	E7EWM1;Q 15596	0.00137573	-1.45908874
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDS5B PE=1 SV=1	Q9NTI5;Q9 NTI5- 2;Q9NTI5-3	0.0016644	-1.45996845
Transgelin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGLN2 PE=1 SV=3	P37802;P37 802- 2;X6RJP6	0.02066525	-1.46193179
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNF20 PE=1 SV=2	Q5VTR2	0.00106518	-1.46675003
Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C1 PE=1 SV=2	P62805;H3B QU8	2.3775E-05	-1.48165317
Broad substrate specificity ATP- binding cassette transporter ABCG2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCG2 PE=1 SV=3	Q9UNQ0;Q 9UNQ0- 2;F8S0F2	0.00082327	-1.48459248
BCL-6 corepressor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BCOR PE=1 SV=1	Q6W2J9;Q6 W2J9- 2;Q6W2J9- 4;H7BYY2;H 7C231;Q6W 2J9- 3;A0A5F9Z GX7;A1A56 4	0.01176067	-1.4993293
Zinc finger protein 638 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF638 PE=1 SV=2	Q14966;Q1 4966- 3;Q14966- 4;Q14966- 2;Q14966- 6;Q14966- 5;C9JWN0; A0A096LPK	0.00687515	-1.50720229

	8;A0A096LNS4		
A-kinase anchor protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKAP6 PE=1 SV=3	Q13023;G3V3H7;Q13023-2	0.00035985	-1.53932322
Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRIQ1 PE=2 SV=3	Q96JM4;Q96JM4-2;H0YCJ9	0.00388338	-1.54746205
Ubiquitin conjugation factor E4 A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE4A PE=1 SV=2	Q14139;Q14139-2	0.00375573	-1.55904056
Plasminogen activator inhibitor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINB2 PE=1 SV=2	P05120	0.01054793	-1.58124812
Spermatogenesis-associated protein 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPATA17 PE=1 SV=1	Q96L03	0.00141335	-1.59143527
Tubulointerstitial nephritis antigen-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TINAGL1 PE=1 SV=1	F6SDV2;Q9GZM7;Q9GZM7-3;Q9GZM7-2	1.7644E-05	-1.64325232
Kinesin-like protein KIFC3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIFC3 PE=1 SV=4	Q9BVG8;Q9BVG8-2;Q9BVG8-6;B7Z896;F5H3M2;Q9BVG8-4;Q9BVG8-5;A0A0C4DGM9	0.01664882	-1.64827658
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606	P04792;A0A6Q8PFK8;A	2.3806E-05	-1.66846092

GN=HSPB1 PE=1 SV=2	0A6Q8PGK1 ;C9J3N8		
Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)- methyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CMTR2 PE=1 SV=2	Q8IYT2	0.01397937	-1.67622756
TBC1 domain family member 9B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBC1D9B PE=1 SV=3	Q66K14;Q6 6K14-2	8.7072E-06	-1.68576421
Tetratricopeptide repeat protein 21A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC21A PE=1 SV=3	Q8NDW8;Q 8NDW8- 7;Q8NDW8- 5;Q8NDW8- 6;Q8NDW8- 3;A0A0B4J1 Y2	0.00059928	-1.69092595
RAC-beta serine/threonine- protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKT2 PE=1 SV=2	P31751;J3Q KW1;M0R0 P9	0.0036712	-1.69838413
Ubiquitin-protein ligase E3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE3B PE=1 SV=3	Q7Z3V4	0.00143298	-1.70362479
Serine/threonine- protein kinase WNK3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WNK3 PE=1 SV=3	Q9BYP7;Q9 BYP7- 4;A0A087W YK2;Q9BYP 7- 2;Q9BYP7-3	0.01146677	-1.72841305
1- phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLCB4 PE=1 SV=3	Q15147;Q1 5147- 2;Q15147- 4;Q15147-5	0.00970403	-1.73494014
Isoform 7 of Nesprin- 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNE2	Q8WXH0- 7;A0A0C4D GK3;G3V4T	0.00071765	-1.7537453

	3;Q8WXH0-13;Q8WXH0-3;G3V3D4;Q8WXH0-10;Q8WXH0-11;Q8WXH0-12;Q8WXH0-4;Q8WXH0-5;A0A087WU26;A0A087WV2;F8W7S5;G3V2Q0;Q8WXH0-6;Q9P2E9;Q9P2E9-3		
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	P11142;E9PKE3;P11142-2;E9PNE6;E9PLF4;E9PN89;A8K7Q2;E9PK54;E9PQK7;E9PQQ4;E9PI65;E9PN25;E9PPY6;E9PM13;E9PS65	0.00152081	-1.80712994
Protein FAM161B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM161B PE=1 SV=2	Q96MY7;Q96MY7-2	0.01526423	-1.81898599
Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A3 PE=1 SV=5	P12111;P12111-2;E7ENL6;P12111-4;P12111-3;P12111-5;C9JNG9	0.00069853	-1.8293646
Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606	P11021	0.00049393	-1.84640365

GN=HSPA5 PE=1 SV=2			
Cilia- and flagella-associated protein 54 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFAP54 PE=2 SV=3	Q96N23;Q96N23-2;A0A1B0GU80;H0YIB5	0.0042628	-1.84772041
WD repeat-containing protein 90 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR90 PE=1 SV=1	F8VUX9;Q96KV7	0.00796915	-1.85819553
Profilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFN1 PE=1 SV=2	P07737;K7EJ44;I3L3D5	0.00056364	-1.87837554
A-kinase anchor protein 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKAP13 PE=1 SV=2	Q12802;Q12802-2;Q12802-4;A0A087WTD7;A8MYJ1;A0A087WY36;A0A087WX73;A0A087WYS7	0.00016642	-1.9614328
Advillin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AVIL PE=1 SV=3	O75366	0.00748023	-1.96164212
Sperm-associated antigen 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPAG5 PE=1 SV=2	Q96R06;K7ELG0	0.0016565	-1.9647138
Myosin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH9 PE=1 SV=4	P35579;P35579-2;B1AH99;Q5BKV1	3.0581E-07	-1.97228582
Trafficking kinesin-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAK1 PE=1 SV=1	Q9UPV9	0.01125258	-1.99212749
Sodium channel protein type 1 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCN1A PE=1 SV=2	P35498;A0A1B0GUX7;A0A1B0GVX7;A0A1B0GWE6;A0A1W2PPJ3;A0A286YEQ8;	0.01502433	-2.02261538

	A0A286YF2 6;A0A286YF A8;A0A5F9 ZHI6;P3549 8-2;P35498- 3		
Transmembrane and coiled-coil domains protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMCC1 PE=1 SV=1	E9PC87;O9 4876;D6RB T7	0.01550933	-2.02351954
Probable ATP- dependent RNA helicase DDX60-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX60L PE=2 SV=2	Q5H9U9;Q5 H9U9- 2;H0Y939	0.01205997	-2.03713918
Spermatid perinuclear RNA- binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRBP PE=1 SV=1	Q96SI9;Q96 SI9-2	0.01116575	-2.04825452
Doublecortin domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCDC1 PE=1 SV=1	M0R2J8;M0 R2J8- 2;M0R2J8-3	0.00160627	-2.05657756
Cyclin-dependent kinase-like 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDKL5 PE=1 SV=1	A0A1B0GU M4	0.00353867	-2.0769103
E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBBP6 PE=1 SV=1	Q7Z6E9;A0 A2R8Y880; Q7Z6E9- 2;H3BSK8	0.00134937	-2.09126487
Serine/threonine- protein kinase Nek2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEK2 PE=1 SV=1	P51955;P51 955-4	0.01209663	-2.10123939
Synaptotagmin-like protein 2 OS=Homo	Q9HCH5;Q9 HCH5-	6.8093E-05	-2.1021085

sapiens OX=9606 GN=SYTL2 PE=1 SV=3	13;Q9HCH5 - 14;Q9HCH5 - 15;Q9HCH5 - 6;A0A0U1R R07		
Whirlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WHRN PE=1 SV=4	Q9P202;A0 A669KBJ1;Q 9P202- 3;Q9P202- 4;Q9P202-2	0.00090723	-2.14422601
14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAG PE=1 SV=2	P61981	0.0069101	-2.18876446
T-lymphoma invasion and metastasis- inducing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TIAM2 PE=2 SV=4	Q8IVF5;Q8I VF5- 2;Q8IVF5- 5;E9PKT1;Q 8IVF5-4	0.00194949	-2.23206829
Zinc finger CCCH domain-containing protein 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZC3H18 PE=1 SV=2	Q86VM9;E7 ERS3	0.01673901	-2.23874105
Tubulin monoglycylase TTLL3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTLL3 PE=4 SV=1	H0Y5E3;J3K QB2;Q9Y4R 7;Q9Y4R7- 5;A0A0A6Y YG9;C9JSD3 ;H3BLT7;P5 9998- 2;Q9Y4R7-2	0.00016994	-2.29650505
TP53-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TP53BP1 PE=1 SV=2	Q12888;A6 NNK5;Q128 88- 2;Q12888- 3;C9JXV0;H 7C3N7	0.00043037	-2.29708518
Unconventional myosin-Ih OS=Homo sapiens OX=9606	Q8N1T3;A0 A140TA25; Q8N1T3-3	0.0050943	-2.31898537

GN=MYO1H PE=1 SV=2			
Zinc finger protein 292 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF292 PE=1 SV=1	J3KNV1;O6 0281	0.00012881	-2.33352386
Chromodomain- helicase-DNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD2 PE=1 SV=2	O14647;O1 4647- 2;A0A1B0G TU9;A0A0D 9SEP7;A0A0 D9SGK0;B7 Z3I4;O1464 7- 3;A0A0D9S FA3;A0A1B 0GU59;A0A 0D9SFV8	1.7317E-05	-2.35159967
PHD finger protein 20 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHF20 PE=1 SV=2	Q9BVI0	0.00022938	-2.36208301
Supervillin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SVIL PE=1 SV=2	O95425;O9 5425- 3;A0A6I8PI X7;O95425- 4;O95425- 2;A0A0J9Y WY6;A0A6I 8PL75	0.00022845	-2.37351939
Collagen alpha-2(IX) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL9A2 PE=1 SV=2	Q14055	0.0037006	-2.38294276
Filamin-A-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FILIP1 PE=1 SV=1	Q7Z7B0	0.00023116	-2.3912464
Liprin-alpha-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPFIA4 PE=2 SV=3	O75335	0.00167214	-2.39562367
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2	P07437;Q5J P53;Q5ST81 ;P68371;Q1 3885;Q9BV	0.00059928	-2.40260631

	A1;A0A0B4J 269;Q1350 9;P04350;Q 13509- 2;G3V2A3;K 7ESM5;M0 QY85;M0QZ L7;M0R278		
Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC12 PE=1 SV=3	O60814;P06 899;P23527 ;P33778;P5 7053;P5887 6;P62807;Q 16778;Q5Q NW6;Q5QN W6- 2;Q8N257; Q93079;Q9 6A08;Q998 77;Q99879; Q99880;U3 KQK0	5.0007E-05	-2.4050574
Vasculin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPBP1 PE=1 SV=1	Q86WP2;D4 PHA4;Q86 WP2-2	6.3578E-05	-2.42905054
Ras-related protein Rab-44 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB44 PE=1 SV=4	Q7Z6P3	0.00736955	-2.440608
Zinc finger protein 345 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF345 PE=1 SV=1	Q14585	0.00013506	-2.45560064
Serine-protein kinase ATM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATM PE=1 SV=4	Q13315	0.0002663	-2.58107967
Serpin H1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	P50454;E9P JH8;E9PKH2 ;E9PPV6;E9 PR70	0.00695928	-2.58697517
Lipoxygenase homology domain- containing protein 1 OS=Homo sapiens	Q8IVV2;A0 A2R8Y7K4;F 5GZB4;J3KR E7;Q8IVV2-	0.02049935	-2.60720782

OX=9606 GN=LOXHD1 PE=2 SV=4	3;J3QKX9;Q 8IVV2- 4;Q8IVV2- 5;F5GXP0		
ATP synthase subunit beta_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3	P06576;HOY H81;F8W0P 7	0.00443297	-2.62987401
Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB7A PE=1 SV=1	A0A6Q8PG 52;A0A6Q8 PGE6;A0A6 Q8PH84;C9I ZZ0;C9J592; P51149;A0 A6Q8PF79; C9J4S4;C9J 4V0;C9J7D1 ;C9J8S3	0.00054334	-2.64496958
Centromere- associated protein E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CENPE PE=1 SV=2	Q02224;A0 A087X0P0; Q02224- 3;A0A286YF G8;A0A5F9 ZH24;Q8IYI 8;REVERSE4 762	3.5263E-05	-2.64684041
Discoidin domain- containing receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDR2 PE=1 SV=2	Q16832	0.00444464	-2.71042845
Tensin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNS1 PE=1 SV=2	Q9HBL0;A0 A2R8Y4T1; A0A494C06 7;E9PF55;E 9PGF5;A0A 087WWW7 ;H0Y4U1	1.9905E-06	-2.72690997
Calmodulin- regulated spectrin- associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMSAP3 PE=1 SV=2	Q9P1Y5	0.00734124	-2.73729829

Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate 5-phosphatase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INPPL1 PE=1 SV=2	O15357;A0 A0A0MTP6; O15357-2	0.0058379	-2.76644263
Ferritin heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FTH1 PE=1 SV=2	P02794;E9P KY7;E9PRK8 ;G3V192;E9 PK45;E9PK M5;E9PQR3	0.01111701	-2.79239903
Disks large homolog 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLG5 PE=1 SV=4	Q8TDM6;Q 8TDM6- 4;Q8TDM6- 2;R4GMQ2; A0A0A0MS L1;Q8TDM6 - 5;C9JLY8;H7 BZ97	3.2095E-06	-2.8123963
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A12 PE=1 SV=2	O75746;B4 DGK6;F8W9 J0;H0YFB2	0.0188354	-2.82044752
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MED12L PE=1 SV=2	Q86YW9;Q 86YW9- 4;F8WAE6; Q86YW9- 2;Q86YW9- 3	0.00076376	-2.82424196
1- phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLCG2 PE=1 SV=4	P16885;A0A 0A0MRF9;H 3BPZ3	0.00056364	-2.84196712
Centrosomal protein of 104 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP104 PE=1 SV=1	O60308;A0 A6Q8PGB3; A0A6Q8PG F0;A0A6Q8 PH38;A0A6	0.00037354	-2.85887823

	Q8PH69;A0A6Q8PHE1;A0A6Q8PHR0;J3QLL3;O60308-3;Q5SR27;A0A6Q8PFR4;A0A6Q8PG89;A0A6Q8PGQ7;A0A6Q8PH14;O60308-2		
SH3 domain and tetratricopeptide repeat-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3TC2 PE=1 SV=1	E9PDF1;Q8TF17;Q8TF17-5;A0A6Q8PFZ4;A0A712Y4M9;D6RAY4M9;H0Y8Q9	0.00057382	-2.91350424
Hormonally up-regulated neu tumor-associated kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HUNK PE=1 SV=1	P57058;H7C2X2	0.0106964	-2.94131368
Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPI1 PE=1 SV=4	P60174;P60174-3;P60174-4;U3KPZ0;U3KQF3;U3KPS5	0.00024781	-2.96227424
m7GpppN-mRNA hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCP2 PE=1 SV=3	Q8IU60;Q8IU60-2;A0A6Q8PGL6	0.0029536	-3.01148206
Multiple PDZ domain protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MPDZ PE=1 SV=2	O75970;F5H1U9;O75970-2;O75970-3;O75970-5;B7ZB24;H0YGQ3	6.2626E-05	-3.04446879
Ellis-van Creveld syndrome protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EVC PE=2 SV=1	P57679;E9PCN4	0.00181259	-3.08531405

Dual oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DUOX1 PE=1 SV=1	Q9NRD9;H0YK19;H0YNR5	0.00030095	-3.08808916
Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2	P07355;H0YN42;H0YMD0;H0YMU9;H0YMW4;P07355-2;H0YM50;H0YNP5;A6NMY6;H0YS4;H0YNB8;A0A7I2V4P4;H0YL33;H0YMM1;H0YN28;H0YKX9;H0YKZ7;H0YLV6;H0YMT9;H0YNA0;H0YKL9;H0YKV8;H0YLE2;H0YMD9	2.0124E-05	-3.09221407
Toll-like receptor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLR8 PE=1 SV=1	Q9NR97	0.00631786	-3.11656993
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPM1 PE=1 SV=2	Q7Z4N2;A0A0G2JMJ5;A0A0G2JMR4;A0A0G2JN34;A0A0G2JPN6;H0YKU7;H0YM61;Q7Z4N2-3;Q7Z4N2-4;Q7Z4N2-5;Q7Z4N2-6;Q7Z4N2-7	0.00102659	-3.13021494
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	P68104;A0A087WV01;A0A087WVQ9;A0A7I2V3H3;A0A7I2V5N4;A0A7I2V659;Q5VTE0;A0A2R8Y488;A0A2	0.00193246	-3.13372608

	R8Y660;A0 A2U3TZH3; A6PW80;Q0 5639;Q5JR0 1;A0A2R8Y DN5;A0A6Q 8PFK6		
Laminin subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMA2 PE=1 SV=4	P24043;A0A 087WX80;A 0A087WYF1	0.01282778	-3.16128476
Calumenin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALU PE=1 SV=2	O43852;O4 3852- 2;O43852- 3;O43852- 4;O43852- 5;O43852- 9;H0Y875;O 43852- 15;O43852- 6;O43852- 8;O43852- 10;O43852- 11;O43852- 12;O43852- 13;O43852- 14;O43852- 7	0.00097242	-3.2337304
14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1	P27348;E9P G15	0.00189458	-3.2753992
CLIP-associating protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLASP2 PE=1 SV=3	O75122;J3K R49;A0A0U 1RQI6;E3W 994;E7ERI8; E7EW49;O7 5122- 3;B3KR06;E 7ENG2;O75 122-2	0.00734124	-3.27557464
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13C PE=1 SV=1	Q709C8;Q7 09C8- 2;Q709C8- 3;Q709C8-4	0.01127152	-3.2793606

Dynein assembly factor 1_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAAF1 PE=2 SV=5	Q8NEP3;Q8NEP3-2;H3BNQ4;H3BP51;H3BV09;Q8NEP3-3	0.0022527	-3.32310606
Negative elongation factor E (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NELFE PE=1 SV=6	A0A0A0MSN9;P18615;P18615-3;A0A0A0MT02;A0A0G2JI50;E9PD43;P18615-4	0.00038436	-3.33132528
Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA5 PE=1 SV=2	P08758;D6RBE9;D6RBL5;E9PHT9	3.4422E-05	-3.37843209
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SART3 PE=1 SV=1	Q15020;A0A499FI31;Q15020-4	0.00056895	-3.42615812
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGM6 PE=1 SV=3	O95932	0.00034171	-3.44049744
Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1	P0DMV8;A0A0G2JIW1;P0DMV9;P0DMV8-2;V9GZ37;P17066;P48741	0.00019285	-3.45837144
14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAE PE=1 SV=1	P62258;P62258-2;K7EM20	3.5446E-05	-3.48435901
Adenomatous polyposis coli protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APC2 PE=1 SV=1	O95996;O95996-2;O95996-3;A0A0C4DGQ0;B5MDS5;K7ELQ3;	0.01386316	-3.4982086

	K7EN62;K7 ERC5		
Stress-70 protein_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=4 SV=1	A0A7I2V2G 2;A0A7I2YQ B2;D6RCD7; P38646;A0 A7I2V3F7;A 0A7I2V2S7; H0Y8K0;A0 A3B3IT14	0.0069797	-3.52455099
Vacuolar protein sorting-associated protein 13D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13D PE=1 SV=2	Q5THJ4;Q5 THJ4- 2;H3BLS7;F 5GX56	0.00050175	-3.5487811
Protein bassoon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BSN PE=1 SV=4	Q9UPA5	8.6186E-05	-3.56232182
Huntingtin- interacting protein 1- related protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIP1R PE=1 SV=2	O75146	0.01194622	-3.595458
ATP-binding cassette sub-family A member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA13 PE=2 SV=3	Q86UQ4;A0 A0A0MT16; Q86UQ4- 4;Q86UQ4- 2	2.3775E-05	-3.61596118
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1R26 PE=1 SV=1	Q5T8A7	0.01851384	-3.62548817
Nidogen-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NID2 PE=1 SV=3	Q14112;Q1 4112- 2;A0A087W ZP6;H0YJV3	0.00143861	-3.63501175
Non-specific serine/threonine protein kinase OS=Homo sapiens	A0A087X0I6 ;A0A7I2V55 0;A0A7I2YQ C1;B4DIB3; Q9P0L2;Q9	0.00284259	-3.64022546

OX=9606 GN=MARK1 PE=1 SV=1	P0L2- 2;Q9P0L2- 3;K7EN95;Q 6IPE9;Q96L 34;Q96L34- 2		
Zinc finger protein 644 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF644 PE=1 SV=2	Q9H582;Q9 H582- 2;Q9H582-3	0.00469871	-3.66264375
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNF40 PE=1 SV=5	O75150;H3 BP71;O751 50- 4;O75150- 3;H3BS50	0.00112203	-3.67355952
COP9 signalosome complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPS4 PE=1 SV=1	D6RAX7;D6 RFN0;Q9BT 78;Q9BT78- 2	7.0322E-05	-3.71901323
ELKS/Rab6- interacting/CAST family member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERC1 PE=1 SV=1	Q8IUD2;Q8I UD2- 3;X6RLX0;G 8JLD3;Q8IU D2- 2;Q8IUD2- 4;Q8IUD2- 5;X6RM00	0.00061682	-3.76338416
Zinc finger protein 143 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF143 PE=1 SV=2	P52747;P52 747- 2;P52747-3	0.00029109	-3.86361174
Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	P14625;A0A 1W2PRR1;Q 96GW1;F8 W026;H0YI V0;Q58FF3	9.1221E-07	-3.90146707
Unconventional myosin-Ib OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1B PE=1 SV=1	E9PDF6;O4 3795;O437 95- 2;E7EQD9	0.0005773	-3.92040125
Activating transcription factor 7-interacting protein 2 OS=Homo sapiens	Q5U623	2.6052E-06	-3.98946923

OX=9606 GN=ATF7IP2 PE=1 SV=2			
Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN4 PE=1 SV=2	O43707;F5 GXS2;H7C1 44;O43707- 2;O43707- 3;A0A494C 1A0;A0A49 4C033;A0A 494C166;G 3V2N5;K7E P19;Q0804 3;A0A087W SZ2;A0A494 C060;A0A4 94C0Q3;G3 V2E8;G3V2 W4;G3V2X9 ;G3V5M4	0.01042482	-4.0341419
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1L2 PE=2 SV=2	Q32P51;A0 A7I2V2L6;A 0A7I2V3R8; A0A7I2V3W 0;F8VTQ5;F 8VZ49;F8W 6I7;P09651; P09651- 2;P09651- 3;F8W646	0.00477701	-4.08202588
Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIA PE=1 SV=2	P62937;A0A 075B759;A0 A0B4J2A2;A 0A0H2UH3 4;A0A7I2V5 J5;C9J5S7;E 5RIZ5;F5H2 84;F8WE65; P0DN26;P2 3284;P6293 7-2	0.00030049	-4.10045932
14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1	P63104;E7E X29;E7ESK7 ;B0AZS6;E5 RGE1;E5RIR 4;E7EVZ2;E 9PD24;P63 104-2	7.1952E-06	-4.14827608

Kell blood group glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KEL PE=1 SV=2	P23276	4.2464E-06	-4.1757902
Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK10 PE=1 SV=3	Q96BY6;A0A2R8YD85; Q96BY6-3	0.00217488	-4.21165296
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD9 PE=1 SV=2	Q3L8U1;H3BTW3;Q3L8U1-2;Q3L8U1-3;H3BRU9; H3BSP3	0.00074204	-4.2235399
Cytospin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPECC1 PE=4 SV=1	A0A7I2V416;A0A7I2V451;A0A7I2V486;A0A7I2V562;A0A7I2YQJ3;J3QS22;Q5M775;Q5M775-2	0.001857	-4.24454286
Huntingtin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HTT PE=1 SV=2	P42858;A0A3B3ISR3	0.00424672	-4.29365188
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KANK1 PE=1 SV=3	Q14678;Q14678-2	0.00124671	-4.30132215
Centrosomal protein of 164 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP164 PE=1 SV=3	Q9UPV0	3.9671E-06	-4.47344326
Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2	P06748;A0A7I2V5S2;A0A7I2YQC0;P06748-2;P06748-3;A0A7I2V2X9;A0A7I2V3U2;A0A7I2V433;A0A7I	0.00125183	-4.57802157

	2V3G5;A0A7I2V4G8;A0A7I2V579;A0A7I2V5J8;E5RGW4;E5RI98		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3	P04406;P04406-2;E7EUT5	1.2679E-05	-4.62213838
Neuron navigator 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAV3 PE=1 SV=3	Q8IVL0;Q8IVL0-2;Q8IVL0-3;A0A1B0GTC4;F8VZV4	0.00067453	-4.67150441
Microtubule-associated protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP2 PE=1 SV=4	P11137	0.00444464	-4.71232142
Spectrin beta chain non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN1 PE=1 SV=2	Q01082	0.0004015	-4.72491809
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA6 PE=1 SV=1	Q15084;Q15084-2;Q15084-3;Q15084-4;Q15084-5	5.7904E-05	-4.82633443
Sperm-associated antigen 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPAG1 PE=1 SV=3	Q07617	0.0022527	-4.83813809
DNA-binding protein SMUBP-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHMBP2 PE=1 SV=3	P38935;A0A6Q8PGT6;A0A6Q8PGX2	0.00043671	-4.92544807
Neurobeachin-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NBEAL1 PE=2 SV=3	Q6ZS30	0.00094556	-4.927876

Melanoma inhibitory activity protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIA2 PE=1 SV=4	Q96PC5;G3 V599;Q96P C5-2	3.4876E-05	-4.94016456
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRBA PE=1 SV=4	P50851;A0A494C1L5;E9 PEM5;P50851-2;A0A494BZ W2	0.00258254	-5.08528997
FH1/FH2 domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FHOD3 PE=1 SV=2	Q2V2M9;Q2V2M9-2;Q2V2M9-3;Q2V2M9-4;K7ER94;A0A0A0MTS9;K7EKZ0;K7EP24	0.0037006	-5.09525483
Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1	A0A6Q8PFJ0;P02545;P02545-2;P02545-6;P02545-3;P02545-4;P02545-5;Q3BDU5;Q5TCI8;A0A6Q8PHQ9;A0A6Q8PF80	0.00051955	-5.12526855
Protein FAM186A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM186A PE=2 SV=3	A6NE01;F5GYN0;F5H8C1	0.01042482	-5.14376024
Tetratricopeptide repeat protein 28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC28 PE=1 SV=4	Q96AY4;A0A087WW06	0.00010557	-5.19936179
Centrosomal protein of 162 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP162 PE=1 SV=2	Q5TB80	0.00022938	-5.24718446
Tubulin alpha-3E chain OS=Homo sapiens OX=9606	Q6PEY2	7.4313E-06	-5.25359348

GN=TUBA3E PE=1 SV=2			
Protein shortage in chiasmata 1 ortholog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SHOC1 PE=1 SV=1	Q5VXU9	0.00478645	-5.27932812
Mitotic deacetylase- associated SANT domain protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIDEAS PE=1 SV=2	Q6PJG2	0.00050434	-5.29428897
Spatacsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPG11 PE=1 SV=3	Q96JI7;Q96 JI7- 3;C4B7M2; Q96JI7- 2;H0YLK7;H OYLR8	0.00069455	-5.29942003
Coiled-coil domain- containing protein 67 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DEUP1 PE=1 SV=1	A0A087WVI 3;E9PIY2;Q 05D60;A0A 088AWP1;A 0A5H1ZRS0 ;E9PLX9;Q0 5D60-2	0.0004015	-5.3598718
Sterile alpha motif domain-containing protein 15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAMD15 PE=2 SV=1	Q9P1V8;Q9 P1V8-2	0.00774374	-5.46973583
Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RERE PE=1 SV=2	Q9P2R6;A0 A590UJ84;A 0A590UK57 ;H7BYW9;B 1AKN3;K7EJ Q1	0.00598127	-5.49714547
Tyrosine-protein kinase Fer OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FER PE=1 SV=2	P16591;P16 591- 2;P16591- 3;W0S4B9; A0A0D9SEV 4;D6RAF9	6.4613E-06	-5.51500021
Parafibromin OS=Homo sapiens	Q6P1J9;A0A 2R8YHB3;A 0A3B3IRP5;	0.00045047	-5.51555388

OX=9606 GN=CDC73 PE=1 SV=1	AOA1B0GU B2		
Caspase recruitment domain-containing protein 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CARD11 PE=1 SV=3	Q9BXL7	0.01454902	-5.54158132
Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1A PE=1 SV=1	Q71U36;F5 H5D3;P683 63;Q71U36- 2;Q9BQE3;P 0DPH7;P0D PH7- 2;P0DPH8;A 0A1W2PQ M2;F8VVB9 ;P68363- 2;F8VQQ4;P 68366;P683 66- 2;C9J2C0;F8 VS66;Q9NY 65;Q9NY65- 2;F8VRZ4;F 8VWV9;F8V X09;C9JDS9 ;C9JEV8;C9J JQ8;C9JQ00 ;F8VRK0;V9 GZ17;C9JDL 2;C9K0S6;F 8W0F6;A6N HL2;A6NHL 2-2;Q9H853	1.3173E-09	-5.56457504
Protein Daple OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC88C PE=1 SV=3	Q9P219	4.1449E-05	-5.67692017
Aldo-keto reductase family 1 member B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1B1 PE=1 SV=1	E9PCX2;P15 121;E9PEF9	3.5609E-07	-5.701924
Tubulin polyglutamylase TTLL4 OS=Homo	Q14679;E9P H58;E7EX20 ;H7BZY4;H7	0.00120506	-5.73367817

sapiens OX=9606 GN=TTLL4 PE=1 SV=2	C1F7;H7C2S 3;H7C421;H 7C470		
Transketolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TKT PE=1 SV=3	P29401;P29 401- 2;E9PFF2;A 0A0B4J1R6; F8W888	0.00035535	-5.76280105
Heat shock 70 kDa protein 1-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1L PE=1 SV=2	P34931;Q5 3FA3	0.00020932	-5.77936939
Tetratricopeptide repeat protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC6 PE=1 SV=1	G3V3A5;Q8 6TZ1;G5E9 W5;Q3SY87 ;Q86TZ1-2	5.4808E-05	-5.8727592
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	P14618;H3B TN5;P1461 8-2;P14618- 3;B4DNK4; H3BQ34;H3 BR70;H3BT 25;H3BTJ2; H3BUW1;H 3BU13	9.8816E-07	-5.89701441
Cytochrome P450 2J2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYP2J2 PE=1 SV=2	P51589;AOA 3B3IT99	0.00023631	-5.89754731
Tyrosine-protein phosphatase non- receptor type 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPN6 PE=1 SV=1	P29350;P29 350- 2;P29350- 3;P29350- 4;F5GY79;F 5H0N8	0.00102659	-5.91554139
Uncharacterized protein KIAA1614 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIAA1614 PE=2 SV=3	Q5VZ46	0.01110074	-5.99651553
Remodeling and spacing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RSF1 PE=1 SV=2	Q96T23;H0 YCN2;Q96T 23-2	9.2795E-05	-6.01931344

Histone-lysine N-methyltransferase 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2A PE=1 SV=5	Q03164;Q03164-2;Q03164-3;E9PR05;A0A3B3ISN4	3.7176E-06	-6.04264195
SUN domain-containing ossification factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUCO PE=1 SV=1	Q9UBS9;Q9UBS9-2	0.00480411	-6.13480347
Homer protein homolog 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HOMER3 PE=1 SV=2	Q9NSC5;Q9NSC5-2;Q9NSC5-5;M0QYF9;M0QZN1;M0R2T8;M0R2U7;Q9NSC5-3;Q9NSC5-4	0.00013132	-6.22187695
General transcription factor 3C polypeptide 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GTF3C1 PE=1 SV=4	Q12789;Q12789-3	0.00037354	-6.23395404
Tektin-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TEKT5 PE=1 SV=1	Q96M29;I3L1F7	0.0150519	-6.2440597
Coiled-coil domain-containing protein 178 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC178 PE=1 SV=1	F8W7A7;Q5BJE1;Q5BJE1-2;Q5BJE1-3;Q5BJE1-4;J3KSU3	1.2758E-05	-6.29778335
Protocadherin gamma-A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHGA2 PE=2 SV=1	Q9Y5H1	0.00016668	-6.38339087
PR domain zinc finger protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDM1 PE=1 SV=1	A0A3B3IU23;O75626;O75626-2	0.00063127	-6.47347086
Striatin-3 OS=Homo sapiens OX=9606	Q13033	0.00970025	-6.65697605

GN=STRN3 PE=1 SV=3			
Serine/threonine- protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKRD44 PE=1 SV=1	A0A2R8Y7Y 4;Q8N8A2; Q8N8A2- 2;Q8N8A2- 4;H7C209	0.00431977	-6.90918965
Protein disulfide- isomerase A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=4	P30101	0.00012446	-7.09522392
Ankyrin repeat and SAM domain- containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKS3 PE=1 SV=1	Q6ZW76;D3 DUE4;F6WF 08;Q6ZW76 -2	0.00198515	-7.12663991
Pleckstrin homology domain-containing family A member 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHA5 PE=1 SV=1	Q9HAU0;Q9 HAU0- 2;Q9HAU0- 4;Q9HAU0- 5;Q9HAU0- 6;A0JP02;B 4DJX4;Q9H AU0- 8;H0YGJ6	0.00019189	-7.12702128
E3 ubiquitin-protein ligase HACE1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HACE1 PE=1 SV=2	Q8IYU2;Q8I YU2- 3;Q8IYU2-4	1.6732E-06	-7.17093621
Toll-like receptor 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLR10 PE=1 SV=2	Q9BXR5	0.01128278	-7.21105213
Centrosomal protein of 120 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP120 PE=1 SV=2	Q8N960;A0 A6Q8PF83; A0A6Q8PG D1;A0A6Q8 PH95;D6RE X9;Q8N960- 2	4.2464E-06	-7.45692191
Neurofascin OS=Homo sapiens	O94856;O9 4856-	0.0020778	-8.05448459

OX=9606 GN=NFASC PE=1 SV=4	13;O94856- 5;O94856- 6;O94856-9		
Outer dynein arm- docking complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ODAD2 PE=1 SV=1	A0A5F9ZH2 2;A0A5F9ZI 13;Q5T2S8	3.9671E-06	-8.13252946
EMILIN-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EMILIN1 PE=1 SV=3	Q9Y6C2	0.00051305	-8.21348345
Sodium/hydrogen exchanger 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC9A4 PE=2 SV=2	Q6AI14	0.00161871	-8.36806123
Nuclear pore complex protein Nup214 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP214 PE=1 SV=2	P35658;A0A 494C1F2;P3 5658- 2;P35658- 3;P35658- 4;P35658- 5;A0A494B ZU9;A0A49 4C0J0	9.1221E-07	-9.27579098
Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TJP1 PE=1 SV=3	Q07157;A0 A087X0K9; A0A0G2JNH 2;A0A7I2V5 U5;G3V1L9; G5E9E7;Q0 7157- 2;H0YKB1	2.383E-08	-9.88487604
Non-histone chromosomal protein HMG-17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGN2 PE=1 SV=3	P05204	6.1799E-05	-10.4789196

13 BIBLIOGRAFÍA

1. Arsenijevic T, Gregoire F, Chiadak J, Courtequisse E, Bolaky N, Perret J, et al. (2013) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide

- (PACAP) Participates in Adipogenesis by Activating ERK Signaling Pathway. PLoS ONE 8(9): e72607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072607>
2. Balaban, S., Shearer, R. F., Lee, L. S., van Geldermalsen, M., Schreuder, M., Shtein, H. C., Cairns, R., Thomas, K. C., Fazakerley, D. J., Grewal, T., Holst, J., Saunders, D. N., y Hoy, A. J. (2017). Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer & metabolism*, 5, 1.
 3. Belgodere, J. A., King, C. T., Bursavich, J. B., Burow, M. E., Martin, E. C., y Jung, J. P. (2018). Engineering Breast Cancer Microenvironments and 3D Bioprinting. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 66.
 4. Berrier, A.L. and Yamada, K.M. (2007), Cell–matrix adhesion. *J. Cell. Physiol.*, 213: 565-573. <https://doi.org/10.1002/jcp.21237>
 5. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* 2005; 23; 7350–7360.
 6. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological Reviews.* 2008;60(3):261–310.
 7. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, IARC, (2020). (<http://www-dep.iarc.fr>)
 8. Cao Y. (2019). Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. *The Journal of clinical investigation*, 129(8), 3006–3017. <https://doi.org/10.1172/JCI127201>
 9. Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13; 2329–2334.
 10. Chen, Y., Verbeek, F. J., y Wolstencroft, K. (2021). Establishing a consensus for the hallmarks of cancer based on gene ontology and pathway annotations. *BMC bioinformatics*, 22(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04105-8>

11. Choi J, Cha YJ, Koo JS. (2018). Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator.. *Prog Lipid Res.* 2018 Jan;69:11-20.
12. Cignarelli, A., Genchi, V. A., Perrini, S., Natalicchio, A., Laviola, L., y Giorgino, F. (2019). Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 759. <https://doi.org/10.3390/ijms20030759>
13. Cozzo, Alyssa y Fuller, Ashley y Makowski, Liza. (2017). Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. *Comprehensive Physiology.* 8. 237-282. 10.1002/cphy.c170008.
14. Cockcroft S. (2012). The diverse functions of phosphatidylinositol transfer proteins. *Current topics in microbiology and immunology*, 362, 185–208. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5025-8_9
15. Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., y Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, 5(10), 2929-2943.
16. Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, et al. (2015). Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Mol Cell.*;60:524–536.
17. Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., y Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *The Journal of Breast Health*, 11(2), 59-66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>
18. Esteve Ràfols, Montserrat. (2014). «Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity». *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* 61(2):100-112. doi: 10.1016/j.endoen.2014.02.001.
19. Franchi, M., Piperigkou, Z., Riti, E., Masola, V., Onisto, M., y Karamanos, N. K. (2020). Long filopodia and tunneling nanotubes define new phenotypes of breast cancer cells in 3D cultures. *Matrix biology plus*, 6-7, 100026. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100026>
20. Haagenson, K. K., y Wu, G. S. (2010). The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer metastasis reviews*, 29(1), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9208-5>

21. Heusermann W., Hean J., Trojer D., Steib E., von Bueren S., Graff-Meyer A., Genoud C., Martin K., Pizzato N., Voshol J., Morrissey D.V., Andaloussi S.E., Wood M.J., Meisner-Kober N.C. (2016). Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J. Cell Biol.* 2016;213:173–184.
22. Hovey Rc, y Aimo L (2010) Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 279-290
23. Hoy, A. J., Balaban, S., y Saunders, D. N. (2017). Adipocyte–Tumor Cell Metabolic Crosstalk in Breast Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 23(5), 381–392. doi:10.1016/j.molmed.2017.02.009
24. Iyengar, N. M., Gucalp, A., Dannenberg, A. J., y Hudis, C. A. (2016a). Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(35), 4270–4276. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4283>
25. Iyengar, N. M., Gucalp, A., Dannenberg, A. J., y Hudis, C. A. (2016). Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4283>
26. Kai, M., Yamamoto, E., Sato, A., Yamano, H. O., Niinuma, T., Kitajima, H., Harada, T., Aoki, H., Maruyama, R., Toyota, M., Hatahira, T., Nakase, H., Sugai, T., Yamashita, T., Toyota, M., y Suzuki, H. (2017). Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer. *Molecular carcinogenesis*, 56(7), 1743–1752. <https://doi.org/10.1002/mc.22631>
27. Kenny, Paraic A., Genee Y. Lee, Connie A. Myers, Richard M. Neve, Jeremy R. Semeiks, Paul T. Spellman, Katrin Lorenz, Eva H. Lee, Mary Helen Barcellos-Hoff, Ole W. Petersen, Joe W. Gray, y Mina J. Bissell. 2007. «The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression». *Molecular Oncology* 1(1):84-96. doi: 10.1016/j.molonc.2007.02.004.
28. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2008;27(2):253–261.

29. Lee, G., Jeong, Y. S., Kim, D. W., Kwak, M. J., Koh, J., Joo, E. W., Lee, J. S., Kah, S., Sim, Y. E., & Yim, S. Y. (2018). Clinical significance of APOB inactivation in hepatocellular carcinoma. *Experimental & molecular medicine*, 50(11), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0174-2>
30. Lee Isla Crake, R., Phillips, E., Kleffmann, T., y Currie, M. J. (2019). Co-culture With Human Breast Adipocytes Differentially Regulates Protein Abundance in Breast Cancer Cells. *Cancer genomics y proteomics*, 16(5), 319–332. <https://doi.org/10.21873/cgp.20137>
31. Lee, G. Y., Kenny, P. A., Lee, E. H., y Bissell, M. J. (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature methods*, 4(4), 359–365. <https://doi.org/10.1038/nmeth1015>
32. Lee, K., Kruper, L., Dieli-Conwright, C. M., y Mortimer, J. E. (2019). The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Current oncology reports*, 21(5), 41. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0787-1>
33. Moreno, G. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 124-128. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70288-2](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70288-2)
34. Munir, R., Lisec, J., Swinnen, J.V. et al. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *Br J Cancer* 120, 1090–1098 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0451-4>
35. Nelson, C. M., y Bissell, M. J. (2005). Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Seminars in cancer biology*, 15(5), 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.001>
36. Nickel, A., Blücher, C., Kadri, O. A., Schwagarus, N., Müller, S., Schaab, M., Thiery, J., Burkhardt, R., y Stadler, S. C. (2018). Adipocytes induce distinct gene expression profiles in mammary tumor cells and enhance inflammatory signaling in invasive breast cancer cells. *Scientific reports*, 8(1), 9482. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27210-w>
37. Ocaka, L., Spalluto, C., Wilson, D. I., Hunt, D. M., & Halford, S. (2005). Chromosomal localization, genomic organization and

- evolution of the genes encoding human phosphatidylinositol transfer protein membrane-associated (PITPNM) 1, 2 and 3. *Cytogenetic and genome research*, 108(4), 293–302. <https://doi.org/10.1159/000081519>
38. Oh SJ, Cho SB, Park SH, et al. (2008). Cell cycle and immune-related processes are significantly altered in chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 41(12):1047-1057.
 39. O'Brien, K., Rani, S., Corcoran, C., Wallace, R., Hughes, L., Friel, A. M., McDonnell, S., Crown, J., Radomski, M. W., y O'Driscoll, L. (2013). Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990), 49(8), 1845–1859. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.01.017>
 40. Pallegar, N. K., Garland, C. J., Mahendralingam, M., Vilorio-Petit, A. M., y Christian, S. L. (2019). A Novel 3-Dimensional Co-culture Method Reveals a Partial Mesenchymal to Epithelial Transition in Breast Cancer Cells Induced by Adipocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 24(1), 85–97. <https://doi.org/10.1007/s10911-018-9420-4>
 41. Panuganti KK, Nguyen M, Kshirsagar RK, Doerr C. (2021). Obesity (Nursing). In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
 42. Paul E. Richardson, Medha Manchekar, Nassrin Dashti, Martin K. Jones, Anne Beigneux, Stephen G. Young, Stephen C. Harvey, Jere P. Segrest, (2005). Assembly of Lipoprotein Particles Containing Apolipoprotein-B: Structural Model for the Nascent Lipoprotein Particle, *Biophysical Journal*, Volume 88, Issue 4,
 43. Peña Moreno, M (2014). Papel de la fosfolipasa A2 citosólica grupo I en la diferenciación adipocítica y en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta alta en grasa. Universidad de Valladolid.
 44. Perou, C., Sørlie, T., Eisen, M. et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093><https://doi.org/10.1038/35021093>
 45. Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., y Slingerland, J. M. (2017). Obesity and adverse breast cancer

- risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(5), 378–397.
46. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. (2013). Cell Viability Assays. May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
 47. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2006; 59; 225–231.
 48. Ren, L., Yi, J., Li, W., Zheng, X., Liu, J., Wang, J., & Du, G. (2019). Apolipoproteins and cancer. *Cancer medicine*, 8(16), 7032–7043. <https://doi.org/10.1002/cam4.2587>
 49. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* (2008) 371:569–78. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X
 50. Richard AJ, White U, Elks CM, et al. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. [Updated 2020 Apr 4]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>
 51. Sánchez-Jiménez, F., Pérez-Pérez, A., de la Cruz-Merino, L., y Sánchez-Margalet, V. (2019). Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. *Frontiers in oncology*, 9, 596.
 52. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*; 98; 10869–10874.
 53. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*; 100; 8418–8423.
 54. Tan, J., Buache, E., Chenard, M.-P., Dali-Youcef, N., y Rio, M.-C. (2011). Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer

- cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-8-9), 851–859. doi:10.1387/ijdb.113365jt
55. Thu, K. L., Soria-Bretones, I., Mak, T. W., y Cescon, D. W. (2018). Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 17(15), 1871–1885. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1502567>
 56. Torres-Ayuso P, Daza-Martín M, Martín-Pérez J, Ávila-Flores A, Mérida I. (2014). Diacylglycerol kinase α promotes 3D cancer cell growth and limits drug sensitivity through functional interaction with Src. *Oncotarget*; 5:9710-9726
 57. Vega-Robledo, G. B., y Rico-Rosillo, M. G. (2019). Tejido adiposo: Función inmune y alteraciones inducidas por obesidad. *Revista Alergia México*, 66(3), 340. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.589>
 58. Vogelstein, B., y Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
 59. Wu GS. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(3–4):579–585
 60. Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., y Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: Key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0778-6>
 61. Xiong, Y., Si, Y., Feng, Y., Zhuo, S., Cui, B., y Zhang, Z. (2021). Prognostic value of lipid metabolism-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Immunity, inflammation and disease*, 9(1), 196–209. <https://doi.org/10.1002/iid3.379>
 62. Xu, P., Li, J., Liu, J., Wang, J., Wu, Z., Zhang, X. and Zhai, Y. (2017), Mature adipocytes observed to undergo re proliferation and polyploidy. *FEBS Open Bio*, 7: 652-658. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12207>
 63. Xu H, Eirew P, Mullaly SC, et al. The omics of triple-negative breast cancers. *Clin Chem*. 2014;60:122–133.
 64. Zaidi, N., Lupien, L., Kuemmerle, N. B., Kinlaw, W. B., Swinnen, J. V., y Smans, K. (2013). Lipogenesis and lipolysis: The pathways

exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. Progress in lipid research, 52(4), 585-589.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.08.005>

65. Zorrilla García, Adonis E, Eirez Izquierdo, Mayté, y Izquierdo Expósito, Moreisby. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 23(1), 51-57.